

Cristina Yus Argón

Desarrollo de sistemas poliméricos  
mucoadhesivos de liberación  
controlada para la distribución  
localizada de agentes terapéuticos  
bioactivos

Director/es

Irusta Alderete, Silvia  
Sebastián Cabeza, Víctor

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza  
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606



**Universidad**  
Zaragoza

Tesis Doctoral

DESARROLLO DE SISTEMAS POLIMÉRICOS  
MUCOADHESIVOS DE LIBERACIÓN  
CONTROLADA PARA LA DISTRIBUCIÓN  
LOCALIZADA DE AGENTES TERAPÉUTICOS  
BIOACTIVOS

Autor

Cristina Yus Argón

Director/es

Irusta Alderete, Silvia  
Sebastián Cabeza, Víctor

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA**  
**Escuela de Doctorado**

Programa de Doctorado en Ingeniería Química y del Medio Ambiente

2020





**Universidad**  
Zaragoza

## Tesis Doctoral

**Desarrollo de sistemas poliméricos mucoadhesivos de liberación controlada para la distribución localizada de agentes terapéuticos bioactivos.**

Autor

María Cristina Yus Argón

Director/es

Víctor Sebastián Cabeza  
Silvia Irusta Alderete

Ingeniería Química y del Medio Ambiente  
2020



## RESUMEN.

La investigación sobre el diseño de nuevos vectores de liberación controlada de fármacos o biomoléculas ha estado en continuo desarrollo desde los años 50. Es necesaria la modificación de las propiedades físico-químicas de numerosos agentes terapéuticos para poder mejorar sus perfiles farmacocinéticos y su biodistribución. Las principales limitaciones de muchos de estos agentes terapéuticos en su administración son la escasa solubilidad en los fluidos del organismo y la inestabilidad que presentan ante algunas condiciones a las que se exponen en el interior del organismo, como drásticos cambios de pH, fagocitosis o degradaciones enzimáticas. Es por esto que se precisan sistemas de liberación de estos bioagentes, para protegerlos y mejorar sus propiedades. Un punto clave en el diseño de estos nuevos sistemas de liberación es la vía de administración ya que, dependiendo de ésta, el agente bioactivo va a exponerse a ciertas condiciones y va a tener que atravesar unas barreras determinadas. Las investigaciones recientes se centran, en su mayoría, en las vías de administración no invasivas ya que apuestan por la sencillez, comodidad y autonomía de administración para la mejora de calidad de vida del paciente. Tanto la forma, el tamaño, como la morfología del vector van a influir en la vía de administración y en la biodistribución del bioagente que va a ser administrado.

Este trabajo de tesis titulado “Desarrollo de sistemas poliméricos mucoadhesivos de liberación controlada para la distribución localizada de agentes terapéuticos bioactivos” se centra en la aplicación de diversas técnicas de síntesis de sistemas poliméricos, como el método de emulsión doble, el método de nanoprecipitación y la aplicación de la tecnología microfluídica o las técnicas electrohidrodinámicas para el diseño y desarrollo de sistemas de liberación controlada de diversos agentes bioactivos basados en el polímero Eudragit RS100, que presenta un mecanismo de liberación controlado en el tiempo y propiedades mucoadhesivas.

Se ha llevado a cabo el estudio del comportamiento del polímero para la optimización de la síntesis por el método de doble emulsión, obteniendo micropartículas mediante la aplicación de energía por ultrasonidos para la obtención de las emulsiones. En dichas micropartículas obtenidas se encapsularon proteínas modelo (BSA y HRP) para demostrar la posible aplicación en la administración oral de proteínas terapéuticas. Los resultados muestran una encapsulación altamente eficiente, ofreciendo estabilidad a las proteínas encapsuladas frente a la desnaturalización ácida. También se ha llevado a cabo la encapsulación de bacterias probióticas modelo (*E. coli* y *L. acidophilus*), para demostrar la posible aplicación en la administración oral de probióticos, en micropartículas obtenidas mediante la variante del método de doble emulsión denominada emulsión doble de elevada fase interna (HIPE) aplicando, en este caso, energía mecánica para producir las emulsiones. Los resultados muestran la supervivencia de los microorganismos al proceso de síntesis, la protección de los mismos a las condiciones extremadamente ácidas del estómago y, tras su liofilización, se

comprueba la supervivencia del agente probiótico encapsulado hasta un total de 5 meses en condiciones de humedad, luz y temperatura de laboratorio.

Otro tipo de vector de liberación se ha obtenido mediante el método de síntesis basado en nanoprecipitación. Se ha llevado a cabo un estudio preliminar del comportamiento del polímero variando algunos de los parámetros influyentes en esta metodología, y se ha extendido este estudio a la aplicación de la tecnología microfluídica. Esta tecnología se aplica con la finalidad de mejorar la distribución de tamaño y aumentar la producción del vector, aprovechando las principales ventajas que ofrece la microfluídica: un elevado control de la mezcla y la precipitación del polímero. Mediante esta técnica y la aplicación de la microfluídica se han desarrollado nanopartículas de reducido tamaño, aumentando la producción y obteniendo distribuciones más homogéneas que las obtenidas mediante la técnica discontinua. En estas nanopartículas se ha encapsulado el antibiótico hidrófobo modelo rifampicina y se ha llevado a cabo la caracterización completa *in vitro* tanto de la encapsulación y liberación del fármaco. Se demostró, además, también *in vitro*, la actividad del antibiótico encapsulado contra bacterias *S. aureus*.

Por último, se ha llevado a cabo la síntesis de nanopartículas, micropartículas y fibras mediante técnicas electrohidrodinámicas. Para ello, se ha realizado un amplio estudio del comportamiento de diferentes disoluciones poliméricas (con distintos disolventes y concentraciones) mediante estas técnicas electrohidrodinámicas. En las micropartículas se han encapsulado antibióticos modelo de distinta naturaleza química, ciprofloxacino y rifampicina, mientras que en las nanopartículas se ha encapsulado el antibiótico rifampicina. En las fibras se ha incorporado el antibiótico hidrófobo rifampicina. Los resultados muestran una eficiencia de encapsulación elevada mediante estas técnicas. Se ha llevado a cabo la caracterización morfológica de todos los vectores diseñados, los estudios *in vitro* de encapsulación y liberación. Se comprobó, además, la actividad terapéutica de los vectores como agentes de liberación controlada de antibióticos confirmando la actividad del antibiótico liberado mediante ensayos con bacterias *S. aureus*.

Al estudio *in vitro* del mantenimiento de la actividad terapéutica del bioagente encapsulado se añade un estudio de citotoxicidad con células Caco2-TC7 y fibroblastos de cada uno de los vectores diseñados por las diferentes metodologías de síntesis, comprobando, en todos los casos, que los sistemas de liberación controlada diseñados son idóneos para su aplicación como tratamiento administrados por vías no invasivas para diferentes aplicaciones biomédicas.

Por lo tanto, en este trabajo de tesis doctoral se han desarrollado vectores de diferentes tamaños y morfologías para la liberación controlada en el tiempo de agentes bioactivos mediante su administración por vías no invasivas, principalmente, mediante la vía oral. De todos ellos se ha comprobado su idoneidad como agentes terapéuticos que mejoran las propiedades farmacocinéticas y la estabilidad preservando la actividad terapéutica del agente encapsulado.

## ABSTRACT.

The design of new controlled-release systems for drugs or biomolecules has been intensively developed since the 50s. Most of the therapeutic agents need to be improved in order to modify their pharmacokinetic profiles and their biodistribution. Main limitations of most of these agents are the poorly solubility and the instability when they are exposed to drastic pH changes, phagocytosis or enzymatic degradation. For this reason, controlled-releases systems are required to protect and improve the physico-chemical properties of these therapeutic agents. It is important to consider the route of administration for the development of new controlled-release systems. Depending on the route of administration, the bioactive agent will be exposed to different environments and will have to overcome barriers inside the organism. Recent research mainly focuses on non-invasive routes of administration because of their simplicity, comfort and self-administration for a better quality of life and patient compliance. Size, shape and morphology of the vector will influence on the route of administration and biodistribution of the administered bioagent.

This PhD thesis entitled “Development of controlled-release mucoadhesive polymeric systems for targeted distribution of therapeutic bioactive agents” is focused on different synthesis techniques such as double emulsion, nanoprecipitation and the application of microfluidic technology and electrohydrodynamic methodology for the development of polymeric controlled-release systems based on the polymer Eudragit® RS100, a polymer which delivery mechanism is time-controlled, with mucoadhesive.

The optimization of the synthesis by the double emulsion method have been carried out, obtaining microparticles by applying ultrasound energy to perform the emulsions. Model proteins (BSA and HRP) have been encapsulated inside the obtained microparticles for the oral administration of therapeutic proteins. Results demonstrate the high efficiency of encapsulation achieved and also the encapsulated protein stability against acid denaturation. The encapsulation of model probiotic bacteria (*E. coli* and *L. acidophilus*) have been also carried out. Model bacteria have been encapsulated by the variation of the conventional double emulsion called high internal phase emulsion (HIPE) by applying mechanical energy in this case. Results show encapsulated microorganism survival and the protection provided by the polymer against the extremely acidic conditions of the stomach. Finally, microparticles with the encapsulated bacteria were lyophilized and the survival of the microorganisms was checked after keeping the microparticles for 5 months under laboratory conditions of humidity, light and temperature.

Nanoprecipitation methodology have been also used to synthesized controlled-release particles. First, a preliminary study of the batch synthesis parameters has been carried out. After that, microfluidic technology has been applied to the synthesis, in order to improve the size distribution and to increase the productivity. This was achieved due to the advantages offered by microfluidics: high control of the mixture and of the polymer precipitation process.

The application of microfluidics in nanoprecipitation yields into the development of ultra-small polymer nanoparticles, with a narrow size distribution comparing with the ones synthesized by batch methodology. A hydrophobic antibiotic, rifampicin, has been encapsulated and the *in vitro* characterization of the drug encapsulation and release has been performed. The activity of the encapsulated drug against *S. aureus* has been verified satisfactorily.

Finally, electrohydrodynamic techniques have been used to obtain polymeric microparticles, nanoparticles and fibers. An extensive study about the behavior of different polymer solutions (solvents and concentrations) has been carried out. Two model antibiotics, ciprofloxacin and rifampicin, have been encapsulated into microparticles and rifampicin into nanoparticles. The hydrophobic antibiotic rifampicin has been encapsulated into fibers. Final results show a high encapsulation efficiency using electrospraying and electrospinning. Morphological characterization and *in vitro* encapsulation and release studies have been carried out. The therapeutic effect of the drug delivery system has been verified by the study of the released antibiotic against *S. aureus*.

An *in vitro* cytotoxicity study of the designed vectors on Caco2-TC7 and fibroblasts cell lines was also performed. The results conclude that all the designed systems are cytocompatible and suitable for biomedical applications as a treatment administered by non-invasive routes.

Therefore, in this PhD work, controlled-delivery systems of different sizes and morphologies have been developed for the therapeutic application of bioactive agents by non-invasive routes. The obtained results demonstrate that all of them are suitable therapeutic agents, improving the pharmacokinetic properties and the stability of the bioagents, preserving their therapeutic activity.

# ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE GENERAL.	V
ÍNDICE DE FIGURAS.	IX
ÍNDICE DE TABLAS.	XXI
ABREVIATURAS.	XXV
<b>CAPITULO I.</b>	<b>29</b>
1.1 Sistemas de liberación controlada de fármacos.	32
1.2 Influencia de la morfología del vector en la biodistribución del organismo.	37
1.2.1 Efecto del tamaño del vector.	38
1.2.2. Efecto de la forma del vector.	39
1.2.3. Efecto de la superficie del vector.	40
1.3 Vías de administración de los sistemas de liberación controlada no invasivos y su farmacocinética.	41
1.3.1 Vía oral.	42
1.3.2 Vía transdermal.	45
1.3.3 Vía pulmonar y nasal.	46
1.4 Sistemas poliméricos para la liberación de fármacos.	47
1.4.1 Polímeros de origen natural.	47
1.4.1.1 Ácido hialurónico (HA).	47
1.4.1.2 Quitosano (CS).	48
1.4.1.3 Alginato.	48
1.4.1.4 Celulosa (CEL).	49
1.4.1.5 Ciclodextrina (CD).	50
1.4.2 Polímeros de origen artificial.	51
1.4.2.1 Ácido poliláctico (PLA).	51
1.4.2.2 Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).	51
1.4.2.3 Policaprolactona (PCL).	52
1.4.2.4 Polímeros acrílicos.	53
1.5 Métodos de síntesis de sistemas poliméricos de liberación controlada.	57
1.5.1 Emulsión-evaporación del disolvente.	58
1.5.2 Gelificación ionotrópica.	58
1.5.3 Nanoprecipitación.	59
1.5.4 Técnicas electrohidrodinámicas.	59
1.5.5 <i>Salting out</i> .	60
1.5.6 Diálisis.	60
1.5.7 <i>Spray-drying</i> .	61

1.6 Agentes bioactivos terapéuticos. _____	62
1.7 Enfoque y objetivos del trabajo. _____	65
<b>CAPITULO II. _____</b>	<b>68</b>
2.1 Introducción. _____	70
2.1.1 Encapsulación por emulsión. _____	70
2.1.1.1 Emulsión doble. _____	71
2.1.1.2 Emulsión doble de elevada fase interna (HIPE). _____	72
2.1.2 Proteínas terapéuticas. _____	74
2.1.3 Probióticos. _____	76
2.2 Encapsulación de proteínas modelo para la administración enteral de proteínas terapéuticas. _____	79
2.2.1 Materiales y métodos. _____	79
2.2.1.1 Materiales. _____	79
2.2.1.2 Optimización de la síntesis de micropartículas entéricas. _____	79
2.2.1.3 Síntesis de micropartículas y encapsulación de proteínas modelo. _____	80
2.2.1.4 Caracterización de las micropartículas. _____	82
2.2.1.5 Cuantificación de la liberación <i>in vitro</i> de proteínas en el tracto gastrointestinal y evaluación de la actividad _____	84
2.2.1.6 Estudio de la integridad estructural de las proteínas en la encapsulación. _____	84
2.2.1.7 Ensayo de viabilidad celular <i>in vitro</i> . _____	87
2.2.2 Resultados y discusión. _____	87
2.2.3 Conclusiones. _____	101
2.3 Encapsulación de bacterias gram+ y gram- modelo para la distribución localizada de probióticos. _____	101
2.3.1 Materiales y métodos. _____	101
2.3.1.1 Materiales. _____	101
2.3.1.2 Optimización de la síntesis. _____	102
2.3.1.3 Síntesis de micropartículas y encapsulación de bacterias modelo. _____	103
2.3.1.4 Caracterización de las micropartículas. _____	105
2.3.1.5 Estudio de la liberación <i>in vitro</i> en el tracto gastrointestinal. _____	105
2.3.1.6 Ensayos microbiológicos <i>in vitro</i> . _____	106
2.3.1.7 Estudio de la estabilidad del probiótico a largo plazo. _____	107
2.3.1.8 Ensayo de viabilidad celular <i>in vitro</i> . _____	107
2.3.1.8 Análisis estadísticos. _____	107
2.3.2 Resultados y discusión. _____	108
2.3.3 Conclusiones. _____	117
<b>Anexo II. _____</b>	<b>119</b>

<b>CAPITULO III.</b>	<b>126</b>
3.1 Introducción.	128
3.1.1 Síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación.	128
3.1.1.1 Mecanismo de formación de nanopartículas.	128
3.1.1.2 Factores que influyen en la técnica de nanoprecipitación.	132
3.1.1.3 Variaciones de la técnica de nanoprecipitación.	135
3.1.2 Sistemas de microfluídica.	137
3.1.3 Antibiótico. Rifampicina.	140
3.2 Encapsulación de antibióticos en nanopartículas sintetizadas por nanoprecipitación: método discontinuo y aplicación de sistemas microfluídicos.	142
3.2.1 Materiales y métodos.	142
3.2.1.1 Materiales	142
3.2.1.2 Optimización de los parámetros de síntesis de nanopartículas por el método discontinuo.	142
3.2.1.3 Optimización de los parámetros de síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación en continuo: microfluídica.	143
3.2.1.4 Síntesis de nanopartículas y encapsulación de un antibiótico modelo.	145
3.2.1.5 Caracterización de las nanopartículas.	145
3.2.1.6 Cuantificación de la liberación <i>in vitro</i> del fármaco encapsulado.	147
3.2.1.7 Estudio <i>in vitro</i> de la acción bactericida de los antibióticos encapsulados.	148
3.2.1.8 Ensayo de la viabilidad celular <i>in vitro</i> .	149
3.2.1.9 Análisis estadísticos.	149
3.2.3 Resultados y discusión.	149
3.2.3 Conclusiones.	171
<b>Anexo III.</b>	<b>173</b>
<b>CAPITULO IV.</b>	<b>177</b>
4.1 Introducción.	179
4.1.1 Síntesis de fibras por electrohilado y partículas por electroespray.	179
4.1.1.1 Principios y funcionamiento de las técnicas electrohidrodinámicas.	179
4.1.1.2 Parámetros de las técnicas electrohidrodinámicas.	182
4.1.1.3. Tipos y variaciones de las técnicas electrohidrodinámicas.	187
4.1.2 Antibióticos. Rifampicina y ciprofloxacino.	188
4.2 Encapsulación de antibióticos en partículas sintetizadas por electroespray.	190
4.2.1 Materiales y métodos.	190
4.2.1.1 Materiales.	190
4.2.1.2 Optimización de la síntesis de sub-micropartículas y micropartículas.	190
4.2.1.3 Síntesis de sub-micro y micropartículas y encapsulación de antibióticos modelo.	192
4.2.1.4 Caracterización de las partículas.	193
4.2.1.5 Cuantificación de la liberación <i>in vitro</i> del fármaco encapsulado.	194

4.2.1.6 Estudio <i>in vitro</i> de la acción bactericida del fármaco encapsulado. _____	195
4.2.1.7 Ensayo de viabilidad celular <i>in vitro</i> . _____	196
4.2.1.8 Análisis estadísticos. _____	198
4.2.2 Resultados y discusión. _____	199
4.2.3 Conclusiones. _____	219
4.3 Encapsulación de antibióticos en fibras sintetizadas por electrohilado. _____	220
4.3.1 Materiales y métodos. _____	220
4.3.1.1 Materiales. _____	220
4.3.1.2 Optimización de la síntesis de fibras. _____	220
4.3.1.3. Síntesis de fibras y encapsulación de antibióticos modelo. _____	220
4.3.1.4. Caracterización de las fibras. _____	221
4.3.1.5. Cuantificación de la liberación <i>in vitro</i> del fármaco encapsulado. _____	221
4.3.1.6 Estudio <i>in vitro</i> de la acción bactericida del fármaco encapsulado. _____	222
4.3.1.7 Ensayo de viabilidad celular <i>in vitro</i> . _____	222
4.3.1.8 Análisis estadísticos. _____	222
4.3.2 Resultados y discusión. _____	222
4.3.3 Conclusiones. _____	234
Anexo IV. _____	237
<b>CAPITULO V.</b> _____	<b>249</b>
5.1 Ventajas y desventajas de las técnicas de síntesis utilizadas en esta Tesis Doctoral. _	251
5.2 Comparativa de la degradación y cinética de liberación de los diferentes vectores diseñados. _____	254
<b>CAPITULO VI.</b> _____	<b>261</b>
<b>Bibliografía.</b> _____	<b>265</b>

# ÍNDICE DE FIGURAS.

## CAPÍTULO I.

<b>Figura 1.1</b> Cronograma de publicaciones con la palabra clave “ <i>drug delivery</i> ” en diferentes bases de datos de búsquedas científicas. (Febrero 2020). _____	32
<b>Figura 1.2</b> a) Perfiles farmacocinéticos de liberación de sistemas de liberación de fármacos de primera, segunda y tercera generación, modulables en función de las necesidades biológicas. b-i) Micrografías de diferentes geometrías de sistemas de liberación Imágenes (b-f) adaptadas de [9] con permiso de American Chemical Society. y (g-i) de [10] con permiso de John Wiley & Sons. _____	33
<b>Figura 1.3</b> Tipos y propiedades principales de los diferentes sistemas de liberación. _____	35
<b>Figura 1.4</b> Esquema de la biodistribución de los sistemas de liberación en función del tamaño del vector a través de diferentes vías de administración: a) vía intravenosa, b) vía pulmonar y c) vía oral. _____	39
<b>Figura 1.5</b> Dibujo esquemático de los parámetros físico-químicos que influyen en la biodistribución de los sistemas de liberación controlada en el organismo. Adaptado con licencia CC de [61]. _____	41
<b>Figura 1.6</b> Principales rutas de administración no invasivas y las ventajas (en verde) y desventajas (en rojo) de cada una de ellas. Imagen adaptada con permiso de Springer Nature [71]. _____	42
<b>Figura 1.7</b> a) Esquema de las diferentes fases de digestión a través de la administración oral de un sistema de liberación controlada. b) Diferentes formas de dosificación de estos vectores a través de la administración oral. _____	44
<b>Figura 1.8</b> Esquema de las diferentes formas de dosificación de los sistemas de liberación de fármacos a través de la vía transdermal. _____	46
<b>Figura 1.9</b> Esquema de las necesidades para la correcta administración a través de la vía respiratoria. _____	47
<b>Figura 1.10</b> Estructura molecular de las unidades repetitivas de los diferentes polímeros de origen natural. _____	50
<b>Figura 1.11</b> Estructura molecular de las unidades repetitivas de los diferentes polímeros de origen artificial. _____	53
<b>Figura 1.12</b> Dibujo esquemático de los diferentes tipos de Eudragit® de la casa comercial Evonik® (izquierda) y estructura molecular del copolímero Eudragit® RS100 (derecha). _____	55
<b>Figura 1.13</b> Esquema del fenómeno de mucoadhesión adaptado con permiso de Elsevier de [151]. _____	56
<b>Figura 1.14</b> Esquemas de los diferentes métodos de síntesis de sistemas poliméricos para la liberación controlada de agentes bioactivos: a) emulsión, b) gelificación ionotrópica, c) nanoprecipitación, d) técnicas electrohidrodinámicas, e) <i>salting out</i> , f) diálisis, g) <i>spray drying</i> . _____	61

## CAPÍTULO II.

- Figura 2.1** Esquema de las principales variaciones del método de síntesis de micropartículas emulsión- evaporación del solvente: a) emulsión simple agua-en-aceite (w/o), b) emulsión simple aceite-en-agua (o/w), c) emulsión doble agua-en-aceite-en-agua (w/o/w) y d) emulsión doble aceite-en-agua-en-aceite (o/w/o). En todas ellas se representa la fase orgánica en amarillo y la acuosa en azul. \_\_\_\_\_ 70
- Figura 2.2** Esquema adaptado de Cameron N.R et al. (1996) [256] de la formación de partículas altamente porosas mediante una HIPE. Imagen de microscopía óptica de las partículas sintetizadas en este trabajo. \_\_\_\_\_ 73
- Figura 2.3** Micrografías de SEM de la superficie de las partículas sintetizadas mediante HIPE. \_\_\_\_\_ 73
- Figura 2.4** Esquema del plegamiento de una proteína adaptado de [262]. a) sucesión de estructuras del plegamiento proteico, b) gráfico de la desnaturalización de las proteínas según las condiciones de temperatura, pH o presión a las que se encuentren. \_\_\_\_\_ 75
- Figura 2.5** a) Gráfico esquemático que representa, de manera aproximada, la carga negativa de las proteínas a  $\text{pH} > \text{pI}$  y la carga positiva a  $\text{pH} < \text{pI}$  de las proteínas modelo BSA (morado) y HRP (naranja). La línea discontinua representa el valor de pH de trabajo en esta síntesis y modelos tridimensionales de las proteínas b) BSA y c) HRP [307]. \_\_\_\_\_ 81
- Figura 2.6** Esquema del protocolo optimizado de la síntesis de micropartículas por método de doble emulsión- evaporación del disolvente para la encapsulación de proteínas modelo. \_ 82
- Figura 2.7** Espectro DC UV lejano de varios tipos de estructuras secundarias proteicas adaptado de [312] con permiso de Elsevier: línea sólida-hélice- $\alpha$ , línea discontinua larga-lámina- $\beta$ , resto de líneas de puntos-estructuras con giros e irregulares. \_\_\_\_\_ 85
- Figura 2.8** Espectro de fluorescencia de la proteína BSA adaptado de [316] a diferentes valores de pH: a) pH 2, b) pH 5, c) pH 6 y d) pH 9. \_\_\_\_\_ 86
- Figura 2.9** Caracterización de la morfología de las micropartículas mediante microscopía electrónica de barrido a-c) partículas vacías, d) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas vacías, e-g) micropartículas con BSA encapsulada, h) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas con BSA encapsulada, i-k) micropartículas con HRP encapsulada, l) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas con HRP encapsulada. \_\_\_\_\_ 90
- Figura 2.10** Imágenes de las micropartículas cargadas con BSA-FITC obtenidas mediante microscopía invertida a) de contraste en campo claro, b) de fluorescencia y c) superposición de contraste y fluorescencia. \_\_\_\_\_ 91
- Figura 2.11** Imágenes obtenidas por microscopía óptica confocal de sucesivos cortes ecuatoriales en dirección del eje Z (*Z-stack*) de una micropartícula con BSA-FITC encapsulada. \_\_\_\_\_ 91

- Figura 2.12** Perfiles de liberación de las proteínas modelo a) BSA y b) HRP, y sus correspondientes imágenes de SEM a diferentes puntos de la liberación *in vitro*: a1-b1) tras 2h en fluido gástrico simulado, a2-b2) tras 1h, a3-b3) tras 3h y a4-b4) tras 24h en fluido intestinal simulado \_\_\_\_\_ 92
- Figura 2.14** Espectro FTIR y descomposición de la banda I. a) espectro de FTIR de la proteína nativa (verde) y la proteína en medio gástrico (granate), b) descomposición en picos gaussianos de la banda I amida del espectro de la proteína nativa y c) descomposición en picos gaussianos de la banda I amida del espectro de la proteína en medio gástrico. \_\_\_\_\_ 95
- Figura 2.15** Espectro de dicroísmo circular en la región del UV lejano (200-260 nm) a) proteína BSA nativa (línea discontinua verde) y proteína BSA tras ser encapsulada (línea continua azul), b) espectro individual de la proteína BSA nativa y c) espectro individual de la proteína BSA tras ser encapsulada. \_\_\_\_\_ 96
- Figura 2.16** Espectro de fluorescencia de a) BSA y b) HRP: proteína nativa (línea discontinua verde), proteína encapsulada (línea continua azul) y partículas vacías (línea continua negra). \_\_\_\_\_ 97
- Figura 2.17** Espectro de fluorescencia de a) BSA y b) HRP: proteína nativa (línea discontinua verde), proteína en fluido gástrico simulado (línea discontinua granate), proteína encapsulada en fluido gástrico simulado (línea continua morada) y partículas vacías (línea continua negra). \_\_\_\_\_ 98
- Figura 2.18** Espectro de fluorescencia de a) BSA y b) HRP: proteína en fluido intestinal simulado (línea discontinua verde), proteína en fluido gástrico simulado (línea discontinua granate), proteína liberada en fluido intestinal simulado (línea continua azul) y proteína liberada en fluido gástrico simulado (línea continua morada). \_\_\_\_\_ 99
- Figura 2.19** Imágenes de microscopía óptica convencional de las células Caco2 TC7 adheridas al fondo del pocillo de la placa (izquierda) y de las células Caco2 TC7 una vez han alcanzado la máxima confluencia y se diferencian formando una membrana semejante a la monocapa intestinal. \_\_\_\_\_ 100
- Figura 2.20** Viabilidad celular de las micropartículas de Eudragit® RS100 en la línea celular Caco2 TC7 tras un periodo de incubación de 24h. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE (n=4). La viabilidad del 100% fue asignado a las células control no tratadas. \_\_\_\_\_ 100
- Figura 2.21** Protocolo de síntesis de micropartículas por método de doble emulsión- evaporación del disolvente de elevada fase interna (HIPE) para la encapsulación de bacterias modelo. \_\_\_\_\_ 104
- Figura 2.22** Esquema del método de cuantificación bacteriana de las diluciones seriadas y siembra en placa. \_\_\_\_\_ 106
- Figura 2.23** Caracterización de la morfología de las micropartículas mediante microscopía electrónica de barrido a-c) partículas vacías, d) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas vacías, e-g) micropartículas con *E. coli* encapsulada, h) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas con *E. coli* encapsulada, i-k) micropartículas

con <i>L. acidophilus</i> encapsulada, l) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas con <i>L. acidophilus</i> encapsulada. _____	109
<b>Figura 2.24</b> Datos del análisis termogravimétrico que muestran la pérdida de peso de las partículas vacías (línea negra discontinua), de las bacterias (línea verde discontinua) y las micropartículas cargadas con las bacterias modelos probióticas (línea azul continua). a) análisis de los datos de TGA, b) primera derivada del análisis TGA. _____	110
<b>Figura 2.25</b> Estudio del perfil de liberación gastrointestinal <i>in vitro</i> : a) imagen óptica de una suspensión de micropartículas de Eudragit® RS100 con FITC encapsulado mediante el método HIPE, b) imagen óptica del sobrenadante recogido tras 2 h a 37 °C en condiciones gástricas simuladas, c) imagen óptica del sobrenadante recogido tras 6 h a 37 °C en condiciones intestinales simuladas y d) perfil de liberación del colorante FITC de las micropartículas a lo largo del tiempo. _____	111
<b>Figura 2.26</b> Micrografías de SEM de las micropartículas que encapsulan a <i>E. coli</i> (a-c) y a <i>L. acidophilus</i> (d-f) tras a y d) 2 h en condiciones gástricas simuladas, b y e) 6 h en condiciones intestinales simuladas, c y f) 24 h en condiciones intestinales simuladas. _____	113
<b>Figura 2.27</b> Viabilidad de las bacterias después de estar en contacto con el polímero, los medios y reactivos de encapsulación y las condiciones de síntesis de: a) <i>E. coli</i> , b) <i>L. acidophilus</i> . Los resultados se obtuvieron de tres ensayos independientes. _____	114
<b>Figura 2.28</b> Viabilidad de las bacterias después de condiciones simuladas gastrointestinales (2 h en condiciones gástricas y 24 h en condiciones intestinales) de bacterias vivas libres (barras sin rayas) y bacterias encapsuladas (barras con rayas) de a) <i>E. coli</i> , b) <i>L. acidophilus</i> (** $p < 0.001$ , *** $p < 0.0001$ ). _____	115
<b>Figura 2.29</b> Resultados de la prueba de viabilidad bacteriana del estudio de estabilidad a largo plazo de las micropartículas liofilizadas que encapsulan a) <i>E. coli</i> y b) <i>L. acidophilus</i> , tras 2 h en condiciones gástricas y 24 h en condiciones intestinales. Los resultados se obtuvieron de tres síntesis de encapsulación independientes ensayadas por triplicado. _____	116
<b>Figura 2.30</b> Viabilidad celular de las micropartículas de Eudragit® RS100 en la línea celular Caco2 TC7 tras un periodo de incubación de 24h. Los resultados se presentan como media $\pm$ DE (n=4). La viabilidad del 100% fue asignado a las células control no tratadas. _____	116
<b>Figura A2.1</b> Optimización de la síntesis de micropartículas para la encapsulación de proteínas modelo mediante el método de emulsión doble-evaporación del disolvente. Las condiciones de síntesis finales se encuentran enmarcadas en azul. _____	122
<b>Figura A2.2</b> Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación de la proteína BSA <i>in vitro</i> : a) primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold, e) Korsmeyer-Peppas. _	123
<b>Figura A2.3</b> Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación de la proteína HRP <i>in vitro</i> : a) primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold, e) Korsmeyer-Peppas. _	123
<b>Figura A2.4</b> Gráfica de la cuantificación de proteína libre BSA (morado) y HRP (naranja) en la liberación <i>in vitro</i> junto con micropartículas vacías. _____	124

**Figura A2.5** Optimización de la síntesis de micropartículas para la encapsulación de bacterias probióticas modelo mediante el método de emulsión doble-evaporación del disolvente de elevada fase interna. Las condiciones de síntesis finales se encuentran enmarcadas en azul.

\_\_\_\_\_ 124

**Figura A2.6** Caracterización de la morfología de las bacterias probióticas modelo mediante microscopía electrónica de barrido a) *Escherichia coli*, b) *Lactobacillus acidophilus*. \_\_\_\_\_ 125

**Figura A2.7** Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación de FITC *in vitro*: a) primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold, e) Korsmeyer-Peppas. \_\_\_\_\_ 125

### **CAPÍTULO III.**

**Figura 3.1** Esquema del proceso de síntesis por nanoprecipitación. \_\_\_\_\_ 129

**Figura 3.2** Fases de nucleación, crecimiento y agregación del proceso de síntesis de partículas por nanoprecipitación. Imagen adaptada de [368][369]. \_\_\_\_\_ 131

**Figura 3.3** Diagrama de fases para la mezcla ternaria de los componentes del método de síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación (soluto-disolvente-agua) adaptada con permiso de Elsevier de [363]. La curva binodal separa la región monofásica de la región bifásica. La curva espinodal separa el dominio que evoluciona por nucleación (con círculos amarillos) y el dominio donde se produce la separación espontánea de fases (dominio con rayas moradas). La región metaestable en la que se produce una población de gotas nanométricas monodispersas en una disolución acuosa es la zona de efecto Ouzo (dominio de color verde). \_\_\_\_\_ 132

**Figura 3.4** Esquema de la variación de la técnica de nanoprecipitación en dos pasos. \_\_\_\_ 136

**Figura 3.5** Diferentes geometrías de dispositivos multicanales: a) CIJM de dos corrientes, b) MIVM de dos corrientes, c) MIVM de cuatro corrientes. Las flechas negras indican las corrientes de entrada y las rojas las corrientes de salida. \_\_\_\_\_ 137

**Figura 3.6** Diferentes configuraciones de sistemas de microfluídica: a) micromezclador en forma de Y, b) micromezclador en forma de Y inversa, c) micromezclador en forma de T y d) micromezclador en forma de cruz. Las flechas negras indican las corrientes de entrada y las rojas las corrientes de salida. \_\_\_\_\_ 138

**Figura 3.7** a) Imagen óptica del micromezclador interdigital multilaminado, cavidad y unidad de mezcla, b) esquema de la distribución de las corrientes de entrada (FA y FO) y la corriente de salida producto de la nanoprecipitación, c) esquema que representa la multilaminación que permite la rápida transferencia de masa por difusión, d y e) imágenes de microscopía electrónica de barrido de la estructura interna de los microcanales interdigitados del micromezclador. \_\_\_\_\_ 139

**Figura 3.8** Esquema del mecanismo de acción de la rifampicina y resumen de microorganismos sensibles al antibiótico rifampicina (adaptado de [415]) \_\_\_\_\_ 141

- Figura 3.9** Espectro ultravioleta-visible de rifampicina (10 ppm) en agua milliQ (línea continua) y en PBS (línea discontinua). \_\_\_\_\_ 147
- Figura 3.10** Distribuciones de tamaño de DLS e imágenes de TEM (a y c) y SEM (b y d) de cada una de las síntesis: a) Eudragit® RS100 10% (p/v) EtOH:acetona, R=5, sin surfactante, b) Eudragit® RS100 10% (p/v) EtOH:acetona, R=5, Pluronic 0.5% (p/v), c) Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona, R=5, sin surfactant y d) Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona, R=5, Pluronic 0.5% (p/v). \_\_\_\_\_ 153
- Figura 3.11** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona (azul) y 10% (p/v) (gris) a diferentes valores de R y caudales totales. Índices de polidispersidad (PDI) de Eudragit® RS100 5% (p/v) (■) y 10% (p/v) (●), b) potencial Z de NPs de Eudragit® RS100 5% (p/v) (● azul) y 10% (p/v) (● gris) (\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001). Distribuciones de tamaño de DLS c) con R =10, 5 mL/min, d) con R =10, 50 mL/min. \_\_\_\_\_ 156
- Figura 3.12** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona (azul) y 5% (p/v) acetona (gris) a diferentes valores de R y caudales totales. Índices de polidispersidad (PDI) de Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona (■) y 5% (p/v) acetona (●), b) potencial Z de NPs de Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona (● azul) y 5% (p/v) acetona (● gris) (\*\*\*\*p < 0.0001). \_\_\_\_\_ 157
- Figura 3.13** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 5% y 10% (p/v) EtOH:acetona a caudal total 5 mL/min (azul) y a 50 mL/min (gris) a diferentes valores de R. Índices de polidispersidad (PDI) de 5 mL/min (■) y 50 mL/min (●), b) potencial Z de NPs a 5 mL/min (● azul) y 50 mL/min (● gris) (\*p < 0.05, \*\*\*\*p < 0.0001). \_\_\_\_\_ 158
- Figura 3.14** Micrografías de TEM y distribución de tamaños (N=150) de las síntesis con una concentración polimérica e Eudragit® RS100 de 5% (p/v), R = 10: a) 5 mL/min y b) 50 mL/min. \_\_\_\_\_ 159
- Figura 3.15** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 10% (p/v) EtOH:acetona a caudal total 50 mL/min y diferentes valores de R y los índices de polidispersidad (PDI) (■), b) potencial Z de NPs a diferentes valores de R (● azul). \_\_\_\_\_ 160
- Figura 3.16** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 5% y 10% (p/v) EtOH:acetona a caudal total 5 mL/min y 50 mL/min a valores de R = 2 (azul), R = 5 (rosa) y R = 10 (gris). Índices de polidispersidad (PDI) de R = 2 (▼), R = 5 (◆) y R = 10 (■), b) potencial Z de NPs a valores de R=2 (● azul), R = 5 (● rosa) y R = 10 (\*p < 0.05, \*\*\*\*p < 0.0001). \_\_\_\_\_ 161
- Figura 3.17** a) Aspecto macroscópico e imágenes de SEM del producto formado al adicionar rifampicina a concentraciones de 50, 20, 10 y 5% (p/p) respecto al polímero en la síntesis de nanoprecipitación por el método discontinuo, b) efecto de la adición de rifampicina en el diámetro hidrodinámico. Datos obtenidos por medidas de DLS. \_\_\_\_\_ 163
- Figura 3.18** a-d) NPs con rifampicina sintetizadas mediante el método discontinuo: a) imagen de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños se SEM (N = 150), c) distribución de tamaños de DLS, d) análisis de los picos de las distribuciones del histograma del DLS. e-h) NPs con rifampicina sintetizadas mediante la tecnología microfluídica: e) imagen de TEM, f)

zoom de una NP, g) histograma de la distribución de tamaños se TEM (N = 150), h) distribución de tamaños de DLS. _____	165
<b>Figura 3.19</b> a) Espectro FTIR del antibiótico rifampicina y sus picos característicos, b) espectros FTIR de las NPs sintetizadas mediante microfluídica. Se muestra el espectro de rifampicina (naranja), de la mezcla física del polímero y el antibiótico (rojo), de las NPs vacías (verde) y de las NPs con rifampicina encapsulada (azul). _____	166
<b>Figura 3.20</b> Caracterización del antibiótico rifampicina y de las NPs sintetizadas por microfluídica en estado sólido mediante difracción por rayos X (XRD). Se muestra la rifampicina (naranja), las NPs sin rifampicina (verde) y las NPs con rifampicina encapsulada (azul). _____	167
<b>Figura 3.21</b> a) perfil de liberación de las NPs de Eudragit® RS100 en PBS b-d) micrografías de SEM de las NPs: a) tras 2h en FGS, b) tras 24h en FIS, d) tras 7 días en FIS. _____	168
<b>Figura 3.22</b> a) Viabilidad de <i>S. aureus</i> en presencia de NPs vacías, antibiótico libre (concentración teóricamente liberada en el tiempo de contacto con las bacterias, 24h) y NPs con antibiótico (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001), b) viabilidad de <i>S.aureus</i> del sobrenadante liberado en 24h de las NPs, c-d) imágenes de SEM de <i>S aureus</i> (coloreadas de verde) en contacto con las NPs. _____	170
<b>Figura 3.23</b> Viabilidad celular de las NPs de Eudragit® RS100 en células Caco2 TC7 y fibroblastos. Los resultados se presentan como media ± DE (n=4). La viabilidad del 100% fueron células control no tratadas. a) células Caco2-TC7 y b) células fibroblastos. _____	171
<b>Figura A3.1</b> a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit RS100 10% (p/v) EtOH:acetona (azul) y Eudragit RS100 10% (p/v) acetona (gris) a diferentes valores de R y caudales totales. Índices de polidispersidad (PDI) de Eudragit RS100 10% (p/v) EtOH:acetona (■) y Eudragit RS100 10% (p/v) acetona (●), b) potencial Z de NPs de Eudragit RS100 10% (p/v) EtOH:acetona (● azul) y Eudragit RS100 10% (p/v) acetona (● gris). _____	175
<b>Figura A3.2</b> Rectas de calibrado del fármaco encapsulado obtenidas de las medidas de UV-Vis: a) rifampicina en agua milliQ, b) rifampicina en PBS, c) rifampicina en fluido gástrico simulado (FGS). _____	175
<b>Figura A3.3</b> Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación: a) Primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold y e) Korsmeyer-Peppas, de las NPs sintetizadas por nanoprecipitación. _____	176
<b>Figura A3.4</b> Gráfica de los resultados experimentales de la supervivencia de la bacteria <i>S. aureus</i> frente al antibiótico libres rifampicina. _____	176

#### **CAPÍTULO IV.**

<b>Figura 4.1</b> Principales componentes del <i>electrospinner</i> Yflow <i>Electrospinner</i> 2.2.D-500 empleado en esta Tesis Doctoral para la producción de fibras, micro y nanopartículas. _____	180
---	-----

<b>Figura 4.2</b> Esquema de las etapas principales del procedimiento de producción de materiales mediante las técnicas electrohidrodinámicas. _____	181
<b>Figura 4.3</b> Dibujos esquemáticos de los diferentes tipos de colectores: a) colector plano, b) colector tambor rotatorio, c) colector disco rotatorio y d) colector en disolución. _____	185
<b>Figura 4.4</b> Esquema de las diferentes variantes de las técnicas electrohidrodinámicas: a) electrohilado uniaxial, b) electroespray uniaxial, c) técnica coaxial y d) técnica de emulsión. _____	188
<b>Figura 4.5</b> Esquema del mecanismo de acción del ciprofloxacino sobre la ADN girasa inhibiendo el proceso de replicación y resumen de microorganismos sensibles al antibiótico ciprofloxacino (adaptado de [493]). _____	189
<b>Figura 4.6</b> Esquema de la síntesis de nano y micropartículas del polímero Eudragit® RS100 por electroespray. _____	193
<b>Figura 4.7</b> Espectros ultravioleta-visibles de los fármacos rifampicina (naranja, 10 ppm), ciprofloxacino (azul, 1 ppm) y Eudragit® RS100 (negro, 1mg/mL) en DMSO. _____	194
<b>Figura 4.8</b> Ejemplo del gráfico de los resultados procesados de citometría de flujo para el estudio de muerte celular en el que se muestran las señales de Anexina V-FITC (verde) y de yoduro de propidio (azul). _____	197
<b>Figura 4.9</b> Ejemplo del gráfico de los resultados procesados de citometría de flujo para el estudio del ciclo celular en el que se muestran las señales de yoduro de propidio en función de la cantidad de ADN cuantificado. Siendo G <sub>0</sub> : fase quiescente, G <sub>1</sub> : primera fase de crecimiento, S: fase de síntesis, G <sub>2</sub> : segunda fase de crecimiento y M: fase de mitosis. _____	198
<b>Figura 4.10</b> Caracterización de las partículas de Eudragit® RS100 optimizadas y sintetizadas por electroespray: a) imagen de la morfología de las sub-MPs de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños (N=150), c) parámetros utilizados en la síntesis, d) resultados de la caracterización de las sub-MPs, e) imagen de la morfología de las MPs de SEM, f) histograma de la distribución de tamaños (N=150), g) parámetros utilizados en la síntesis y h) resultados de la caracterización de las MPs. _____	202
<b>Figura 4.11</b> Caracterización de la encapsulación de rifampicina al 20% (p/p) en sub-MPs: a) imagen de la morfología de las sub-MPs de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños (N=150), c) resultados de la caracterización de las sub-MPs y d) resultados de la encapsulación de rifampicina. _____	203
<b>Figura 4.12</b> Caracterización de la encapsulación de rifampicina al 15% (p/p) en MPs: a) imagen de la morfología de las MPs de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños, c) resultados de la caracterización de las MPs y d) resultados de la encapsulación de rifampicina. _____	204
<b>Figura 4.13</b> a) Espectros FTIR del antibiótico rifampicina y sus picos característicos, b) espectros FTIR de las sub-MPs y MPs con y sin fármaco encapsulado. Se muestra el espectro de rifampicina (línea naranja) con los picos característicos con líneas punteadas, de las MPs y sub-MPs sin fármaco (líneas verdes) y de las MPs y sub-MPs con rifampicina encapsulada (líneas azules), c) región ampliada entre 2000 y 600 cm <sup>-1</sup> . _____	205

- Figura 4.14** Caracterización del antibiótico rifampicina y de las partículas sintetizadas por electro spray con y sin antibiótico por difracción de rayos X (XRD). Se muestra la rifampicina (naranja), las MPs y sub-MPs sin rifampicina (verde) y las MPs y sub-MPs con rifampicina encapsulada (azul).\_\_\_\_\_ 206
- Figura 4.15** Caracterización de la encapsulación de ciprofloxacino al 15% (p/p) en TFA estabilizado con 0.5% (p/p) de Tween80 en MPs: a) imagen de la morfología de las MPs de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños, c) resultados de la caracterización de las MPs y d) resultados de la encapsulación de ciprofloxacino. \_\_\_\_\_ 207
- Figura 4.16** Espectros FTIR de las MPs-Cpx . Se muestra el espectro de ciprofloxacino (línea azul) con los picos característicos con líneas punteadas, de las partículas con ciprofloxacino encapsulado (línea morada) y de Eudragit® RS100 (línea gris), b) región ampliada entre 1800 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ . \_\_\_\_\_ 208
- Figura 4.17** Caracterización del antibiótico ciprofloxacino y de las partículas sintetizadas por electro spray con y sin antibiótico por difracción de rayos X (XRD). Se muestra el ciprofloxacino (azul), las MPs sin ciprofloxacino (verde) y las MPs con ciprofloxacino (morado).\_\_\_\_\_ 209
- Figura 4.18** Perfiles de liberación de los diferentes tipos de partículas y distintos antibióticos encapsulados durante 75 días : a) sub-MPs con rifampicina encapsulada, b) MPs con rifampicina encapsulada y c) MPs con ciprofloxacino encapsulado. \_\_\_\_\_ 210
- Figura 4.19** Imágenes de SEM a diferentes puntos de la liberación *in vitro*: tras 2h en fluido gástrico simulado, tras 24h, 7, 25 y 60 días en PBS, de las sub-MPs y MPs con rifampicina encapsulada y de las MPs con ciprofloxacino encapsulado. \_\_\_\_\_ 211
- Figura 4.20** Viabilidad de *S. aureus* en presencia de partículas vacías, antibiótico libre (concentración teóricamente liberada en el tiempo de contacto con las bacterias, 24h), partículas con antibiótico (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ). a) sub-MPs-rifampicina, b) MPs-rifampicina, c) MPs-ciprofloxacino, d-g) imágenes coloreadas de SEM del contacto entre partículas (MPs-rifampicina) y *S. aureus* (coloreadas de verde) a concentraciones 0, 0.005, 0.01 y 0.05 mg/mL de partículas respectivamente. \_\_\_\_\_ 214
- Figura 4.21** Viabilidad de *S. aureus* en presencia de partículas con antibiótico y los sobrenadantes de la liberación de las partículas tras 24h, 48h y 7 días (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*  $p < 0.0001$ ). a) sub-MPs-rifampicina, b) MPs-rifampicina, c) MPs-ciprofloxacino. \_\_\_\_\_ 215
- Figura 4.22** Viabilidad celular de las partículas de Eudragit® RS100 en la línea celular Caco2 TC7. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE (n=4). La viabilidad del 100% fueron células control no tratadas. a) sub-MPs – rifampicina, b) MPs – rifampicina, c) MPs – ciprofloxacino d-g) imágenes de microscopía óptica convencional de las células control y en contacto con cada tipo de partícula respectivamente. \_\_\_\_\_ 216
- Figura 4.23** Viabilidad celular de las partículas de Eudragit® RS100 en fibroblastos. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE (n=4). La viabilidad del 100% fueron células control no tratadas. a) sub-MPs – rifampicina, b) MPs – rifampicina, c) MPs – ciprofloxacino, d-g)

imágenes de microscopía óptica convencional de las células control y en contacto con cada tipo de partícula respectivamente. \_\_\_\_\_ 217

**Figura 4.24** Análisis del ciclo celular por citometría de flujo a concentración de 1 mg/mL. (sub-MPs: Eudragit® RS3% (p/v) etanol:acetona, MPs: Eudragit® RS100 13% (p/v) cloroformo). Los controles se realizaron de células sin tratar. Siendo G<sub>0</sub>: fase quiescente, G<sub>1</sub>: primera fase de crecimiento, S: fase de síntesis, G<sub>2</sub>: segunda fase de crecimiento y M: fase de mitosis. Resultados obtenidos de Figura A4.12. \_\_\_\_\_ 218

**Figura 4.25** Esquema de la síntesis de fibras del polímero Eudragit® RS100 por electrohilado. \_\_\_\_\_ 221

**Figura 4.26** Caracterización de las fibras de Eudragit® RS100 optimizadas y sintetizadas por electrohilado: a) imágenes de la morfología de las fibras de SEM, b) histograma de la distribución de diámetros, c) datos de los parámetros de síntesis y resultados de la caracterización de las fibras. \_\_\_\_\_ 224

**Figura 4.27** Caracterización de la encapsulación de rifampicina al 2.5% (p/p) respecto al polímero en fibras de Eudragit® RS100 30% (p/v) en cloroformo sintetizadas por electrohilado: a) imágenes de la morfología de las fibras se SEM, b) histograma de la distribución de diámetros de las fibras (N=150), c) caracterización de las fibras, d) imagen de una membrana formada por fibras con rifampicina con una gota de agua en la superficie y e) caracterización de la rifampicina encapsulada.. \_\_\_\_\_ 225

**Figura 4.28** Caracterización de la encapsulación de rifampicina al 5% (p/p) respecto al polímero en fibras de Eudragit® RS100 30% (p/v) en cloroformo sintetizadas por electrohilado: a) imágenes de la morfología de las fibras se SEM, b) histograma de la distribución de diámetros de las fibras (N=150), c) caracterización de las fibras, d) imagen de una membrana formada por fibras con rifampicina con una gota de agua en la superficie y e) caracterización de la rifampicina encapsulada.. \_\_\_\_\_ 226

**Figura 4.29** Espectros FTIR de las fibras-Rif. Se muestra el espectro de rifampicina (línea naranja) con los picos característicos con líneas punteadas, de las fibras con 2.5% (p/p) de rifampicina encapsulada (línea azul claro), de las fibras con 5% (p/p) de rifampicina encapsulada (línea azul oscura) y de las fibras sin antibiótico (línea verde) y la mezcla física del antibiótico y de las fibras (línea roja). \_\_\_\_\_ 227

**Figura 4.30** Perfiles de liberación de las fibras de Eudragit® RS100 con a) 2.5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero y b) 5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero. \_\_\_\_\_ 228

**Figura 4.31** Imágenes de las membranas tras 14 días en contacto con el medio de liberación PBS/Tween80: a) con 2.5% (p/p) rifampicina b) su respectiva imagen de SEM, c) con rifampicina 5% (p/p) y d) su respectiva imagen de SEM. \_\_\_\_\_ 228

**Figura 4.32** Viabilidad de *S. aureus* en presencia de fibras vacías, antibiótico libre (concentración teóricamente liberada en el tiempo de contacto con las bacterias, 24h) y fibras con antibiótico (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001). a) con 2.5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero, b y c) imágenes de SEM de *S aureus* (coloreadas de verde) en contacto

con 0.5 mg/mL y 0.025 mg/mL de fibras respectivamente, d) con 5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero, e y f) imágenes de SEM de <i>S aureus</i> (coloreadas de verde) en contacto con 0.5 mg/mL y 0.025 mg/mL de fibras respectivamente. _____	231
<b>Figura 4.33</b> Viabilidad de <i>S. aureus</i> en presencia de fibras con antibiótico y los sobrenadantes de liberación de las fibras tras 24h, 48h y 7 días (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, *** p<0.0001). a) 2.5% (p/p) de rifampicina, b) 5% (p/p) de rifampicina. _____	232
<b>Figura 4.34</b> Viabilidad celular de las fibras de Eudragit® RS100 en células Caco2 TC7 y fibroblastos. Los resultados se presentan como media ± DE (n=4). La viabilidad del 100% fueron células control no tratadas. a) 2.5% (p/p) de rifampicina en Caco2 TC7, b) 2.5% (p/p) de rifampicina en fibroblastos, c) 5% (p/p) de rifampicina en Caco2 TC7 y d) 5% (p/p) de rifampicina en fibroblastos. _____	233
<b>Figura A4.1</b> Espectros ultravioleta-visible en DMSO, fluido gástrico simulado (FGS) y PBS de los fármacos a) rifampicina y b) ciprofloxacino. Se indican los máximos de absorbancia empleados en las cuantificaciones de cada uno de los antibióticos. _____	239
<b>Figura A4.2</b> Optimización de la síntesis de por electrospray para la encapsulación de fármacos. Las condiciones de síntesis de partículas empleadas en esta Tesis Doctoral se encuentran marcadas en azul y de las fibras en verde. _____	240
<b>Figura A4.3</b> Rectas de calibrado de los fármacos encapsulados obtenidas de las medidas de UV-Vis: a) rifampicina en DMSO, b) rifampicina en PBS, c) rifampicina en fluido gástrico simulado (FGS), d) ciprofloxacino en DMSO, e) ciprofloxacino en PBS y f) ciprofloxacino en FGS. _____	241
<b>Figura A4.4</b> Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de las diferentes pruebas de optimización de la cantidad de antibiótico: a) sub-MPs Eudragit RS100 3% (p/v) en etanol:acetona y b) MPs de Eudragit RS100 13% (p/v) en cloroformo. _____	241
<b>Figura A4.5</b> a) Pruebas de solubilidad del antibiótico ciprofloxacino en etanol:acetona, cloroformo y HCl 0.1N. b) Pruebas de solubilidad máxima en HCl 0.1N. c) Pruebas de solubilidad máxima en TFA. _____	242
<b>Figura A4.6</b> a) Caracterización de la síntesis de sub-MPs por nanoprecipitación tras preparar la disolución polimérica para encapsular ciprofloxacino de Eudragit RS100. b) Emulsión estable previa al electrosprayado de micropartículas con ciprofloxacino encapsulado. ____	242
<b>Figura A4.7</b> Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación: a) Primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold y e) Korsmeyer-Peppas, de los sistemas de liberación obtenidos por electrospray: a1-e1) sub-MPs + rifampicina 20% (p/p), a2-e2) MPs + rifampicina 15% (p/p) y a3-e3) MPs + ciprofloxacino 15% (p/p). _____	244
<b>Figura A4.8</b> Gráfica de los resultados experimentales de la supervivencia de la bacteria <i>S. aureus</i> frente al antibiótico libres ciprofloxacino. _____	244
<b>Figura A4.9</b> Resultados obtenidos por citometría de flujo de la evaluación de la muerte celular en fibroblastos. _____	245

<b>Figura A4.10</b> Resultados obtenidos por citometría de flujo de la evaluación del ciclo celular en fibroblastos. _____	245
<b>Figura A4.11</b> a) Imagen del cono de Taylor estabilizado en la producción de fibras mediante electrohilado de una disolución polimérica de Eudragit® RS100 a una concentración de 30% (p/v) en cloroformo, b) esquema de la dirección de las fibras desde el jet al colector. _____	246
<b>Figura A4.12</b> Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de las diferentes pruebas de optimización de la cantidad de rifampicina en las fibras de Eudragit® RS100. _____	246
<b>Figura A4.13</b> Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación: a) Primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold y e) Korsmeyer-Peppas, de los sistemas de liberación obtenidos por electrospray: a1-e1) Eudragit® RS100 30% (p/v) cloroformo + rifampicina 5% (p/p), a2-e2) Eudragit® RS100 30% (p/v) cloroformo + rifampicina 2.5% (p/p). _____	247

## CAPÍTULO V.

<b>Figura 5.1</b> Resumen que engloba micrografías de SEM y las distribuciones de tamaño de cada uno de los vectores que han sido diseñados a lo largo del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral. _____	254
<b>Figura 5.2</b> Micrografías de SEM de cada uno de los vectores que han sido diseñados en el trabajo de esta Tesis Doctoral (enmarcada en morado) junto con una micrografía representativa de la degradación para cada tiempo indicado (enmarcada en verde). _____	256
<b>Figura 5.3</b> a) Gráfica comparativa de los perfiles de liberación de tres de los vectores diseñados en el trabajo de esta Tesis Doctoral: nanopartículas, sub-micropartículas y micropartículas, b) tiempo necesario para alcanzar la concentración MIC, c) tiempo necesario para alcanzar la concentración MBC. _____	257

# ÍNDICE DE TABLAS.

## CAPÍTULO I.

<b>Tabla 1.1</b> Problemas comunes de los fármacos actuales y posibles soluciones que pueden aportar los sistemas de liberación de fármacos de tercera generación. Modificada de [14] con permiso de AAAS (American Association for the Advancement of Science). _____	34
<b>Tabla 1.2</b> Ejemplos de agentes bioactivos encapsulados por el polímero PLA. _____	51
<b>Tabla 1.3</b> Ejemplos de agentes bioactivos encapsulados por el polímero PLGA. _____	52
<b>Tabla 1.4</b> Ejemplos de agentes bioactivos encapsulados por el polímero PCL. _____	53
<b>Tabla 1.5</b> Diferentes tipos de polímero Eudragit® con la composición y sus propiedades [147]. _____	54
<b>Tabla 1.6</b> Ejemplos de agentes bioactivos encapsulados y aplicaciones del polímero Eudragit® RS100. Adaptado bajo licencia CC de [153]. _____	57
<b>Tabla 1.7</b> Ejemplos de sistemas de liberación controlada y/o localizada para diferentes biomoléculas: a) proteínas, vitaminas u hormonas, b) material genético, c) fármacos hidrófobos, d) fármacos antitumorales y e) mejoras de las vías de administración. _____	62

## CAPÍTULO II.

<b>Tabla 2.1</b> Lista de algunos ejemplos de fármacos basados en proteínas recombinantes con efectos terapéuticos aprobados por la FDA y, actualmente, en el mercado. Adaptada con permiso de [264]. _____	75
<b>Tabla 2.2</b> Efectos de los probióticos documentados y comprobados en seres humanos y en animales y su mecanismo de acción. Tabla adaptada de [274] con permiso de Elsevier. ____	77
<b>Tabla 2.3</b> Tabla resumen de los géneros, especies y cepas bacterianas con efectos probióticos demostrados más empleados. Tabla adaptada de [274] con permiso de Elsevier. _____	78
<b>Tabla 2.4</b> Tabla resumen de las variables estudiadas en la optimización de la síntesis de micropartículas mediante el método de doble emulsión-evaporación del disolvente para la encapsulación de proteínas modelo. _____	79
<b>Tabla 2.5</b> Resultados de la eficiencia de encapsulación de diferentes concentraciones de proteína BSA en la fase interna, obtenidos mediante el método de la BCA. _____	88
<b>Tabla 2.6</b> Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación de los mejores modelos matemáticos ajustados a los perfiles de liberación in vitro. _____	93
<b>Tabla 2.7</b> Contribución de los diferentes tipos de estructura secundaria de la proteína BSA en su estado nativo y tras su paso por el medio gástrico. _____	96
<b>Tabla 2.8</b> Valores de los coeficientes de repartición de octanol en agua de los posibles disolventes orgánicos de la síntesis de micropartículas. Datos obtenidos de la base de datos PubChem®. _____	102

<b>Tabla 2.9</b> Tabla resumen de las variables estudiadas en la optimización de la síntesis de micropartículas mediante el método de doble emulsión-evaporación del disolvente para la encapsulación de bacterias probióticas modelo. _____	103
<b>Tabla 2.10</b> Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación del mejor modelo matemático ajustado al perfil de liberación <i>in vitro</i> . _____	112

### CAPÍTULO III.

<b>Tabla 3.1</b> Resumen de los factores que pueden influir en las partículas poliméricas obtenidas por nanoprecipitación y el efecto que produce el aumento de cada parámetro. ....	135
<b>Tabla 3.2</b> Información molecular y algunas propiedades físico-químicas del antibiótico rifampicina. Datos obtenidos de la base de datos PubChem®. ....	140
<b>Tabla 3.3</b> Parámetros y condiciones empleadas en la síntesis de NPs de Eudragit® RS100 mediante el método discontinuo de nanoprecipitación.....	143
<b>Tabla 3.4</b> Parámetros y condiciones empleadas en la síntesis de NPs de Eudragit® RS100 mediante el método de nanoprecipitación por microfluídica.....	144
<b>Tabla 3.5</b> Valores de viscosidad ( $\eta$ , mPa·s) a una temperatura de 20 °C de las disoluciones poliméricas elegidas como FO.....	150
<b>Tabla 3.6</b> Caracterización DLS y potencial Z de las nanopartículas sintetizadas por nanoprecipitación mediante el método discontinuo. ....	152
<b>Tabla 3.7</b> Resultados obtenidos por la caracterización de DLS de diámetro medio y PDI del método discontinuo y el microfluídico para diferentes concentraciones poliméricas. ....	156
<b>Tabla 3.8</b> Resultados obtenidos por la caracterización de DLS de diámetro medio y PDI del método discontinuo y el microfluídico para diferentes disolventes. ....	158
<b>Tabla 3.9</b> Caracterización DLS y potencial Z de las NPs sintetizadas por nanoprecipitación mediante el método discontinuo y mediante microfluídica con las condiciones consideradas más idóneas de las NPs vacías y de la encapsulación de rifampicina .....	164
<b>Tabla 3.10</b> Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación de los mejores modelos matemáticos ajustados al perfil de liberación <i>in vitro</i> .....	169

### CAPÍTULO IV.

<b>Tabla 4.1</b> Propiedades de diferentes disolventes utilizados en la técnica de electrospinner. Adaptado de [199] con la licencia de Elsevier. _____	182
<b>Tabla 4.2</b> Efectos de las propiedades de la disolución polimérica sobre la probabilidad de obtener fibras o partículas como producto de síntesis mediante las técnicas electrohidrodinámicas. _____	183
<b>Tabla 4.3</b> Efectos de los parámetros del proceso de síntesis sobre el diámetro y la morfología de productos de síntesis mediante las técnicas electrohidrodinámicas. _____	185

<b>Tabla 4.4</b> Efectos de los factores medioambientales sobre el diámetro y la morfología de productos de síntesis mediante la técnica del electrohidrodinámicas. _____	186
<b>Tabla 4.5</b> Información molecular y algunas propiedades físico-química del antibiótico ciprofloxacino. Datos obtenidos de la base de datos PubChem®. _____	188
<b>Tabla 4.6</b> Tabla resumen de las variables estudiadas en la optimización de la síntesis de partículas por electroespray para la encapsulación de fármacos utilizando el polímero Eudragit® RS100. _____	191
<b>Tabla 4.7</b> Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación de los mejores modelos matemáticos ajustados a los perfiles de liberación <i>in vitro</i> . _____	212
<b>Tabla 4.8</b> Evaluación de la apoptosis celular por citometría de flujo de los tratamientos de las diferentes partículas y antibióticos encapsulados con una concentración de 1 mg/mL. Los controles se realizaron de células sin tratar. Resultados obtenidos de Figura A4.11. _____	218
<b>Tabla 4.11</b> Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación de los mejores modelos matemáticos ajustados a los perfiles de liberación <i>in vitro</i> . _____	229

## **CAPÍTULO V.**

<b>Tabla 5.1</b> Comparación entre las técnicas empleadas en el desarrollo del trabajo de esta Tesis Doctoral. _____	253
--	-----



## ABREVIATURAS.

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolín]-6-sulfónico
ADN	Ácido desoxirribunucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
Au/Pd	Oro/paladio
BCA	Ácido bicinconínico
BSA	Albúmina sérica bovina
CaCO <sub>3</sub>	Carbonato de calcio
CD	Ciclodextrina
CEL	Celulosa
CIJM	Mezcladores de corrientes confinadas
CPP	Péptido de penetración celular
Cpx	Ciprofloxacino
CS	Quitosano
DC	Dicroísmo circular
DCM	Diclorometano
Desv.Est	Desviación estándar
DL	Capacidad de carga
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiencia de encapsulación
EtOH	Etanol
FAS	Fase antidisolvente
FDA	Agenacia de medicamentos y alimentos
FDC	Combinación de dosis fija
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	óxido de hierro
FG	Fluido gástrico simulado
FI	Fase interna
FI	Fluido intestinal simulado
FITC	Fluoresceína-5-isotiocianato
FNP	Nanoprecipitación flash
FO	Fase orgánica
FS	Fase solvente
FTIR	Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier
GRAS	Generalmente reconocido como seguro
h	hora
H <sub>2</sub> O	Agua
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno

HA	Ácido hialurónico
HCl	Ácido clorhídrico
HIPE	Emulsión de elevada fase interna
HMW	Alto peso molecular
HRP	Peroxidasa de rábano
ISO	Organización Internacional para la Estandarización
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Dihidrógeno fosfato de potasio
LMW	Bajo peso molecular
log	Logaritmo decimal
MBC	Concentración mínima bactericida
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MIVM	Mezclador Vortex de múltiples entradas
MPs	Micropartículas
MRS	Man, Rogosa y Sharpe
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Hidrógeno fosfato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NIR	Infrarrojo cercano
NLS	Señales de señalización nuclear
NP(s)	Nanopartícula(s)
o/w	Aceite en agua
o/w/o	Aceite en agua en aceite
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Presión
PBS	Tampón fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PDI	Índice de polidispersidad
PEEK	Poli éter-éter cetona
PEG	Poli(etilenglicol)
Phe	Fenilalanina
pI	Punto isoeléctrico
PLA	Ácido poliláctico
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PMMA	Polimetil-metacrilato
PNIPAM	Poli(N-isopropil-acrilamida)
PVA	Polivinil alcohol
Rifa	Rifampicina
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Microscopio electrónico de barrido
SER	Sistema retículo-endotelial
siARN	Ácido ribonucleico de silenciamiento
Sub-MPs	Sub-micropartículas

T <sup>a</sup>	Temperatura
TEC	Trietilcitrate
TEM	Microscopía de transmisión electrónica
TFA	Ácido trifluoroacético
THF	Tetrahidrofurano
TPP	Tripolifosfato
Trp	Triptófano
TSB/TSA	Medio de cultivo/agar tripton-soja
Tyr	Tirosina
UFC	Unidad Formadora de Colonia
UV	Ultravioleta
VEGFR	Factor de crecimiento endotelial vascular
w/o	Agua en aceite
w/o/w	Agua en aceite en agua
$\lambda$	Longitud de onda



# CAPITULO I.

## INTRODUCCIÓN.

Sistemas de liberación controlada y localizada de agentes bioactivos.



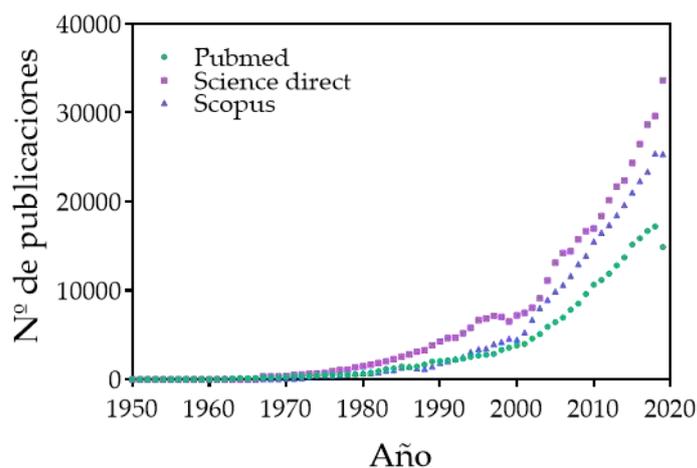




## 1.1 Sistemas de liberación controlada de fármacos.

En los últimos años, el interés por el desarrollo de nuevos sistemas de liberación controlados y localizados de fármacos se ha visto incrementado notablemente. Estos sistemas de liberación de fármacos se desarrollan con la finalidad de mejorar las propiedades fisicoquímicas y farmacológicas de los medicamentos. Es decir, estos sistemas proporcionan una forma más efectiva de administración de fármacos, reduciendo a su vez la toxicidad y proporcionando vías de administración más cómodas para el paciente.

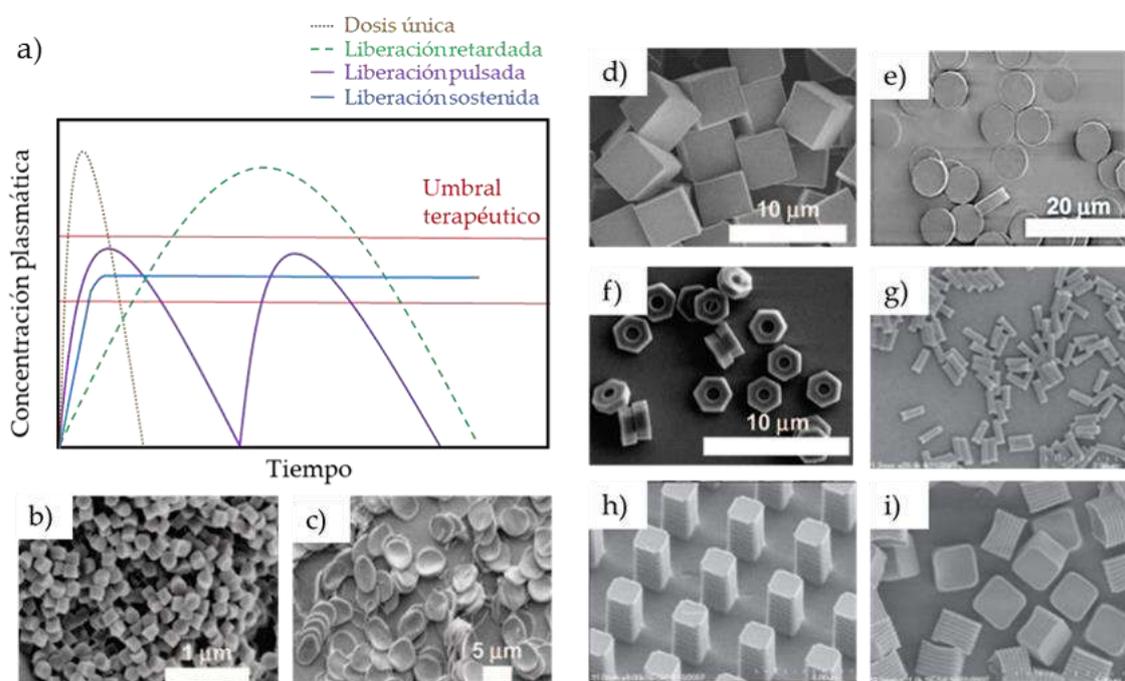
No fue hasta 1950 cuando aparecieron los primeros sistemas de liberación, que recibieron el nombre de sistemas de primera generación (1950-1980), entre los que se incluían parches, inhaladores o cápsulas orales [1]. En 1952 se desarrolló la primera tecnología de liberación continua durante 12h, Spansule® (de “*sustained-release capsules*”), que se basaba en cápsulas de disolución retardada en la que se encapsulaban los fármacos [2]. Posteriormente, en 1979, la FDA aprobó el primer parche transdermal, Scop® [3]. A partir de 1980 ya se habla de sistemas de liberación de segunda generación, entre los que se incluyen liposomas, nano y micropartículas [4]. En 1995, la FDA aprobó el primer fármaco basado en nanotecnología, Doxil®, un medicamento quimioterapéutico compuesto por liposomas que encapsulan el agente anticanceroso [5]. Hasta diez años después no se aprobó el segundo fármaco siguiendo esta línea de investigación, Abraxane®, en 2005, una formulación basada en nanopartículas de un fármaco quimioterapéutico unido a la proteína albúmina, la cual actúa como vector [6]. A partir de este punto, se empezó a hacer hincapié en el campo de la liberación de fármacos de forma controlada y/o localizada, de manera que la investigación ha ido cada vez más en aumento, como se observa en la Figura 1.1



**Figura 1.1** Cronograma de publicaciones con la palabra clave “*drug delivery*” en diferentes bases de datos de búsquedas científicas. (Febrero 2020).

Sin embargo, el ritmo de aparición de nuevos fármacos con propiedades mejoradas en el mercado es bastante más lento y estable que el de nuevas publicaciones [7]. Por otro lado, la

media de tiempo entre que se diseña un nuevo fármaco y es comercializado se estima próximo a los 10 años, debido a que el diseño a escala de laboratorio y la caracterización de la aplicación *in vitro* e *in vivo* en pequeños animales no resulta igualmente efectiva cuando se traduce a ensayos clínicos [8]. Por esta razón, surgen los denominados sistemas de liberación controlada de tercera generación (2010- actualidad), los cuales se centran en las propiedades fisicoquímicas del fármaco, pero también en las barreras biológicas que deben atravesar a lo largo de su camino [1]. De esta forma, se puede controlar la farmacocinética según la necesidad biológica, como se muestra en la Figura 1.2, y el punto de acción mediante el control de la morfología del mismo.



**Figura 1.2** a) Perfiles farmacocinéticos de liberación de sistemas de liberación de fármacos de primera, segunda y tercera generación, modulables en función de las necesidades biológicas. b-i) Micrografías de diferentes geometrías de sistemas de liberación. Imágenes (b-f) adaptadas de [9] con permiso de American Chemical Society. y (g-i) de [10] con permiso de John Wiley & Sons.

Los sistemas de liberación se desarrollan debido a la necesidad de mejorar, principalmente, la biodisponibilidad del fármaco en el organismo tras su administración y de modular su modo de acción, reduciendo de esta manera los efectos tóxicos. Por lo tanto, previamente a su diseño, se deben conocer las barreras fisiológicas a las que se va a enfrentar el sistema de liberación. Dichos sistemas ayudan a la solubilidad de fármacos poco solubles en agua [11], a su protección frente a condiciones adversas de pH o ante la presencia de enzimas [12][13]. Sin embargo, hay que tener en cuenta la capacidad de acción del fármaco para así poder trabajar en el rango de concentraciones efectivas a nivel terapéutico. En resumen, a la hora de diseñar un sistema de liberación de fármacos se deben de estudiar los

problemas asociados al medicamento y proporcionar soluciones viables y compatibles. En la Tabla 1.1 se exponen los problemas más comunes que presentan los medicamentos actuales y cómo los sistemas de liberación pueden contribuir a su mejora.

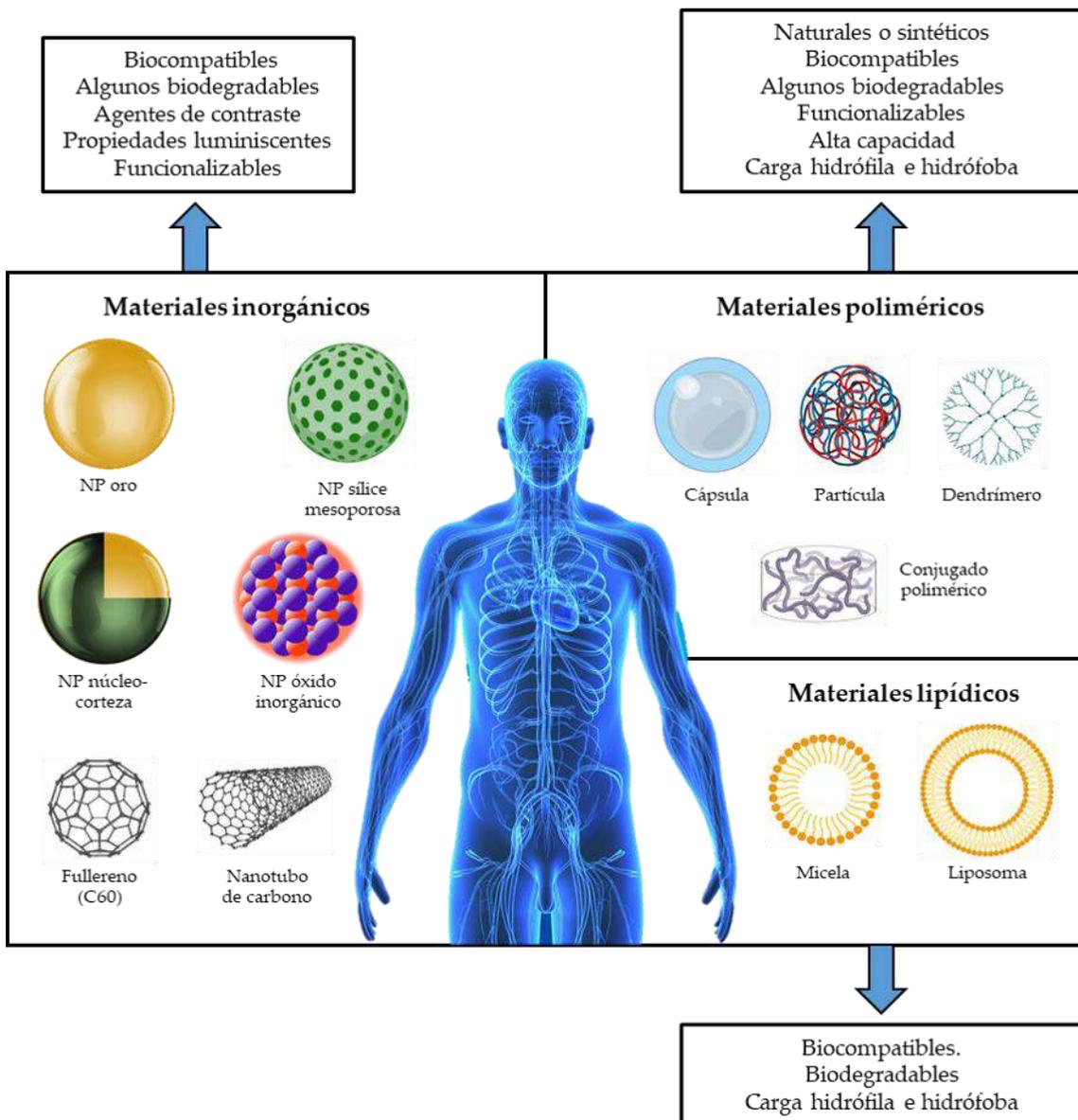
**Tabla 1.1** Problemas comunes de los fármacos actuales y posibles soluciones que pueden aportar los sistemas de liberación de fármacos de tercera generación. Modificada de [14] con permiso de AAAS (American Association for the Advancement of Science).

Problema	Consecuencia	Solución aportada por los sistemas de liberación
Baja solubilidad	Precipitación de los fármacos hidrófobos con la consecuente mala biodistribución.	Mejoran la solubilidad del fármaco hidrófobo vehiculizándolo en un vector hidrófilo.
Daño tisular	Irritación del tejido por extravasación del fármaco en elevadas dosis.	Producen una liberación controlada y sostenida que reduce este daño tisular por extravasación.
Rápida degradación del fármaco <i>in vivo</i>	Pérdida de la actividad del fármaco tras su administración.	Protegen los fármacos del medio externo y producen una liberación sostenida. De esta forma, se reducen las dosis administradas.
Farmacocinética desfavorable	Eliminación rápida del organismo y necesidad de dosis elevadas y continuas.	Aumentan el tiempo de vida media del fármaco en el organismo evitando la eliminación renal.
Mala biodistribución	El fármaco se distribuye por todo el organismo dando lugar a efectos secundarios, limitando las dosis administradas.	La biocompatibilidad y localización del vector en el lugar de acción reduce los efectos secundarios y mejora la biodistribución.
Falta de selectividad para tejidos diana	El fármaco se distribuye por todos los tejidos generando efectos secundarios.	Pueden localizar la liberación del fármaco pudiendo, de esta forma, aumentar la concentración en el tejido específico en el que se quiere actuar.

La efectividad y el éxito de estos sistemas de liberación se atribuyen a diferentes propiedades como a la estabilidad física, biológica y morfológica a largo plazo, a la ausencia de toxicidad de sus excipientes, a la simplicidad de síntesis y manipulación y a la posibilidad de escalado [15]. Aunque lo que resulta primordialmente imprescindible es tener en cuenta el tamaño, las características superficiales y la forma para obtener la biodistribución *in vivo* que exige la aplicación biomédica del vector [16].

Los sistemas de liberación de tercera generación se pueden clasificar en función de su morfología y de su composición. Para poder aportar esta serie de mejoras farmacocinéticas, se han diseñado sistemas de liberación de diversos materiales y con diferentes propiedades. Los

más estudiados hasta la fecha para estas aplicaciones biomédicas son los vectores lipídicos, poliméricos o materiales inorgánicos como óxidos metálicos o materiales mesoporosos, entre otros, como se reúne en la Figura 1.3.



**Figura 1.3** Tipos y propiedades principales de los diferentes sistemas de liberación.

Los materiales inorgánicos estudiados como vectores de transporte de fármacos suelen ser nanopartículas metálicas, de diversas morfologías y composiciones. Por ejemplo, las nanopartículas de oro han sido ampliamente estudiadas por su versatilidad como vector de fármacos mediante el anclaje de los mismos a la superficie de la partícula, la diversidad de tamaños posibles de las mismas y su falta de toxicidad debido a su biocompatibilidad [17]. Hay que mencionar la posibilidad de controlar la liberación del fármaco anclado a las

nanopartículas de oro mediante la aplicación de luz, ya que cuando se encuentran en dispersión coloidal presenta un fenómeno denominado resonancia de plasmón de superficie, lo que quiere decir que es capaz de absorber luz de determinadas longitudes de onda y transformarla en propiedades fotoacústicas o fototérmicas. Para darse este control por luz, las nanopartículas son irradiadas preferiblemente por luz infrarroja cercana (NIR, 800–1.200 nm), ya que presenta buenas propiedades de penetración a través de los tejidos sin producir daños [18] Agasti et al. [19] investigaron la liberación del fármaco contra el cáncer 5-fluoroacilo de la superficie de las NPs de oro controlado por luz y observaron que las NPs de oro con el fármaco anclado sólo ejercía acción citotóxica cuando se todo el conjunto se exponía a luz UV (365 nm) durante 1, 6 y 15 minutos. Por otro lado, también se han estudiado otras morfologías de estos vectores, como los nanorods de oro, utilizados también como sistemas de liberación controlados por luz [20]. Otras partículas metálicas que también han sido aplicadas al tratamiento del cáncer han sido las de sulfuro de cobre (CuS), como vectores para la terapia fototérmica aprovechando su capacidad de absorción de luz infrarroja, junto con la liberación de fármacos mediante la aplicación de luz [21]. Resulta altamente interesante la aplicación de NP de sílice mesoporosa como vectores de liberación de fármacos debido a su elevada área superficial, al volumen de los poros y a su reactividad superficial (grupos hidroxilo), las cuales también han sido utilizadas como sistemas de liberación mediante el anclaje de fármacos en el interior de los poros y la liberación controlada espaciotemporalmente por luz [22][23]. Cabe mencionar que, además de como vector de fármacos para terapia dirigida, pueden igualmente ser empleadas como medios de diagnóstico por imagen al mismo tiempo [24], lo que se denominan vectores teragnósticos. Ejemplo de ello son las NPs de óxido de hierro o de otros metales, que presentan propiedades superparamagnéticas, por lo que bajo la aplicación localizada de un campo magnético son capaces de generar calor por vibración y liberar fármacos de manera controlada y, a su vez, sirven como marcadores para diagnóstico por imagen [25].

Los liposomas son estructuras de 90 a 150 nm formados a partir de una bicapa lipídica (fosfolípidos y colesterol), es decir, tienen la misma composición que las membranas celulares, por lo que una de sus principales propiedades es la ausencia total de toxicidad y la capacidad de internalización celular. Los fosfolípidos están compuestos por cabezas polares, capaces de atrapar fármacos hidrófilos, y cadenas apolares, capaces de atrapar fármacos hidrófobos [26]. Sin embargo, uno de los principales inconvenientes de estos vectores es el corto tiempo de vida media en el organismo, ya que son rápidamente fagocitados, por lo que necesitan modificaciones para poder prolongar el tiempo de circulación en el organismo [27]. Las aplicaciones de los liposomas se centran, principalmente, en la administración de agentes quimioterapéuticos [28] o terapia génica [29]. Por ejemplo, Elsana et al. estudiaron el efecto en la capacidad de encapsulación de moléculas de ADN mediante la incorporación de carboximetil- $\beta$ -ciclodextrina a la bicapa lipídica para mejorar la eficiencia de la terapia génica

[30]. Por otro lado, Kim et al. [31] diseñaron un sistema liposomal para la liberación de un antibiótico hidrófobo que inhibe la proliferación de células madre, salinomicina, y un quimioterápico hidrófilo, doxorubicina, localizada en las células madre de tumores de mama.

La versatilidad de las partículas poliméricas las hace potencialmente atractivas en su aplicación como sistemas de liberación de fármacos. Las principales características de los vectores poliméricos son, entre otras, la biocompatibilidad, la ausencia de toxicidad, la facilidad de modificar su estructura química y la posibilidad de modular su tamaño, superficie, morfología y, por lo tanto, la cinética de liberación [32]. Los polímeros aplicados a esta finalidad han sido tanto de origen natural como sintético, siempre dependiendo de las propiedades de cada uno y las necesidades del vector como el mecanismo de degradación requerido, la carga superficial apropiada o los factores fisicoquímicos a los que va a ser expuesto (pH, enzimas, ...) [33]. Algunos de los polímeros naturales aplicados a los sistemas de liberación son, por ejemplo, el quitosano, un polisacárido cargado positivamente que actúa como vector mucoadhesivo [34] o la albúmina, una proteína transportadora con elevada capacidad de anclaje de sustancias [35]. Por otro lado, la variedad de los polímeros sintéticos es mucho más amplia, entre los que podemos encontrar, polímeros de base poliacrílica [36], el polímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) [37], entre otros muchos. Por otra parte, existen derivados poliméricos que son capaces de responder a estímulos externos, tales como el pH o la temperatura [38]. Por ejemplo, el polímero acrílico Eudragit® L100 libera su carga selectivamente a un valor de pH 7.0 [39], o el polímero poli(N-isopropil-acrilamida) (PNIPAM), el cual cambia de conformación cuando aumenta la temperatura de forma reversible [40].

## 1.2 Influencia de la morfología del vector en la biodistribución del organismo.

Cuando se administra un sistema de liberación, es expuesto a varias dificultades para atravesar las barreras biológicas y llegar a su lugar de acción. Algunas de estas dificultades son: la rápida eliminación del vector de la circulación sanguínea debido a la acción del sistema retículo-endotelial (SRE) por fagocitosis, la degradación enzimática del vector, la agregación con proteínas séricas o la filtración a través de los capilares de otros órganos y su bioacumulación. El tamaño, las propiedades superficiales y la forma del vector juegan un papel fundamental en la biodistribución del sistema de liberación *in vivo* y en la permanencia del vector en el organismo [41].

### 1.2.1 Efecto del tamaño del vector.

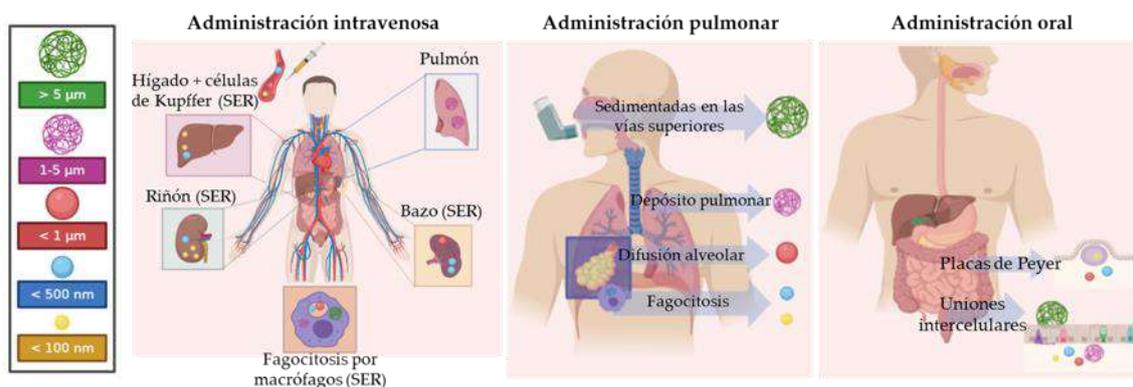
Este efecto ha sido profundamente estudiado durante mucho tiempo ya que influye directamente en la biodistribución y existen técnicas de síntesis que ayudan a modificar el tamaño y la dispersión de tamaños de los vectores [42]. La biodistribución en el organismo va a depender de la vía de administración del vector.

En el caso de la administración intravenosa (**Figura 1.4-a**), está reportado que partículas inferiores a 5 nm se eliminan rápidamente de la circulación porque inmediatamente extravasan o son expulsadas por el riñón [43]. Además, los endotelios vasculares de diferentes órganos son de estructura fenestrada. Las dimensiones de estas fenestraciones, que actúan como filtro de los vectores de fármacos, están directamente relacionadas con la dimensión de las partículas que se acumularán en dichos órganos. En el caso del hígado, las fenestraciones se encuentran en el rango de los 50-100 nm [44], o en el bazo en el rango de 200-500 nm [45], entre otras. Las partículas de mayor tamaño, 2-5  $\mu\text{m}$ , presentan una rápida acumulación en los capilares pulmonares [46]. Por otra parte, los macrófagos del sistema retículo endotelial fagocita y, en especial, las células de Kupffer en el hígado, eliminan rápidamente los vectores en el torrente sanguíneo cuando el rango del diámetro es de 200 nm hasta 5  $\mu\text{m}$  [47][48].

Cuando se administra por vía inhalatoria (**Figura 1.4-b**) también se produce una biodistribución dependiente del tamaño del vector. Se trata de una vía de administración muy interesante al tratarse de una vía no invasiva y con una extensa superficie de absorción del fármaco a lo largo del sistema pulmonar [49]. Aunque existen ciertas desventajas, como la necesidad de sincronizar la respiración o la limpieza de los dispositivos de administración que se proponen como futuros retos [50]. Mediante esta vía de administración se consigue llegar a la circulación sistémica mediante vectores de pequeño tamaño (< 200 nm) que son capaces de alcanzar los alveolos pulmonares y son susceptibles a la fagocitosis. Por otro lado, vectores de tamaño inferior a 1  $\mu\text{m}$  son capaces de recorrer todo el sistema respiratorio hasta los alveolos, mientras que los vectores entre 1-5  $\mu\text{m}$  quedan depositados en la mucosa pulmonar. Sistemas de liberación superiores a las 5  $\mu\text{m}$  quedan sedimentados en las vías respiratorias superiores [51].

Por último, mediante la vía de administración oral (**Figura 1.4-c**), a través del sistema gastrointestinal, también se produce esta biodistribución. Se trata de una vía de administración capaz de transportar el fármaco al torrente sanguíneo mediante la absorción intestinal. Además, es una vía cómoda, no invasiva y directa de administración. Mediante esta vía de administración, los vectores inferiores a 1  $\mu\text{m}$  pueden ser internalizados a través de las placas de Peyer, que son zonas de tejido linfático a lo largo del intestino delgado, a través de las cuales pasan directamente a circulación [52]. Además, estos vectores y hasta las 5  $\mu\text{m}$  aproximadamente, pueden acceder al torrente sanguíneo a través de cavidades entre las uniones intercelulares del intestino delgado y grueso. Las partículas superiores a las 10  $\mu\text{m}$  de

diámetro, no son capaces de ser internalizadas y se bioacumulan en las paredes intestinales siendo lavadas y excretadas [53].



**Figura 1.4** Esquema de la biodistribución de los sistemas de liberación en función del tamaño del vector a través de diferentes vías de administración: a) vía intravenosa, b) vía pulmonar y c) vía oral.

### 1.2.2. Efecto de la forma del vector.

La forma física del vector tiene también un importante papel en la biodistribución de los sistemas de liberación. Mediante esta propiedad se puede prevenir la fagocitosis o dirigir la endocitosis, entre otras, mediante las diferentes interacciones con la membrana celular [54].

En cuanto a la internalización de los sistemas de liberación por las células se han realizado diversos estudios. Giglio et al. [55] estudiaron este efecto en nanopartículas de sílice mesoporosa, observando que cuando tenían forma de disco la internalización era mayor que cuando tenían morfología esférica. En la misma línea Zhenget al. [56] concluyeron que la internalización de los *nanorods* de sílice era mayor que la de las partículas esféricas. La investigación de Sharma et al. [57] se basó en la influencia de la morfología de partículas poliméricas sobre su internalización por macrófagos, siendo mucho mayor la de partículas con forma elipsoide que esférica.

Además, se ha estudiado el efecto de la forma del vector en la citocompatibilidad del mismo. En un estudio, se comprobó que las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  esféricas eran mucho menos citotóxicas que aquellas con morfología dendrítica [58]. O las partículas de hidroxiapatita en forma de agujas o con morfología aplanada inducían mayor muerte celular que las esféricas [59].

Sin embargo, estas influencias no hacen que una morfología sea mejor o peor que otra. Simplemente, diferentes formas o tamaños ofrecen diferentes tendencias de bioacumulación, de internalización celular, de liberación del fármaco contenido o de la citotoxicidad del vector [60].

### 1.2.3. Efecto de la superficie del vector.

El tamaño o la forma del vector resultan cruciales para la biodistribución y la interacción con los tejidos del organismo, sin embargo, de la química de la superficie van a depender importantes propiedades como la solubilidad, las interacciones superficiales con la célula o el reconocimiento del vector [61]. Por lo tanto, los vectores pueden ser modificados superficialmente para ser dirigidos a las diferentes dianas dentro del organismo o para imitar moléculas propias del organismo y, así, evitar ser reconocidas y fagocitadas por los macrófagos. Es decir, modificarlos para que sean perfectos caballos de Troya en el interior del organismo y puedan llegar a su lugar de acción (Figura 1.5). Además, la química superficial de un vector influye en la biodistribución del mismo y modula su interacción con los tejidos del organismo, así como el efecto citotóxico del sistema [62].

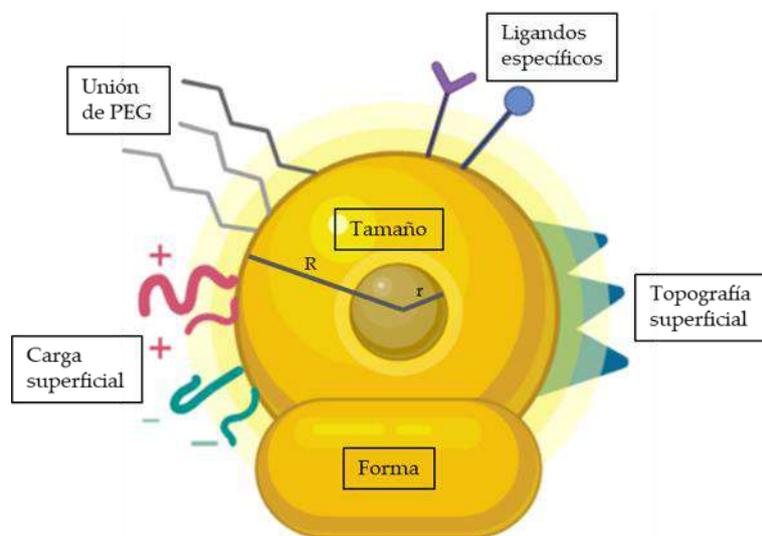
Se observó que una eficaz manera de evitar que los sistemas de liberación administrados fueran reconocidos inespecíficamente y, consecuentemente eliminados, era el recubrimiento del mismo con el ligando poli(etilenglicol) (PEG) ya que evita la interacción con proteínas séricas. Xie et al. [63] demostraron que el recubrimiento de PEG en nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  evitaba la fagocitosis de las partículas por los macrófagos en cultivo celular.

Otra modificación estudiada es la inserción de grupos cargados electrostáticamente en la superficie de los vectores. Las membranas celulares tienen una composición que les confiere carga superficial negativa [64]. Cho et al. [65] estudiaron el efecto de esta carga superficial sobre la internalización celular de nanopartículas de oro, demostrando que la interacción de las partículas cargadas positivamente con la superficie negativa de las membranas celulares o de las mucosas es mucho mayor que la interacción de las partículas neutras o con carga negativa. Consecuentemente, también se observó que, si la interacción con la membrana era mayor, la probabilidad de ser internalizada también aumentaba.

Además, los sistemas de liberación pueden ser modificados con otras pequeñas moléculas como péptidos, aptámeros o anticuerpos, entre otros. Se trata de ligandos específicos de reconocimiento celular. Entre otros muchos, se ha estudiado ampliamente el efecto de la funcionalización con los denominados CPPs (del inglés *Cell penetrating peptide*) [66]. Se comprobó que estos ligandos favorecían la internalización del vector en el interior celular [67]. Nativo et al. [68] utilizaron en su investigación una combinación de este péptido CPP con otras señales de señalización nuclear (NLS) en la superficie de partículas de oro. Observaron que las partículas eran internalizadas por las células más eficazmente que sin la presencia de CPP y, además, se reguló la entrada al núcleo de las mismas gracias a la acción de NLS.

Por otra parte, lejos de las modificaciones químicas de la superficie, hay que tener en cuenta la topografía de la misma, ya que también influye en las interacciones con las células. La topografía proporciona diferente área superficial y energía de los sistemas de liberación [69]. En el estudio de Song et al. [70] diseñaron partículas huecas de silicio imitando la

morfología superficial rugosa de los granos de polen. Observaron que la elevada rugosidad aumentó hasta diez veces la interacción de estas partículas con bacterias, aumentando considerablemente la actividad antibacteriana del sistema.

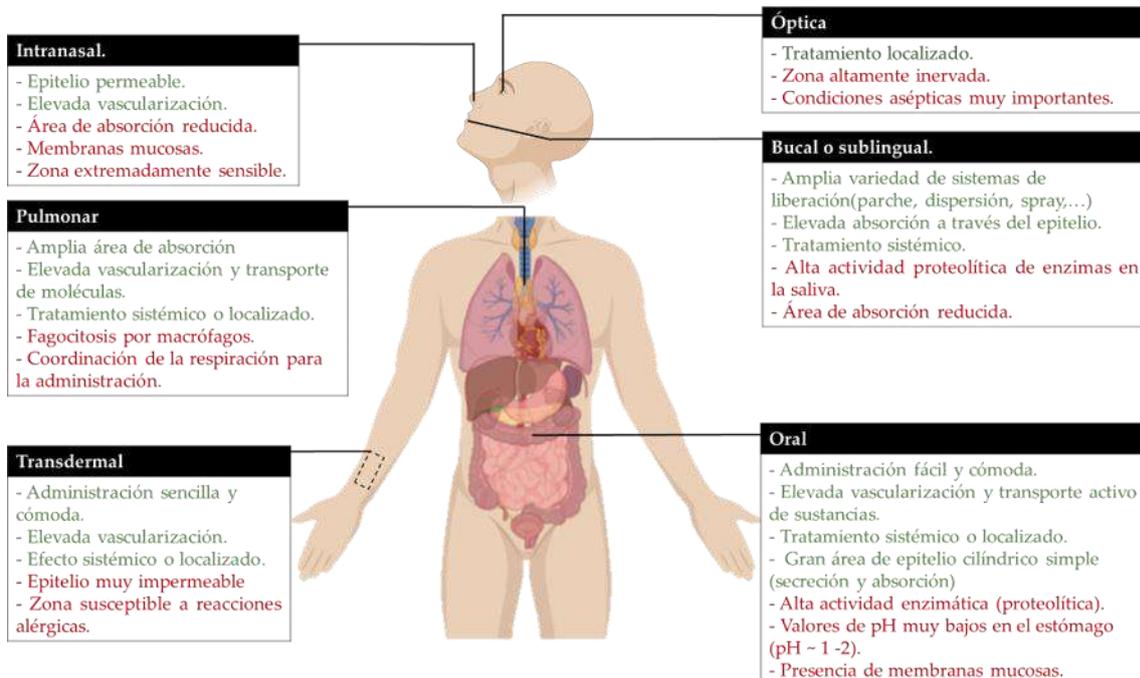


**Figura 1.5** Dibujo esquemático de los parámetros físico-químicos que influyen en la biodistribución de los sistemas de liberación controlada en el organismo. Adaptado con licencia CC de [61].

### 1.3 Vías de administración de los sistemas de liberación controlada no invasivos y su farmacocinética.

Las vías de administración de los productos farmacéuticos que actualmente se encuentran en el mercado, aprobados por la FDA, sigue la siguiente tendencia: vía oral (62.02%), vía parenteral (22.34%), vía cutánea (8.70%), vía mucosa (5.22%), vía inhalatoria (1.21%) y otras vías (0.42%) [7]. Dicha estadística demuestra que la vía oral es la preferida a la hora de administrar un fármaco, ya que engloba una serie de propiedades que facilitan la calidad de vida del paciente. Estos datos muestran que las preferencias del mercado a la hora de diseñar un vector para la liberación controlada de un fármaco se centran en la sencillez, comodidad y autonomía de administración, en la medida de lo posible.

Por estas razones, a pesar de que la vía de administración más inmediata y en la que se evitan las diferentes barreras del organismo ya que se administra directamente en el torrente sanguíneo para alcanzar rápidamente el órgano o tejido diana es la vía de administración parenteral, se preferirán las vías de administración no invasivas (Figura 1.6).



**Figura 1.6** Principales rutas de administración no invasivas y las ventajas (en verde) y desventajas (en rojo) de cada una de ellas. Imagen adaptada con permiso de Springer Nature [71].

Entre todas las vías de administración no invasivas mencionadas en la Figura 1.6, las más asiduas y ampliamente utilizadas son las vías de administración oral, transdermal y pulmonar, ya que se trata de las más sencillas en ser administradas y en todas ellas hay una amplia zona de absorción para el transporte de las biomoléculas hasta el torrente sanguíneo para un efecto sistémico y la posibilidad de un efecto localizado, inclusive.

### 1.3.1 Vía oral.

Se trata de la vía de administración más cómoda, sencilla y recomendada para la administración de fármacos biológicos. Sobre todo, para la administración a largo plazo o para tratamientos de enfermedades crónicas. Sin embargo, para el paso de diversas moléculas se presentan diversas desventajas que se deben de tener en cuenta para mantener la estabilidad del fármaco y, por lo tanto, su biodisponibilidad [72].

Las desventajas más importantes son la presencia enzimática y el pH. Cuando se ingiere una biomolécula por vía oral comienza su digestión en la boca, donde el pH es 6.5 y se secreta la saliva, rica en proteínas amilasas y lisozima, aunque el tiempo en contacto bajo estas condiciones del producto administrado es suficientemente corto como para no considerarse la boca como una de las principales barreras [73]. Sin embargo, el estómago y el intestino sí que se consideran principales barreras en este tipo de administración. Cuando el compuesto ingerido llega al estómago, las glándulas gástricas secretan fluidos compuestos por enzimas

proteolíticas, concretamente endopeptidasas y lipasas, y ácido clorhídrico, generando así el ambiente más ácido en el interior del organismo (pH 1-2). Posteriormente, la digestión continúa con el paso por el intestino delgado en el que se aumenta la secreción de enzimas de origen pancreático, entre las que encontramos tripsinas, carboxipeptidasas endopeptidasas, aminopeptidasas y elastasas, entre otras. Durante este paso de la digestión, se encuentra también una amplia variedad de valores de pH, siendo primero el paso por el duodeno a pH 4-5.5, luego el yeyuno con pH 5.5-7, el íleon con pH 7-7.5 y, por último, el colon y el recto con valores de pH 7-7.5 [74].

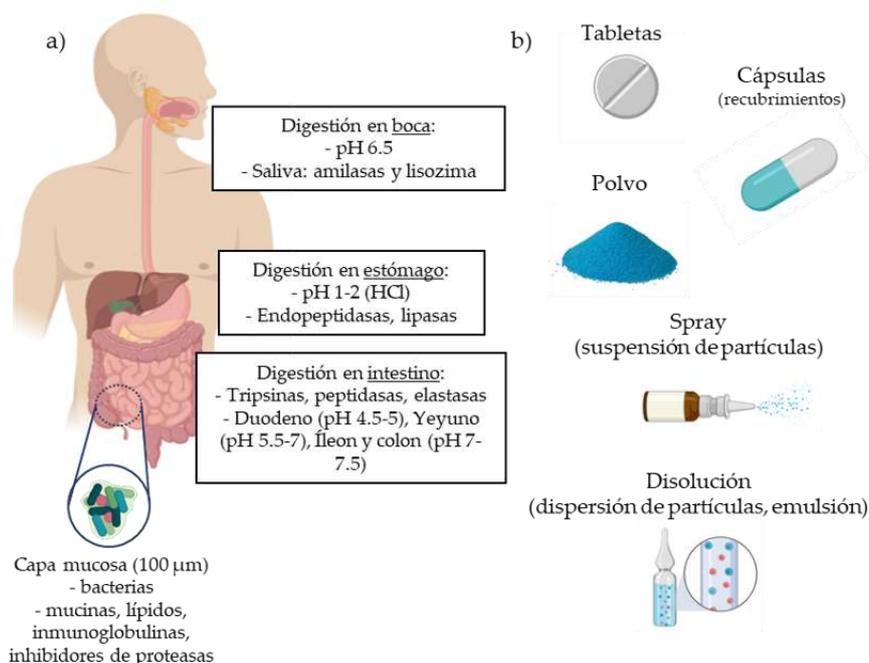
Además, también hay que tener en cuenta la presencia de una extensa capa mucosa a lo largo del epitelio intestinal. Dicha capa está compuesta por una sustancia similar a un hidrogel secretada por las propias células de tracto con un elevado contenido en mucinas (una clase de glicoproteínas altamente glicosiladas) [75] y, además, también se encuentran lípidos, electrolitos, inmunoglobulinas, péptidos antimicrobianos, inhibidores de proteasas y agua, entre otros [76]. Además de todo esto, también es un punto de colonización de las bacterias intestinales que actúan como barrera para otras bacterias patógenas [77]. Por lo tanto, la principal función de esta capa mucosa, aparte de facilitar el paso del bolo alimenticio, es la de actuar como barrera física limitando la difusión de las sustancias ingeridas desde el lumen al interior epitelial [76]. Esta capa mucosa tiene un espesor de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  y poros de una media de tamaño de 0.2  $\mu\text{m}$ , aunque este diámetro va a depender de la localización, del individuo y de su estado de salud [78]. En la Figura 1.7-a se expone de forma resumida cada una de las fases de la digestión de un sistema de liberación a través de su administración oral.

Otro punto importante a tener en cuenta en la administración de fármacos por vía oral es el denominado primer paso hepático. Se trata de un obstáculo inevitable en la digestión de cualquier molécula ya que, a lo largo del sistema digestivo, una parte de las moléculas ingeridas se absorben rápidamente y son transportadas a la circulación menor, es decir, la circulación que pasa por el hígado antes de llegar al corazón para ser distribuida por el organismo. El hígado actúa como un filtro que elimina parte de las moléculas o las ataca enzimáticamente convirtiéndolas en metabolitos hidrosolubles que, normalmente, se inactivan y se eliminan a través de los riñones. Por lo tanto, este primer paso hepático reduce la biodisponibilidad del fármaco administrado por vía oral [79]

La aplicación de sistemas de liberación controlada en este tipo de administración resulta altamente favorable debido a que permite superar los obstáculos expuestos. Estos sistemas de liberación deben de ser capaces de evitar la degradación enzimática o por acción del pH del vector y de la molécula que transporta, aumentar el tiempo de residencia en el tracto digestivo para aumentar la absorción a la circulación sistémica y evitar el primer paso hepático reduciendo, a su vez, los efectos secundarios por el metabolismo de elevadas dosis de fármacos. En resumen, deben de ser capaces de mejorar la biodisponibilidad del agente

bioactivo administrado [80]. Además, cabe destacar la versatilidad de las formas de dosificación del producto para su administración oral: en forma de disolución, suspensión, emulsión, polvo, gránulos, cápsulas, tabletas, entre otros, como puede observarse en la Figura 1.7-b [81].

El mayor ejemplo en la aplicación del diseño de sistemas de liberación en la que se han invertido, hasta la fecha, más esfuerzos en cuando a investigación es en el desarrollo de sistemas de administración oral de insulina. La administración más eficaz para la diabetes mellitus es la inyección subcutánea de insulina dos veces al día, por lo que el desarrollo de un sistema de liberación prolongada y de administración oral supondría una gran mejora para el paciente [82]. Es por esto que se encuentran numerosas publicaciones desarrollando sistemas de liberación de insulina para la administración oral utilizando como vehículo liposomas, polímeros naturales como quitosano o polímeros acrílicos o hidrogeles [83]. Un enfoque innovador fue el reportado por Sakloetsakun et al. [84] en el que se desarrolló una fórmula esférica de ingestión oral de insulina basada en quitosano tiolado que, tras 30 minutos, se observaba un notable aumento en el perfil de liberación *in vitro* de insulina respecto al sistema sin modificación ya que se liberó mayor proporción de insulina cuando el quitosano se encontraba tiolado. Estos resultados los respaldaron con un experimento *in vivo* en el que observaron un aumento significativo de la insulina sérica biodisponible mediante la administración de este sistema de liberación en comparación con la administración de una disolución de insulina oral.



**Figura 1.7** a) Esquema de las diferentes fases de digestión a través de la administración oral de un sistema de liberación controlada. b) Diferentes formas de dosificación de estos vectores a través de la administración oral.

### 1.3.2 Vía transdermal.

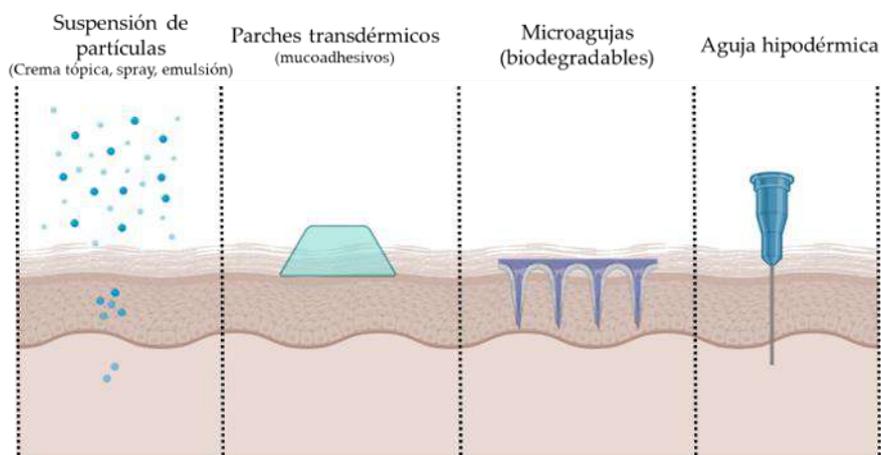
Se trata de un sistema de administración indoloro que puede ser fácilmente autoadministrado. Además, mediante esta vía se evita el primer paso hepático que produce la rápida metabolización espontánea de las moléculas administradas y permite un tratamiento localizado, por ejemplo, en infecciones o enfermedades cutáneas, evitando la presencia del fármaco en suero y, con ello, la posible toxicidad generada [85].

Sin embargo, en estos sistemas de liberación cutáneo, hay que contemplar diversas limitaciones que hacen de esta vía de administración un sistema menos atractivo. La principal limitación tiene que ver con la composición multicapa de la piel (del exterior al interior: epidermis, dermis e hipodermis), que actúa como una barrera fisiológica de baja permeabilidad. Para que la difusión de las moléculas se produzca de manera eficaz por el estrato córneo de la epidermis, los pesos moleculares deben ser inferiores a 500 Da y, además, deben de tener una afinidad por ambientes lipídicos, lo que supone un impedimento para la administración de moléculas hidrófilas [86]. Además, también hay que tener en cuenta la actividad enzimática de esta primera capa de la epidermis debido a la presencia de peptidasas y estererasas en la piel que metabolizan rápidamente las moléculas que la atraviesan [87].

Sin embargo, el verdadero talón de Aquiles de la administración cutánea es la elevada sensibilidad de la piel con la irritación de la misma debido a la elevada actividad inmunológica presente en la zona [88].

A pesar de las limitaciones presentes, hay un elevado interés en el desarrollo de sistemas de liberación para la administración transdermal entre los que se encuentran vectores basados en dendrímeros, en polímeros de origen natural, en polímeros sintéticos o en lípidos. Estos últimos son los más explorados en esta aplicación, con la posibilidad de desarrollar liposomas, niosomas o nanoemulsiones lipídicas, entre otros [89]. Actualmente, existen parches transdermales de liberación controlada y prolongada en el tiempo en el mercado como, por ejemplo, el reservorio Duragesic® para el tratamiento del dolor localizado [90] o los parches Zecuity® para el tratamiento de las migrañas [91]. Por otra parte, otro método de administración transdermal que trata de evitar ese problema de difusión a través de la epidermis que se está investigando es el denominado microagujas, las cuales se componen de un material biodegradable con el fármaco o molécula a administrar en su interior. Las microagujas tienen un tamaño de 150-1500  $\mu\text{m}$  de largo y 50-250  $\mu\text{m}$  de ancho y se inyectan superficialmente en la epidermis interna o, incluso, directamente en la dermis, evitando el estrato córneo, pero de manera más superficial y no dolorosa, al contrario que las agujas hipodérmicas. De esta forma, se facilita la llegada a la circulación sistémica del fármaco o de la molécula que se encuentra en el interior de las microagujas [92].

Mediante esta vía de administración, las formas de dosificación se encuentran más limitadas a únicamente la posibilidad de administrar cremas tópicas, parches transdermales, mediante agujas hipodérmicas o microagujas (Figura 1.8).



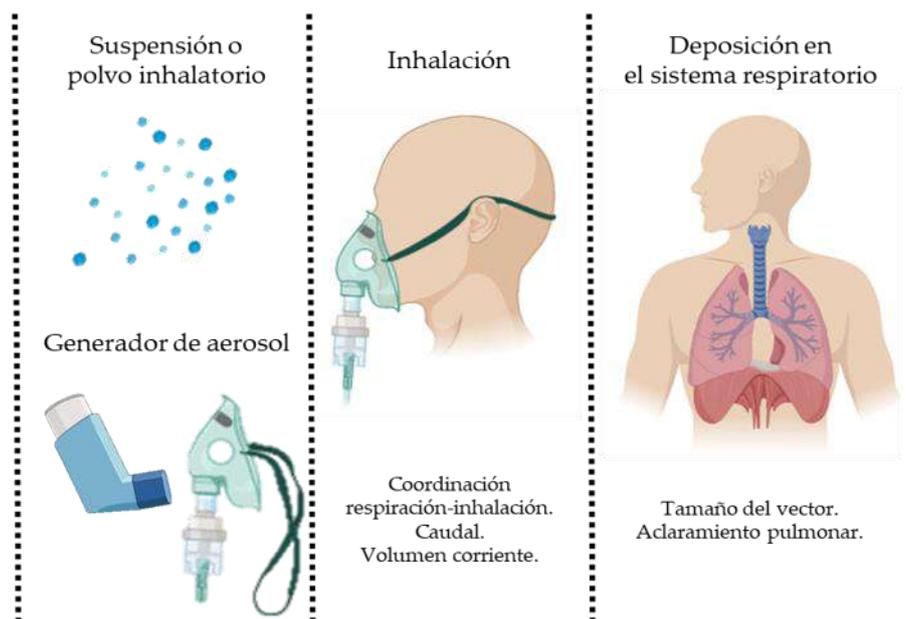
**Figura 1.8** Esquema de las diferentes formas de dosificación de los sistemas de liberación de fármacos a través de la vía transdermal.

### 1.3.3 Vía pulmonar y nasal.

A través de esta vía de administración también se consigue evitar el primer paso metabólico hepático y, de esta forma, mejorar la biodisponibilidad del agente administrado. Esta ruta se utiliza, generalmente, para la administración de fármacos o moléculas localmente en los pulmones en enfermedades como la enfermedad pulmonar obstructiva, asma o fibrosis quística. Además de esto, también supone un paso para acceder al sistema circulatorio o linfático debido a la elevada irrigación de sistema pulmonar [93].

El aspecto más importante a tener en cuenta en esta ruta de administración es el tamaño del vector. Mediante la administración pulmonar, el vector o fármaco es administrado por inhalación y, dependiendo del tamaño del mismo, llegará a un punto final o a otro dentro del sistema pulmonar, tal y como se trató en el apartado 1.2.1. Sin embargo, esta ruta despierta menor interés científico ya que, como se ha dicho anteriormente, la forma de dosificación a través de esta ruta es por una suspensión o un polvo inhalatorio, por lo que se precisa de un dispensador además del desarrollo de un vector óptimo, lo que hace que no resulte una administración ni fácil ni cómoda para el paciente (Figura 1.9) [94].

Algún ejemplo de vectores de administración pulmonar que actualmente se encuentran en el mercado son los antibióticos aerosolizados como tratamiento de infecciones pulmonares. TOBI Podhaler® es un inhalador de polvo de tobramicina, un antibiótico contra *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria patógena en los pacientes con fibrosis quística [95], o Ventolin®, un aerosol de albuterol sulfato que actúa como broncodilatador en patologías alérgicas o asmáticas [96], entre otros.



**Figura 1.9** Esquema de las necesidades para la correcta administración a través de la vía respiratoria.

## 1.4 Sistemas poliméricos para la liberación de fármacos.

Los sistemas de liberación se diseñan a partir de plataformas que les aporte estabilidad, protección y algunas propiedades especiales dependiendo de la función y aplicación final. Dichas plataformas pueden ser diversas y variadas estructuras poliméricas, tanto de origen natural como artificial.

En esta Tesis Doctoral nos centraremos en aquellos aprobados para su administración por vías no invasivas, especialmente, por vía oral, transdermal o pulmonar. En la Figura 1.10, se encuentran resumidos los polímeros de origen natural y, en la Figura 1.11, los polímeros de origen artificial más investigados hasta la actualidad para esta aplicación.

### 1.4.1 Polímeros de origen natural.

#### 1.4.1.1 Ácido hialurónico (HA).

El ácido hialurónico es un mucopolisacárido, de carga negativa, natural no inmunogénico presente en la matriz extracelular, en el humor vítreo del ojo, en las válvulas cardíacas o en el líquido sinovial del organismo, entre otros, ya que lo producen diferentes tipos celulares. El glucoaminoglucano es un disacárido compuesto por el bloque repetitivo polimérico de ácido D-glucurónico y N-acetil-D-glucosamina unidos mediante un enlace glucosídico  $\beta$  (Figura 1.10-a) [97].

Dicho compuesto presenta excelente biocompatibilidad, biodegradabilidad y buenas propiedades viscoelásticas. Además, al ser un producto generado de las propias células, puede

combinarse con receptores de la superficie celulares [98]. Debido a estas interesantes propiedades, se encuentran numerosas aplicaciones terapéuticas en liberación controlada de fármacos, en la cicatrización de heridas o en la regeneración de tejidos [99].

En el marco de la liberación controlada de productos bioactivos, Gianolio et al. [100] desarrollaron un anestésico basado en HA y bupivacaína que conseguía prolongar el efecto de anestésico hasta cinco veces, mediante la conjugación de la molécula anestésica con el polímero, de forma que su tiempo de vida media aumentaba notablemente.

También se ha investigado en el desarrollo de vehículos basados en  $\text{CaCO}_3$  recubiertos de HA para la administración oral de insulina. Es el caso de Lui et al. [101], que desarrollaron el citado complejo consiguiendo un efecto hipoglucémico mucho más prolongado que la insulina administrada por vía parenteral.

#### **1.4.1.2 Quitosano (CS).**

El quitosano es un biopolímero catiónico aminopolisacárido de origen natural, proveniente del exoesqueleto de crustáceos, donde se encuentra la quitina [102]. Se compone de unidades arbitrarias de  $\beta$ -(1-4) D-glucosamina y N-acetil D-glucosamina (Figura 1.10-b) [103].

Las propiedades más interesantes del CS como biopolímero son la biocompatibilidad, la biodegradabilidad, su carga superficial positiva, la cual lo hace mucoadhesivo y la sensibilidad al pH ya que es insoluble a altos valores de pH [103]. Las aplicaciones terapéuticas en la liberación controlada de agentes bioactivos de CS son muy amplias, siendo utilizado en la actualidad en el desarrollo de vectores para todo tipo de administraciones y en diferentes formas de dosificación: cápsulas, nanopartículas, tabletas, fibras o geles [104].

Aprovechando su propiedad mucoadhesiva, se ha investigado ampliamente su aplicación en áreas donde hay presencia de mucosas, como el área pulmonar, oftalmológico, el vaginal o el digestivo. Garg et al. [105] desarrollaron nanopartículas de CS encapsulando rifampicina o isoniacida, fármacos antituberculosis, consiguiendo una liberación sostenida y una localización pulmonar en los macrófagos alveolares *in vivo*.

También se ha aplicado en el campo oncológico, como vector de quimioterápicos para la administración oral. En el caso del trabajo Feng et al. [106], consiguieron sintetizar nanopartículas de CS con hidrocloreto de doxorubicina de forma que resultó un vector no tóxico que aumentó la absorción intestinal del fármaco y la prolongó en el tiempo en comparación con el fármaco libre.

#### **1.4.1.3 Alginato.**

El alginato entra dentro de los polisacáridos aniónicos solubles en agua, presente en las paredes celulares de algunas algas marinas [107]. Está formado por la secuencia de dos monómeros: ácido  $\alpha$ -L-gulurónico y ácido  $\beta$ -D-manurónico (Figura 1.10-c) [108].

Las propiedades que presenta el alginato como biopolímero son, entre otras, su elevada biocompatibilidad y biodegradabilidad, utilizado hasta en el ámbito alimentario debido a su ausencia total de toxicidad y, además, es dependiente del pH, ya que varía su viscosidad en función del pH [109]. Por esto, el alginato ha sido ampliamente utilizado en ingeniería de tejidos, en aplicaciones farmacéuticas y biomédicas, como en los sistemas de liberación controlada de agentes bioactivos [110].

Debido a su cambio de comportamiento en función del pH, Tugcu-Demiröz et al. [111] investigaron la posibilidad de sintetizar un sistema de liberación entérico basado en alginato para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, ya que la administración del fármaco libre (ácido 5-aminosalicílico) se absorbía rápidamente sin llegar al lugar de acción, el colon, en su administración oral. Los resultados *in vivo* demostraron que, en la mayoría de los casos, las tabletas de alginato alcanzaban el intestino delgado y grueso sin ser degradadas y habiendo liberado solamente aproximadamente un 10% del fármaco incluido.

Una interesante aplicación del biopolímero alginato fue la propuesta por Xu et al. [112] mediante el diseño de fluidos ferromagnéticos basados en micropartículas de este polímero para la liberación controlada y localizada de un fármaco modelo. Para esta finalidad, propusieron el recubrimiento de nanopartículas magnéticas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  con alginato para, así, evitar la agregación de las mismas, mejorar su dispersión en medio acuoso y, además, aprovechar las propiedades dependientes de pH del polímero. Los resultados mostraron una buena dispersión y estabilidad de las nanopartículas férricas debido a la presencia del biopolímero y, además, la liberación de las mismas fue pH dependiente y de manera controlada.

#### 1.4.1.4 Celulosa (CEL).

La celulosa es un biopolímero presente en multitud de especies vivas como en plantas, animales y bacterias. Se trata de un homopolisacárido, compuesto por moléculas de  $\beta$ -glucosa formando una conformación plana en forma de cinta, unidas por enlaces  $\beta$ -(1-4)-O-glucosídico (Figura 1.10-d) [113]. La elevada cantidad de grupos  $-\text{OH}$  laterales ofrece la posibilidad de modificar la superficie del biopolímero CEL, haciendo de esta propiedad una de las más atractivas para las aplicaciones del mismo en materiales biomédicos, aparte de la biocompatibilidad [114].

Medhi et al. [115] publicaron su aplicación del biopolímero CEL en la tecnología recientemente emergente de las microagujas. Desarrollaron un sistema transdermal de liberación sostenida de un anestésico, lidocaína, a partir de CEL obtenida de la superficie de bacterias *Acetobacter xylinum*. Los resultados no mostraron liberaciones más prolongadas que las publicadas mediante microagujas de hidrogeles [116], pero gracias a las propiedades mecánicas del biopolímero, se comprobó que la permeabilidad a través de la epidermis aumentaba notablemente.

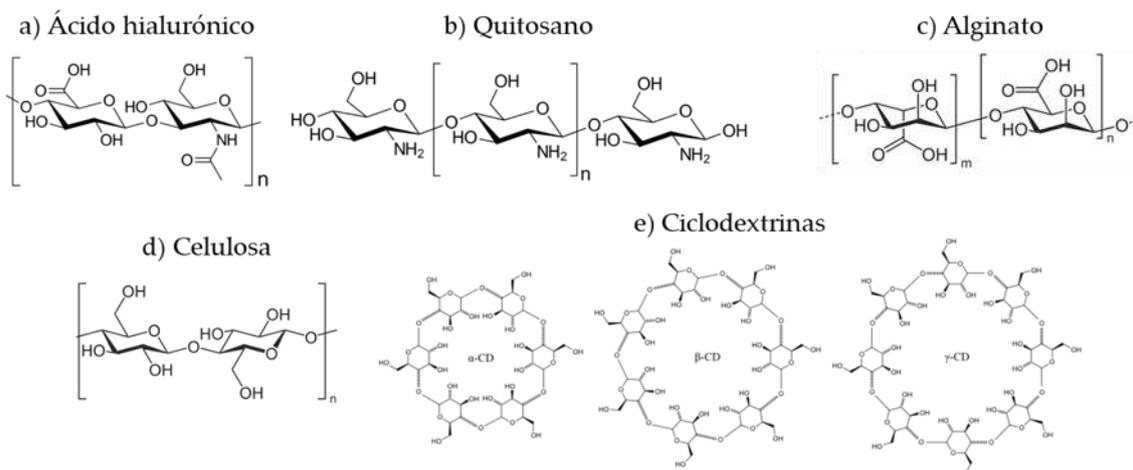
En el trabajo de Khoshnevisan et al. [117] se desarrollaron fibras a partir del derivado acetato de CEL, gracias a técnicas electrohidrodinámicas, en las que incluyeron agentes antimicrobianos, antioxidantes y antiinflamatorios para tratamientos tópicos.

#### 1.4.1.5 Ciclodextrina (CD).

Las ciclodextrinas son oligosacáridos cíclicos compuestos por repetitivas unidades de dextrosa (6 unidades:  $\alpha$ -, 7 unidades:  $\beta$ - y 8 unidades:  $\gamma$ -CD) unidos a través de uno o hasta cuatro enlaces (Figura 1.10-e), obtenidos a partir de la degradación enzimática del almidón presente en diversos microorganismos. Se trata de una estructura hidrófila con un interior menos hidrófilo que es capaz de albergar moléculas con cierto carácter hidrófobo [118]. Al igual que la CEL, tiene una superficie muy reactiva fácilmente modificable, tratándose de un biopolímero altamente compatible y biodegradable.

Las CD han sido extensivamente aplicadas en el desarrollo de sistemas de liberación de moléculas, en su mayoría, hidrófilas. Sin embargo, mediante las modificaciones necesarias de los grupos funcionales de las CD, Patel et al. [119] sintetizaron una  $\beta$ -CD anfifílica mediante la introducción de una cadena carbonada (C12) en un solo paso. En el interior de las nanovesículas modificadas formadas introdujeron un fármaco hidrófobo, citrato de tamoxifeno, de manera exitosa. Además, observaron una ausencia total de citotoxicidad del vector y la farmacocinética mostró una eliminación del fármaco menor y, por lo tanto, un consecuente aumento del tiempo de vida media.

Por otro lado, Jug et al. [120] desarrollaron complejos de CD-hidrocloruro de bupivacaína para la administración bucal de forma que prolongaron el efecto anestésico, de manera que mejoró de esta forma su solubilidad produciendo un efecto localizado rápido y, posteriormente, prolongado en el tiempo.



**Figura 1.10** Estructura molecular de las unidades repetitivas de los diferentes polímeros de origen natural.

## 1.4.2 Polímeros de origen artificial.

### 1.4.2.1 Ácido poliláctico (PLA).

El ácido poliláctico es un polímero poliéster biocompatible y biodegradable, constituido por unidades de ácido láctico metabolizables por el organismo (Figura 1.11-a). Se trata de un polímero con posibilidad de modificaciones superficiales para adquirir propiedades nuevas, o diferentes perfiles de liberación o diferentes interacciones con las barreras biológicas [121].

El PLA ha sido ampliamente utilizado en la encapsulación de agentes bioactivos tanto hidrófilos como hidrófobos, algunos de los cuales podemos encontrar resumidos en la Tabla 1.2.

**Tabla 1.2** Ejemplos de agentes bioactivos encapsulados por el polímero PLA.

Agente bioactivo	Mejora terapéutica	Ref.
Hemoglobina	Nanopartículas que, modificando la superficie con PEG, redujeron la fagocitosis por parte de los macrófagos y la acumulación en el hígado.	[122]
Dexametasona	Nanopartículas que controlaron la liberación del fármaco por difusión y la prolongaron hasta 50h.	[123]
Proteína-C	Nanopartículas que aumentaron la encapsulación de proteína sin desnaturalizar y su posterior liberación.	[124]
Zidovudina	Nanopartículas que redujeron el nivel de fagocitosis por parte de los macrófagos.	[125]
BSA	Nanopartículas que prolongaron el tiempo medio de circulación de la proteína en sangre.	[126]
Neurotoxina-I	Nanopartículas que, mediante la administración nasal, mejoraron el transporte de la Neurotoxina-I al cerebro.	[127]
Progesterona	Nanopartículas que, evadiendo el sistema retículo-endotelial, liberaban de forma controlada la hormona por difusión.	[128]

### 1.4.2.2 Ácido poliláctico-co-glicólico (PLGA).

El ácido poliláctico-co-glicólico es uno de los polímeros más utilizados a día de hoy en la liberación controlada de fármaco (Figura 1.11-b). Esto se debe a sus propiedades ideales como vector para su administración en el organismo. Es un polímero biocompatible y biodegradable, ya que es hidrolizado rindiendo monómeros de ácido láctico y glicólico, ambos

metabolizables por el organismo, por lo que no existe toxicidad asociada al polímero PLGA [129].

Al igual que el PLA, el PLGA ha sido ampliamente utilizado como vector de liberación de agentes bioactivos, mediante la síntesis de nano o micropartículas, fibras, entre otras morfologías posibles [130]. Algunos ejemplos de la aplicación del PLGA en este campo se encuentran resumidos en la Tabla 1.3.

**Tabla 1.3** Ejemplos de agentes bioactivos encapsulados por el polímero PLGA.

Agente bioactivo	Mejora terapéutica	Ref.
Haloperidol	Nanopartículas con tiempo de liberación controlado por difusión y prolongado hasta 13 días.	[131]
Taxol	Nanopartículas que, utilizando Vitamina E como aditivo, aumentan la eficiencia de encapsulación y la adhesión a células. Además, se consigue una liberación prolongada hasta de 20 días.	[132]
Paclitaxel	Nano y microfibras con diferentes perfiles de liberación en función de los disolventes utilizados en su síntesis.	[133]
Estradiol	Nanopartículas que aumentan el tiempo de vida media y, por lo tanto, la biodisponibilidad del fármaco.	[134]
Dexametasona	Nanopartículas que controlaron la liberación del fármaco por difusión de manera prolongada en el tiempo.	[135]
Doxorrubicina-AuNPs	Fibras que liberan rápidamente el fármaco cuando se irradia el sistema con luz NIR para terapia contra el cáncer.	[136]
Vitamina D3	Microagujas formadas por nanopartículas para mejorar y prolongar la deposición transdermal del agente bioactivo.	[137]

#### 1.4.2.3 Policaprolactona (PCL).

La policaprolactona es un polímero poliéster alifático sintetizado a partir, como su nombre indica, de la polimerización de la caprolactona (Figura 1.11-c). Se trata de un polímero biocompatible y biodegradable mediante hidrólisis de los enlaces éster en condiciones fisiológicas, de manera muy lenta [138].

Se trata de un polímero muy versátil ya que se puede modificar químicamente alterando, así, sus propiedades físicas, químicas y mecánicas. Es, por esto, por lo que es ampliamente utilizado en la ingeniería de tejidos y la liberación controlada de fármacos [139].

Algunos ejemplos de la aplicación del PCL en este campo se encuentran resumidos en la Tabla 1.4.

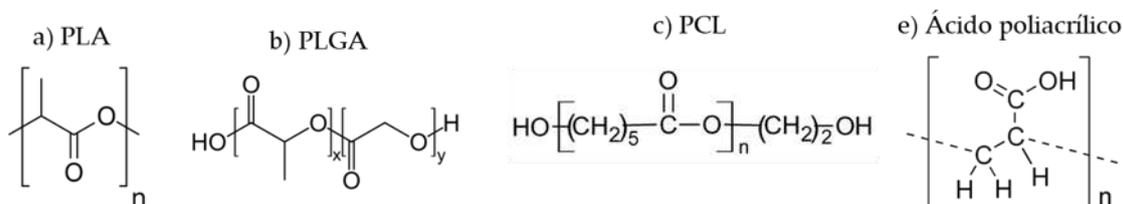
**Tabla 1.4** Ejemplos de agentes bioactivos encapsulados por el polímero PCL.

Agente bioactivo	Mejora terapéutica	Ref.
Taxol	Nanopartículas con mejorada eficiencia de encapsulación.	[140]
Insulina	Junto con otro polímero catiónico, se consiguieron nanopartículas con elevadas eficiencias de encapsulación consiguiendo una disminución de la glucemia en ratas.	[141]
Paclitaxel	Nanofibras que liberan de manera controlada y localizada el fármaco citotóxico para células cancerígenas.	[142]
Ketoconazol	Con la adición de NPs-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , se obtuvieron microfibras que liberaban de forma controlada y localizada el fármaco antifúngico.	[143]

#### 1.4.2.4 Polímeros acrílicos.

Son una familia de polímeros perteneciente a la familia de polímeros vinílicos, es decir, se trata de un conjunto de monómeros de acrilato, los cuales son ésteres que contienen grupos vinílicos (dos carbonos unidos por doble enlace y unidos a un carbonilo) (Figura 1.11-d) [144].

Existen una gran variedad dentro de esta familia polimérica debido a la posibilidad de anclar diferentes grupos funcionales a las unidades monoméricas y, además, combinar varias de ellas.



**Figura 1.11** Estructura molecular de las unidades repetitivas de los diferentes polímeros de origen artificial.

Debido a esto, este apartado se va a centrar en los polímeros Eudragit®, los cuales son copolímeros de polimetacrilatos, con diferentes propiedades según sus composiciones,

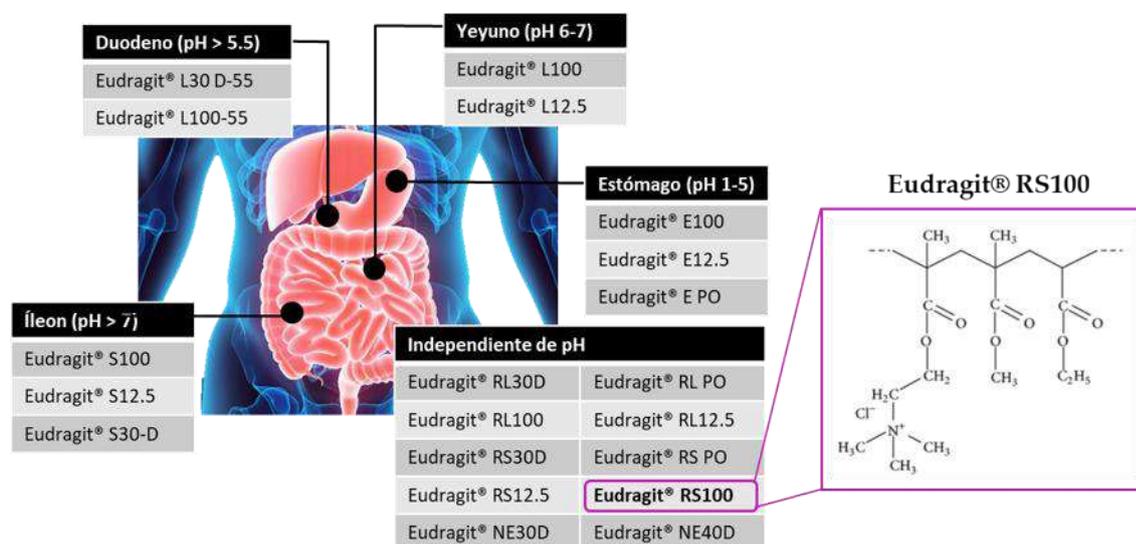
diseñados especialmente para su administración oral [145]. Son una amplia gama de polímeros que se lanzaron por primera vez en 1954 como recubrimientos entéricos para la protección de fármacos en la administración oral y formulaciones transdérmicas. Desde entonces, han sido utilizados como tabletas, recubrimientos gastrorresistentes poliméricos, micropartículas, nanopartículas, fibras, entre otras, sintetizados a través de diferentes técnicas para aplicaciones tópicas, intestinales, ópticas, vaginales o nasales. [146]. En la Tabla 1.5 se muestran los diferentes tipos de polímeros Eudragit® que se encuentran en el mercado, aprobados por la FDA, diseñados, principalmente, para la administración oral.

**Tabla 1.5** Diferentes tipos de polímero Eudragit® con la composición y sus propiedades [147].

Tipo	Composición	Propiedades	
Eudragit® E E12.5, E100, E PO	Dimetilaminoetil-metacrilato, butil-metacrilato, metil-metacrilato (2:1:1)	Dependientes de pH	Soluble a pH < 5.0 Mucoadhesivo
Eudragit® L L12.5, L100, L30 D-55, L100-55	Metil-metacrilato y ácido metacrílico		Soluble a pH > 5.0 - 7.0
Eudragit® S S12.5, S30D, S 100	Metil-metacrilato y ácido metacrílico		Soluble pH > 7.0
Eudragit® FS FS30D, FS100	Metil-acrilato, metil-metacrilato y ácido metacrílico		Soluble pH > 7.0 Baja viscosidad Aniónico
Eudragit® RL RL12.5, RL30D, RL100, RL PO, RL100	Etil-acrilato, metil-metacrilato y éster de ácido metacrílico con grupos amonio cuaternario (1:2:0.2)	Independientes de pH	Insoluble Elevada permeabilidad pH-independiente Mucoadhesivo (catiónico)
Eudragit® NE NE30D, NE40D	Etil-acrilato y metil-metacrilato		Insoluble Baja permeabilidad pH-independiente
Eudragit® RS RS12.5, RS30D, RS100, RSPO	Etil-acrilato, metil-metacrilato y éster de ácido metacrílico con grupos amonio cuaternario (1:2:0.1)		Insoluble Baja permeabilidad pH-Independiente Mucoadhesivo (catiónico)

**Eudragit® RS100.**

Se trata del polímero utilizado en esta Tesis Doctoral. Es un copolímero compuesto por monómeros de etil-acrilato, metil-metacrilato y un bajo contenido éster de ácido metacrílico con grupos amonio cuaternarios (entre 4.48-6.77%). Es un material insoluble en disoluciones acuosas, de baja permeabilidad que se hincha de manera independiente al pH y de forma prolongada en el tiempo ya que, de esta manera, se aumenta su tiempo de latencia de acuerdo con el tiempo que tarda en avanzar por el sistema digestivo gracias a los movimientos peristálticos. En la Figura 1.12 se muestra la estructura molecular del copolímero Eudragit® RS100.



**Figura 1.12** Dibujo esquemático de los diferentes tipos de Eudragit® de la casa comercial Evonik® (izquierda) y estructura molecular del copolímero Eudragit® RS100 (derecha).

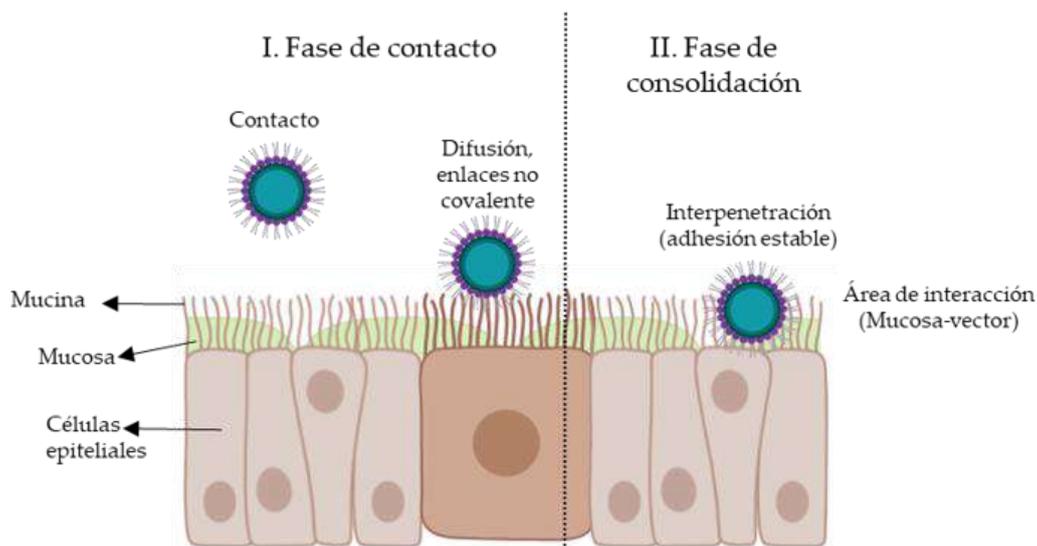
Una de las propiedades más interesantes de este polímero es la mucoadhesividad gracias a los grupos amonio cuaternarios, que dotan a la superficie polimérica de carga positiva [148]. Bioadhesión se define como la interacción de dos materiales cuando, al menos uno de ellos, es de naturaleza biológica, permaneciendo unidos durante un tiempo considerable debido a uniones interfaciales. Cuando una de estas superficies es una capa mucosa del organismo, se denomina mucoadhesión [149].

La mucoadhesión es un fenómeno complejo del que no se comprende totalmente su mecanismo, ya que se encuentran diferentes teorías que tratan de explicarlo:

- La teoría electrónica, la cual explica el fenómeno por uniones electrostáticas de superficies cargadas positivamente con la mucosa negativa.
- La teoría de la adsorción, la cual defiende que se da a partir de enlaces de hidrógeno, fuerzas de van del Waals o efectos hidrofóbicos.

- La teoría de humectación propone que el fenómeno se relaciona con la capacidad de un líquido para extenderse sobre la mucosa.
- La teoría de la difusión propone que el gradiente de concentración participa activamente en la capacidad de penetración de los vectores a través de la mucina.
- La teoría de la fractura, que se relaciona con la fuerza mecánica con la que se produce la unión de las dos superficies.
- La teoría mecánica propone que la adhesión depende de la rugosidad superficial y el área de contacto.

Pero ninguna de estas teorías es capaz de explicar completamente el fenómeno ocurrido, sino que hace falta combinarlas todas ellas para poder entender qué ocurre en los epitelios mucosos para que, finalmente, se produzca la mucoadhesión [150]. Dicha interacción puede ser de diversos tipos: puentes disulfuro (la mucina presenta residuos de cisteína), enlaces de van del Waals, enlaces de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas o fuerzas electrostáticas, de manera que se establezca una adhesión consolidada [151]. En la Figura 1.13 puede entenderse, de forma esquemática, la secuencia de acontecimientos necesarios para que un vector mucoadhesivo interactúe con la capa mucosa.



**Figura 1.13** Esquema del fenómeno de mucoadhesión adaptado con permiso de Elsevier de [151].

Pese a que el polímero esté orientado comercialmente a la administración oral, la propiedad mucoadhesiva abre las puertas a otras dianas. En el organismo hay numerosos epitelios mucosos como barreras fisiológicas para proteger al organismo de la entrada de sustancias o patógenos (mucosa nasal, bucal, ocular, dermal) o como recubrimiento y protección interna de órganos (mucosa del estómago, intestinal, pulmonar, vaginal) [152]. En la Tabla 1.6 se encuentran reflejados algunos ejemplos en los que se ha aplicado el polímero

Eudragit® RS100 como sistema de liberación controlada en diferentes dianas mucosas del organismo.

**Tabla 1.6** Ejemplos de agentes bioactivos encapsulados y aplicaciones del polímero Eudragit® RS100. Adaptado bajo licencia CC de [153].

Agente bioactivo	Sistema de liberación	Aplicación	Ref.
Genisteína	Nanoemulsión lipídica	Se aumentó la penetración corneal hasta 3 veces.	[154]
Metformina HCl + Acarbosa	Tableta bicapa.	Se liberó el fármaco de manera controlada hasta 12h.	[155]
Verapamilo HCl	Tableta con recubrimiento polimérico.	El recubrimiento polimérico minimizó la liberación inicial repentina.	[156]
Terbinafina HCl	Nanopartículas de liberación controlada (gotas oculares).	Se aumentó el tiempo de vida media del fármaco y la biodisponibilidad ocular hasta 4 veces.	[157]
Lornoxicam	Parche transdermal	Se liberó el fármaco sostenidamente y se aumentó la biodisponibilidad.	[158]
Clotrimazol	Tableta vaginal formada por micropartículas bioadhesivas.	Se liberó el fármaco controladamente de forma localizada intravaginalmente.	[159]

### 1.5 Métodos de síntesis de sistemas poliméricos de liberación controlada.

Como se ha descrito, existen una gran variedad de materiales poliméricos a partir de los cuales se pueden diseñar sistemas de liberación controlada y/o localizada de agentes bioactivos. Los métodos de síntesis también son muy diversos por lo que, la elección del óptimo, dependerá del material de partida, del agente bioactivo y de la aplicación final. Algunas de las características de los materiales a tener en cuenta son: la solubilidad del material y del agente bioactivo, la estabilidad durante el proceso de síntesis del bioagente, el

tamaño del vector final, la biocompatibilidad, la biodegradabilidad y el perfil de liberación, entre otras [160].

### 1.5.1 Emulsión-evaporación del disolvente.

El proceso de emulsificación fue patentado por Vanderhoff et al. [161] en 1979. Se trata de un método de síntesis de nano y micropartículas en las que se encapsula un agente de naturaleza hidrófila o hidrófoba [162]. Debido a esta versatilidad es un método de síntesis de vectores poliméricos ampliamente investigada.

Brevemente, se basa en la formación de una emulsión entre una disolución del polímero en un disolvente volátil con otra fase acuosa, siendo ambas fases inmiscibles. Dependiendo de solubilidad de cada uno de los componentes se pueden diferenciar emulsiones simples en un solo paso (aceite en agua o/w, agua en aceite, w/o): cuando polímero y bioagente comparten disolvente, o emulsiones dobles en dos pasos (aceite en agua en aceite, o/w/o, agua en aceite en agua, w/o/w): cuando polímero y bioagente no comparten disolvente [163]. Además, para la estabilidad de la emulsión se precisa la acción de un emulsionante o surfactante que será añadido en la fase en la que sea soluble [164]. Tras la emulsión de las fases, el disolvente es evaporado, precipitando el polímero en un disolvente en el que no es soluble y estabilizando la emulsión.

Dependiendo de la energía aplicada en la emulsión, de la cantidad de polímero, de bioagente, de los disolventes, de los surfactantes y del método de evaporación utilizados se obtienen vectores de diferente morfología y tamaño [165]. En la Figura 1.14-a se presenta de manera esquemática el proceso de síntesis mediante emulsión-evaporación del disolvente.

En la literatura se reportan numerosos polímeros en los que se ha implementado dicha técnica. Entre los más utilizados en la actualidad se encuentran el polímero PLGA [166], PLA [167], PCL [168] o los de la familia Eudragit® [169]. Además, también se encuentran reportados numerosos bioagentes encapsulados en estos sistemas de liberación como fármacos hidrófilos [170], hidrófobos [171], proteínas [172] o plásmidos [173], entre otros.

### 1.5.2 Gelificación ionotrópica.

Se trata de un método de síntesis únicamente para biopolímeros con grupos cargados electrostáticamente y sin necesidad de disolventes orgánicos, ya que puede llevarse a cabo únicamente en condiciones acuosas. Es por esto, que la técnica de síntesis se centra especialmente en polímeros como quitosano o alginato, para los cuales, al interactuar con un agente con carga opuesta, se da la reticulación y formación de partículas [174].

Calvo et al. [175] desarrollaron el método de gelificación ionotrópica para sintetizar partículas de quitosano, polímero con un grupo amina positivo. Una fase acuosa polimérica con carga positiva y una segunda fase acuosa polianiónica de tripolifosfato (TPP)

interaccionan electrostáticamente produciendo coacervados y formando partículas mediante la adición gota a gota de la segunda fase sobre la primera con agitación mecánica continua. Los factores que pueden influir en el producto de síntesis son la concentración polimérica, la del agente reticulante o el valor de pH de la disolución [176]. En la Figura 1.14-b se presenta de manera esquemática el proceso de síntesis mediante gelificación ionotrópica.

Se ha investigado ampliamente en la síntesis de nanopartículas de quitosano. Al tratarse de un método suave y rápido, se han encapsulando numerosos bioagentes, tales como: ARN [177], oligonucleótidos [178], proteínas [179] o fármacos [180].

### 1.5.3 Nanoprecipitación.

El proceso de síntesis por nanoprecipitación, también denominado método de desplazamiento del disolvente o de deposición interfacial, fue desarrollado por Fessi et al. [181], basándose en el efecto Marangoni [182]. En este método, se sintetizan nanopartículas mediante un solo paso. El biopolímero, disuelto en un disolvente orgánico, se añade gota a gota sobre una fase acuosa, con la que es disolvente del polímero es miscible, precipitando las partículas poliméricas en suspensión coloidal instantáneamente.

Se trata de un método de síntesis fácil y rápido, cuyos disolventes más comunes son etanol o acetona, lo que hace que sea menos tóxico, además de que las necesidades energéticas requeridas son mínimas [183]. Entre los parámetros influyentes en el procedimiento de síntesis se encuentran: la velocidad de adición de una fase sobre la otra, la tasa de agitación, la relación entre ambas fases o el disolvente utilizado [184]. En la Figura 1.14-c se presenta de manera esquemática el proceso de síntesis mediante nanoprecipitación.

El método ha sido implementado más ampliamente en la encapsulación de moléculas hidrófobas [185], en la que polímero y molécula se disuelven en la misma fase orgánica miscible en agua formándose las nanopartículas con las moléculas en su interior al entrar en contacto con la fase acuosa. Sin embargo, también se ha investigado sobre la encapsulación de moléculas hidrófilas mediante este método [186].

### 1.5.4 Técnicas electrohidrodinámicas.

Mediante las técnicas electrohidrodinámicas se pueden sintetizar partículas y fibras aplicando grandes diferencias de voltaje. Brevemente, se basa en aplicar un elevado voltaje positivo a una aguja por la que se hace pasar la disolución polimérica que, debido a este potencial y una vez superada su tensión superficial formará un cono (cono de Taylor) atraído por el voltaje aplicado en el colector, sobre el que se recogerán, en estado sólido, las partículas o fibras sintetizadas [187]. En la Figura 1.14-d se presenta de manera esquemática el proceso de síntesis mediante las técnicas electrohidrodinámicas.

Se trata de una técnica muy utilizada en la síntesis de materiales para ingeniería de tejidos y en el desarrollo de sistemas de liberación controlada, debido a la gran versatilidad de bioagentes compatibles y a que la gran mayoría de biopolímeros pueden ser utilizados en dicha técnica [188]. Pueden ser encapsuladas moléculas hidrófilas o hidrófobas [189][190] en biopolímeros como PLGA [191], PCL [192], CS [193], alginato [194], PLA [195]; PMMA [196], Eudragit® E PO [197], Eudragit® L100 [198] y muchos más, en forma de fibras o partículas. Pero es una síntesis más compleja, ya que son muchos los factores que pueden influir en la síntesis y encapsulación de bioagentes, como las disoluciones poliméricas, la naturaleza del bioagente, el voltaje aplicado, el caudal, la temperatura, la humedad, y otros muchos [199].

### 1.5.5 *Salting out*.

Se trata de una variación del método de emulsión, basado en la separación del disolvente orgánico, miscible con el agua, de la fase acuosa por medio de interacciones electrolito-no electrolito, es decir, mediante el aumento de la fuerza iónica de la disolución por medio de sales. Brevemente, el polímero y la molécula a encapsular se disuelven en un disolvente orgánico miscible con el agua, como la acetona o el etanol. Dicha disolución se emulsiona con la fase acuosa que contiene un agente tensioactivo para estabilizar la emulsión y un alto contenido en sal [200]. Los electrolitos más utilizados en esta técnica son cloruro de magnesio, cloruro de calcio y acetato de magnesio [201]–[203]. En la Figura 1.14-e se presenta de manera esquemática el proceso de síntesis mediante *salting out*.

Aunque es una técnica menos utilizada, se encuentran reportadas un elevado número de síntesis optimizadas mediante esta técnica de síntesis empleando polímeros como celulosa [204], Eudragit® S100 [205] o PLGA [206].

### 1.5.6 Diálisis.

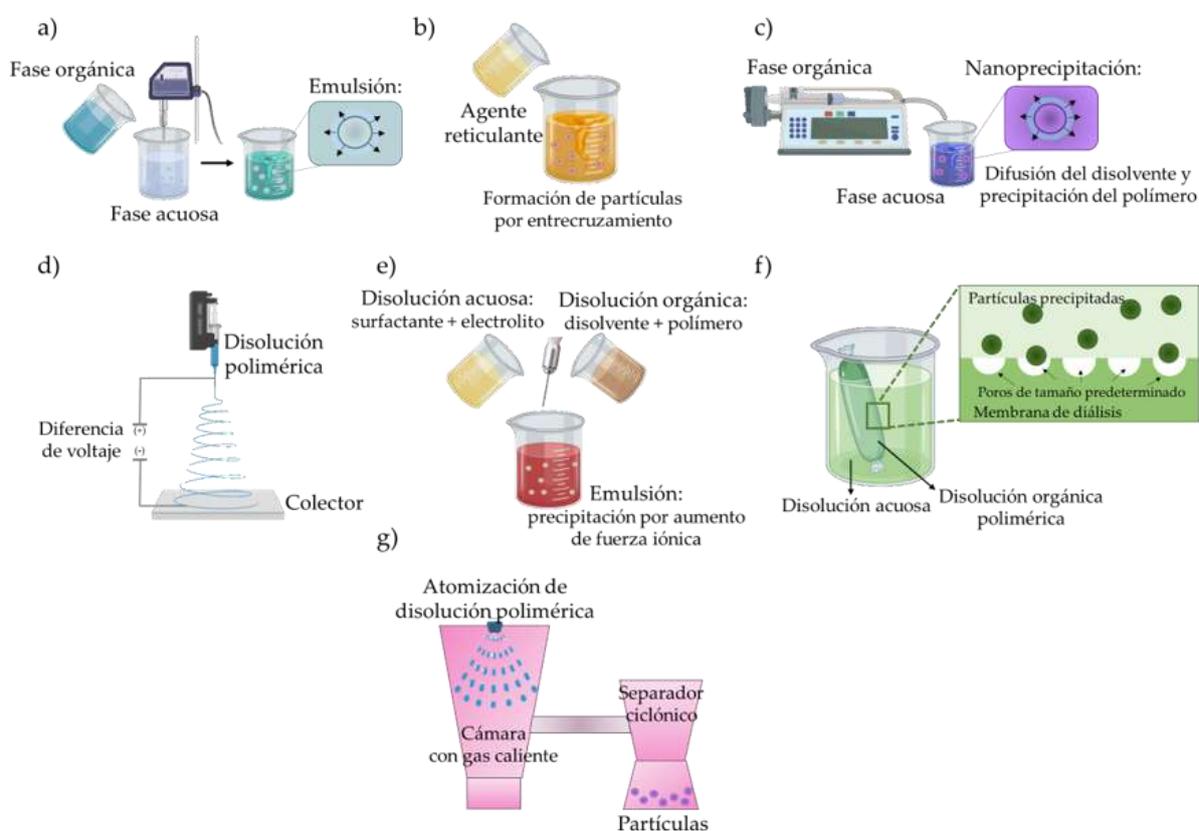
La técnica de diálisis es una técnica simple y efectiva para obtener vectores nanoparticulados con una distribución de tamaños estrecha. Se basa, brevemente, en la difusión de la fase orgánica, en la que se encuentra el polímero y el agente bioactivo disueltos, por una membrana de diálisis con un tamaño de poro determinado y la consecuente pérdida de solubilidad del polímero en la fase acuosa, el cual precipita en forma de partícula [207]. En la Figura 1.14-f se presenta de manera esquemática el proceso de síntesis mediante diálisis.

En literatura se encuentran trabajos basados en esta técnica para biopolímeros como PLA [208] o PLGA [209], entre otros. Pero, en la práctica, el fundamento de diálisis se encuentra con mayor frecuencia aplicado como técnica experimental de purificación de nanopartículas [210] o de determinación de las cinéticas de liberación [211].

### 1.5.7 *Spray-drying*.

La técnica de síntesis por *spray-drying* se basa en la atomización de un líquido en pequeñas gotas que, rápidamente, entran en contacto con gas seco a elevada temperatura para evaporar el disolvente y recoger el producto en estado sólido [212]. Para la encapsulación de bioagentes, se disuelve con el polímero y se atomizan conjuntamente, pudiendo partir de disoluciones acuosas u orgánicas indistintamente. El tamaño y la encapsulación final puede ser influenciada por numerosos factores como la presión de atomización, el flujo, la temperatura del gas o el proceso de recolecta del producto final (separador ciclónico, filtro, colector electrostático) [213]. Esta técnica tiene limitaciones debido a que el biopolímero y el bioagente deben de ser resistente a altas temperaturas [214]. En la Figura 1.14-g se presenta de manera esquemática el proceso de síntesis mediante *spray-drying*.

A través de la revisión de la literatura podemos encontrar que la técnica ha sido utilizada para la síntesis de partículas de PLGA [215], PCL [216], PLA [217]; CS [218] o de silicio [219], entre otros.



**Figura 1.14** Esquemas de los diferentes métodos de síntesis de sistemas poliméricos para la liberación controlada de agentes bioactivos: a) emulsión, b) gelificación ionotrópica, c) nanoprecipitación, d) técnicas electrohidrodinámicas, e) *salting out*, f) diálisis, g) *spray drying*.

## 1.6 Agentes bioactivos terapéuticos.

El reto en el desarrollo de sistemas de liberación de agentes bioactivos es conseguir una entrega del bioagente de manera eficaz, controlada y, a ser posible, localizada. Para que esto ocurra, los vectores de entrega deben de mejorar las propiedades de los bioagentes, cumpliendo una serie de requisitos como vectores de liberación, entre los que se encuentran [160]:

- mejorar la solubilidad del agente en el medio fisiológico presente en su lugar de acción.
- aumentar la biodisponibilidad del agente para aumentar el efecto o el tiempo de acción.
- reducir las dosis necesarias y, con ello, los posibles efectos tóxicos.
- alcanzar antes el efecto terapéutico.
- localizar y controlar la liberación del bioagente.
- protegerlo de la degradación enzimática, a causa del pH o evitar la fagocitosis.

Por todo ello, los agentes bioactivos que podemos incluir en estos sistemas de liberación son muchos. El desarrollo de un sistema de liberación localizada o controlada puede ser necesario para moléculas de baja solubilidad, bioagentes sensibles a degradación por pH o enzimática o para fármacos tóxicos o de rápida absorción. Algunas de estas aplicaciones para la entrega de agentes bioactivos se encuentran resumidas en la Tabla 1.7, entre los que podemos encontrar: proteínas, vitaminas u hormonas; material genético; fármacos hidrófobos; fármacos antitumorales o biomoléculas que necesitan mejoras en su vía de administración.

**Tabla 1.7** Ejemplos de sistemas de liberación controlada y/o localizada para diferentes biomoléculas: a) proteínas, vitaminas u hormonas, b) material genético, c) fármacos hidrófobos, d) fármacos antitumorales y e) mejoras de las vías de administración.

a) Proteínas, vitaminas u hormonas.			
Agente bioactivo	Sistema de liberación	Objetivo	Ref.
Catalasa	Partículas de polímero acrílico funcionalizadas con NPs de silicio.	Protección enzimática frente a procesos térmicos y de ambientes oxidativos y reutilización de la proteína.	[220]
BSA y lisozima	Partículas de PLGA	Aumentar el tiempo de vida media y la reducción de las dosis de proteínas terapéuticas.	[221]
Fosfatasa alcalina	Micropartículas de alginato.	Protección frente a pH ácido gástrico en su paso por el tracto digestivo.	[220]

b) Material genético (ADN, ARN, plásmidos).			
Agente bioactivo	Sistema de liberación	Objetivo	Ref.
Plásmido de ADN	Nanopartículas de PLGA.	Fagocitosis sin que el material genético sea afectado y conseguir la expresión del gen.	[173]
siARN	Nanopartículas PEG-PLA.	Liberación localizada en el interior celular evitando endocitosis.	[222]
Oligo-nucleótido	Micropartículas de PLGA.	Desarrollo de un método de encapsulación que no altera la biomolécula.	[223]

c) Fármacos hidrófobos.			
Agente bioactivo	Sistema de liberación	Objetivo	Ref.
Indometacina	Liposomas recubiertos por hidroxiapatita.	Liberación controlada en medio fisiológico y dependiente del pH en función del recubrimiento	[224]
Dexametasona	Nanopartículas de PLGA.	Biocompatibilidad del fármaco mejorada y liberación controlada.	[225]
Lapatiniv	Nanopartículas de quitosano-dextrano.	Biocompatibilidad del fármaco mejorada y liberación controlada.	[226]

d) Fármacos antitumorales.			
Agente bioactivo	Sistema de liberación	Objetivo	Ref.
9-nitro camptotecina	Nanopartículas de PLGA.	Liberación localizada en el interior del tumor, menor toxicidad.	[227]
Capecitabina	Nanopartículas de PLGA recubiertas de Eudragit® S100.	Liberación localizada en el colon por el efecto mucoadhesivo del recubrimiento acrílico.	[169]
Doxorrubicina	Nanopartículas de quitosano.	Liberación en el interior de las células con posibilidad de funcionalización.	[227]

e) Biomoléculas con necesidad de mejorar su vía de administración.			
Agente bioactivo	Sistema de liberación	Objetivo	Ref.
Insulina	Nanopartículas de quitosano.	Sistema de liberación de insulina sensible al pH para administración oral.	[228]
	Hidrogel de PMMA.	Sistema de liberación que protege de la actividad enzimática para la administración oral de insulina	[229]
	Complejo de ciclodextrinas en hidrogel de PMMA:	Sistema de liberación para la administración oral de insulina	[230]

### 1.7 Enfoque y objetivos del trabajo.

Los sistemas de liberación controlada y localizada poliméricos de agentes bioactivos se diseñan con el objeto de modificar la velocidad y la localización de la liberación de la sustancia activa, mejorando las propiedades de la forma farmacéutica convencional administrada por la misma vía. Para ello, las investigaciones biomédicas más recientes han sido capaces de desarrollar nuevos polímeros inteligentes y modificables para ofrecer especificidad de localización. Ese es el caso de polímeros con cargas positivas superficiales, que los hacen específicos de dianas mucosas como las que se encuentran en el tracto digestivo, urogenital, respiratorio. De esta forma se evita el consumo excesivo de agentes terapéuticos y disminuyen los posibles efectos secundarios producidos por las elevadas dosis. Para desarrollar estos sistemas de liberación controlada, existen una gran diversidad de técnicas de síntesis de vectores poliméricos con numerosos parámetros influyentes en el resultado final que van a ser también dependientes del material de partida y del bioagente que se requiera incorporar. Por ello, a pesar de todos los avances relacionados con el diseño de sistemas de liberación en la actualidad, es necesario un total conocimiento del comportamiento de un material en cada tipo de síntesis, con la finalidad de poder controlar las propiedades finales del vector desarrollado. Además, el bioagente a incorporar debe mantener su integridad para poder ejercer su función una vez administrado sin ningún tipo de modificación. Así mismo, estas propiedades finales del vector y de la biomolécula incluida en su interior, influirán en su biodistribución, en su perfil de liberación o en su actividad una vez administrado. Por lo tanto, resulta de gran interés poder disponer del vector necesario para la aplicación biomédica

Por ello, el objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral, es desarrollar un estudio exhaustivo de las variables y de las influencias de diferentes técnicas de síntesis sobre el desarrollo de vectores de liberación controlada de agentes bioactivos basados en el polímero inteligente comercial Eudragit® RS100. Se trata de un polímero biocompatible, mucoadhesivo (debido a que en su estructura molecular presenta grupos amonios cuaternarios cargados positivamente), insoluble e impermeable, que no sufre ningún tipo de modificación estructural dependiente de pH y cuya liberación se da de forma prolongada en el tiempo. Es un polímero diseñado para la administración oral, que ha sido aplicado en la formación de películas que recubren los fármacos a administrar. Por lo tanto, la generación de nuevos vectores basados en este polímero acrílico supone un reto. El objetivo perseguido es sintetizar vectores de diferentes morfologías, en cuanto a forma y tamaño, con el objetivo de permitir un mayor tiempo de residencia de los bioagentes liberados en las mucosas controlando las dosis necesarias para la acción terapéutica, de forma que se aumente la eficacia del bioagente, permitiendo reducir el número y las concentraciones de dosis, disminuyendo notablemente el consumo y los efectos secundarios de los agentes terapéuticos.

Además, en cada uno de los vectores diseñados, se propone la encapsulación de diferentes agentes bioactivos. El factor común de los bioagentes que se proponen es que son

susceptibles a modificaciones estructurales tras su administración oral, la cual es la más estudiada en la actualidad debido a la comodidad que proporciona al paciente. Estas modificaciones estructurales conducen a pérdidas o cambios en la actividad terapéutica del agente. Por lo tanto, la protección y la conservación de la integridad estructural de cada una de estos bioagentes van a ser objetivo de estudio.

Por lo tanto, los objetivos perseguidos en el desarrollo de esta Tesis Doctoral son: la síntesis de vectores microparticulados, nanoparticulados y producción de membradas basadas en fibras poliméricas en los que se van a encapsular agentes como bacterias modelo (*E. coli* y *L. acidophilus*) para la administración terapéutica de probióticos por vía oral, proteínas modelo (BSA y HRP) para la administración oral de proteínas terapéuticas y antibióticos (rifampicina y ciprofloxacino) de solubilidad limitada en el medio fisiológico y sensibles a condiciones ácidas, para su administración oral y transdermal. La caracterización de los productos obtenidos y de su actividad biológica permitirá analizar el éxito del proceso de encapsulación y protección del agente bioactivo. De esta forma, se evaluará la capacidad de modular la farmacocinética en función del vector formulado y del agente encapsulado.

En resumen, la motivación del presente trabajo de Tesis Doctoral es el diseño de sistemas de liberación controlada, para la administración a través de vías no invasivas, de diversos agentes bioactivos, tratando de optimizar el método y las condiciones de síntesis para maximizar y preservar la actividad terapéutica del agente bioactivo.

Para ello, esta Tesis Doctoral se ha estructurado en 5 capítulos que resumen y explican los resultados más importantes derivados de la labor científica desarrollada, los cuales se exponen a continuación:

**Capítulo I.** Revisión del estado del arte sobre los sistemas de liberación controlada y/o localizada y de las diferentes vías de administración.

**Capítulo II.** Diseño de sistemas de liberación controlada microparticulados mediante la técnica de emulsión-evaporación del disolvente. Encapsulación de bacterias probióticas y proteínas terapéuticas.

**Capítulo III.** Diseño de sistemas de liberación controlada nanoparticulados mediante la técnica de nanoprecipitación en discontinuo y aplicando la tecnología microfluídica. Estudio de los parámetros influyentes en la síntesis de nanopartículas y encapsulación de un antibiótico modelo hidrófobo.

**Capítulo IV.** Diseño de sistemas de liberación controlada nano y microparticulados, así como diseño de fibras, mediante técnicas electrohidrodinámicas. Estudios de los parámetros

## Capítulo I

influyentes en la síntesis de vectores y encapsulación de antibióticos modelo hidrófobo e hidrófilo.

**Capítulo V.** Comparativa de las propiedades intrínsecas de cada uno de ellos debido a las diferentes morfologías y conclusiones finales de los diferentes vectores desarrollados por las distintas técnicas de síntesis.

**Capítulo VI.** Conclusiones finales del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral.

## CAPITULO II.

### DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE como método de síntesis de micropartículas entéricas para la liberación de proteínas terapéuticas y probióticos.

El apartado 2.2 de este capítulo ha sido adaptado bajo los permisos pertinentes del artículo publicado:

Gracia, R., Yus, C., Mendoza, G., Irusta, S., Sebastian, V., ... Arruebo, M. (2018) *Enzyme structure and function protection from gastrointestinal degradation using enteric coatings*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 119, 413-422.

<http://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.143>

El apartado 2.3 de este capítulo ha sido adaptado bajo licencia CC del artículo publicado:

Yus, C., Gracia, R., Larrea, A., Andreu, V., Irusta, S., Sebastian, V., ... Arruebo, M. (2019) *Targeted release of probiotics from enteric microparticulated formulation*. *Polymers*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/polym11101668>



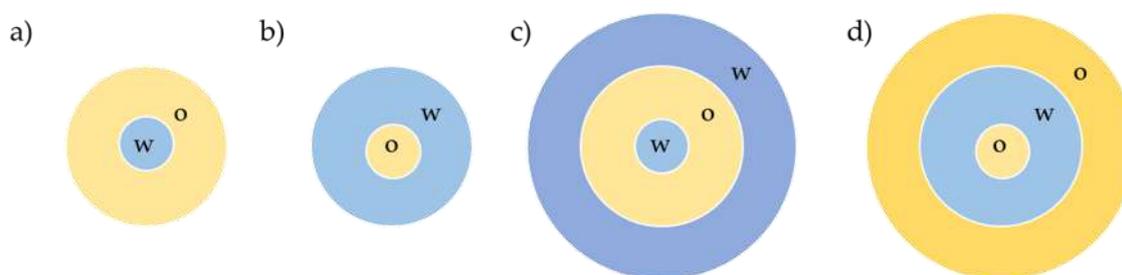
## 2.1 Introducción.

### 2.1.1 Encapsulación por emulsión.

Este capítulo se centra en el método de síntesis de micropartículas poliméricas mediante la técnica de emulsión-evaporación del disolvente para la encapsulación de proteínas terapéuticas y bacterias probióticas.

Esta técnica de síntesis se basa en la formación de, al menos, una emulsión. Emulsión se define como un sistema de dos fases líquidas inmiscibles en el que una fase se encuentra dispersa en pequeñas gotas esféricas en la otra fase. La geometría esférica está originada como respuesta termodinámica para minimizar la energía superficial del sistema. La energía necesaria para la formación de una emulsión se puede suministrar gracias a una fuente externa de energía proveniente de un homogeneizador, sonicador o agitación intensa, y en presencia de un agente tensioactivo como estabilizante. Por lo tanto, la característica fisicoquímica clave en este método es la inmiscibilidad de las fases. La fase líquida que forma las pequeñas gotas esféricas recibe el nombre de “fase interna” o “fase discontinua”, mientras que la fase en la que se dispersan las gotas recibe el nombre de “fase externa” o “fase continua” [231].

La síntesis de micropartículas mediante esta técnica es un proceso ampliamente estudiado [232]–[234]. En la actualidad existen diversas variaciones de dicha técnica, dependiendo de las fases interna y externa, según la sustancia que se vaya a encapsular y la matriz polimérica. Entre ellas encontramos: a) emulsión simple agua en aceite (w/o), b) emulsión simple aceite en agua (o/w), c) emulsión doble agua-en-aceite-en-agua (w/o/w), d) emulsión doble aceite-en-agua-en-aceite (o/w/o) o, e) si la sustancia a encapsular es un sólido, emulsión doble sólido-en-aceite-en-agua (s/o/w) [165], [235], [236]. En la Figura 2.1 se encuentran esquemáticamente presentadas las principales variaciones del método de emulsión.



**Figura 2.1** Esquema de las principales variaciones del método de síntesis de micropartículas emulsión-evaporación del solvente: a) emulsión simple agua-en-aceite (w/o), b) emulsión simple aceite-en-agua (o/w), c) emulsión doble agua-en-aceite-en-agua (w/o/w) y d) emulsión doble aceite-en-agua-en-aceite (o/w/o). En todas ellas se representa la fase orgánica en amarillo y la acuosa en azul.

Por lo tanto, se trata de un método de síntesis muy versátil, que se puede aplicar en la encapsulación de agentes bioactivos tanto hidrófilos [237] como hidrófobos [238]. Las distribuciones de tamaño medias de las micropartículas obtenidas suelen ser superiores a 1  $\mu\text{m}$ , lo cual es favorable para la administración oral de proteínas o bacterias terapéuticas. Con vectores micrométricos aumenta el tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal ya que, en comparación con la elevada proporción volumen-superficie de contacto de los sistemas nanométricos, la probabilidad de ser absorbidos por la mucosa y pasar al torrente sanguíneo es mucho más reducida [239]. Además, las eficiencias de encapsulación de agentes bioactivos en micropartículas mediante esta metodología de síntesis suelen ser superiores al 70% [240]–[242], lo cual es favorable a la hora de encapsular agentes de elevado precio en el mercado relacionado con la biomedicina como son, por ejemplo, las proteínas terapéuticas.

Sin embargo, el proceso de emulsión-encapsulación puede resultar un proceso complejo de optimizar, debido a las variables que pueden interferir en el resultado final en cuanto a tamaño y propiedades de las partículas. Algunos de estos parámetros influyentes son: los disolventes orgánicos utilizados, la naturaleza y concentración de polímero la naturaleza y la concentración del surfactante, la naturaleza y concentración del agente bioactivo, la cantidad de energía aplicada al sistema de emulsión o el proceso de evaporación del disolvente, entre otros [243]–[246].

En esta Tesis Doctoral se consideró más conveniente centrarse en el método de síntesis de doble emulsión agua-en-aceite-en-agua (w/o/w) y una variante del mismo que desarrollaremos más adelante. Se seleccionó esta técnica debido a la naturaleza lipófila del polímero, la naturaleza hidrófila de los agentes encapsulados en este capítulo y, por último, debido a la estabilidad de las partículas sintetizadas en el sitio de acción, es decir, en medio acuoso.

### 2.1.1.1 Emulsión doble.

La metodología de doble emulsión comenzó a estudiarse alrededor de los años 20 del siglo XX [247], aunque no fue hasta los años 80 del siglo XX cuando se profundizó en el gran potencial de la técnica como método de encapsulación de moléculas tanto hidrófobas como hidrófilas [248]–[251]. Actualmente, la también llamada emulsión de emulsión, se trata de una de las más aplicadas en la síntesis de partículas poliméricas [233]. Existen dos variantes de doble emulsión: cuando el agente a encapsular es hidrófobo se desarrolla una emulsión o/w/o, mientras que cuando es hidrófilo se desarrolla una emulsión w/o/w. Esta última será la que se estudie un poco más en profundidad a continuación.

El proceso típico de doble emulsión consta de cuatro etapas [252][253]:

- 1) Primera emulsión: Una disolución acuosa en la que se encuentra disperso el agente bioactivo (fase acuosa interna,  $w_1$ ) se emulsiona con una disolución orgánica (fase orgánica, o) en la que se encuentra disuelto el polímero en un disolvente con baja

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

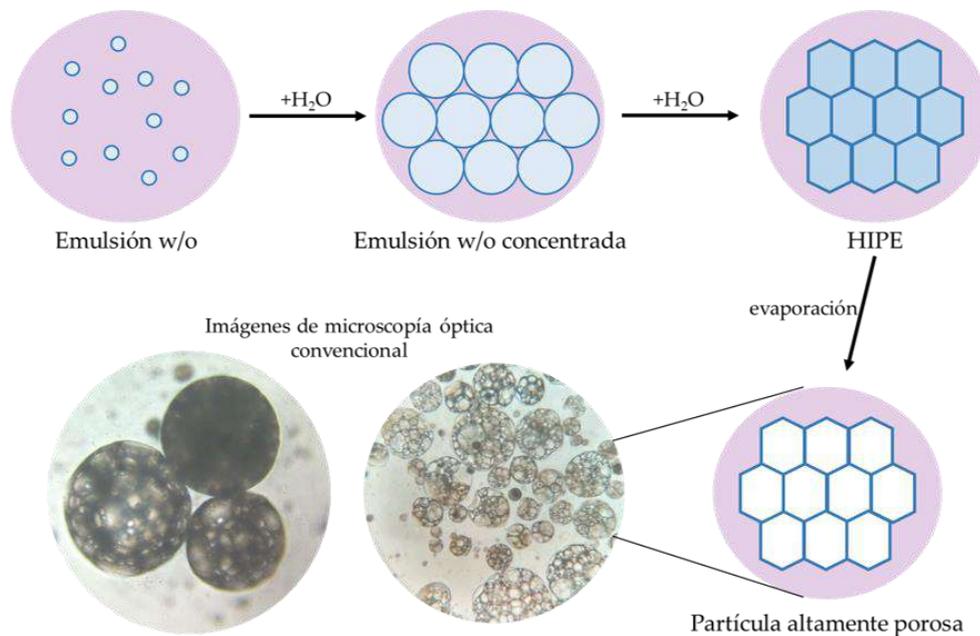
temperatura de ebullición ( $< 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), para facilitar su posterior eliminación. Esta primera emulsión se estabiliza gracias a la acción de un agente tensioactivo.

- 2) Segunda emulsión: la emulsión primaria ( $w_1/o$ ) se emulsiona con una segunda fase acuosa (fase acuosa externa,  $w_2$ ) para formar la doble emulsión ( $w_1/o/w_2$ ). La segunda emulsión también precisa de estabilización mediante la acción de un surfactante.
- 3) Evaporación del disolvente: se trata de la fase en la que se elimina el disolvente orgánico mediante la evaporación o extracción del mismo, formándose así las partículas sólidas debido a la precipitación del polímero insoluble en la fase acuosa. Normalmente, como los disolventes tienen baja temperatura de ebullición, basta con agitar moderadamente la emulsión a temperatura ambiente para conseguir la evaporación total del disolvente.
- 4) Purificación: se trata del proceso de lavado de las partículas obtenidas para eliminar polímero que no ha emulsificado y restos de agente tensioactivo libre que queda sin estabilizar la emulsión. Se pueden purificar mediante centrifugación, filtración, diálisis o por sedimentación y reemplazamientos del medio, dependiendo del material y del tamaño del vector obtenido.

Esta técnica ha sido la utilizada para la encapsulación de proteínas modelo. Se eligió dicha variante porque el agente bioactivo a encapsular se podía dispersar fácilmente en agua mientras que el polímero Eudragit® RS100 es soluble en disolventes orgánicos como el diclorometano (DCM), cloroformo o acetona.

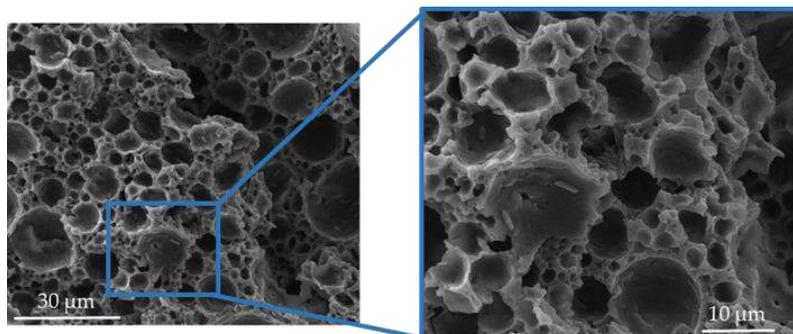
### 2.1.1.2 Emulsión doble de elevada fase interna (HIPE).

Una HIPE se define como una emulsión que contiene más del 74% de volumen de fase interna [254]. Este volumen es el límite máximo que favorece geoméricamente la obtención de partículas monodispersas esféricas, es el valor crítico para el empaquetamiento de esferas uniformes. A partir de este punto, las esferas se deforman, dejando de ser esféricas, haciendo que la fase dispersa forme gotas poliédricas separadas por una fina película de fase continua. Esta geometría hace que la emulsión que se forma presente una microestructura semejante a espuma con una gran variedad de formas poliédricas, lo que genera unas partículas polidespersas y altamente porosas [255]. A modo de resumen, en la Figura 2.2, se esquematiza esta formación de partículas y su diferencia con la doble emulsión explicada en el apartado anterior.



**Figura 2.2** Esquema adaptado de Cameron N.R et al. (1996) [256] de la formación de partículas altamente porosas mediante una HIPE. Imagen de microscopía óptica de las partículas sintetizadas en este trabajo.

Esta variante de doble emulsión consta de las mismas cuatro etapas descritas anteriormente, y de los mismos principios básicos de todas las emulsiones: las inmiscibilidades de los disolventes de las distintas fases y la necesidad de utilizar surfactantes estabilizantes. Hay estudios que demuestran que la naturaleza de la fase orgánica influye directamente sobre la formación de la emulsión, siendo los disolventes más hidrófobos los que forman emulsiones más estables [256]. En función de la composición de la emulsión se pueden controlar los parámetros de los materiales porosos, como el diámetro de los poros, pudiendo alcanzar la fracción vacía hasta un 0.99, la interconexión entre ellos o el área superficial [257]. En las imágenes de la Figura 2.3 se muestra un ejemplo de las partículas empleadas para la encapsulación de bacterias probióticas en las que se observan numerosos poros que no se encuentran interconectados



**Figura 2.3** Micrografías de SEM de la superficie de las partículas sintetizadas mediante HIPE.

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

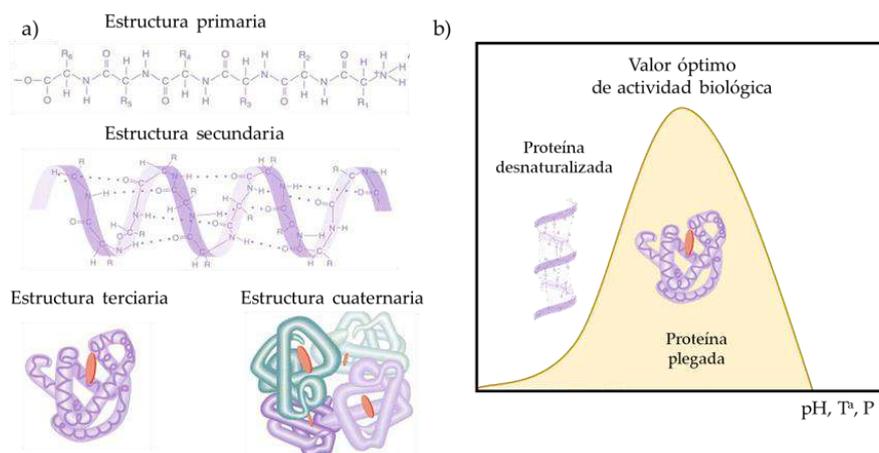
En literatura se encuentran aplicaciones de esas emulsiones de elevada fase interna (HIPE) como plantillas para la síntesis de materiales con una elevada porosidad que reciben el nombre de PolyHIPES [258] para áreas como la química orgánica y catalítica, alimentación, cultivos celulares, ingeniería de tejidos o liberación controlada [259].

Se ha aplicado esta variación de la técnica de doble emulsión-evaporación del disolvente para encapsular las bacterias probióticas modelo en micropartículas del polímero Eudragit® RS100. Se ha elegido dicha técnica debido a la necesidad de reducir lo máximo posible el contacto entre la fase acuosa, en la que se encontraba los microorganismos vivos, y la fase orgánica, que comprometía la supervivencia de los mismos.

### 2.1.2 Proteínas terapéuticas.

Las proteínas son moléculas complejas que constan de una cadena de unidades monoméricas, los aminoácidos. Según los aminoácidos que las componen, se crean interacciones entre ellos de forma que la proteína adquiere un plegamiento característico que definirá su estructura primaria. Cuando entre los aminoácidos plegados se forman puentes de hidrógeno se define la estructura secundaria de la cadena peptídica. Esta estructura puede ser de diferentes tipos: hélice- $\alpha$ , lámina- $\beta$ , giro, o aleatoria, entre otras. A la estructura tridimensional de los átomos que componen la proteína se denomina estructura terciaria. A veces, si se ensamblan con otras cadenas polipeptídicas, adquieren una estructura cuaternaria. Este plegamiento es importante por su relación directa con la actividad específica de la proteína [260]. En la Figura 2.4-a se esquematiza el proceso de plegamiento proteico.

El plegamiento proteico es un proceso termodinámicamente favorecido, pero no es un proceso irreversible. Cuando el complejo proteico se encuentra bajo condiciones de estrés (pH, temperatura o presión), puede verse revertido (Figura 2.4-b), de forma que la proteína pierda su estructura terciaria y, con ella, su actividad biológica. Este proceso de pérdida de estructuras y, por lo tanto, de actividad, se denomina desnaturalización proteica [261].



**Figura 2.4** Esquema del plegamiento de una proteína adaptado de [262]. a) sucesión de estructuras del plegamiento proteico, b) gráfico de la desnaturalización de las proteínas según las condiciones de temperatura, pH o presión a las que se encuentren.

Tras la primera proteína aprobada para su administración terapéutica, la insulina en 1982, en las últimas décadas la FDA ha aprobado alrededor de 240 proteínas recombinantes y, actualmente, hay en el mercado cerca de 380 productos farmacéuticos basados en proteínas como anticuerpos monoclonales, vacunas, hormonas o enzimas [263]. En la Tabla 2.1 se listan algunas de esas proteínas recombinantes aprobadas para su administración con fines terapéuticos.

**Tabla 2.1** Lista de algunos ejemplos de fármacos basados en proteínas recombinantes con efectos terapéuticos aprobados por la FDA y, actualmente, en el mercado. Adaptada con permiso de [264].

Nombre comercial	Mecanismo	Clase	Categoría terapéutica
Ipilimumab	Anti-CTLA-4 humano	Anticuerpo	Melanoma
Elelyso	Taligucerasa $\alpha$	Enzima	Enfermedad de Gaucher
Voraxane	Glucarpidasa	Enzima	Toxicidad por metotrexano
Raxibacumab	Anti-ántrax humano	Anticuerpo	Ántrax
Rixubis	Factor IX recombinante	Factor de coagulación	Hemofilia B
Myalept	Metreleptina	Hormona	Desorden metabólico
Cyramza	Anti-VEGFR2 humano	Anticuerpo	Cáncer gástrico
Natpara	Hormona paratiroidea	Hormona	Hipoparatiroidismo
Darzalex	Anti-CD38 humano	Anticuerpo	Mieloma múltiple
Kanuma	Lipasa ácida lisosómica	Enzima	Deficiencia de lipasa

Estas proteínas terapéuticas generalmente se administran por vía intravenosa, intramuscular o subcutánea, aunque también se contempla la vía oral para su administración [265]. En comparación con las vías parenterales, la vía oral mejora la calidad de vida del

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

paciente por su comodidad de administración, además de que reduce los costes. Sin embargo, presenta inconvenientes como el paso por el tracto gastrointestinal, con valores de pH muy extremos, o el primer paso hepático, que metaboliza las sustancias administradas, reduciendo drásticamente su biodisponibilidad. Se han desarrollado varias técnicas para prolongar la estabilidad proteica en condiciones gastrointestinales como, por ejemplo, protegerlas con polímero unidos covalentemente, modificarlas genéticamente para evitar que se desnaturalicen y se hidrolicen en condiciones gástricas o protegerlas con recubrimientos entéricos [266].

La encapsulación de estas proteínas terapéuticas con materiales entéricos presenta claras ventajas como el almacenamiento, la vida útil, el manejo o la liberación dirigida y controlada. Además, como se ha mencionado, el pH influye directamente en la estructura y funcionalidad de las proteínas, debido al estado de ionización de los aminoácidos que la componen, por lo que supone una necesidad la vehiculización de estas proteínas terapéuticas administradas por vía oral [38][39]. Hasta la actualidad, los recubrimientos que se han utilizado de origen natural, son, entre otros, alginato o quitosano, y entre los de origen sintético encontramos celulosa o ácido metacrílico [269]–[271].

En este capítulo se demuestra la encapsulación de dos proteínas modelo utilizando un polímero sintético basado en derivados metacrílicos con la finalidad de preservar la estructura y funcionalidad de enzimas terapéuticas para su administración oral.

### 2.1.3 Probióticos.

Un probiótico se define como “un conjunto de microorganismos vivos que, al ser administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto fisiológico beneficioso sobre la salud del hospedador”, según se aceptó en 2002 por la Organización Mundial de la Salud (OMS) [272].

Para que los microorganismos vivos puedan administrarse como probióticos deben de cumplir una serie de características: deben de ser de origen humano y seguros para el consumo humano, lo que recibe el nombre de producto *GRAS* (*Generally Recognized as Safe*). Además, debe de resistir las condiciones ácidas gástricas debido a que la administración de los probióticos se produce por vía oral, y deben de poseer una buena adherencia al intestino, su lugar de acción [273].

Actualmente existen evidencias científicas de los efectos beneficiosos atribuidos a estos probióticos, siendo necesario destacar que dicho efecto dependerá del tipo de microorganismo y del hospedador que los consuma. Estos efectos, aunque se centran principalmente en el sistema gastrointestinal, pueden observarse también asociados al sistema inmune, cardiovascular o urogenital [274]. En la Tabla 2.2 se resumen algunos de estos efectos

terapéuticos asegurados mediante ensayos y estudios en animales y, algunos de ellos, en seres humanos.

**Tabla 2.2** Efectos de los probióticos documentados y comprobados en seres humanos y en animales y su mecanismo de acción. Tabla adaptada de [274] con permiso de Elsevier.

	Efecto beneficioso	Mecanismo
Documentados y comprobados en humanos.	Mejoras en el metabolismo de la lactosa [275].	- Lactosa metabolizada por los microorganismos. - Lisis bacteriana y liberación de proteína lactasa al lumen intestinal.
	Efectividad frente a cuadros diarreicos [276].	- Recuperación del equilibrio de la microbiota. - Competencia con patógenos exógenos. - Estimulación del sistema inmune.
Comprobados en modelos animales.	Propiedades anticarcinogénicas para el cáncer colorrectal [277].	- Disminución de la actividad genotóxica de productos químicos. - Regeneración de microbiota alterada o dañada. - Normalización de la permeabilidad intestinal.
	Efecto sobre la Enfermedad Inflamatoria Intestinal [278].	- Interacción con microbiota alterada. - Estimulación del sistema inmune antiinflamatorio.
	Estimulación del sistema inmune y efecto sobre las alergias [279].	- Aumento de la respuesta inmune específica. - Alergias relacionadas con la microbiota individual.
	Reducción de colesterol sérico [280].	- Bacterias probióticas capaces de desconjugar sales biliares mediante la producción de una enzima hidrolasa de sales biliares. - Reducción de colesterol sérico.
	Efecto sobre enfermedades urogenitales [281].	- Regeneración de la microbiota urogenital normal. - Competencia entre organismos autóctonos y patógenos.

Según el lugar de acción del probiótico y el efecto deseado, el microorganismo administrado será diferente ya que la flora microbiana difiere entre individuos y, en un mismo individuo, entre órganos [282]. Algunos de los microorganismos más empleados y estudiados para esta finalidad pertenecen al género *Bacillus*, aunque también se incluyen levaduras del género *Saccharomyces* y otras bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Dentro de

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

cada género de microorganismo probiótico se abre un abanico de diferentes especies y cepas, que se presentan en la Tabla 2.3, con distintos efectos según recoge la literatura.

**Tabla 2.3** Tabla resumen de los géneros, especies y cepas bacterianas con efectos probióticos demostrados más empleados. Tabla adaptada de [274] con permiso de Elsevier.

Género	Especie	Cepa	Efecto
Lactobacillus	acidophilus	La5	Disminuye la diarrea asociada a la administración de antibióticos[283].
	casei	Shirota	Acorta la diarrea asociada a Rotavirus [284]. Reduce la incidencia del cáncer de vejiga [285]. Modulación del sistema inmune [286].
	plantarum	299v	Alivio de los síntomas de la enfermedad inflamatoria intestinal [287].
	johnsonii	La1	Mejora la acción de vacunas orales [288]. Disminuye la colonización de <i>Helicobacter pylori</i> [289].
	reuteri	SD2112	Alivia la diarrea asociada a Rotavirus [290].
	rhamnosus	GG	Alivia la diarrea asociada a Rotavirus [291]. Activa el sistema inmune [292]. Tratamiento y prevención de la alergia [293]. Mejora de la enfermedad inflamatoria intestinal [294].
	salivarius	UCC118	Mejora de la enfermedad inflamatoria intestinal [295].
Bifidobacterium	breve		Mejora la enfermedad inflamatoria intestinal [296].
	lactis	Bb12	Tratamiento de la alergia [297]. Acorta la diarrea asociada a Rotavirus [298]. Mejora la acción de vacunas orales [288]. Disminuye la incidencia de 'diarrea del viajero' [299].
Escherichia	coli	Nisle 1917	Disminuye la aparición de la enfermedad inflamatoria intestinal [300].
Saccharomyces	cerevisiae	boulardii	Disminuye la aparición de episodios en la enfermedad inflamatoria intestinal [301].

Debido a las condiciones tan específicas requeridas y las condiciones drásticas de pH a las que deben sobrevivir los microorganismos para llegar intactos al intestino donde deben ser capaces de colonizar para ejercer el efecto terapéutico deseado, en esta Tesis Doctoral se ha

desarrollado un sistema avanzado para el suministro de probióticos por vía oral asegurando la viabilidad bacteriana. Este sistema se basa en la encapsulación de las bacterias probióticas modelo gram negativa, *E. coli* [302], y gram positiva, *L. acidophilus* [303], en micropartículas del polímero metacrílico entérico Eudragit® RS100.

## 2.2 Encapsulación de proteínas modelo para la administración enteral de proteínas terapéuticas.

### 2.2.1 Materiales y métodos.

#### 2.2.1.1 Materiales.

El polímero Eudragit® RS100 fue cedido por Evonik AG (Essen, Alemania). Los reactivos diclorometano, polivinil alcohol (PVA, HMW: 85000-124000 Da), trietilcitrate (TEC), albúmina sérica bovina (BSA, MW 66.5 kDa), albúmina sérica bovina-isotiocianato de fluoresceína (BSA-FITC), peroxidasa de rábano (HRP, 44 kDa), ácido acético e hidróxido de sodio se compraron en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania) y fueron utilizados tal y como se recibieron.

El fluido gástrico simulado (HCl 0.1 N + NaCl + H<sub>2</sub>O, pH = 1.2) y el fluido intestinal simulado (NaCl + Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O, pH = 6.8) se prepararon sin enzimas, siguiendo la norma US Farmacopea XXIII (1995).

#### 2.2.1.2 Optimización de la síntesis de micropartículas entéricas.

Se realizó la optimización de la síntesis mediante el método de doble emulsión-evaporación del disolvente para la obtención de micropartículas lo más homogéneas posible que encapsulasen la mayor cantidad de proteína modelo, para asegurar un mayor efecto terapéutico. Para ello se realizaron una serie de experimentos en los que se fueron variando los parámetros clave de la síntesis, tal y como se presenta en la Tabla 2.4.

**Tabla 2.4** Tabla resumen de las variables estudiadas en la optimización de la síntesis de micropartículas mediante el método de doble emulsión-evaporación del disolvente para la encapsulación de proteínas modelo.

Optimización del disolvente.					
Muestra	Polímero	mg	Disolvente	Surfactante	Fase interna
EM1	Eudragit® RS100	50	Etanol	Colato de sodio 1% (p/v)	1mL H <sub>2</sub> O milliQ
EM2			Acetato de etilo	PVA HMW* 1% (p/v)	
EM3			Diclorometano	PVA LMW** 1% (p/v)	

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

Optimización del surfactante.					
Muestra	Polímero	mg	Disolvente	Surfactante	Fase interna
EM4	Eudragit® RS100	50	Diclorometano	Colato de sodio 1% (p/v)	1 mL H <sub>2</sub> O milliQ
EM5				Pluronic F68	
EM6				PVA LMW* 1% (p/v)	
EM7				PVA HMW** 1% (p/v)	

\*HMW: High Molecular Weight (85-124 kDa)

\*\*LMW: Low Molecular Weight (31-50 kDa)

Optimización de la concentración de polímero.					
Muestra	Polímero	mg	Disolvente	Surfactante	Fase interna
EM8	Eudragit® RS100	25	Diclorometano	PVA HMW 1% (p/v)	1 mL H <sub>2</sub> O milliQ
EM9		50			
EM10		100			
EM11		150			
EM12		200			

Optimización de la evaporación del disolvente.					
Muestra	Polímero	mg	Disolvente	Evaporación	
EM13	Eudragit® RS100	100	Diclorometano	Rotavapor 35 °C, 30 min	
EM14				Sin agitación, T <sup>a</sup> ambiente, 3h	
EM15				Agitación magnética 600 rpm, 3h	

\*Síntesis realizadas con PVA HMW como surfactante y 1 mL H<sub>2</sub>O milliQ como fase interna.

Optimización de la proteína encapsulada.					
Muestra	Polímero	mg	Disolvente	Surfactante	Fase interna
EM16	Eudragit® RS100	100	Diclorometano	PVA HMW 1% (p/v)	BSA 0.5% (p/v)
EM17					BSA 1% (p/v)
EM18					BSA 5% (p/v)

\*Síntesis evaporadas con agitación magnética 600 rpm, durante 3 h.

### 2.2.1.3 Síntesis de micropartículas y encapsulación de proteínas modelo.

La encapsulación de proteínas modelo se llevó a cabo mediante el método de doble emulsión (w/o/w) evaporación del disolvente optimizado, basada en el trabajo descrito por V. Jain et R. Singh (2010) [304], siguiendo el esquema de la

Figura 2.6. La fase acuosa de la emulsión se componía de la proteína disuelta en agua milliQ, excepto para la síntesis de partículas vacías, que era tan sólo agua milliQ. Por lo tanto, para la encapsulación de la proteína se disolvieron 10 mg de la correspondiente biomolécula en 1 mL de agua milliQ, y se acidificó con ácido acético hasta alcanzar un pH de 4.3, con el

objeto de alcanzar un valor de pH que quedase por debajo del punto isoelectrico (pI) de la proteína (pI (BSA) = 4.7-5 [305] y pI (HRP) = 7.2-7.5 [306]) sin comprometer la estabilidad estructural de la misma. El punto isoelectrico es el valor de pH en el que la molécula tiene carga neutra, por debajo de este valor la molécula adquiere carga positiva, como se puede observar en la Figura 2.5.

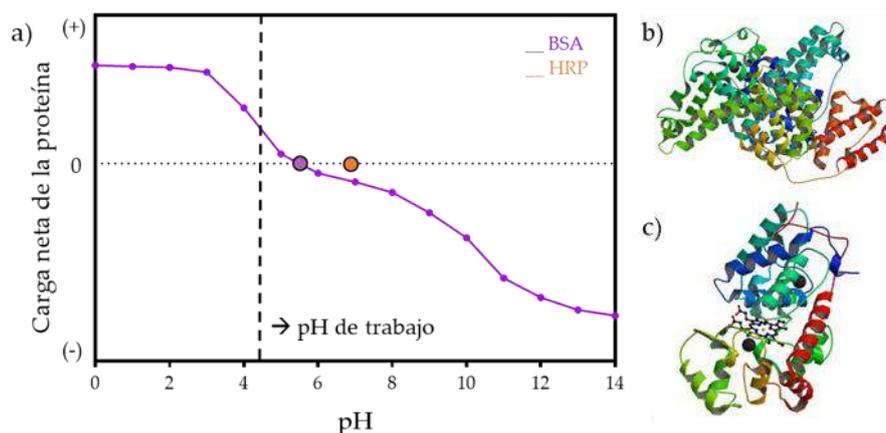


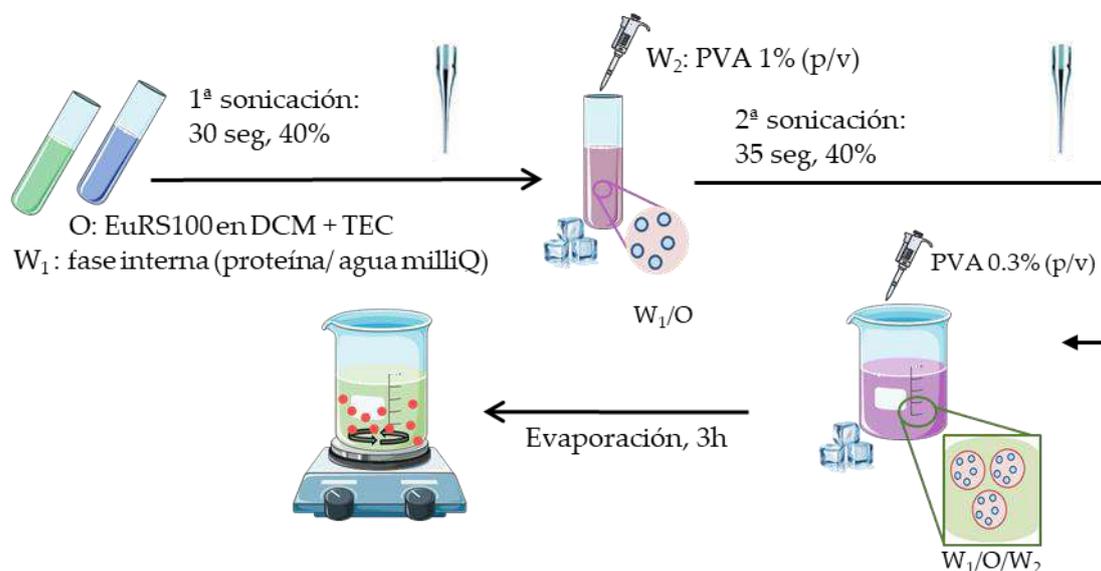
Figura 2.5 a) Gráfico esquemático que representa, de manera aproximada, la carga negativa de las proteínas a  $\text{pH} > \text{pI}$  y la carga positiva a  $\text{pH} < \text{pI}$  de las proteínas modelo BSA (morado) (Adaptada con permiso de [305]. Copyright (2004) American Chemical Society). y HRP (naranja). La línea discontinua representa el valor de pH de trabajo en esta síntesis. Modelos tridimensionales de las proteínas b) BSA y c) HRP [307].

Por esta razón se trabajó por debajo de ese valor, para tratar de evitar interacciones polímero-proteína previas a la encapsulación, estando polímero y proteína cargados positivamente. En el caso de la síntesis de las partículas vacías se añadió la misma cantidad de ácido acético a 1 mL de agua milliQ. La fase orgánica consistió en 100 mg de polímero EuRS100 disuelto en 2.5 mL de diclorometano con un 1% (p/v) de TEC como plastificante.

La primera emulsión se formó por sonicación, utilizando un Sonicador Banson Digital 450. Las condiciones de sonicación de esta primera etapa fueron 30 seg, amplitud 40% en baño de hielo a 4 °C. Rápidamente se estabilizó esta emulsión con una segunda emulsión con PVA disuelto en agua milliQ (2 mL de PVA 1% (p/v),  $\text{pH} = 4.3$ ). Las condiciones de esta segunda emulsión fueron 35 seg, amplitud 40% en baño de hielo a 4 °C. Por último, se añadieron 10 mL de una disolución de PVA 0.3% (p/v)  $\text{pH} 4.3$  para conseguir una estabilidad coloidal extra. El resultado de la doble emulsión se mantuvo en agitación a 600 rpm durante 3h hasta la completa evaporación del disolvente. Las micropartículas formadas se lavaron tres veces mediante decantación, sustituyendo el sobrenadante por agua milliQ. El sobrenadante de cada lavado se guardó para la posterior caracterización.

Se utilizó el mismo protocolo para la encapsulación de todas las proteínas modelo (BSA, BSA-FITC y HRP), modificando únicamente la fase interna.

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.



**Figura 2.6** Esquema del protocolo optimizado de la síntesis de micropartículas por método de doble emulsión- evaporación del disolvente para la encapsulación de proteínas modelo.

### 2.2.1.4 Caracterización de las micropartículas.

Para visualizar la morfología de las micropartículas sintetizadas se empleó un microscopio electrónico de barrido Inspect F50 (SEM), trabajando a 5-10 kV, siendo previamente recubiertas con Au/Pd con un recubridor de alto vacío (Leica EM ACE200, Wetzlar, Alemania), ya que las muestras deben ser conductoras para su correcta visualización.

Las distribuciones de tamaño se obtuvieron mediante un análisis estadístico, realizado con el software Origin (Origin Lab Corporation), de las imágenes de SEM, midiendo una media de N = 150 partículas con el software ImageJ (National Institutes of Health, USA).

La estabilidad de las partículas tras la incubación en los fluidos gastrointestinales se analizó también mediante la visualización de la morfología de las partículas por SEM.

El rendimiento de la síntesis se calculó mediante la relación entre la cantidad de producto seco obtenido y la cantidad total de todos los reactivos añadidos, mediante la Ecuación 2.1.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{mg partículas (secas)}}{\text{mg reactivos (polímero+proteína+PVA+TEC)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.1}$$

La cuantificación de la proteína total encapsulada se llevó a cabo mediante la detección colorimétrica del test del ácido bicinónico, BCA (Pierce™ BCA Protein Assay Kit de Thermo Fischer), en el que se reduce el Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>+</sup> en presencia de proteína y el ácido bicinónico reacciona con estos iones Cu<sup>+</sup> dando un complejo de color morado con absorbancia a 562 nm directamente proporcional a la cantidad total de proteína. Se produjo la ruptura mecánica de las micropartículas con tres ciclos con la sonda de ultrasonidos y se adicionó acetona fría (-20

°C), de tal manera que precipitó la proteína disuelta en el medio mientras que el polímero permanece en solución. Se centrifugó la suspensión en acetona 10 min a 10000 rpm y el pellet se dispersó en agua milliQ para su cuantificación. Se pusieron en contacto las muestras con el reactivo del test y se incubó durante 30 min a 37 °C en oscuridad. La absorbancia obtenida se midió en un lector de multiplacas (Multi-mode Synergy HT Microplate reader, Biotek, US) del servicio de Proteómica del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA) y la cantidad de proteína se calculó en referencia a una recta de calibrado realizada en cada ensayo en un amplio rango de 20 a 2000 µg/mL [308]. Cada medida se realizó por duplicado de tres síntesis de micropartículas independientes.

Se determinó la cantidad de proteína encapsulada de manera directa, mediante la eficiencia de encapsulación (EE, Ecuación 2.2) y la cantidad de carga (DL, Ecuación 2.3) rompiendo mecánicamente las partículas.

$$EE (\%) = \frac{\text{mg proteína encapsulados}}{\text{mg proteína iniciales}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.2}$$

$$DL (\text{mg/mg}) = \frac{\text{mg proteína encapsulados}}{\text{mg partículas totales}} \quad \text{Ecuación 2.3}$$

También se determinó la cantidad de proteína encapsulada de manera indirecta mediante la cuantificación de proteína en el sobrenadante, mediante la Ecuación 2.4 y la Ecuación 2.5:

$$EE (\%) = \frac{\text{mg proteína totales} - \text{mg proteína en sobrenadante}}{\text{mg proteína iniciales}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.4}$$

$$DL (\text{mg/mg}) = \frac{\text{mg proteína totales} - \text{mg proteína en sobrenadante}}{\text{mg partículas totales}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.5}$$

Se estudió la distribución de la proteína encapsulada dentro de las micropartículas mediante su visualización por microscopía óptica invertida (Microscopio invertido de Fluorescencia con lámparas metal-haluro, Olympus IX81) y por microscopía confocal (Microscopio Confocal Compacto Olympus FV10-i Oil Type), en el laboratorio de SCT de Microscopía óptica e Imagen del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS) en las instalaciones del CIBA, utilizando la fluorescencia del conjugado BSA-FITC (máximo de emisión 518 nm) como marcador [309].

### 2.2.1.5 Cuantificación de la liberación *in vitro* de proteínas en el tracto gastrointestinal y evaluación de la actividad

Se realizó el estudio *in vitro* de la liberación de las proteínas BSA y HRP. Las micropartículas se pusieron en contacto con el fluido gástrico simulado, incubándose a 37°C con agitación magnética durante 2h. Tras la incubación, las micropartículas se centrifugaron y dispersaron en fluido intestinal simulado y se mantuvieron a 37°C con agitación magnética durante 24h. A diversos intervalos de tiempo (1, 2, 3, 4 y 24h) se tomaron alícuotas de 1 mL, que se centrifugaron a 10000 rpm durante 10 min y recogiendo el sobrenadante y dispersando el pellet en medio fresco, reponiéndolo en el medio de liberación. La cantidad de proteína en las muestras recogidas se cuantificó mediante el test BCA, siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 2.2.1.3. Se analizaron un total de dos duplicados por muestra de tres síntesis independientes.

Se determinó la actividad biológica de la proteína HRP encapsulada, una vez liberada tras el proceso de digestión simulada *in vitro*, mediante el test ABTS (ácido 2,2'-azinobis [3-etilbenzotiazolín]-6-sulfónico) en presencia de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La proteína HRP, con actividad peroxidasa, reacciona con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generando especies reactivas de oxígeno que, a su vez, oxidan al reactivo ABTS formando el radical ABTS<sup>•+</sup>, que tiene coloración azul y máximos de absorbancia a 405 y 650 nm [310]. Con una previa calibración de la actividad de la proteína a diferentes concentraciones se evaluó si la proteína, una vez liberada, mantenía sus funciones enzimáticas intactas. Para ello, se utilizaron las alícuotas tomadas se diluyeron 10 veces hasta el rango apropiado de concentraciones del método (0-0.1 mg/mL) y se añadieron los reactivos ABTS (150 µL, 1M), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (v/v) (50 µL, 1 mM) y la reacción tuvo lugar durante 10 min a temperatura ambiente. Antes de determinar la absorbancia de las muestras en un lector de multiplacas (Multi-mode Synergy HT Microplate reader, Biotek, US) del servicio de Proteómica del Centro de Investigación Biomédica de Aragón (CIBA), la reacción se paralizó con la adición de dodecilsulfato sódico, SDS, 1% (p/v). Cada medida se realizó por duplicado de tres síntesis de micropartículas independientes.

### 2.2.1.6 Estudio de la integridad estructural de las proteínas en la encapsulación.

La existencia de algún cambio en la estructura proteica tras la encapsulación se estudió mediante tres técnicas espectroscópicas: espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopía dicroísmo circular (DC) y fluorimetría.

#### Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

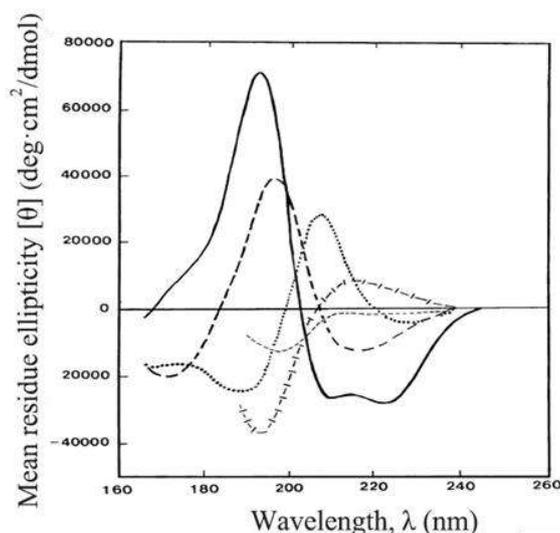
La necesidad de encapsulación de proteínas modelo con fin terapéutico para su administración por vía oral se estudió mediante FTIR. Se determinó la modificación de la estructura secundaria de la proteína libre BSA dispersa en agua, en su estado nativo, y dispersa

en fluido gástrico simulado. El espectro infrarrojo se analizó, mediante la descomposición de la banda denominada Amida I, para poder determinar la contribución de las diferentes estructuras secundarias (hélice- $\alpha$ , lámina- $\beta$  o aleatoria) en cada medio, según el método descrito por Abrosimova et al. [311].

Se llevó a cabo la medida de FTIR de la proteína en agua y en fluido gástrico simulado utilizando un espectrómetro de infrarrojos Bruker Vertex 70 equipado con un detector DTGS y un accesorio Golden Gate ATR de diamante. Se recogieron los espectros mediante el promedio 40 barridos desde 4000 hasta 600  $\text{cm}^{-1}$ . El tratamiento de los datos se realizó con el software OPUS de Bruker Optics. El espectro del agua milliQ se tomó como blanco.

### Espectroscopía de dicroísmo circular (DC).

La técnica de espectroscopía por DC resulta un excelente método para determinar la estructura secundaria de la proteína gracias a la absorción de luz en el ultravioleta lejano del enlace peptídico. Dependiendo de la estructura secundaria de la proteína (hélice- $\alpha$ , lámina- $\beta$  o aleatoria) presentará una señal característica de DC u otra, tal y como se observa en la Figura 2.7.



**Figura 2.7** Espectro DC UV lejano de varios tipos de estructuras secundarias proteicas adaptado de [312] con permiso de Elsevier: línea sólida-hélice- $\alpha$ , línea discontinua larga-lámina- $\beta$ , resto de líneas de puntos-estructuras con giros e irregulares.

En el espectro de la proteína BSA se observan, en su estado nativo, dos bandas negativas a 208 y 222 nm, características de una estructura hélice- $\alpha$ , siendo la predominante en esta proteína. Mediante la medida de DC se obtuvo información de la estructura secundaria de la proteína BSA antes y tras ser encapsulada. Así, se evaluó si el proceso de encapsulación modificaba dicha estructura proteica.

Los espectros de dicroísmo circular se obtuvieron tras romper mecánicamente las micropartículas y midiendo la proteína liberada en un espectropolarímetro Jasco 710 a 25 °C.

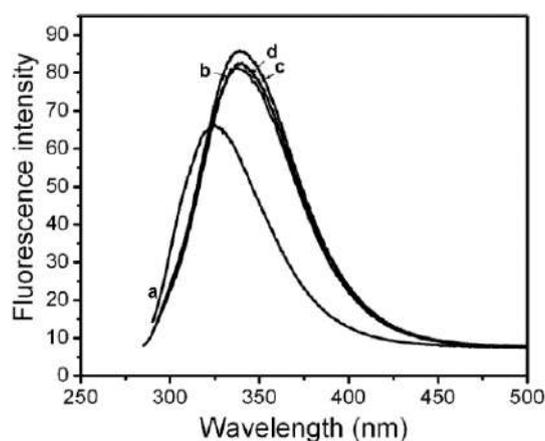
## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

Se midieron los espectros en el UV lejano (200-260 nm) en una celda de cuarzo de 1.0 cm de diámetro. Esta caracterización la llevó a cabo en el instituto I3A la Dra. Olga Abián.

### Fluorimetría.

Mediante la medida de fluorescencia se obtuvo información del estado conformacional de la proteína y de su grado de desnaturalización. Las proteínas que incluyen aminoácidos aromáticos en su composición como tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe) y, en mayor medida, triptófano (Trp), presentan lo que se denomina fluorescencia intrínseca. La  $\lambda_{\text{máx}}$  absorción del triptófano se encuentra en torno a los 280 nm, mientras que la  $\lambda_{\text{máx}}$  de emisión puede encontrarse desde 300 a 350 nm [313]. Tal y como reportó Peters T. (1985) [314], la proteína BSA contiene dos residuos triptófano en su estructura molecular: Trp-212, localizado en el interior hidrófobo de la proteína y Trp-134, en la superficie. Por otro lado, la integridad estructural de la proteína HRP también se estudió. Según secuenció Welinder K.G (1978) [315] la fluorescencia intrínseca de esta proteína se encuentra localizada en el residuo Trp-117, que está en el interior hidrófobo del plegamiento de la proteína.

Tal y como puede observarse en la Figura 2.8, mediante esta técnica se puede analizar el efecto del pH sobre la conformación de las proteínas, por lo que se evaluó si habían sufrido alguna modificación estructural, debido al brusco cambio de pH, al simular un proceso de digestión *in vitro*, tras su paso por el fluido gástrico simulado y si mantenía su conformación estructural una vez liberada de la micropartícula en fluido intestinal. Las muestras se midieron en un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian-Agilent Technologies, Santa Clara, CA), utilizando una longitud de onda de excitación de 280 nm. Se midieron los espectros de emisión de 300 a 400 nm a 25 °C en una celda de cuarzo de 1.0 cm de diámetro. Esta caracterización también la llevo a cabo la Dra. Olga Abián.



**Figura 2.8** Espectro de fluorescencia de la proteína BSA adaptado de [316] a diferentes valores de pH: a) pH 2, b) pH 5, c) pH 6 y d) pH 9.

### 2.2.1.7 Ensayo de viabilidad celular *in vitro*.

Las células Caco2 TC7 fueron cedidas por la Dra. M.J. Rodríguez Yoldi. Se cultivaron a 37 °C en condiciones de hipoxia (5% CO<sub>2</sub>/95% atmósfera de aire) y humedad constante en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM con glutamina estable, Biowest, Nuaille, Francia) suplementado con suero fetal bovino (FBS, 10% (v/v), Thermo Fischer Scientific, MA, USA), previamente inactivado por calor (56 °C, 30 min), y una mezcla de antibióticos y antimicóticos (PSA, 60 µg/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de anfotericina B, Biowest, Nuaille, Francia).

Para evaluar el efecto citotóxico de las micropartículas de Eudragit® RS100, se sembraron en una placa de 96 pocillos a una densidad de  $1.5 \times 10^4$  células/pocillo en 100 µL de medio de cultivo. Se dejaron adherir y proliferar hasta alcanzar una confluencia de 100%. En este punto, se agregaron las micropartículas a diferentes concentraciones en un rango de 0.5 a 20 mg/mL y se dejaron en incubación a 37 °C durante 24 h. Tras este periodo de tiempo, las células se lavaron dos veces con una solución tamponada con fosfatos de Dulbecco (DPBS, Biowest) y se cuantificó la viabilidad celular tras el tratamiento con las micropartículas con el kit Blue Cell Viability (Abnova GmbH, Taipéi, Taiwán) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Este método está basado en el reactivo resazurina que, una vez reducido por el metabolismo de las células vivas, produce un producto fluorescente, la resorufina, que puede ser cuantificado mediante la mitad de la intensidad de fluorescencia [317]. Por lo tanto, el reactivo Cell-Quanti Blue se diluyó al 10% (v/v) en medio de cultivo completo y se añadieron 100 µL a cada pocillo, dejándolo actuar durante 4h. Trascurrido el tiempo de reacción, se midió la fluorescencia del medio en un lector de multiplacas (Multi-mode Synergy HT Microplate reader, Biotek, US), con longitud de onda de excitación de 530 nm y de emisión de 590 nm. La viabilidad celular se expresó como porcentaje relativo al total de células vivas en contacto con las micropartículas respecto al total de células vivas del control sin tratamiento. Los datos fueron obtenidos de un total de tres experimentos independientes con un promedio de cuatro réplicas por experimento.

## 2.2.2 Resultados y discusión.

### Optimización de la síntesis de micropartículas entéricas.

En el proceso de optimización se fueron modificando diferentes parámetros influyentes en la síntesis por doble emulsión, tal y como se han descrito en la anterior Tabla 2.4, hasta que se dieron con las condiciones más favorables para la obtención de partículas estables, lo más homogéneas posibles y no porosas.

En la Figura A2.1 se adjuntan las imágenes de microscopía electrónica de barrido del proceso descrito de optimización. Respecto a los disolventes (Figura A2.1-EM1-3), el etanol fue descartado por la escasa solubilidad del polímero en dicho disolvente, mientras que el acetato

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

de etilo no produjo emulsiones estables, ya que en el proceso de evaporación las partículas se rompían. El disolvente adecuado resultó ser el DCM. En cuanto a la selección del surfactante adecuado, se descartó el colato de sodio al tratarse de un surfactante iónico cargado negativamente que interacciona con la carga positiva del polímero haciéndolo precipitar. El PVA (LMW) y el Pluronic F68 no consiguieron una estabilización eficiente de las micropartículas rompiéndose éstas en su manipulación. El único surfactante que ofreció como producto final unas partículas estables fue el PVA (HMW) (EM7). Respecto a la cantidad de polímero utilizado, se determinó que 100 mg era la cantidad idónea ya que a más bajas cantidades de polímero observábamos elevada polidispersidad en la distribución de tamaños de las partículas producidas y, a mayores cantidades, se observaban restos de polímero que quedaban sin formar la emulsión (EM10). El método de evaporación mediante el uso del rotavapor se descartó al no resultar eficaz debido a la cantidad de espuma que producía el PVA al someter la síntesis a vacío. La evaporación estática no resultó favorable debido a que la evaporación lenta produjo una gran cantidad de poros en las partículas finales. Se estableció como método de evaporación adecuado la agitación magnética durante 3h, tiempo suficiente para que la totalidad del disolvente se hubiese evaporado y se comprobó que las partículas permanecían morfológicamente inalteradas (EM15).

En cuanto a la cantidad de proteína óptima encapsulada, se realizó un barrido de concentraciones variando la cantidad de BSA disuelta en agua milliQ y, con ella, la viscosidad de la fase interna. Tras la encapsulación, se cuantificó la cantidad tal y como se menciona en el apartado 2.2.1.4. Como se muestra en la Tabla 2.5, se obtuvo el máximo de encapsulación para una concentración de 1% (p/v).

**Tabla 2.5** Resultados de la eficiencia de encapsulación de diferentes concentraciones de proteína BSA en la fase interna, obtenidos mediante el método de la BCA.

	Eficiencia de encapsulación (%)
BSA 0.5% (w/v)	67.8
BSA 1% (w/v)	88,4
BSA 5% (w/v)	62,5

### Caracterización de las micropartículas.

Tras el proceso de optimización descrito en el apartado anterior se obtuvieron partículas de Eudragit® RS100 vacías de un tamaño medio de  $143.1 \pm 36 \mu\text{m}$ , Figura 2.9-a-d. A través del estudio de la morfología por SEM se demostró la ausencia de poros o grietas en la superficie de las micropartículas. El rendimiento de síntesis obtenido fue de  $72.8 \pm 0.1\%$ .

Algunas proteínas son estables frente a la degradación gastrointestinal, por ejemplo, las inmunoglobulinas, que no se degradan en su paso por el tracto gastrointestinal [318]. Sin

embargo, se ha demostrado que otras proteínas, entre las que incluimos a la proteína BSA, empleada como modelo en este estudio, se degradan en cuestión de minutos [319]. Por lo tanto, para poder estudiar si las condiciones ácidas afectarían a las proteínas terapéuticas encapsuladas en su actividad biológica, además de en su configuración estructural, se incluye en el estudio la proteína peroxidasa HRP. Dicha proteína, en condiciones gástricas simuladas, se degrada en tan sólo 2 minutos, perdiendo su capacidad biológica como peroxidasa [320].

Cuando las micropartículas se cargaron con la proteína BSA, el tamaño medio de las partículas aumentó a  $172.9 \pm 73 \mu\text{m}$ , alcanzando un  $88.4 \pm 7.6\%$  de eficiencia de encapsulación y carga de  $5.1 \pm 0.3\%$  (p/p) con una morfología mostrada en la Figura 2.9 (e-h). Los resultados de encapsulación que se obtuvieron resultaron superiores a los ya publicados previamente usando quitosano, poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) y micropartículas de poli ( $\alpha$ -butilcianoacrilato) sintetizadas mediante spray drying [321] y similares a los de los polímeros basados en Eudragit® [322].

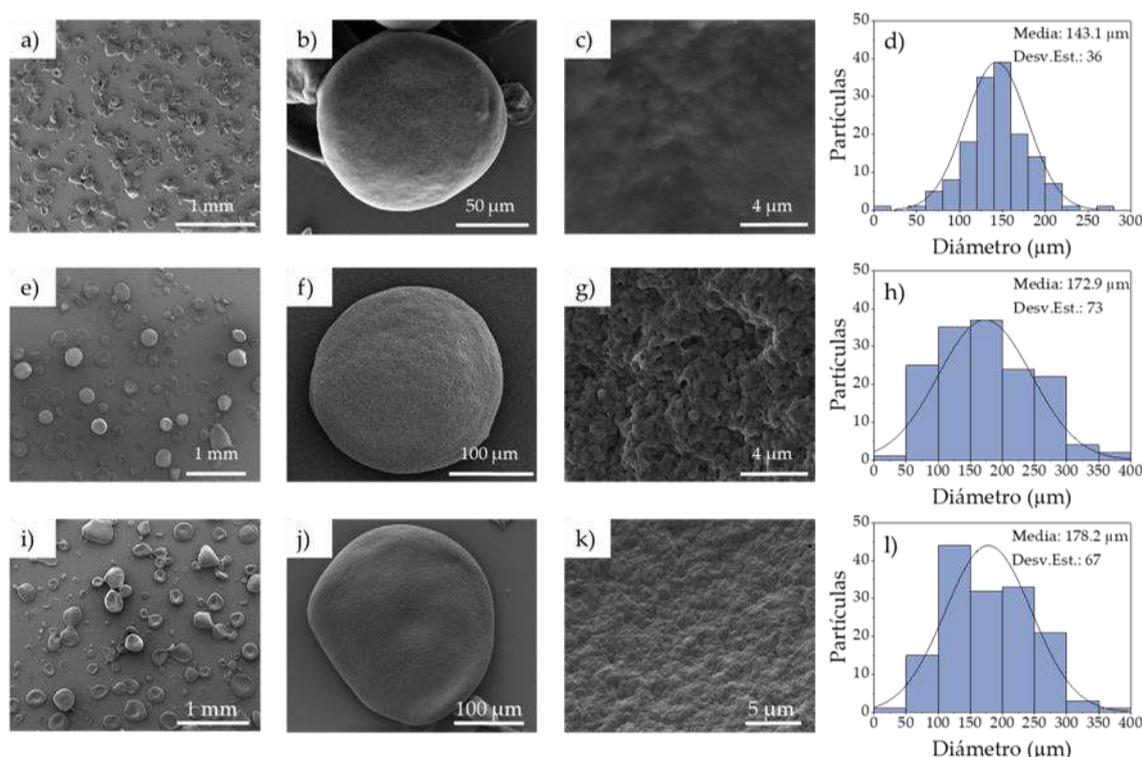
Las partículas cargadas con la proteína HRP aumentaron el tamaño promedio a  $178.2 \pm 67 \mu\text{m}$  Figura 2.9 (i-l), consiguiendo una eficiencia de encapsulación de  $95.8 \pm 2.3\%$  y alcanzando una carga enzimática de  $4.6 \pm 0.4\%$  (p/p). Los resultados obtenidos en la encapsulación de HRP mediante este método de síntesis fueron también superiores a los encontrados en bibliografía, en los que la encapsulación proteica en alginato de calcio o en micropartículas de dextrano se encontraban en torno al 70-75% [323][324].

Como se ha explicado en el apartado 2.2.1.3, las proteínas pueden tener carga positiva o negativa dependiendo del pH al que se encuentren y del punto isoeléctrico de cada una. Por lo tanto, el pH de trabajo y de la carga superficial del polímero pueden ser responsables de estas diferencias en las eficiencias de encapsulación.

Hace falta mencionar, respecto a la eficiencia de encapsulación, que la cuantificación directa y la indirecta sumaban, en todos los casos, aproximadamente el 100% de la proteína de partida. Por lo que el cierre en el balance de materia en el proceso de cuantificación garantiza la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Como se puede observar en las micrografías de SEM (Figura 2.9) tanto las micropartículas vacías como las cargadas, presentan una superficie libre de poros, lo que dificultaría la entrada de fluidos al interior de las partículas y, a su vez, la salida del contenido encapsulado. Esta ausencia de poros se le puede atribuir a la adición del plastificante trietilcitrate, que actúa como aglutinante alisando la superficie y mejorando las propiedades mecánicas poliméricas mediante su intercalación a través de las cadenas poliméricas, según lo reportado en la bibliografía [325].

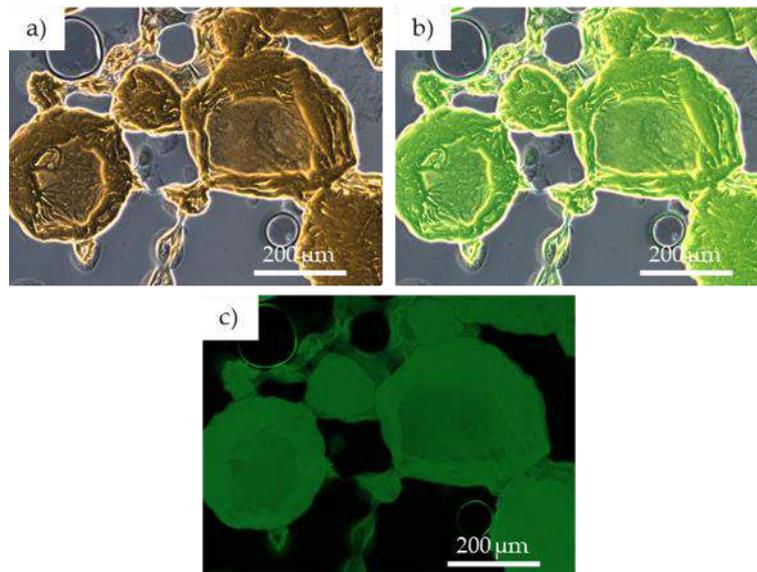
## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.



**Figura 2.9** Caracterización de la morfología de las micropartículas mediante microscopía electrónica de barrido a-c) partículas vacías, d) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas vacías, e-g) micropartículas con BSA encapsulada, h) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas con BSA encapsulada, i-k) micropartículas con HRP encapsulada, l) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas con HRP encapsulada.

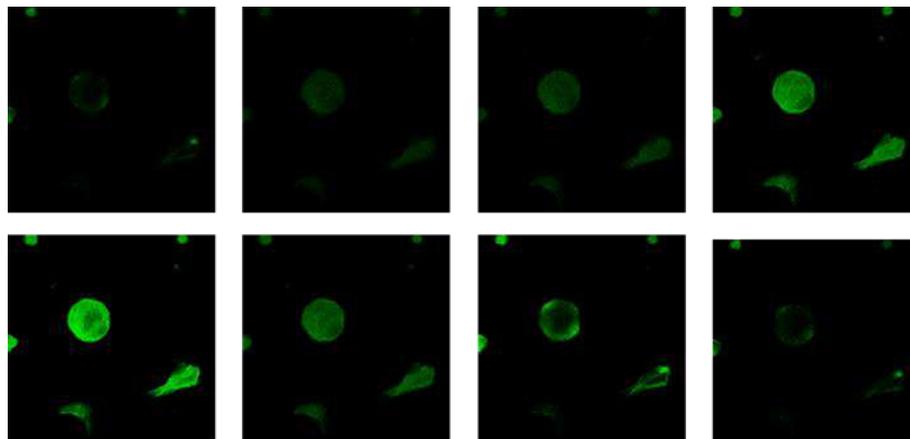
Como puede observarse, el diámetro medio de las micropartículas vacías es alrededor de  $30 \mu\text{m}$  menor que el de las micropartículas sintetizadas que contienen cualquiera de las proteínas encapsuladas. Este hecho se le atribuye al correspondiente aumento de la viscosidad de la fase interna cuando la proteína BSA o HRP se encuentran dispersas en dicha fase. Cuando la viscosidad aumenta, la emulsión que se forma resulta en gotas de mayor tamaño, formándose partículas de mayor tamaño [326].

Para estudiar la distribución de la proteína en las micropartículas se trabajó con la encapsulación de la proteína BSA conjugada con fluoresceína (BSA-FITC). En la Figura 2.10 se muestran las imágenes obtenidas por microscopía óptica invertida de fluorescencia. Se pudo comprobar que la encapsulación del fluoróforo anclado a la proteína no modificaba morfológicamente el resultado de la síntesis. Además, tal y como se puede observar en la Figura 2.10-(c), cuando se observa la superposición de las imágenes de contraste (a) y de fluorescencia (b), el fluoróforo FITC se colocaliza en las micropartículas y no se observa BSA-FITC libre en el medio circundante.



**Figura 2.10** Imágenes de las micropartículas cargadas con BSA-FITC obtenidas mediante microscopía invertida a) de contraste en campo claro, b) de fluorescencia y c) superposición de contraste y fluorescencia.

En la Figura 2.11 se muestran las imágenes seleccionadas del estudio a lo largo del eje z de la distribución de la proteína anclada al fluoróforo en el interior de la micropartícula, en las que se pudo deducir que la proteína se encontraba distribuida en toda la partícula, siendo la fluorescencia emitida homogénea en la partícula en cada corte ecuatorial.



**Figura 2.11** Imágenes obtenidas por microscopía óptica confocal de sucesivos cortes ecuatoriales en dirección del eje Z (*Z-stack*) de una micropartícula con BSA-FITC encapsulada.

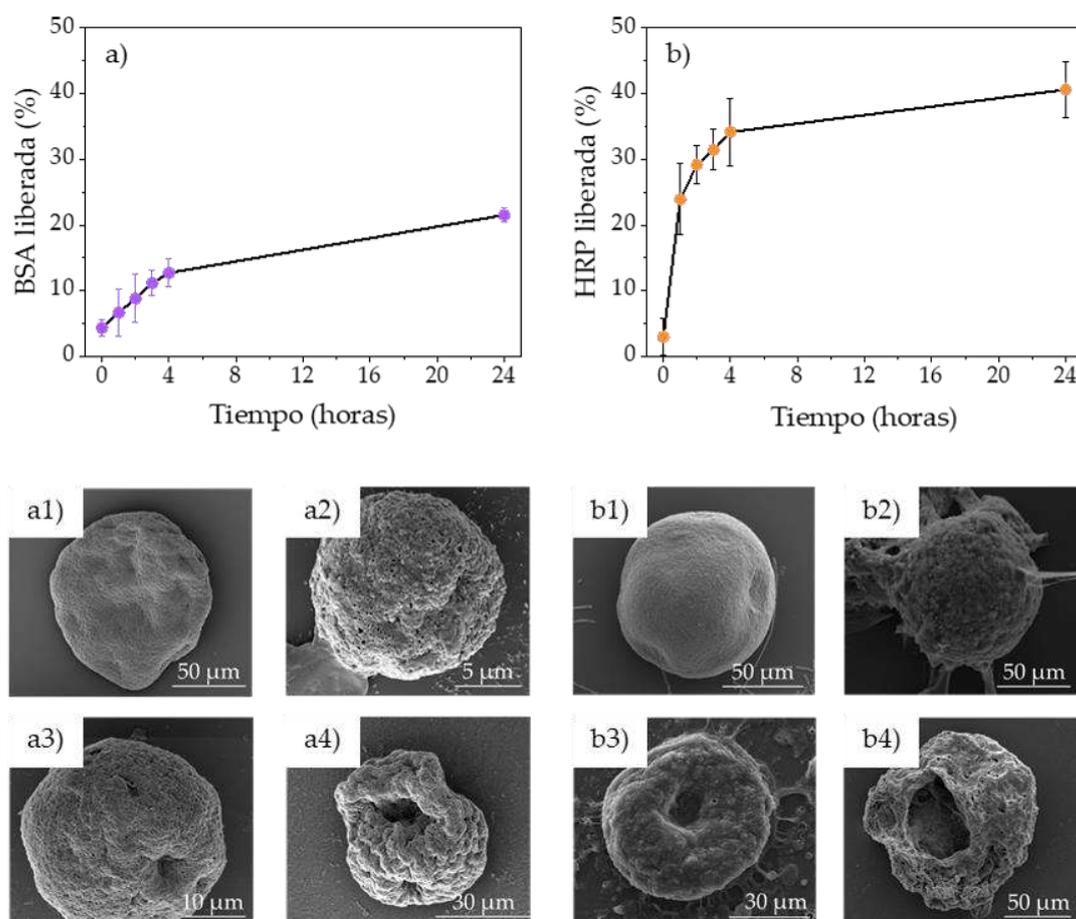
### **Cuantificación de la liberación *in vitro* de proteínas en el tracto gastrointestinal y evaluación de la actividad.**

Con la finalidad de predecir el perfil de liberación de ambas proteínas encapsuladas, el tránsito gastrointestinal de las micropartículas cargadas se simuló *in vitro* a 37 °C bajo agitación

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

continua. Con ese fin, las micropartículas de Eudragit® cargadas de proteínas se incubaron en fluido gástrico simulado durante 2h y, posteriormente, en fluido intestinal durante 24h de acuerdo con las recomendaciones indicadas en la farmacopea de EE.UU. Los perfiles de liberación de ambas proteínas modelo de las micropartículas se muestran en la Figura 2.12-a para BSA, en el que se observa una liberación inicial lenta y sostenida, y Figura 2.12-b para HRP, en el que se puede observar un inmediata y rápida liberación inicial seguida de un proceso lento de liberación. La cuantificación mostró que la cantidad de proteína liberada en el fluido gástrico era muy reducida para ambas proteínas (< 5% en peso), correspondiendo probablemente a proteínas unidas débilmente a la superficie de la partícula o ubicadas en cavidades superficiales. Al cabo de 24h en condiciones intestinales, el 20% y 40% del total cargado, respectivamente para cada proteína modelo, fue liberado.

Las imágenes de SEM mostraron que las micropartículas, tras 2h en contacto con fluido gástrico simulado, conservaron su morfología (Figura 2.12-a1 y b1), mientras que se fueron erosionando a lo largo del tiempo en condiciones intestinales (Figura 2.12-a2-a4 y b2-b4).



**Figura 2.12** Perfiles de liberación de las proteínas modelo a) BSA y b) HRP, y sus correspondientes imágenes de SEM a diferentes puntos de la liberación *in vitro*: a1-b1) tras 2h en fluido gástrico simulado, a2-b2) tras 1h, a3-b3) tras 3h y a4-b4) tras 24h en fluido intestinal simulado

Mediante los ajustes matemáticos de primer orden, Higuchi, Peppas-Sahlin, Lindner-Lippold y Korsmeyer-Peppas. (Figura A2.2 (BSA) y Figura A2.3 (HRP)), se estudiaron los mecanismos que contribuían a cada una de las liberaciones. La mejor cinética de liberación se identificó evaluando el coeficiente de correlación  $R^2$  de todos los ajustes. Los mejores ajustes matemáticos (Tabla 2.6) indican que el coeficiente más alto obtenido para la liberación de la proteína BSA ( $R^2 = 0.96$ ) corresponde a la ecuación propuesta por Lidner y Lippold [327], reflejando el importante papel de la erosión del polímero (constante  $k$ ) durante el proceso de liberación de la carga, pero también una rápida cinética inicial (constante  $b$ ) de la proteína que se encuentra más superficial. Cuando la difusión de la biomolécula y la erosión del polímero controlan el proceso de liberación a partes iguales, el valor del coeficiente  $n$  es 0.66. El valor obtenido en el ajuste,  $n = 0.47$ , implica un mayor control del proceso de difusión. Este perfil de liberación, basado en la erosión de la matriz polimérica y difusión del bioagente, se corroboró con las imágenes de SEM de las partículas (Figura 2.12-a1-a4). En el caso de la liberación de la proteína HRP, se describe mejor mediante el modelo cinético Peppas-Sahlin ( $R^2 = 0.982$ ), describiendo una liberación controlada por el proceso de difusión de Fick (constante  $k_1$ ) y la aportación del hinchamiento de la matriz polimérica (constante  $k_2$ ), relacionado con la relajación de las cadenas poliméricas [328]. Esta cinética de liberación está relacionada con la difusión de la proteína desde y a través de la matriz polimérica y, como puede observarse en la gráfica de liberación (Figura 2.12-b) la liberación va disminuyendo con el tiempo, lo que se relaciona con un mayor recorrido de la proteína desde el interior de la matriz hasta ser liberada. Respecto al valor de las constantes  $k_1$  y  $k_2$ , puede deducirse que destaca el mecanismo de liberación por difusión de Fick y depende en menor medida de la relajación de las cadenas poliméricas, sin dejar de ser necesaria esta contribución. En cuanto al exponente  $n$ , debería de tener un valor de 0.43 cuando se produce un mecanismo de difusión tipo Fick en un sistema de geometría esférica, sin embargo, el valor obtenido en el ajuste es 0.36, que estaría relacionado con la amplia distribución de tamaños de las micropartículas [329].

**Tabla 2.6** Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación de los mejores modelos matemáticos ajustados a los perfiles de liberación in vitro.

Proteína	Modelo matemático	Ecuación*	Parámetros
BSA	Lindner-Lippold	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n + b$	$R^2 = 0.966$
			$k = 0.04$
			$b = 0.04$
			$n = 0.47$
HRP	Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1t^n + k_2t^{2n}$	$R^2 = 0.982$
			$k_1 = 0.29$
			$k_2 = -0.05$
			$n = 0.36$

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

En los mecanismos propuestos de liberación, el fluido intestinal penetra en las partículas erosionando la matriz y creando poros desde los cuales la proteína encapsulada difunde al medio externo. Teniendo en cuenta las diferencias observadas en el perfil de liberación de ambas proteínas, no se puede descartar una influencia de las propiedades físico-químicas propias de cada proteína en la movilidad a través de la matriz polimérica.

Podría ser que una de estas propiedades físico-químicas que influye en la cinética de liberación sea la diferencia en el peso molecular y la solubilidad en el medio. El mayor peso molecular y la menor solubilidad en agua de la proteína BSA, junto con su elevada capacidad para unirse a sitios de unión inespecíficos, podrían producir una velocidad de difusión de la proteína reducida y una fuerte interacción con la matriz polimérica, lo que lleva a una menor liberación acumulativa. Como en el caso de D'Arrigo et al. [323], en el que la liberación de la proteína HRP de vectores de alginato de calcio / dextrano metacrilato fue más rápida en comparación con la de la proteína BSA, señalando el menor peso molecular de HRP como parámetro que facilita la difusión de la proteína al medio externo.

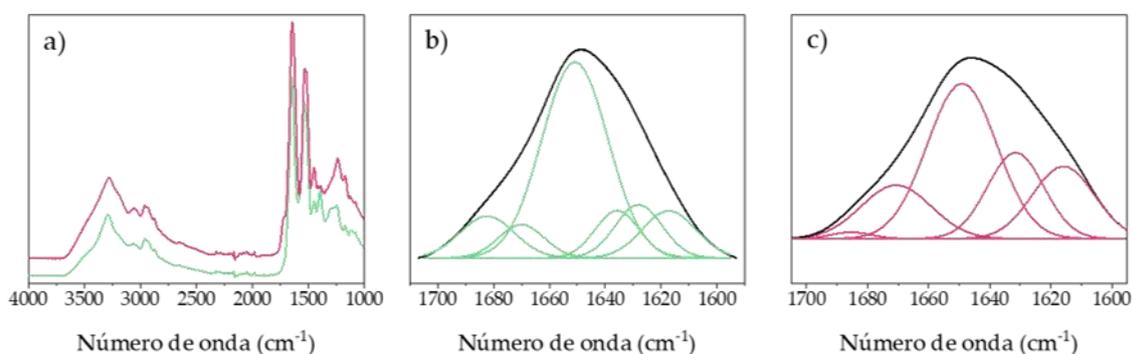
Además, se comprobó la existencia de interacciones inespecíficas entre la proteína libre y el polímero que se iba degradando, posiblemente, debido a las cargas electrostáticas. Para llevar a cabo dicha comprobación, se añadió una cantidad conocida de proteína (BSA y HRP, independientemente) y micropartículas vacías al fluido intestinal simulado. Se observó que conforme avanzaba el tiempo, la cantidad de proteína libre disminuía, lo que se explica con dichas interacciones proteína-matriz polimérica (Figura A2.4) [330].

Finalmente, se analizó la actividad biológica de la proteína liberada en ambos fluidos mediante la medida de la actividad enzimática de la proteína HRP. El ensayo enzimático se llevó a cabo con peróxido de hidrógeno y ABTS como sustrato. Los resultados mostraron que, las pequeñas fracciones de proteína que se liberaban en su paso por el fluido gástrico durante 2h, siendo probablemente las fracciones de proteína que quedaban en la superficie de la partícula, habían perdido el 100% de su actividad. Probablemente, bajo estas condiciones drásticas, la proteína no protegida por el polímero sufra un cambio conformacional influyendo en el sitio de unión del sustrato, lo que resulta en una proteína no funcional. Rabbani et al. [331] describieron cómo nanopartículas de óxido de cobre actuaban como inhibidores competitivos al causar reordenamientos estructurales en la enzima  $\beta$ -galactosidasa, afectando a la accesibilidad del sustrato al sitio activo enzimático. Posteriormente, se analizó la actividad de la proteína liberada al completar la digestión simulada *in vitro*. La proteína HRP liberada, tras 2h en condiciones gástricas y 24h en condiciones intestinales, conservaba el 100% de funcionalidad. Un comportamiento similar fue descrito para la enzima *Rhizopus niveus lipase* (RNL), la cual era enzimáticamente activa en un rango de pH superior a 7.4 y esta funcionalidad disminuía conforme disminuía el pH, siendo inestimable a pH extremadamente ácidos [268]. Por lo tanto, las micropartículas protegen la proteína cargada de la desnaturalización causada por el pH ácido en su paso por el estómago y, de esta forma,

aumenta su biodisponibilidad a nivel intestinal en comparación con la administración de la proteína terapéutica libre.

### Estudio de la integridad estructural de las proteínas en la encapsulación.

Para resaltar la necesidad de encapsulación de las proteínas terapéuticas se estudió la integridad estructural de la proteína BSA libre en su paso por el tracto gastrointestinal mediante espectroscopía FTIR. Esta técnica nos ofreció la información necesaria sobre la estructura secundaria tanto en su estado nativo como en fluido gástrico. Los espectros de adsorción de la proteína BSA se muestran en la Figura 2.13 Espectro FTIR y descomposición de la banda I. a) espectro de FTIR de la proteína nativa (verde) y la proteína en medio gástrico (granate), b) descomposición en picos gaussianos de la banda I amida del espectro de la proteína nativa y c) descomposición en picos gaussianos de la banda I amida del espectro de la proteína en medio gástrico. Tras la corrección de la línea base, para estudiar la estructura secundaria de la proteína, se aisló la región amida I, asociada a las vibraciones de estiramiento de grupos C-O de los enlaces peptídicos. La banda aislada, se descompuso utilizando picos gaussianos (Figura 2.13-b y c) para la proteína en los diferentes medios.



**Figura 2.13** Espectro FTIR y descomposición de la banda I. a) espectro de FTIR de la proteína nativa (verde) y la proteína en medio gástrico (granate), b) descomposición en picos gaussianos de la banda I amida del espectro de la proteína nativa y c) descomposición en picos gaussianos de la banda I amida del espectro de la proteína en medio gástrico.

Los centros de los picos se obtuvieron de los mínimos de la segunda derivada y la contribución de cada tipo de estructura secundaria se calculó en base al área de los picos. Las contribuciones de cada tipo de estructura secundaria se muestran en la Tabla 2.7. Se pueden apreciar diferencias significativas entre los porcentajes de estructuras secundarias de la proteína en su estado nativo y de la misma tras su paso por el medio gástrico simulado, que causa una disminución de las estructuras hélice- $\alpha$  y un aumento en la cantidad de láminas- $\beta$  intermoleculares. Abrosimova et al. [311] señalaron que la presencia de estos cambios de contribuciones estructurales puede ser indicador de agregación proteica.

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

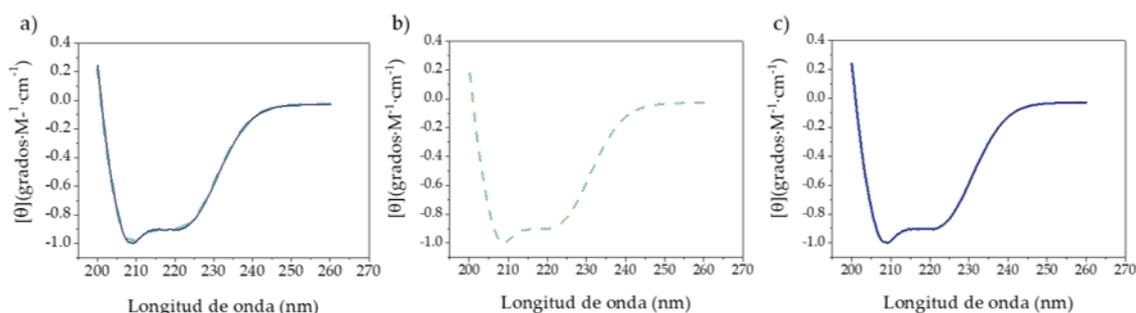
**Tabla 2.7** Contribución de los diferentes tipos de estructura secundaria de la proteína BSA en su estado nativo y tras su paso por el medio gástrico.

BSA nativa		BSA en fluido gástrico		Estructura secundaria*
Centro Gaussiano (cm <sup>-1</sup> )	Área (%)	Centro Gaussiano (cm <sup>-1</sup> )	Área (%)	
1617	10.5	1615	18.2	Indefinida
1627	10.5	-	-	Lámina-β
1635	8.7	1631	20.2	Lámina-β
1650	54.6	1649	45.0	Hélice-α
1770	6.4	1670	15.5	Giro-β
1683	9.4	1685	1.1	Giro-β

\*Abrosimova et al. [311]

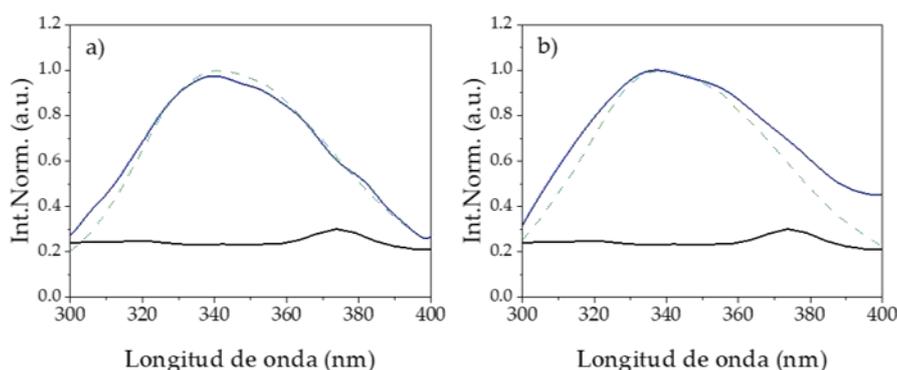
Una vez confirmada la necesidad de proteger las proteínas del medio ácido gástrico, se estudió la estabilidad conformacional de la proteína BSA durante el proceso de encapsulación en las micropartículas de Eudragit® RS100, para comprobar que los reactivos y los procesos físico-químicos de la síntesis no afectaban a la estructura proteica. Para este estudio se emplearon dos técnicas espectroscópicas, dicroísmo circular y fluorescencia.

Como se muestra en la Figura 2.14 Espectro de dicroísmo circular en la región del UV lejano (200-260 nm) a) proteína BSA nativa (línea discontinua verde) y proteína BSA tras ser encapsulada (línea continua azul), b) espectro individual de la proteína BSA nativa y c) espectro individual de la proteína BSA tras ser encapsulada., los espectros de dicroísmo circular en la región del UV lejano (200-260 nm) de la proteína nativa y de la proteína encapsulada después de romper las micropartículas mediante rotura mecánica, resultaron idénticos. Las señales de ambas proteínas nos ofrecen información de la estructura secundaria, mostrando dos mínimos negativos en las longitudes de onda de 208 nm y 222 nm que, como hemos visto, son característicos de una estructura hélice α. Como muestran los resultados, la proteína BSA mantuvo su estructura secundaria tras el proceso de encapsulación.



**Figura 2.14** Espectro de dicroísmo circular en la región del UV lejano (200-260 nm) a) proteína BSA nativa (línea discontinua verde) y proteína BSA tras ser encapsulada (línea continua azul), b) espectro individual de la proteína BSA nativa y c) espectro individual de la proteína BSA tras ser encapsulada.

Para obtener información sobre la estructura terciaria de las proteínas tras el proceso de encapsulación se empleó la técnica de caracterización de espectroscopía por fluorescencia. Como se puede observar en la Figura 2.15-a, la proteína BSA nativa y la proteína BSA encapsulada muestran espectros de fluorescencia similares, presentando un máximo de emisión a 341 nm aproximadamente, lo cual demuestra que la proteína no se modificó mediante el proceso de encapsulación. La misma comparación se llevó a cabo para la encapsulación de la proteína HRP. Como se muestra en la Figura 2.15-b, la proteína HRP nativa presenta un pico máximo de emisión a 339 nm aproximadamente coincidiendo con el de la proteína HRP encapsulada. Puesto que la estructura de una proteína determina la función biológica de la misma, estos resultados resultan coherentes con los resultados de DC de la proteína BSA y con el 100% de la actividad biológica que se obtuvo mediante el test del ABTS de la proteína HRP liberada.



**Figura 2.15** Espectro de fluorescencia de a) BSA y b) HRP: proteína nativa (línea discontinua verde), proteína encapsulada (línea continua azul) y partículas vacías (línea continua negra).

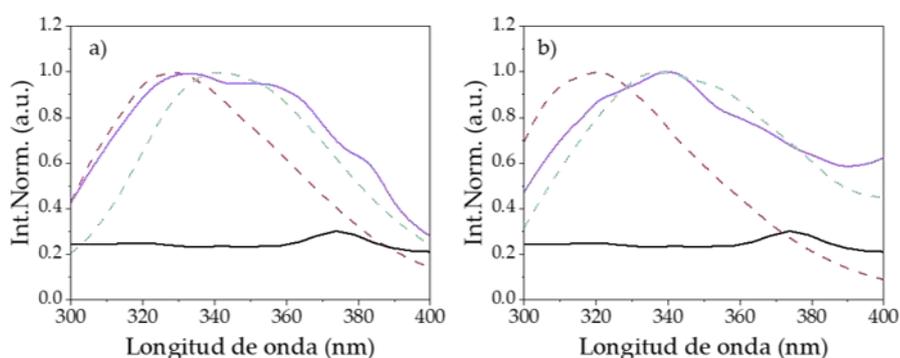
Para completar el estudio de la integridad estructural de las proteínas encapsuladas, se llevó a cabo la determinación de los espectros de fluorescencia de las proteínas tras la liberación *in vitro*, es decir, tras simular su paso por el tracto gastrointestinal. Para ello, se caracterizaron las proteínas de dos formas: la proteína en el interior de la partícula en su paso por los diferentes fluidos gastrointestinales simulados y la proteína liberada en dichos fluidos.

En primer lugar, en la Figura 2.16 se muestran los datos espectroscópicos de las proteínas encapsuladas en su paso por el fluido gástrico simulado. En el caso de la proteína BSA en fluido gástrico simulado (Figura 2.16-a), se observó un desplazamiento hacia el azul (disminución de la longitud de onda) de 12.8 nm (desplazamiento en el máximo de fluorescencia de 341.4 nm a 328.6 nm), lo que sugiere que la proteína BSA sufre un cambio conformacional en fluidos de bajo pH que afecta a su estructura terciaria, de acuerdo con los datos observados por Iosin et al. Los máximos de emisión de fluorescencia de la proteína BSA se desplazan en función del pH al que se encuentra debido a la ubicación de los residuos

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

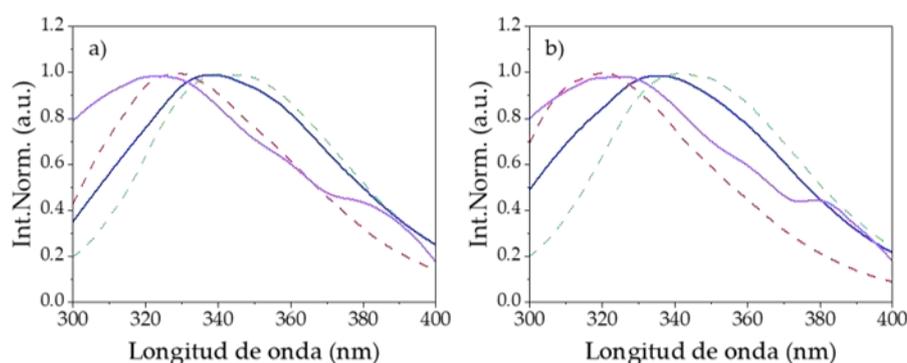
triptófano de la proteína BSA en un ambiente más hidrófobo [332]. En el espectro correspondiente a la fluorescencia emitida por la proteína encapsulada tras 2h en contacto con fluido gástrico simulado se pueden observar dos poblaciones de proteína diferentes, es decir, dos estructuras terciarias distintas. Como se observa en la Figura 2.16-a, una de las poblaciones mostró un desplazamiento similar al del máximo de emisión de la proteína libre en fluido gástrico simulado, lo que indica que parte de la proteína sufrió un cambio conformacional que afectó a su estructura terciaria tras su paso por el fluido gástrico. Esta población que se ve influida por el pH directamente podría tratarse de la BSA en la superficie de las micropartículas de tal forma que hubiese podido estar en contacto directo con el fluido ácido. Además, en la segunda población se observó un desplazamiento hacia el rojo (aumento de la longitud de onda) de 28 nm (desplazamiento en el máximo de fluorescencia de 341.4 nm a 369 nm) respecto a la proteína BSA en su estado nativo. Estos resultados demuestran que esta población también sufrió algún cambio conformacional en su estructura terciaria diferente al influenciado por el bajo pH. Sin embargo, mediante la técnica de fluorescencia no podemos concluir si el cambio conformacional es dependiente del pH y si afecta a la actividad biológica de la enzima. Como publicaron Rabbani et al. [333], se observa un desplazamiento hacia el rojo de 25 nm de los máximos de emisión de fluorescencia de los aminoácidos Trp de la proteína Lipasa B de *Candida antártica* cuando se encontraba en un ambiente de pH > 10.5, lo que indica que también influye el estado de ionización de los residuos Tyr a medida que varía el pH del medio en el que se encuentra sobre la fluorescencia intrínseca de los residuos Trp.

Por otro lado, como se muestra en la Figura 2.16-b, en el caso de la proteína HRP se observaron resultados similares en los espectros de fluorescencia. Es el espectro de la proteína encapsulada tras su paso por el fluido gástrico simulado se ve de forma más clara la protección de la integridad estructural de una fracción de esta proteína del ambiente ácido mediante la encapsulación de la misma, siendo la población afectada por el pH ácido aquella fracción proteica remanente en la superficie de las micropartículas.



**Figura 2.16** Espectro de fluorescencia de a) BSA y b) HRP: proteína nativa (línea discontinua verde), proteína en fluido gástrico simulado (línea discontinua granate), proteína encapsulada en fluido gástrico simulado (línea continua morada) y partículas vacías (línea continua negra).

Por último, se estudió la integridad estructural de la proteína liberada tras su paso por el tracto gastrointestinal, comparando la señal de emisión de fluorescencia de la proteína liberada de la micropartícula con la de la proteína libre en el mismo medio. [268]. En la Figura 2.17-a se muestran los espectros correspondientes a la liberación de la proteína BSA en los diferentes medios gastrointestinales simulados, y en la Figura 2.17-b los de la proteína HRP. Respecto a los resultados obtenidos en el paso por fluido gástrico simulado, se observan máximos de emisión idénticos para la proteína libre en dicho medio y para la liberada de la micropartícula tanto para la proteína BSA como para la proteína HRP. Del mismo modo, en los espectros de ambas proteínas, no se observaron diferencias significativas en el caso de la proteína libre en el fluido intestinal y en el de la proteína liberada en dicho medio.



**Figura 2.17** Espectro de fluorescencia de a) BSA y b) HRP: proteína en fluido intestinal simulado (línea discontinua verde), proteína en fluido gástrico simulado (línea discontinua granate), proteína liberada en fluido intestinal simulado (línea continua azul) y proteína liberada en fluido gástrico simulado (línea continua morada).

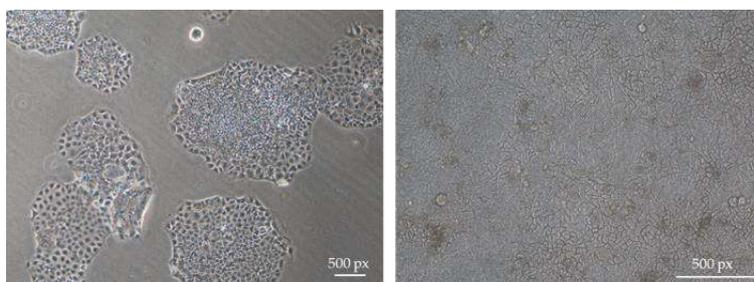
Por lo tanto, se puede concluir con los resultados obtenidos del estudio del perfil de liberación junto con los del estudio de la integridad estructural de las proteínas, que hay una fracción de la proteína total que queda adherida sobre la superficie de las micropartículas. Es esta pequeña fracción la que sufre modificaciones en su estructura terciaria, como muestran los resultados de la fluorimetría. La proteína encapsulada en las micropartículas liberada en el fluido intestinal tras la digestión *in vitro*, en cambio, no sufre cambios conformacionales, lo que coincide con los resultados del ensayo de actividad enzimática.

### Ensayo de viabilidad celular *in vitro*.

Con la finalidad de analizar el posible efecto citotóxico de las micropartículas entéricas, se realizó un ensayo de viabilidad *in vitro* con células Caco2-TC7 intestinales humanas. Esta línea celular, tal y como explican Hidalgo I. et al. [334], tiene la peculiaridad que cuando se cultiva sobre placas de plástico, filtros de nitrocelulosa o membranas de policarbonato, son capaces de formar una monocapa que mimetiza la morfología y la funcionalidad de los

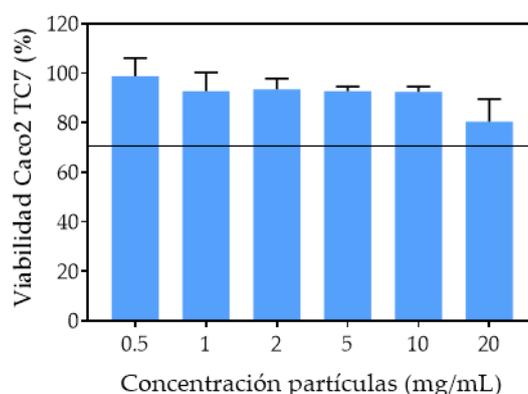
## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

enterocitos del epitelio intestinal humano. Como se puede observar en la Figura 2.18, tras alcanzar la confluencia es cuando se diferencian y forman la monocapa intestinal con la que se realizaron los estudios de viabilidad celular.



**Figura 2.18** Imágenes de microscopía óptica convencional de las células Caco2 TC7 adheridas al fondo del pocillo de la placa (izquierda) y de las células Caco2 TC7 una vez han alcanzado la máxima confluencia y se diferencian formando una membrana semejante a la monocapa intestinal.

Según indica la norma internacional ISO 10993-5, un material se considera citotóxico cuando muestra una reducción de la viabilidad celular superior al 30% respecto al control. Como se muestra en la Figura 2.19, no se observó reducción significativa en la actividad metabólica celular de las células tratadas con las micropartículas durante 24h respecto a las no tratadas., siendo los porcentajes de viabilidad mayores del 80% en todo el rango de concentraciones ensayadas (0.5 a 20 mg/mL). Por lo tanto, las micropartículas de Eudragit® RS100 resultaron citocompatibles, lo que confirma la idoneidad y seguridad como vectores para la administración oral de proteínas terapéuticas. Estos resultados coinciden con los publicados, en los que obtienen porcentajes de viabilidad similares de materiales basados en el polímero Eudragit® RS100 en células humanas epiteliales (HaCaT) y en macrófagos murinos [335], en células epiteliales de la lente humana (HEL) [336] y en células leucémicas humanas (K562) [337].



**Figura 2.19** Viabilidad celular de las micropartículas de Eudragit® RS100 en la línea celular Caco2 TC7 tras un periodo de incubación de 24h. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE (n=4). La viabilidad del 100% fue asignado a las células control no tratadas.

### 2.2.3 Conclusiones.

En este trabajo se han sintetizado micropartículas de Eudragit® RS100 cargadas con dos proteínas modelo, BSA y HRP, mediante el método de doble emulsión- evaporación del disolvente.

Se lograron eficiencias de encapsulación elevadas: un 88.4% para la proteína BSA y una carga de  $5.1 \pm 0.3\%$  (p/p) y un 95.8% para HRP y una carga de  $4.6 \pm 0.4\%$  (p / p).

Por otro lado, se estudió la integridad estructural de las proteínas encapsuladas, confirmándose la conservación de la estructura durante el proceso de síntesis.

Los patrones de liberación *in vitro*, en condiciones gastrointestinales simuladas, fueron diferentes para cada una de las proteínas encapsuladas. Las micropartículas cargadas con BSA mostraron una liberación inicial sostenida y lineal, más acusada durante las primeras horas. La liberación de HRP, en cambio, presentó una liberación repentina inicial del 23% del total de la proteína contenida durante la primera hora seguida de una liberación de orden cero. Estos perfiles de liberación indicaron que, tanto la erosión de la matriz polimérica, como las propiedades fisicoquímicas de cada proteína, influyen en la liberación.

Se confirmó que, mediante la microencapsulación, la proteína contenida se protegió de la desnaturalización causada por los drásticos valores de pH en su paso por las condiciones simuladas gástricas. Por lo tanto, se consiguió preservar las proteínas aumentando considerablemente su biodisponibilidad a nivel intestinal en comparación con la administración de la proteína libre.

Finalmente, se evaluó la elevada citocompatibilidad del material entérico (hasta 20 mg/mL) confirmando su potencial aplicabilidad en la administración oral de proteínas terapéuticas.

## 2.3 Encapsulación de bacterias gram+ y gram- modelo para la distribución localizada de probióticos.

### 2.3.1 Materiales y métodos.

#### 2.3.1.1 Materiales.

En esta parte del capítulo se emplearon los reactivos especificados en la sección 2.2.1.1: el polímero Eudragit® RS100 (Evonik, Essen, Alemania), polivinil alcohol (PVA, MW: 85000-124000 Da), trietilcitrate (TEC), ácido acético e hidróxido de sodio. Además, cloroformo e isotiocianato de fluoresceína (FITC) se compraron en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania) y fueron utilizados tal y como se recibieron.

Las bacterias gram negativas, *Escherichia coli* S17 fueron cedidas por el Dr. J.A. Ainsa (Universidad de Zaragoza, Zaragoza, España) y las bacterias gram positivas, *Lactobacillus*

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

*acidophilus* (Moro) Hansen y Mocquot (ATCC®4356™) fueron compradas al grupo LGC (Barcelona, España). Se recibieron en forma de polvo liofilizado conteniendo glicerol como crioprotector. Los medios de cultivo de bacterias de Triptona Soja (TSB), el medio MRS, el agar de Triptona Soja (TSA) y el agar MRS se compraron a Laboratorios Conda-Pronadisa S.A (Torrejón de Ardoz, España). El fluido gástrico simulado (HCl 0.1 N + TSB/MRS, pH = 1.1) y fluido intestinal simulado (NaOH + TSB/MRS, pH = 7.4) también se utilizaron.

### 2.3.1.2 Optimización de la síntesis.

La optimización de la síntesis mediante el método de doble emulsión-evaporación del disolvente para la obtención de micropartículas que encapsulasen bacterias en su interior de forma que se asegurase la viabilidad celular, se basó en la síntesis optimizada anteriormente (apartado 2.2.1.2) adaptándola a una doble emulsión de elevada fase interna (HIPE) teniendo en cuenta las resistencias bacterianas reportadas en literatura [338]. Según numerosos estudios, los disolventes orgánicos, al ser liposolubles, dañan irreversiblemente la membrana celular. [339]. Este daño tiene que ver directamente con la polaridad del disolvente, que se representa como el logaritmo del coeficiente de repartición de octanol en agua ( $\log P_{o/w}$ ) reflejando la concentración del disolvente en cada una de las dos fases, tal y como se representa en la Ecuación 2.6.

$$\text{Log } P_{\frac{o}{w}} = \text{Log} \left( \frac{[\text{disolvente}]_{\text{octanol}}}{[\text{disolvente}]_{\text{agua}}} \right) \quad \text{Ecuación 2.6}$$

Por lo tanto, los disolventes con elevado  $\log P_{o/w}$  son más hidrófobos y aquellos con bajo  $\log P_{o/w}$  son más hidrófilos. Los valores críticos de este coeficiente de repartición se encuentran entre 1 y 4, ya que resultan lo suficientemente miscibles con el agua para estar biodisponibles, poder alterar las membranas lipídicas y causar la muerte celular [340]. Además de adecuarse a los valores de  $\log P_{o/w}$  óptimos para la aplicación, los disolventes debían de cumplir los requisitos para ser aplicados al método de síntesis de emulsión-evaporación del disolvente, debían de tener bajas temperaturas de ebullición y solubilizar al polímero de manera estable. Los datos de los coeficientes de repartición de los disolventes orgánicos utilizados para la síntesis se presentan en la Tabla 2.8.

**Tabla 2.8** Valores de los coeficientes de repartición de octanol en agua de los posibles disolventes orgánicos de la síntesis de micropartículas. Datos obtenidos de la base de datos PubChem®.

	Log Po/w
Diclorometano	1.25
Cloroformo	1.97

A pesar de encontrarse dentro del rango tóxico de valores de  $\log P_{o/w}$ , Koenig J. et al demostraron que existen resistencias adquiridas de tipos bacterianos que les permite crecer bajo una cierta exposición a estos disolventes [341]. Basándonos en este estudio, se ajustó la concentración de disolvente respecto al medio bacteriano para asegurarnos la viabilidad de la mayor cantidad de microorganismos encapsulados, razón por la cual la fase interna (FI) superó en volumen a la fase orgánica (FO), que contenía el polímero, optimizando una emulsión tipo HIPE. La optimización de esta síntesis se basó en una serie de experimentos en los que se fueron variando los parámetros clave de la síntesis, tal y como se presenta en la Tabla 2.9.

**Tabla 2.9** Tabla resumen de las variables estudiadas en la optimización de la síntesis de micropartículas mediante el método de doble emulsión- evaporación del disolvente para la encapsulación de bacterias probióticas modelo.

Optimización del método de síntesis.				
Muestra	Polímero	mg	Disolvente	Método de síntesis
EM19	Eudragit® RS100	100	Diclorometano	Sonicación (30 y 35 seg), 40% amplitud
EM20				Agitación mecánica 5 min, 800 rpm
EM21			Cloroformo	Sonicación (30 y 35 seg), 40% amplitud
EM22				Agitación mecánica 5 min, 800 rpm

\*Síntesis realizadas con PVA HMW como surfactante y 1 mL H<sub>2</sub>O milliQ como fase interna

Optimización de la supervivencia bacteriana.				
Muestra	Polímero	mg	Disolvente	Método de síntesis*
EM23	Eudragit® RS100	100	Diclorometano	Baño de hielo ( $\approx 4^\circ\text{C}$ ) F.I = 1 mL, F.O = 2.5 mL (**)
EM24			Cloroformo	Baño de hielo ( $\approx 4^\circ\text{C}$ ) F.I = 1 mL, F.O = 2.5 mL (***)
EM25			Diclorometano	Baño de hielo ( $\approx 4^\circ\text{C}$ ) F.I = 4 mL, F.O = 1 mL (**)
EM26			Cloroformo	Baño de hielo ( $\approx 4^\circ\text{C}$ ) F.I = 4 mL, F.O = 1 mL (***)

\*Síntesis realizadas con PVA HMW como surfactante

(\*\*) Síntesis con ondas de ultrasonidos., (\*\*\*) Síntesis con agitación mecánica.

### 2.3.1.3 Síntesis de micropartículas y encapsulación de bacterias modelo.

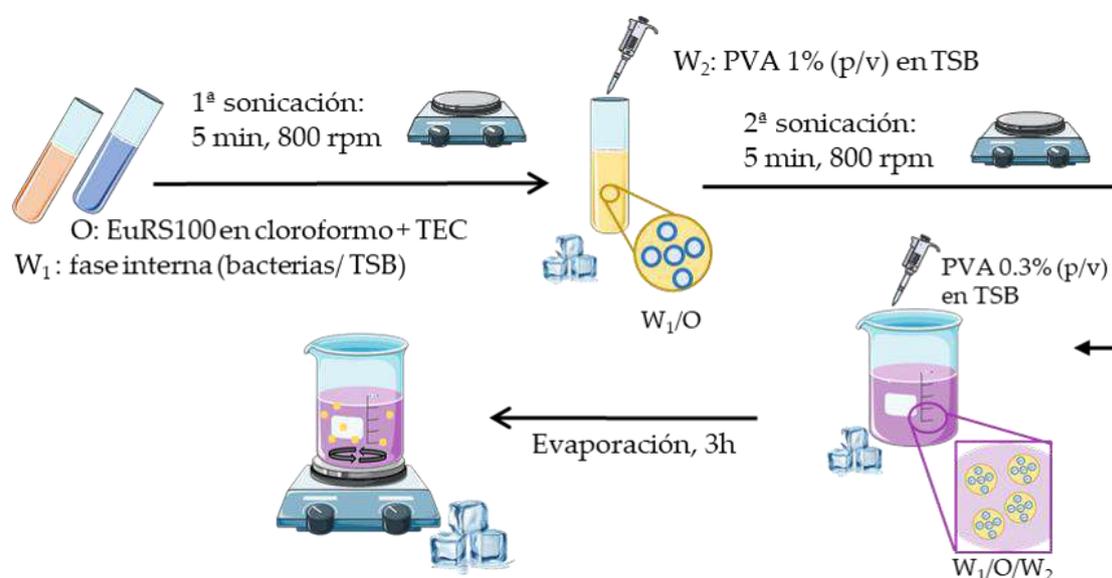
La síntesis optimizada se adaptó al método de doble emulsión de elevada fase interna (HIPE) [256]. En la fase interna se encontraban dispersas las bacterias en el medio de cultivo correspondiente, TSB para la bacteria *E. coli* y MRS para la bacteria *L. acidophilus*. Se inoculó una colonia de *E. coli* S17 en 4 mL de TSB y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  durante toda la noche en agitación continua a 150 rpm. Transcurrido este tiempo, las bacterias en fase estacionaria ( $\sim 10^9$  UFC/mL)

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

se centrifugaron (5 min, 3000 rpm) y el pellet obtenido se dispersó en TSB ligeramente acidificado con ácido acético para evitar la precipitación del polímero. En el caso de *L. acidophilus*, 1mL de bacterias criogenizadas ( $10^6$  UFC/mL) se incubó en 10 mL de medio MRS a 37 °C durante toda la noche en agitación continua a 150 rpm. Transcurrido este tiempo, las bacterias en fase estacionaria ( $\sim 10^9$  UFC/mL) se centrifugaron (5 min, 3000 rpm) y el pellet obtenido se dispersó en 4mL de MRS ligeramente acidificado con ácido acético.

La fase orgánica estaba compuesta por 100 mg de polímero Eudragit® RS100 disueltos en 1 mL de cloroformo, junto con TEC 2% (p/v) como plastificante.

La síntesis mediante el método HIPE se llevó a cabo mediante la mezcla por agitación (5 min, 800 rpm) de la fase orgánica y la fase acuosa interna conteniendo las bacterias en baño de hielo ( $\sim 4$  °C), siendo esta fase interna un 80% del volumen ( $> 74\%$  del volumen con el que se define la HIPE). Esta primera emulsión se estabilizó con una segunda mezcla por agitación mecánica (5 min, 800 rpm) con una disolución acuosa de PVA en TSB (2 mL, 1% (p/v)). Finalmente, la doble emulsión de elevada fase interna se estabilizó con la adición de PVA disuelto en TSB (10 mL, 0.3% (p/v)). La evaporación del disolvente y la consecuente precipitación de las micropartículas se llevó a cabo en baño de hielo ( $\sim 4$  °C) en agitación continua (3h, 600 rpm). Las micropartículas formadas se lavaron tres veces mediante decantación, sustituyendo el sobrenadante por agua milliQ. La Figura 2.20 resume la síntesis de micropartículas para la encapsulación de bacterias modelo probióticas.



**Figura 2.20** Protocolo de síntesis de micropartículas por método de doble emulsión-evaporación del disolvente de elevada fase interna (HIPE) para la encapsulación de bacterias modelo.

Se siguió el mismo protocolo de síntesis para encapsular FITC como modelo óptico para el estudio del perfil de liberación *in vitro* del fluoróforo encapsulado en condiciones

gástricas e intestinales simuladas. La fase interna, en este caso, estaba formada por una disolución acuosa de FITC 0.025% (p/v).

### 2.3.1.4 Caracterización de las micropartículas.

La caracterización de la morfología de las diferentes partículas producidas se realizó por SEM y se analizaron las distribuciones de tamaño (apartado 2.2.1.4).

La estabilidad de las partículas tras la incubación en los fluidos gastrointestinales se analizó también mediante la visualización de la morfología de las partículas por SEM.

El rendimiento de la síntesis se calculó mediante la relación entre la cantidad de producto seco obtenido y la cantidad total de todos los reactivos añadidos, como se indica en la Ecuación 2.1 (apartado 2.2.1.4).

Para cuantificar la cantidad de bacterias encapsuladas en el interior de las micropartículas, se realizó un análisis termogravimétrico (Mettler Toledo TGA/STDA 851e, Mettler Toledo; Columbus, OH, US) que se basó en las diferentes temperaturas de degradación de los microorganismos y del polímero que los contenía. Primero se analizó el perfil de descomposición del microorganismo y del polímero con el fin de obtener las temperaturas de degradación de cada componente por separado. Las medidas se realizaron en aire (flujo de aire 50 mL/min) con una rampa de temperatura de 10 °C/min en un rango de 30 a 800 °C. Se pudo identificar una rápida pérdida de masa bacteriana a una temperatura de 225 °C que no se solapaba con la temperatura de degradación del polímero, la cual fue la referencia para calcular la masa de bacterias encapsuladas dentro de la matriz polimérica.

Se estudió la flotabilidad de las partículas en el medio gástrico, parámetro que se relaciona con la vida media del vector en el estómago y su probabilidad de alcanzar el intestino ya que, si el vector flota, se evita un exceso de contacto con las sales biliares y enzimas gástricas [342]. Para ello, una cantidad conocida de micropartículas se pusieron en contacto con 5 mL de fluido gástrico simulado en agitación constante (200 rpm) durante 8h. Tras este tiempo, se recogieron las partículas que quedaban flotando en la superficie con una pipeta Pasteur, dejándolas en una placa Petri, previamente pesada, y se secaron a 60 °C para eliminar la totalidad de agua hasta que se alcanzó un peso constante. La flotabilidad se calculó mediante la Ecuación 2.7

$$\text{Flotabilidad (\%)} = \frac{\text{mg partículas en la superficie}}{\text{mg partículas iniciales}} \times 100 \quad \text{Ecuación 2.7}$$

### 2.3.1.5 Estudio de la liberación *in vitro* en el tracto gastrointestinal.

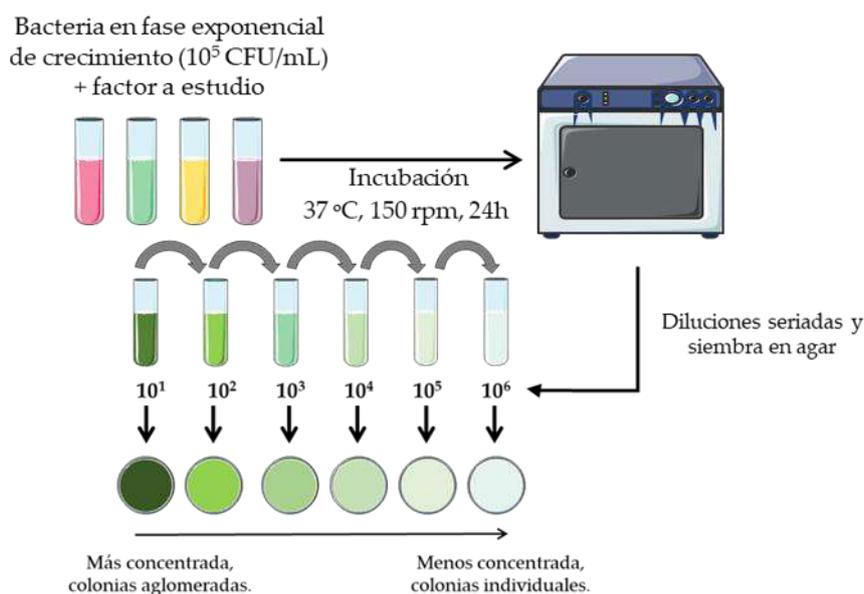
Para obtener el perfil de liberación de las micropartículas cargadas con el fluoróforo, se dispersaron en fluido gástrico simulado a 37 °C durante 2h en agitación continua. Tras este

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

tiempo, se sustituyó el medio por fluido intestinal simulado a 37 °C. Se tomaron alícuotas del sobrenadante a determinados tiempos (2, 4, 6, 8, 24 y 48h), reemplazando el volumen retirado. La cantidad de FITC liberada se cuantificó mediante la medida de la muestra por espectroscopía UV-Vis (Jasco V670), siendo su máximo de absorbancia a 480 nm.

### 2.3.1.6 Ensayos microbiológicos *in vitro*.

En primer lugar, se estudió la influencia en la viabilidad bacteriana en los procedimientos del protocolo de síntesis, de las condiciones del mismo y de los reactivos utilizados mediante la puesta en contacto de los microorganismos con cada uno de los parámetros a ensayar individualmente y cuantificando la supervivencia. Como se resume en la Figura 2.21, para la cuantificación de la supervivencia bacteriana se utilizó el método de las diluciones seriadas en PBS y siembra en placa de agar, contando las colonias viables y calculando, así, la concentración bacteriana tras 24h de incubación a 37 °C.



**Figura 2.21** Esquema del método de cuantificación bacteriana de las diluciones seriadas y siembra en placa.

Los ensayos realizados en cuanto a reactivos fueron: TSB acidificado, polímero en su forma sólida, TEC 2% (p/v), PVA 1% (p/v) y 0.3% (p/v). Las condiciones y los procedimientos de síntesis que se evaluaron fueron: bacterias en baño de hielo durante 3.5h y en agitación magnética durante 3.5h. Todas las pruebas se evaluaron por triplicado, realizando tres ensayos independientes.

El estudio de liberación de las bacterias encapsuladas en el interior de las micropartículas se desarrolló llevando a cabo una digestión simulada *in vitro*. Las micropartículas se pusieron en contacto con fluido gástrico simulado durante 2h. Trascorrido

este tiempo, se recogió el sobrenadante de las micropartículas que contenían bacterias y se sembró en placas para contar las bacterias viables. Posteriormente, las micropartículas se pusieron en contacto con fluido intestinal simulado durante 24-48h y se sembró el sobrenadante de la liberación bacteriana. Paralelamente, se realizó el mismo ensayo mediante una digestión simulada *in vitro* con las bacterias libres sin encapsular. Los ensayos se realizaron por triplicado con tres síntesis independientes.

Los fluidos digestivos simulados para el estudio de la liberación de *E. coli* y *L. acidophilus* encapsuladas se prepararon en TSB o MRS respectivamente.

### 2.3.1.7 Estudio de la estabilidad del probiótico a largo plazo.

Previamente al estudio de la estabilidad, las micropartículas se liofilizaron (LyoQuest, Telstar < 0.1 mBar, -50 °C, 24h), sin la adición de ningún crioprotector adicional. Una vez liofilizadas, las micropartículas se mantuvieron bajo las condiciones de luz, temperatura y humedad del laboratorio ( $23 \pm 2$  °C de temperatura y  $43 \pm 7$  % de humedad, media de diez días). Tras 4 días, 1 y 5 meses, las micropartículas se reconstituyeron en 10 mL de fluido intestinal simulado preparado en TSB basificado con NaOH (pH = 7.4) para las partículas conteniendo *E. coli* y en MRS basificado para *L. acidophilus*, y se incubaron durante 24h a 37 °C. Se retiró el sobrenadante y mediante el método de las diluciones seriadas (Figura 2.21) se cuantificaron las bacterias viables liberadas de las partículas.

### 2.3.1.8 Ensayo de viabilidad celular *in vitro*.

Se llevó a cabo la evaluación de la citocompatibilidad de las micropartículas sintetizadas mediante HIPE en células Caco2-TC7 (cedidas por la Dra. M.J. Rodríguez Yoldi) tal y como se explica en el anterior apartado 2.2.1.7.

Las concentraciones ensayadas estuvieron en el rango de 0.5 – 20 mg/mL y el kit colorimétrico utilizado para la cuantificación fue Blue Cell Viability (Abnova).

### 2.3.1.8 Análisis estadísticos.

Todos los resultados se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (DE). Se realizaron los análisis estadísticos de distribución normal de las variables y el análisis de varianza unidireccional (ANOVA) de los recuentos de colonias de bacterias viables (Software GraphPad Prism). Los resultados de los distintos grupos fueron considerados significativamente diferentes cuando  $p \leq 0.05$ .

### 2.3.2 Resultados y discusión.

#### Optimización de la síntesis.

En el proceso de optimización se fueron modificando diferentes parámetros influyentes en la síntesis por doble emulsión de elevada fase interna, tal y como se han descrito en la anterior Tabla 2.9, hasta que se encontraron las condiciones más favorables para la obtención de partículas estables que encapsulasen bacterias vivas.

Tomando como referencia la síntesis optimizada de la encapsulación de proteínas terapéuticas y teniendo en cuenta las referencias bibliográficas que comprometían la supervivencia bacteriana, se probaron técnicas menos energéticas para la obtención de las micropartículas con la finalidad de suavizar las condiciones de síntesis y evitar, así, el posible daño a los microorganismos implicados. Para ello, además del optimizado, se probó el protocolo de síntesis con agitación mecánica. Además, a pesar de que el valor de  $\log P_{o/w}$  no era el más adecuado, también se seleccionó el cloroformo como disolvente ya que el polímero Eudragit® RS100 se solubilizaba perfectamente y las referencias bibliográficas mostraban algo de tolerancia a este segundo disolvente halogenado [341].

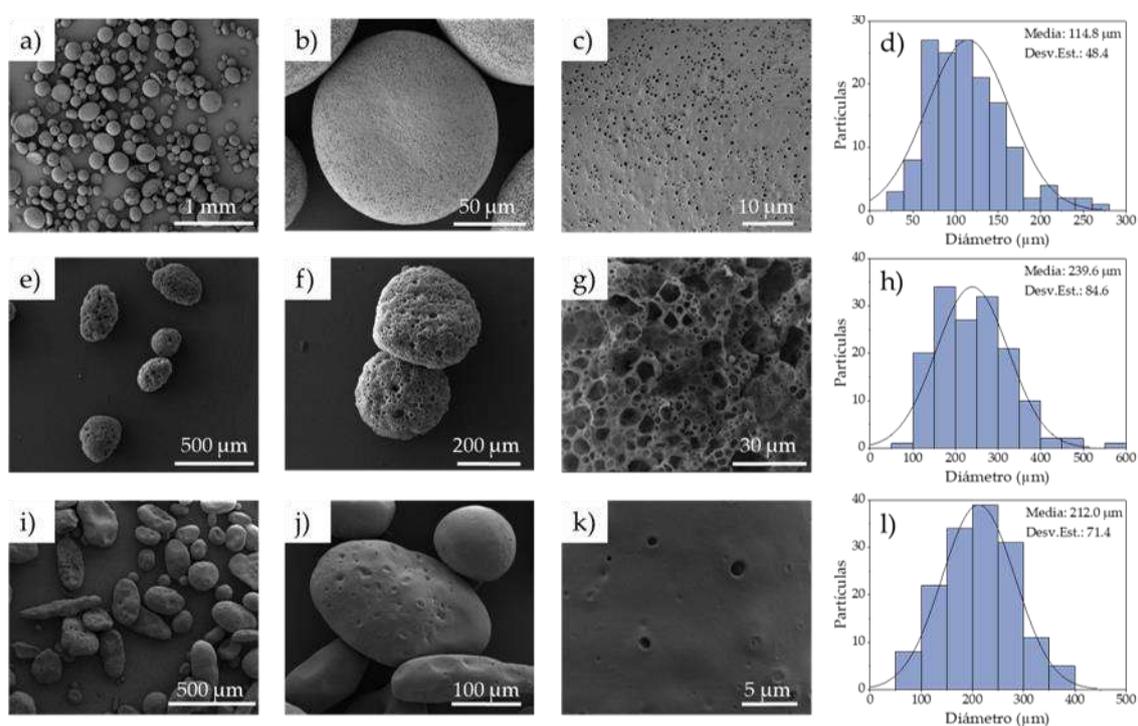
En la Figura A2.5 se adjuntan las imágenes de microscopía electrónica de barrido del proceso descrito de optimización. Se descartó el DCM como disolvente porque las partículas producidas no eran estables, mediante la síntesis con la sonda de ultrasonidos o agitación mecánica, al incrementar la fase interna a 4 mL (EM20-19). Además de preferir metodologías de síntesis menos enérgicas, las partículas obtenidas con cloroformo como disolvente y con la energía proveniente de la sonda de ultrasonidos, tenían un tamaño demasiado reducido como para poder albergar microorganismos en su interior (EM21). Sin embargo, con este último disolvente, la fase interna aumentada a 4 mL y la energía de un agitador magnético se obtuvieron micropartículas del diámetro suficiente para poder encapsular las bacterias modelo (EM22).

A la hora de encapsular bacterias viables, se comprobó que si no se aumentaba la fase interna a 4 mL respecto a una fase orgánica reducida de 1 mL no sobrevivían las bacterias por el exceso de disolvente orgánico y la elevada probabilidad de entrar en contacto con él. Mediante la síntesis de doble emulsión, con elevada fase interna y cloroformo como disolvente, se consiguió la encapsulación de bacterias vivas.

#### Caracterización de las micropartículas.

Tras el proceso de optimización descrito en el apartado anterior se obtuvieron partículas de EuRS100 vacías de un tamaño medio de  $114.8 \pm 48.4 \mu\text{m}$  con un rendimiento de síntesis de  $64.0 \pm 1.8\%$ , Figura 2.22-a-d. Se observaban pequeños poros en la superficie de las micropartículas (Figura 2.22-c) aún con la acción plastificante del TEC.

Cuando se encapsularon bacterias el tamaño de las micropartículas aumentó en comparación con las partículas vacías,  $114.8 \pm 48.4 \mu\text{m}$ . En el caso de la encapsulación de la bacteria modelo *E. coli* se aumentó hasta dos veces el tamaño de las partículas, siendo de una media de  $239.6 \pm 84.6 \mu\text{m}$ , como se muestra en la Figura 2.22-e-h. El aumento de tamaño cuando se encapsuló *L. acidophilus* fue similar,  $212.0 \pm 71.4 \mu\text{m}$ , como se observa en la Figura 2.22-i-l.



**Figura 2.22** Caracterización de la morfología de las micropartículas mediante microscopía electrónica de barrido a-c) partículas vacías, d) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas vacías, e-g) micropartículas con *E. coli* encapsulada, h) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas con *E. coli* encapsulada, i-k) micropartículas con *L. acidophilus* encapsulada, l) histograma de la distribución de tamaños de las micropartículas con *L. acidophilus* encapsulada.

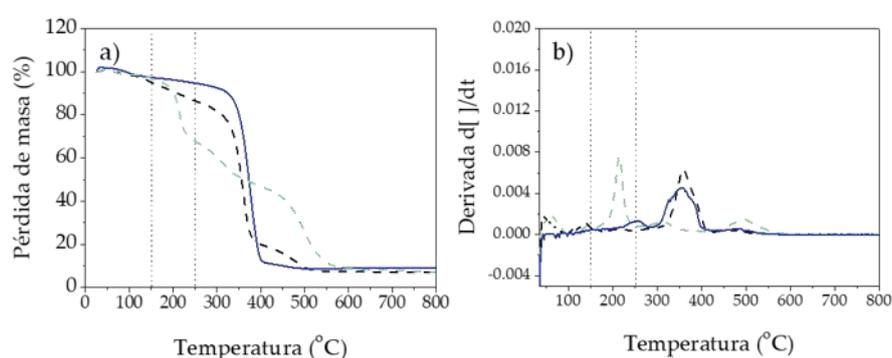
Una de las razones por las que se produce este aumento en el diámetro medio de las micropartículas, es la encapsulación de elementos microscópicos como son las bacterias, cuyas longitudes son superiores a  $2.5 \mu\text{m}$  (Figura A2.6). Además, la viscosidad de los medios de cultivo de bacterias es más elevada que la viscosidad del agua, y aumenta más con la presencia de los microorganismos en el medio [343]. Dicho aumento podría ser también responsable del aumento en el diámetro de las micropartículas cargadas con bacterias, ya que la tensión de esfuerzo cortante se ve disminuida durante el proceso de emulsión mecánica de acuerdo con la bibliografía [344].

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

La superficie de las micropartículas también parece depender de la bacteria encapsulada y del medio de cultivo que la acompaña ya que las micropartículas que encapsularon a la bacteria *E. coli* mostraron una mayor porosidad que las que contenían a la bacteria *L. acidophilus*.

En literatura, para que el tiempo de residencia intestinal sea prolongado evitándose así una rápida excreción gastrointestinal, se recomienda la administración de sistemas microparticulados  $< 200 \mu\text{m}$  [239]. Cabe destacar que todas las micropartículas sintetizadas tienen un tamaño medio por debajo de  $250 \mu\text{m}$ , por lo que encajan, aproximadamente, en el tamaño máximo reportado. Gracias al elevado tamaño de las micropartículas, se evita que el vector, que contiene bacterias en su interior, sea absorbido por las paredes intestinales y se liberen las bacterias en el torrente circulatorio, produciendo una bacteriemia en el interior del organismo [345]. Estas micropartículas mostraron una flotabilidad de 90.2%, lo que apoya la idoneidad del vector para la administración del probióticos por vía gastrointestinal, debido a la posibilidad de permanecer largo tiempo en dicho tracto.

La eficiencia de encapsulación de las bacterias resultó complicada de valorar ya que se trata de un organismo vivo en continuo proceso de crecimiento y división. Así que se abordó el cálculo de la eficacia de encapsulación mediante análisis termogravimétrico (TGA) de las micropartículas liofilizadas. Como se observa en la Figura 2.23, la degradación de las bacterias liofilizadas mostró su máxima pendiente a la temperatura de  $225 \text{ }^\circ\text{C}$ , mientras que las micropartículas vacías se degradaban a la temperatura de  $360 \text{ }^\circ\text{C}$ . Por lo tanto, valorando la pérdida de masa de las micropartículas conteniendo bacterias a la temperatura de  $225 \text{ }^\circ\text{C}$ , en las que lo único que se degrada es el contenido bacteriano presente en las micropartículas, se cuantificó que un 2.5% en peso del vector era carga bacteriana.



**Figura 2.23** Datos del análisis termogravimétrico que muestran la pérdida de peso de las partículas vacías (línea negra discontinua), de las bacterias (línea verde discontinua) y las micropartículas cargadas con las bacterias modelos probióticos (línea azul continua). a) análisis de los datos de TGA, b) primera derivada del análisis TGA.

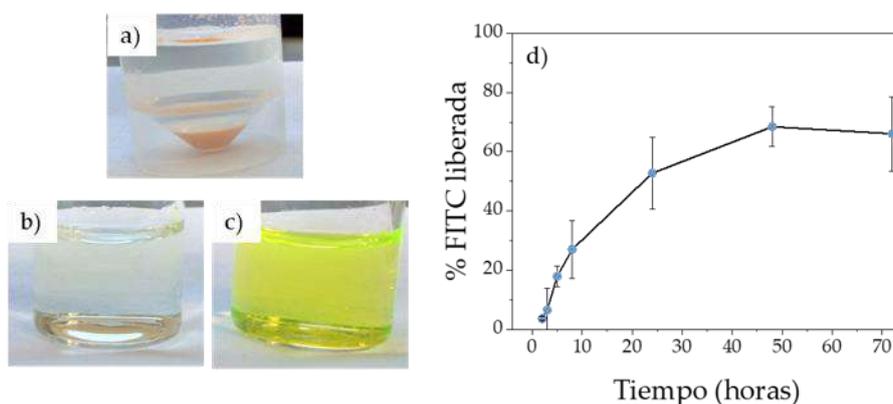
En la industria alimentaria, la dosis recomendada administrada es de  $10^6$  UFC de *L. acidophilus* por gramo de probiótico para conseguir el efecto beneficioso terapéutico deseado

sobre la salud humana [346]. Sin embargo, teniendo en cuenta las condiciones drásticas que deben atravesar hasta llegar al órgano diana, según estudios *in vivo*, se ha comprobado que la dosis diaria requerida para poder observar un cambio en la microbiota debería de encontrarse entre  $10^8$  -  $10^9$  UFC [347].

Por lo tanto, teniendo en cuenta que el peso seco de una bacteria reportado en bibliografía es de 1 pg ( $10^{-12}$  g) [348], para una dosis con efecto terapéutico, se debería administrar 1 mg de bacteria en forma de polvo seco. En relación a los resultados de encapsulación obtenidos, con tan sólo una administración de 40 mg de micropartículas liofilizadas alcanzaríamos la dosis terapéutica, además de proteger el vector frente al pH ácido gástrico y de liberar el contenido microbiano de manera localizada por la mucoadherencia a la pared intestinal, haciendo que el vector resulte potencialmente exitoso para la finalidad probiótica deseada.

### Estudio de la liberación *in vitro* en el tracto gastrointestinal.

Para poder estudiar el proceso de liberación *in vitro* de las micropartículas se encapsuló FITC como colorante fluorescente y se simuló un proceso de digestión gastrointestinal: se incubaron las micropartículas cargadas en fluido gástrico simulado durante 2h y en fluido intestinal simulado durante 72h, de acuerdo con las recomendaciones indicadas en la farmacopea de EE.UU. El perfil de liberación se encuentra representado en la Figura 2.24.



**Figura 2.24** Estudio del perfil de liberación gastrointestinal *in vitro*: a) imagen óptica de una suspensión de micropartículas de Eudragit® RS100 con FITC encapsulado mediante el método HIPE, b) imagen óptica del sobrenadante recogido tras 2 h a 37 °C en condiciones gástricas simuladas, c) imagen óptica del sobrenadante recogido tras 6 h a 37 °C en condiciones intestinales simuladas y d) perfil de liberación del colorante FITC de las micropartículas a lo largo del tiempo.

Aunque en la caracterización de las micropartículas (Figura 2.22-c) se destacó que las micropartículas tenían una superficie algo porosa, se pudo comprobar mediante la liberación gastrointestinal *in vitro* que el fluido gástrico no penetraba por dichos poros ya que la cantidad

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

de fluoróforo liberada en estas condiciones fue de tan sólo un 3.6% en peso (Figura 2.24-b), pudiendo ser el material adherido a la superficie de la micropartícula. Una vez que la micropartícula estaba un tiempo en contacto con el fluido intestinal simulado, comenzaba a degradarse liberando el colorante encapsulado en su interior (Figura 2.24-c).

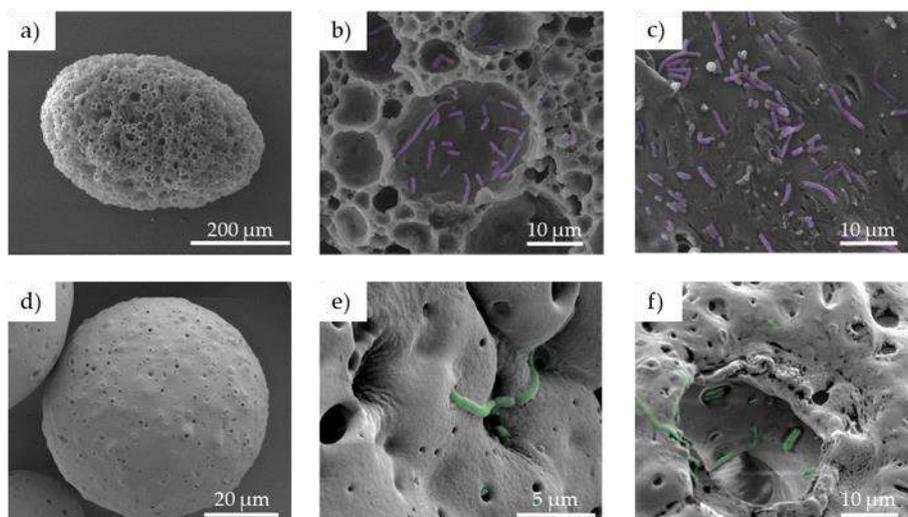
Se realizaron los ajustes cinéticos de primer orden, Higuchi, Peppas-Sahlin, Lindner-Lippold y Korsmeyer-Peppas, incluidos en la Figura A2.7. La cinética que mejor se ajustaba a la liberación del contenido de estas micropartículas, para la cual se obtenía el coeficiente de correlación  $R^2$  más elevado, fue la del modelo de Higuchi [349]. El ajuste matemático se encuentra resumido en la Tabla 2.10.

**Tabla 2.10** Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación del mejor modelo matemático ajustado al perfil de liberación *in vitro*.

Modelo matemático	Ecuación*	Parámetros
Higuchi	$\frac{M_t}{M_\infty} = k^{n=0.5}$	$R^2 = 0.9892$
		$k = 0.08$
		$n = 0.5$

El modelo de liberación de Higuchi propone una liberación mediada por la difusión (constante k) de Fick (n=0.5) a través de la matriz polimérica y de las cavidades que van apareciendo por la erosión del polímero. Lo que quiere decir, se trata de una liberación únicamente controlada por este proceso de difusión, sin que influya ningún proceso más en la cinética.

Por otro lado, se realizó la simulación de la digestión *in vitro* de las micropartículas que contenían bacterias probióticas modelo encapsuladas y se realizó la caracterización mediante microscopía electrónica de barrido, pudiéndose observar dicha caracterización en la Figura 2.25. Se pudo observar la resistencia química de las micropartículas a las condiciones gástricas y que, en condiciones intestinales a lo largo del tiempo, se erosionaban, abriendo grandes poros en su superficie, liberando las bacterias al medio exterior. Este proceso de erosión corresponde a una degradación paulatina de la superficie polimérica de la micropartículas que genera poros de mayor tamaño que las bacterias, por lo que los microorganismos no ven impedida su salida de la matriz polimérica.



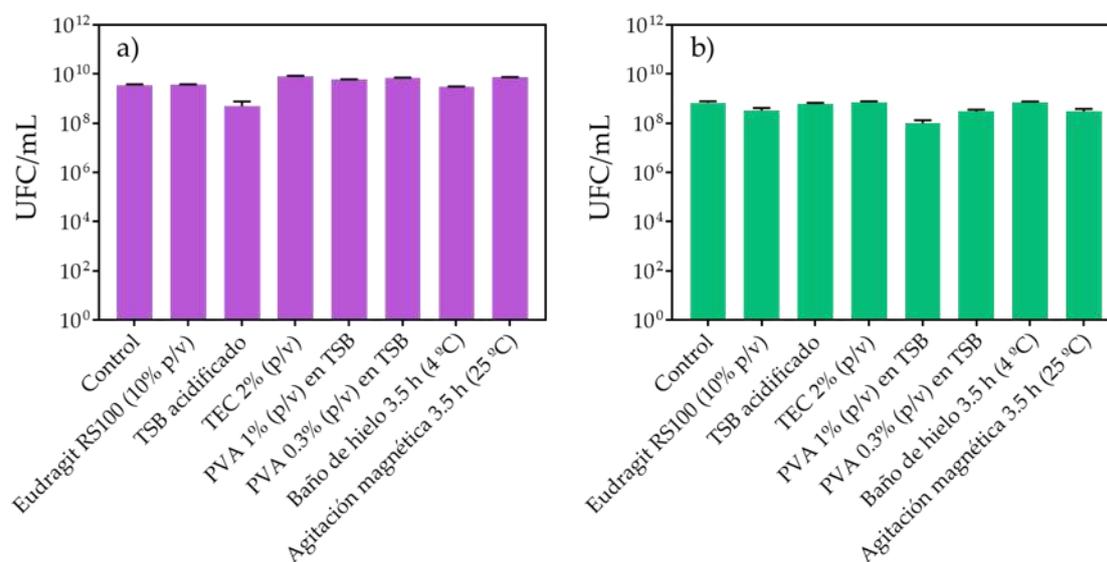
**Figura 2.25** Micrográficas de SEM de las micropartículas que encapsulan a *E. coli* (a-c) y a *L. acidophilus* (d-f) tras a y d) 2 h en condiciones gástricas simuladas, b y e) 6 h en condiciones intestinales simuladas, c y f) 24 h en condiciones intestinales simuladas. Las imágenes se han coloreado de morado (*E. coli*) y verde (*L. acidophilus*) con el software Affinity photo (2019 Serif, Europe).

### Ensayos microbiológicos in vitro.

En la Figura 2.26 se evalúan los resultados de viabilidad bacteriana tras poner la carga microbiana en contacto con los diferentes reactivos de síntesis de manera individual y tras someter a las bacterias a los procedimientos de la síntesis. Se puede concluir que ni el polímero, ni los reactivos, ni la agitación mecánica ni el baño de hielo (temperatura 4 °C) perjudicaron la supervivencia bacteriana.

Posteriormente se comprobó que todo el conjunto que formaba la síntesis junto con el disolvente con el que se había optimizado dicha síntesis tampoco resultaban perjudicial para la población bacteriana, lográndose una encapsulación satisfactoria de microorganismos vivos. El cloroformo que formaba la fase orgánica es altamente inmiscible con el agua, por lo tanto, el contacto entre el disolvente halogenado y la fase acuosa que contenía las bacterias fue mínimo. Dicha inaccesibilidad de las bacterias al disolvente orgánico y que la fracción acuosa fuera mayor que la orgánica, reducían considerablemente un efecto citotóxico durante el procedimiento de encapsulación. Además, cabe destacar el efecto protector que parece ejercer el plastificante TEC sobre las bacterias debido al efecto crioprotector de los grupos citrato [350].

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.



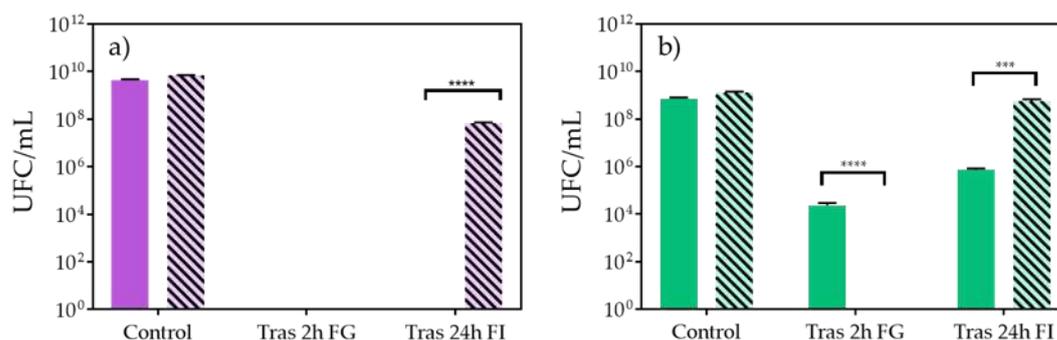
**Figura 2.26** Viabilidad de las bacterias después de estar en contacto con el polímero, los medios y reactivos de encapsulación y las condiciones de síntesis de: a) *E. coli*, b) *L. acidophilus*. Los resultados se obtuvieron de tres ensayos independientes.

Además, se realizaron ensayos microbiológicos para evaluar la viabilidad de las bacterias, libres y encapsuladas, en condiciones gastrointestinales. La evaluación de la resistencia de las bacterias sin encapsular (*E. coli* como bacteria gram negativa [302] y *L. acidophilus* como bacteria gram positiva) en condiciones gástricas e intestinales simuladas mostró, como se representa en la Figura 2.27, que la bacteria *E. coli* no sobrevivía al drástico pH ácido gástrico, mientras que para la bacteria ácido resistente *L. acidophilus* se observó una reducción de 4 log respecto al control (de 10<sup>8</sup> a 10<sup>4</sup>). Como se refleja en literatura, las bacterias ácido resistentes son capaces de permanecer viables a valores de pH tan bajos como son los gástricos, sin embargo, la reducción en la supervivencia que sufren, aunque no sea total, es suficiente para que se encuentre por debajo de la dosis mínima recomendada indicada anteriormente (10<sup>6</sup> UFC/mL) [343]. Por esta razón, cabe destacar las ventajas que la encapsulación de las bacterias probióticas presenta frente a la administración de bacterias vivas (en yogures o liofilizadas): en la supervivencia y en el efecto terapéutico, además de que aumenta la vida útil del probiótico, el manejo es más fácil y cómodo reducido a una sola administración y en la liberación que se produce de manera más controlada y localizada.

En la Figura 2.27 también se muestran la tasa de viabilidad de las bacterias probióticas modelo encapsuladas tras condiciones de digestión simulada. Tras 2h en condiciones gástricas, no se observó crecimiento alguno tanto para *E. coli* como para *L. acidophilus*. En cambio, cuando se reemplazó el medio gástrico simulado por fluido intestinal simulado, tras 24h en incubación a 37 °C, se obtuvieron recuentos similares a los controles de partida, 10<sup>7</sup>

UFC/mL para *E. coli* y  $10^8$  UFC/mL para *L. acidophilus*. Los recuentos celulares, en este caso, se encontraban por encima del límite mínimo de dosis terapéutica.

Igualmente, se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos encapsulados y los grupos no encapsulados (barras rayadas), partiendo de diferentes controles que no presentaban diferencias estadísticas.



**Figura 2.27** Viabilidad de las bacterias después de condiciones simuladas gastrointestinales (2 h en condiciones gástricas y 24 h en condiciones intestinales) de bacterias vivas libres (barras sin rayas) y bacterias encapsuladas (barras con rayas) de a) *E. coli*, b) *L. acidophilus* (\*\*\*)  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

Al realizar la digestión simulada de las micropartículas con las bacterias encapsuladas, se quiso también evaluar la cinética de crecimiento de las bacterias liberadas a lo largo del tiempo o, lo que es lo mismo, cuánto tardaría una bacteria en adaptarse y crecer una vez alcanzado el intestino tras su paso por el tracto gastrointestinal. Se obtuvo un lapso de tiempo de 6 h hasta que las bacterias consiguieron liberarse de las partículas poliméricas y colonizar el medio de forma que se obtuvieran recuentos bacteriana en su fase exponencial de crecimiento, es decir, en su fase proliferativa ( $10^7$  UFC/mL), alcanzando la fase estacionaria ( $10^9$  UFC/mL) y, por lo tanto, la total colonización, al cabo de 24h.

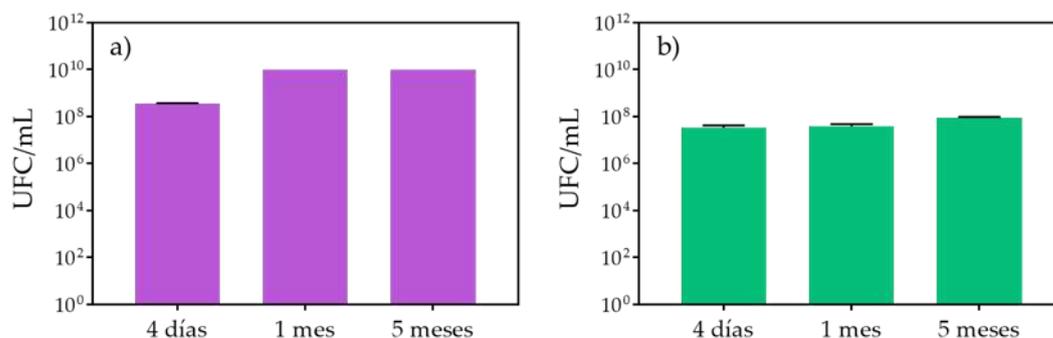
### Estudio de la estabilidad del probiótico a largo plazo.

En vista a que el probiótico desarrollado resultó viable y protegió el contenido bacteriano de las drásticas condiciones gástricas, este estudio resultó de elevado interés ya que, también debía de ser capaz de mantener la actividad probiótica durante largo tiempo. Esta necesidad se debe, simplemente, al almacenamiento del producto desarrollado para poder ser comercializado.

Para ello, las micropartículas que contenían las bacterias probióticas modelo encapsuladas se liofilizaron y almacenaron en condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad. Tras 4 días, 1 mes y 5 meses se reconstituyeron sometiéndolas a las condiciones gastrointestinales simuladas. Tras el recuento bacteriano y, como se muestra en la Figura 2.28, los resultados revelaron que las bacterias encapsuladas y liofilizadas permanecieron vivas el tiempo que estuvieron almacenadas. Los niveles de concentración bacteriana alcanzaban los

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

niveles de recuento bacteriano alcanzado tras la reconstituir las partículas inmediatamente después de ser sintetizadas.

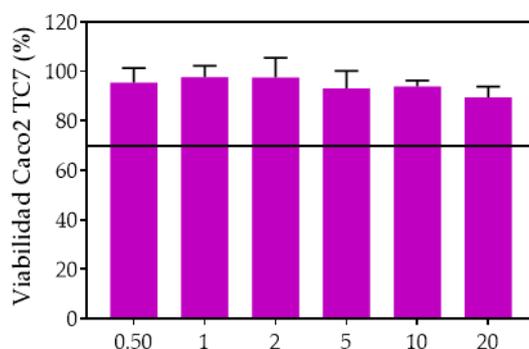


**Figura 2.28** Resultados de la prueba de viabilidad bacteriana del estudio de estabilidad a largo plazo de las micropartículas liofilizadas que encapsulan a) *E. coli* y b) *L. acidophilus*, tras 2 h en condiciones gástricas y 24 h en condiciones intestinales. Los resultados se obtuvieron de tres síntesis de encapsulación independientes ensayadas por triplicado.

### Ensayo de viabilidad celular *in vitro*.

Para estudiar el posible efecto citotóxico se realizó un ensayo de viabilidad *in vitro* en la línea celular Caco2-TC7, tal y como se ha explicado en el apartado 2.2.1.7, debido a que su fenotipo imita los enterocitos del intestino delgado.

Como puede observarse en la Figura 2.29, los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron superiores al 90% en todo el rango de concentraciones ensayadas (0.5 – 20 mg/mL), comparándolas con las células que no han sido tratadas con micropartículas.



**Figura 2.29** Viabilidad celular de las micropartículas de Eudragit® RS100 en la línea celular Caco2 TC7 tras un periodo de incubación de 24h. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE (n=4). La viabilidad del 100% fue asignada a las células control no tratadas.

De acuerdo a la norma ISO 100993-5, la cual dicta que un material no es citotóxico si no reduce la viabilidad celular por debajo del 70% respecto al control, las micropartículas

resultaron altamente citocompatibles hasta una concentración de 20 mg/mL, siendo, por lo tanto, idóneas para la administración terapéutica oral de probióticos encapsulados en vectores poliméricos.

En estudios previos realizados se comprobó la ausencia de citotoxicidad de los polímeros basados en metacrilato y ácido metacrílico en diferentes líneas celulares como en la línea de hepatoma humano (HepG2) [344], células de adenocarcinoma de colon humano (SW480) [351], células de fibroblastos (NIH / 3T3) [352], además de que el polímero Eudragit® RS100 se encuentra incluido en los materiales aprobados por la FDA [343]. Sin embargo, en todos los casos mencionados se estudiaron concentraciones más bajas que las ensayadas en este estudio.

### 2.3.3 Conclusiones.

En esta Tesis Doctoral se han sintetizado micropartículas de Eudragit® RS100 mediante el método de doble emulsión de elevada fase interna (HIPE) conteniendo en su interior bacterias probióticas modelo gram negativas, *E. coli*, y gram positivas, *L. acidophilus*.

Tanto los procesos del protocolo, el polímero y los reactivos utilizados no afectaron a la viabilidad bacteriana. Se evaluó la eficiencia de carga por peso de bacteria obteniéndose un 2.8% del peso de la micropartícula.

Se obtuvieron vectores de 212.0  $\mu\text{m}$  y de 293.6  $\mu\text{m}$  que encapsulaban las bacterias probióticas *E. coli* y *L. acidophilus*, respectivamente, encontrándose ambas dentro del rango adecuado para lograr largos tiempos de residencia en el intestino evitando la absorción sistémica.

Las micropartículas permanecieron intactas tras condiciones gástricas simuladas, liberando su carga al cambiarlas a condiciones intestinales simuladas, por lo que la matriz polimérica actuaba como protector de los microorganismos contenidos. Esta liberación se dio por la erosión polimérica y permeabilización de la carga bacteriana encapsulada.

Las bacterias liberadas a lo largo del tiempo en condiciones intestinales mostraron una viabilidad suficientemente elevada como para alcanzar las dosis recomendadas de probióticos comerciales.

Las micropartículas mostraron una elevada citocompatibilidad (20 mg/mL) con células Caco2-TC7, confirmando así su potencial idoneidad para la administración terapéutica oral.

Los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral destacan la eficacia de esta tipología de polímeros entéricos como recubrimientos para la administración oral localizada de probióticos, mejorando la eficiencia de liberación en el tejido diana.

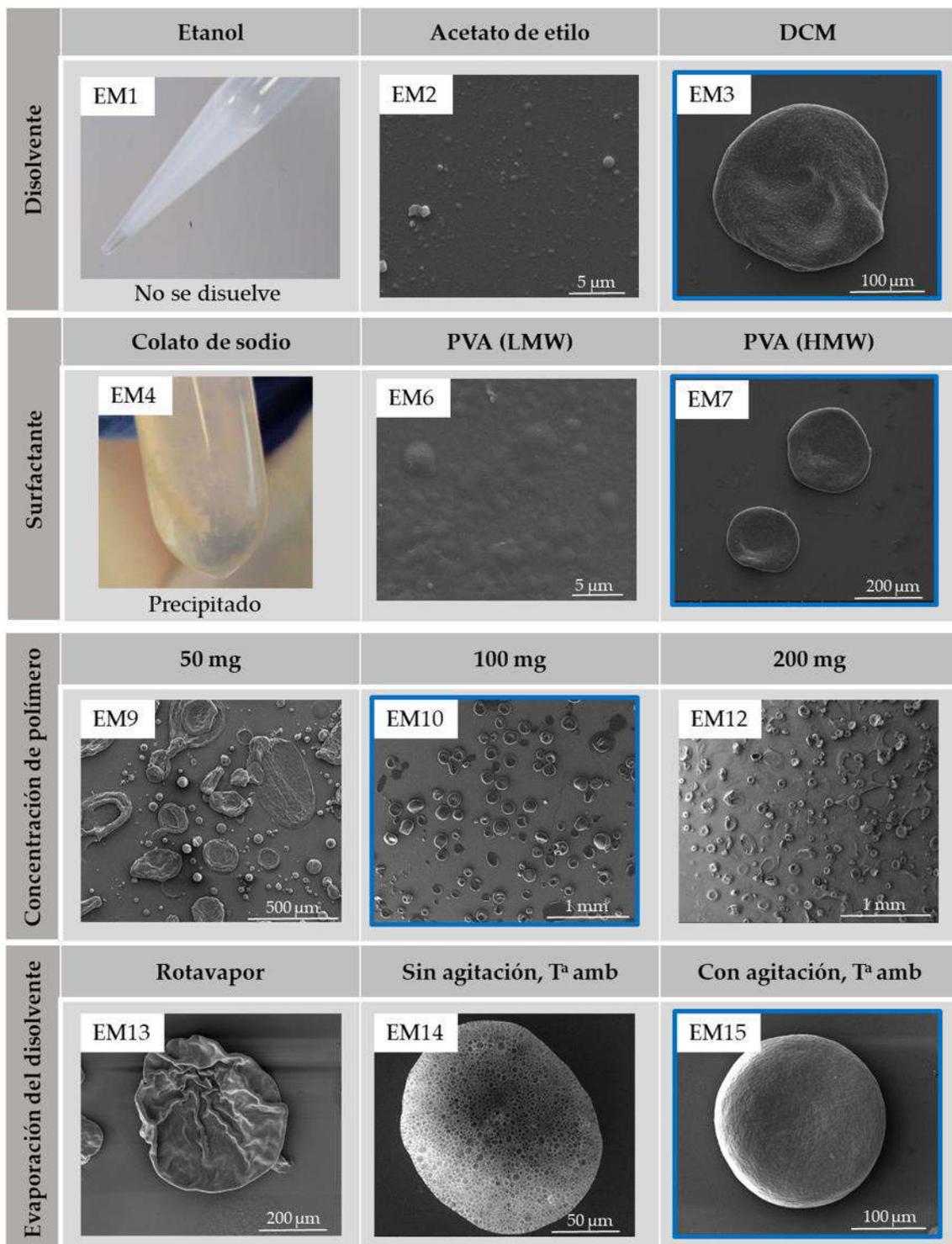


**Anexo II.**



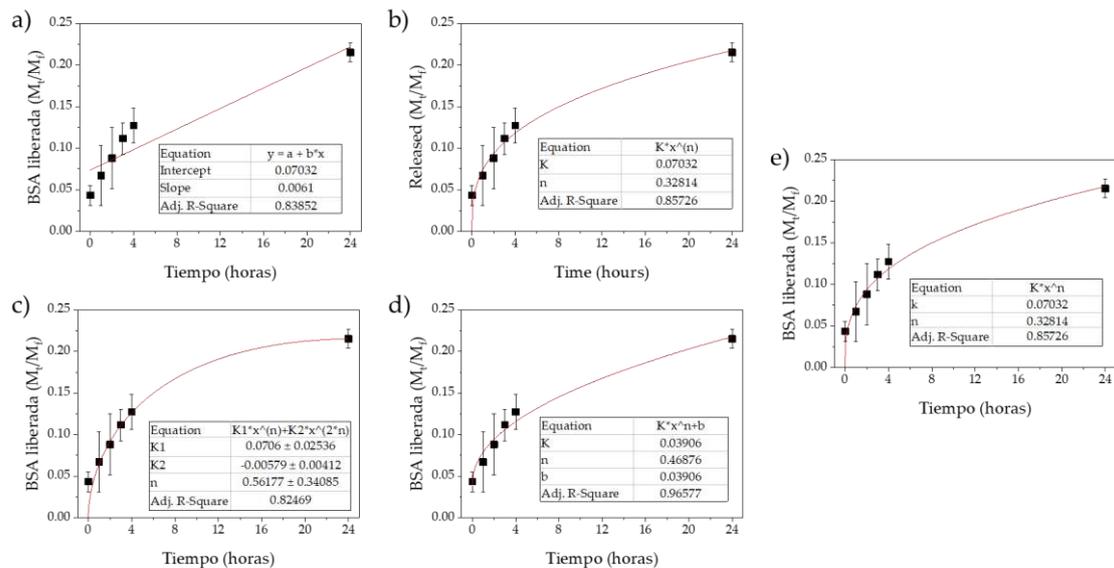


## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

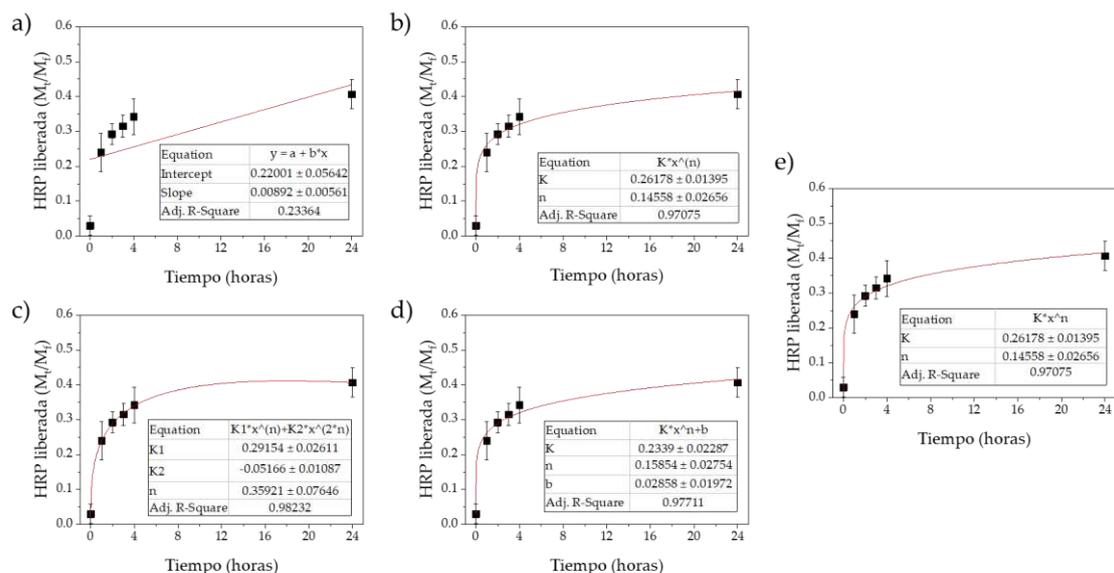


**Figura A2.1** Optimización de la síntesis de micropartículas para la encapsulación de proteínas modelo mediante el método de emulsión doble-evaporación del disolvente. Las condiciones de síntesis finales se encuentran enmarcadas en azul.

## Anexo II.

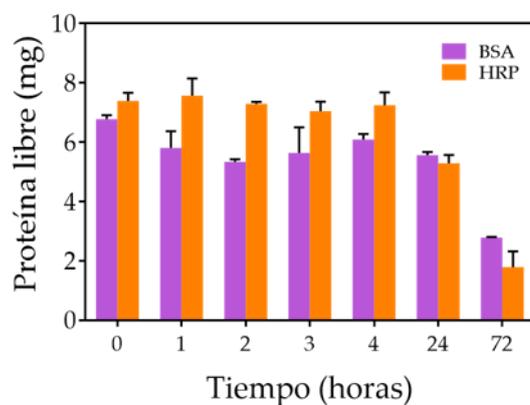


**Figura A2.2** Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación de la proteína BSA *in vitro*: a) primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold, e) Korsmeyer-Peppas.

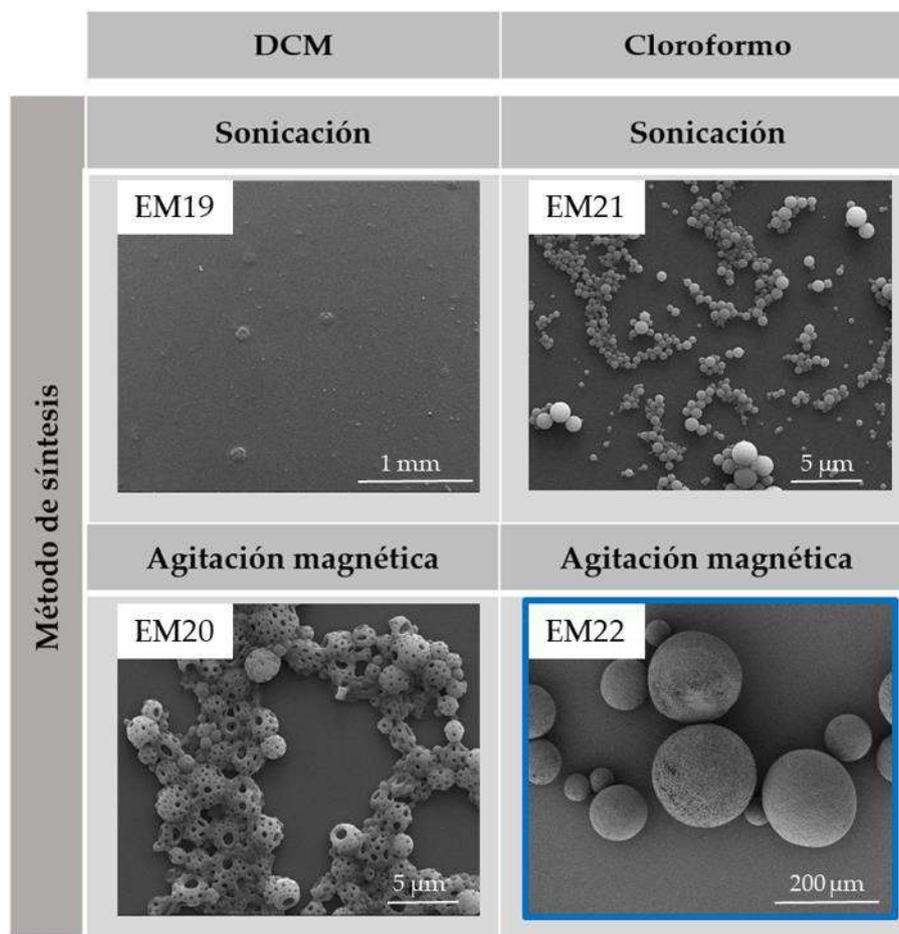


**Figura A2.3** Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación de la proteína HRP *in vitro*: a) primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold, e) Korsmeyer-Peppas.

## DOBLE EMULSIÓN-EVAPORACIÓN DEL DISOLVENTE.

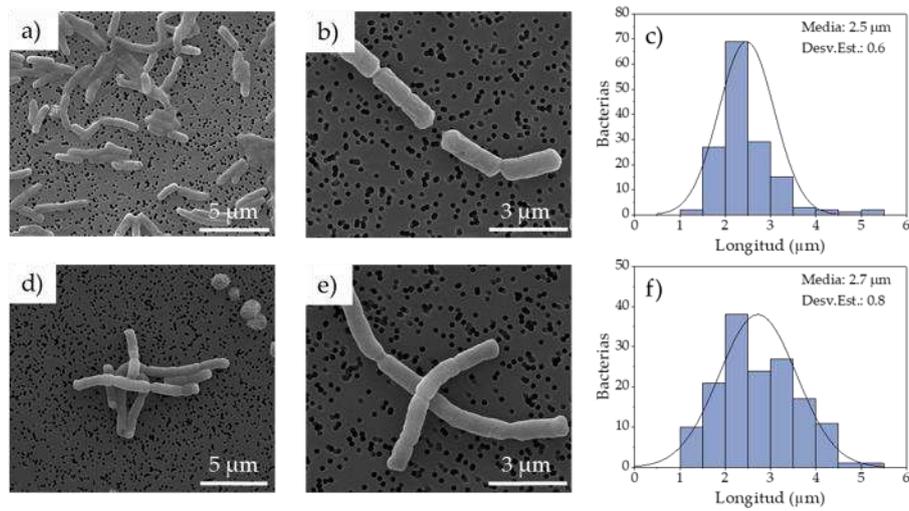


**Figura A2.4** Gráfica de la cuantificación de proteína libre BSA (morado) y HRP (naranja) en la liberación in vitro junto con micropartículas vacías.

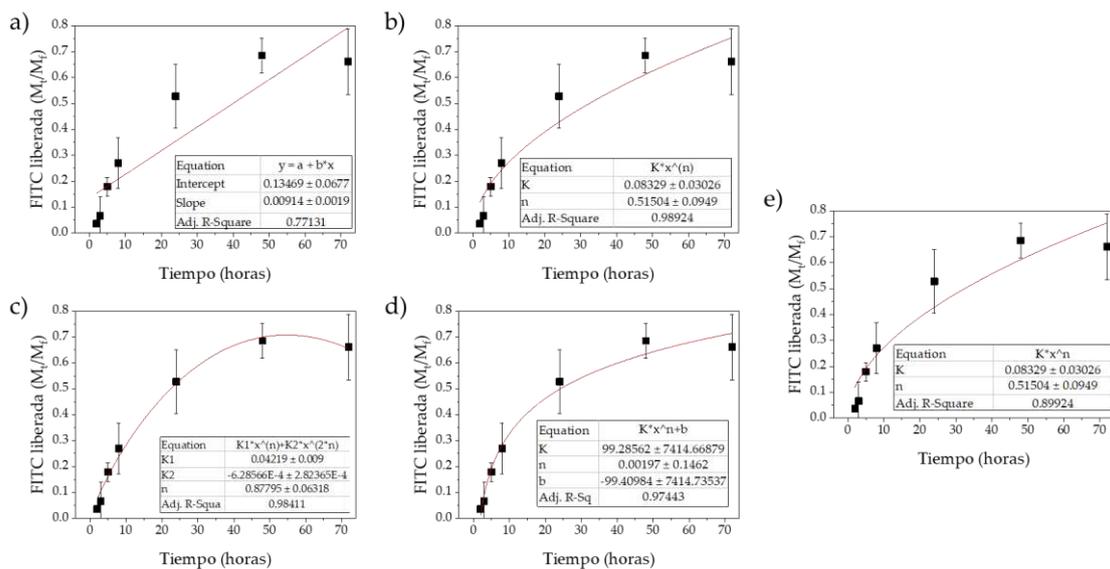


**Figura A2.5** Optimización de la síntesis de micropartículas para la encapsulación de bacterias probióticas modelo mediante el método de emulsión doble-evaporación del disolvente de elevada fase interna. Las condiciones de síntesis finales se encuentran enmarcadas en azul.

## Anexo II.



**Figura A2.6** Caracterización de la morfología de las bacterias probióticas modelo mediante microscopía electrónica de barrido a) *Escherichia coli*, b) *Lactobacillus acidophilus*.



**Figura A2.7** Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación de FITC *in vitro*: a) primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold, e) Korsmeyer-Peppas.

# **CAPITULO III.**

## **NANOPRECIPITACIÓN.**

**Síntesis en discontinuo y su implementación en microfluídica para la síntesis de nanosistemas de liberación de antibióticos.**





### 3.1 Introducción.

#### 3.1.1 Síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación.

Este capítulo se centra en el método de síntesis de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitación, también conocido como método de desplazamiento del disolvente o de deposición interfacial. Fue descrito por primera vez por Fessi et al. [181] en 1989 como una técnica de síntesis de micro y nanopartículas que se basa en la precipitación interfacial del polímero tras el desplazamiento del disolvente semipolar miscible con el agua de una disolución lipofílica.

Esta técnica presenta importantes ventajas frente a otras técnicas de síntesis de partículas poliméricas, entre las que destaca la facilidad y simpleza para desarrollar partículas, ya que tan sólo consta de un paso. Además, otras ventajas asociadas a este método son: a) la reproducibilidad del método debido a, como se ha comentado, la sencillez del mismo, b) la obtención de partículas submicrométricas con distribuciones de tamaño bastante homogéneas, c) no es necesaria la adición de estabilizadores coloidales, d) necesidad de pequeñas cantidades de disolventes orgánicos, e) uso de disolventes de baja toxicidad, y f) requiere bajos aportes energéticos y no necesita fuentes externas de energía, como en el caso del proceso de emulsificación [353]. Sin embargo, la limitación principal se encuentra en la encapsulación de fármacos, ya que este debe ser capaz de precipitar en el interior de las partículas formadas, siendo un proceso más sencillo para moléculas lipofílicas o anfipáticas que para aquellas hidrofílicas [354].

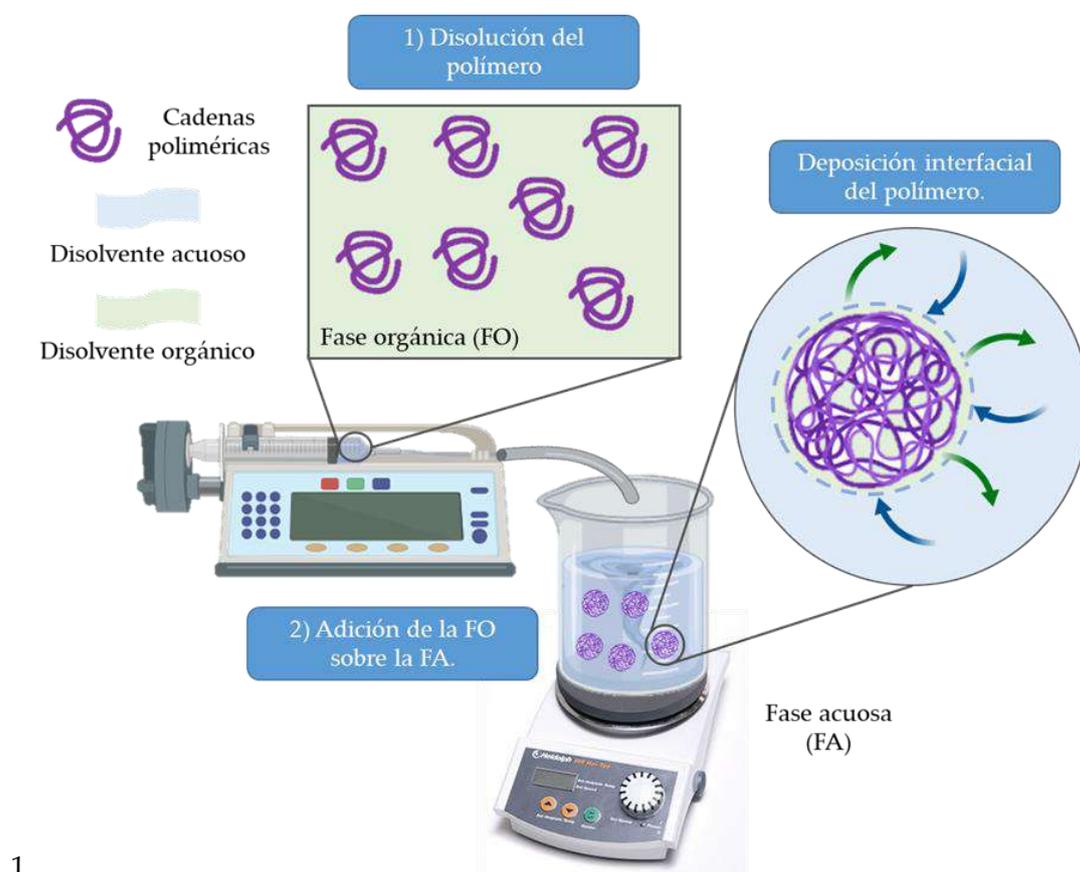
Los campos de aplicación de los materiales obtenidos por la técnica de nanoprecipitación son muy diversos y variados, entre los que se pueden encontrar: la industria agroalimentaria [355], liberación controlada de fármacos [356], cosmética [357], textil [358], biomedicina [359], imagen y diagnóstico [360], entre otros.

##### 3.1.1.1 Mecanismo de formación de nanopartículas.

Para llevar a cabo el método de síntesis de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitación es necesaria una fase orgánica (FO) compuesta por un disolvente semipolar capaz de mantener disuelto al polímero, que la temperatura de ebullición de este disolvente no sea elevada y que, a su vez, sea miscible con agua. Los más utilizados son los disolventes de bajo potencial tóxico, clasificados por la Agencia Europea del Medicamento como clase 3, entre ellos, el etanol y la acetona [361]. Por otro lado, también es necesaria una segunda fase acuosa (FO).

El mecanismo de la síntesis es muy sencillo e involucra dos pasos principales: un primer paso en que se disuelven el polímero y el fármaco a encapsular en la fase orgánica y un segundo paso en el que se añade esta fase orgánica sobre la fase acuosa gota a gota de

manera que, cuando difunde la primera fase sobre la segunda fase, se reduce la solubilidad del polímero y éste precipita favoreciendo la formación espontánea de partículas [362], tal y como se esquematiza en la Figura 3.1.



1

**Figura 3.1** Esquema del proceso de síntesis por nanoprecipitación.

La formación de partículas es un proceso complejo que incluye tres pasos: nucleación, crecimiento y aglomeración [363]. La fuerza impulsora de estos fenómenos es la denominada supersaturación ( $S$ ), la cual se define como la relación entre la concentración polimérica y la solubilidad del polímero en la mezcla de disolvente, como se expresa en la Ecuación 3.1.

$$S = \frac{\text{Concentración local de soluto}}{\text{Límite de solubilidad de la mezcla}} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

De acuerdo con la teoría clásica de nucleación [363], cuando el polímero supera su valor de supersaturación crítica, la separación de las fases se encuentra favorecida energéticamente y se produce la precipitación del polímero en el medio de síntesis, formando núcleos poliméricos, que son termodinámicamente estables. Por lo tanto, la energía libre ( $\Delta G$ ) de la formación de los núcleos viene definida por la expresión de la Ecuación 3.2.

$$\Delta G = \frac{16\pi\gamma^3 v^3}{3 k^2 T^2 (\ln S)^2} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

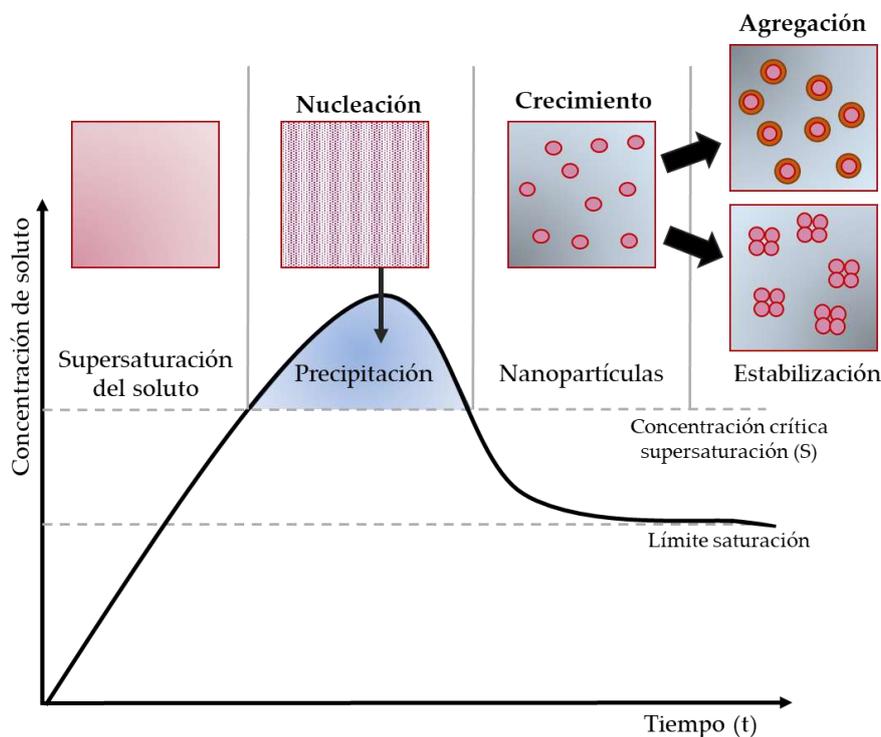
Donde  $\gamma$  es la tensión superficial en la interfase entre el líquido y el polímero,  $v$  es el volumen molar de soluto,  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura y  $S$  la supersaturación [364].

Una vez producidos estos núcleos, aumentan de tamaño por asociación con otras moléculas del polímero disuelto en el medio en condiciones de supersaturación hasta que se alcanza un tamaño crítico para el que los núcleos formados y crecidos no se redisuelven. Este paso de nucleación continuará hasta que el crecimiento de los núcleos reduzca la concentración de polímero en la mezcla y con ello se aleje de las condiciones de supersaturación. Por lo tanto, la tasa de nucleación ( $B$ ) podría expresarse como se indica en la Ecuación 3.3.

$$B = K_1 \exp\left(-\frac{16\pi\gamma^3 v^2}{3 k^3 (\ln S)^2}\right) \quad \text{Ecuación 3.3}$$

Donde  $K_1$  es una constante y el resto de variables ya han sido definidas previamente.

Por lo tanto, la principal variable en el proceso de nanoprecipitación es la supersaturación ( $S$ ) del sistema, la cual se puede modificar mediante la concentración polimérica, el mezclado de fases o cualquier fenómeno que altere la transferencia de masa [365]. En el punto en el que la nucleación se detiene, es decir, cuando la concentración de soluto se encuentra por debajo de la supersaturación crítica, se dará el crecimiento de los núcleos por condensación o coagulación. El proceso de condensación implica el depósito de moléculas individuales en la superficie de la partícula en formación, delimitado por la difusión de las moléculas a través de la interfase. Por otro lado, el de condensación implica la agregación de partículas cuando las interacciones atractivas (Van de Waals o interacciones hidrofóbicas) predominan sobre las repulsivas (estéricas o electrostáticas), y está delimitado por la cinética de las partículas formadas y la eficiencia de colisión entre ellas [366]. Cuando la concentración de soluto en el disolvente se reduce por debajo de la concentración de saturación de la disolución, el proceso de crecimiento por condensación se detiene, predominando únicamente el de aglomeración por coagulación [367]. El proceso de síntesis de nanopartículas mediante el método de nanoprecipitación se encuentra esquematizado en la Figura 3.2.

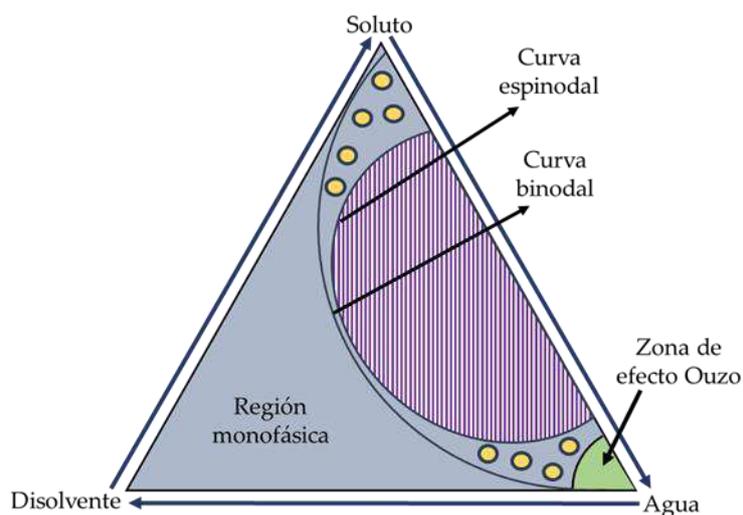


**Figura 3.2** Fases de nucleación, crecimiento y agregación del proceso de síntesis de partículas por nanoprecipitación. Imagen adaptada de [368][369].

Debido a la sucesión de acontecimientos que se producen a lo largo del proceso de síntesis de partículas por nanoprecipitación, resulta clave el control espacio-temporal de cada una de las fases [370]. Por lo tanto, si se produce una mezcla homogénea y rápida, gracias a la mezcla molecular, la supersaturación se alcanzará rápidamente, permitiendo la rápida nucleación y la separación temporal del crecimiento de las partículas y, con ello, un rendimiento de partículas pequeñas con distribuciones de tamaño mucho más estrechas [367].

Por otro lado, existe otro enfoque de la técnica de síntesis de partículas mediante nanoprecipitación que se basa en diagramas de fase de cada polímero en la mezcla de disolventes que componen la FO y la FA. En este enfoque, se propone como estrategia de síntesis la elección de las proporciones adecuadas de cada componente del sistema ternario para la obtención espontánea de partículas pequeñas y monodispersas [371]. Vitale et al. [372] denominaron esta estrategia como “efecto Ouzo”, debido a la similitud en la preparación de un licor griego que recibe el mismo nombre. Los principales componentes de dicho licor son agua (~55%), alcohol (~45%) y trans-anetol (~0.2%), un aceite insoluble en agua extraído de las semillas de anís que adquiere un aspecto lechoso al mezclarlo con agua formando gotas de aceite metaestables. Brevemente, se trata de centrar las condiciones de síntesis de partículas a las de la región metaestable del diagrama de fases la cual se encuentra entre la curva binodal (límite de miscibilidad) y la curva espinodal (límite de estabilidad) [373]. Es en esta zona donde se produce la nucleación y el crecimiento de las partículas y corresponde a bajas

concentraciones de soluto y una pequeña proporción de FO respecto a la FA, como se indica en el diagrama representado en la Figura 3.3.



**Figura 3.3** Diagrama de fases para la mezcla ternaria de los componentes del método de síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación (soluto-disolvente-agua) adaptada con permiso de Elsevier de [363]. La curva binodal separa la región monofásica de la región bifásica. La curva espinodal separa el dominio que evoluciona por nucleación (con círculos amarillos) y el dominio donde se produce la separación espontánea de fases (dominio con rayas moradas). La región metaestable en la que se produce una población de gotas nanométricas monodispersas en una disolución acuosa es la zona de efecto Ouzo (dominio de color verde).

### 3.1.1.2 Factores que influyen en la técnica de nanoprecipitación.

Como se ha mencionado, la técnica de nanoprecipitación se basa en la mezcla de dos fases parcialmente miscibles, una denominada FO (fase orgánica) que contiene el polímero disuelto en un disolvente semipolar y otra denominada FA (fase acuosa) compuesta por un líquido acuoso en el que el polímero no es soluble. Por ello, los factores que pueden influir en el resultado final obtenido por esta técnica, resumidos en la Tabla 3.1, son los siguientes:

#### - Concentración y peso molecular del polímero.

Ambos parámetros influyen directamente sobre las propiedades físico-químicas de la disolución orgánica que compone la FO, principalmente en la viscosidad de la misma. Cuando la concentración polimérica aumenta, el tamaño de las partículas obtenidas también aumenta, posiblemente debido al aumento de la viscosidad de la fase [374]. Sin embargo, de acuerdo con los diagramas de fase ternarios, la concentración polimérica debe encontrarse en un rango de valores propio para cada conjunto de componentes. Dicho parámetro debe ser superior a la concentración de supersaturación crítica para dar la nucleación, pero si es

excesivamente superior, se dará el fenómeno de coalescencia con la consecuente aparición de agregados de partículas [375].

En cuanto al peso molecular del polímero, la relación observada entre el parámetro y el diámetro final de las partículas no es tan evidente. Hay estudios que sostienen el aumento del diámetro de las partículas producidas con el aumento del peso molecular polimérico, debido al aumento de la viscosidad de la fase orgánica [376]. Pero, por otro lado, Lince et al. [377] observaron diámetros mayores con disoluciones poliméricas de menores pesos moleculares, fenómeno que explicaron mediante la diferencia de solubilidad ya que, la precipitación de las disoluciones de mayor peso molecular es más rápida al disminuir la solubilidad. Por último, Legrand et al. [378] no observaron diferencias en el diámetro del producto final relacionadas con el peso molecular del polímero.

### - Disolvente.

Un buen disolvente para esta técnica debe cumplir una serie de requisitos como: 1) baja temperatura de ebullición para una fácil eliminación del medio y mayor estabilidad térmica del polímero, 2) mantener disuelto al polímero de manera estable y 3) ser miscible con la fase acuosa para que se pueda dar el fenómeno de desplazamiento de las fases. Para este método de síntesis, los disolventes más utilizados, como ya se ha comentado, son los disolventes de bajo potencial tóxico, clasificados por la Agencia Europea del Medicamento como clase 3, entre ellos, el etanol y la acetona [361].

La elección del disolvente va a influir en las propiedades de la FO ya que tendrá efecto sobre la viscosidad de la disolución, entre otros. Perevyazko et al. [379] estudiaron el efecto de la viscosidad en función del disolvente y del polímero observando que, a valores de viscosidad elevados, el mezclado de las fases es peor y la dispersión de tamaño de las partículas finales mayor. Por otro lado, el estudio de Huang et al. [380] observó la relación directa entre el tamaño final de las partículas y el coeficiente de difusión del disolvente empleado en agua ( $D$ ). Los valores del coeficiente de difusión en agua a 20 °C de los disolventes más utilizados en esta técnica son:  $D_{\text{acetona}} 1.28$ ,  $D_{\text{etanol}} 1.24$ ,  $10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  [381]. Dicha relación establecía que a mayor valor de difusión del disolvente en la fase acuosa, el tamaño final de las partículas producidas era inferior [380].

### - Surfactante.

Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de partículas estables mediante la técnica de nanoprecipitación no precisa la adición de agentes estabilizadores [382]. Sin embargo, ha sido estudiado si su incorporación influía sobre la estabilización final, evitando la aglomeración y, por lo tanto, sobre el tamaño de partículas finalmente producidas.

Kwon et al. [383] observaron que un aumento de concentración del agente estabilizador rendía diámetros de partículas inferiores, posiblemente debido a la reducción de coalescencia

entre partículas por un aumento de estabilidad estérica. Por otro lado, Zweers et al. [384] observaron que el efecto producido era el contrario, se observó un aumento en el diámetro final de las partículas con elevadas concentraciones de surfactante. En vista a estos resultados, Arica et al. [385] propusieron como hipótesis la presencia de dos efectos competitivos: un efecto estabilizador que rendía menores tamaños de partículas finales y un incremento de viscosidad de la fase acuosa, cuando la concentración del surfactante se elevaba, que producía partículas finales con mayores diámetros.

Por otro lado, los estudios de Dong et al. [386] no observaron efectos directos sobre el diámetro final de las partículas o sobre la distribución de tamaños obtenidas en relación con la adición de agentes estabilizadores ni con el aumento de su concentración.

### - Ratio FA/FO (R).

El estudio de la influencia del ratio entre las fases acuosa (FA) y orgánica (FO) sobre el tamaño final de las partículas producidas fue estudiado por Budhian et al. [387]. El estudio demostró que el aumento de la proporción de la FA originaba partículas de menor diámetro, lo que se debe a la rápida difusión del disolvente a la fase acuosa con la consecuente precipitación y estabilización de la partícula.

Sin embargo, otros experimentos llevados a cabo por Chorny et al. [388] no encontraron ninguna influencia sobre el diámetro final de las partículas al incrementar el valor del ratio FA/FO.

### - Tiempo de mezcla.

En el método de síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación se precisa, simplemente, de la agitación mecánica de la mezcla de fases. Por lo tanto, una buena agitación implicará una mejor homogeneidad de la mezcla, una difusión del disolvente más rápida y, consecuentemente, un menor tamaño final de las partículas [389]. Sin embargo, también se encuentran estudios de este tipo de método de síntesis en los que no se encuentran diferencias en el producto final al aumentar la velocidad de agitación de la mezcla [380]. No obstante, es necesario indicar que la existencia de perfiles de concentración, produce distintos niveles de supersaturación y favorece la existencia de diferentes eventos de crecimiento de nanopartículas en regiones muy próximas, favoreciendo así la polidispersidad de tamaños.

### - Molécula bioactiva.

Lo más habitual es la encapsulación de biomoléculas de naturaleza hidrofóbica [390]. Sin embargo, las investigaciones actuales tratan también de introducir biomoléculas de naturaleza hidrófila en el interior de las nanopartículas producidas [391][185]. Sin embargo, los estudios de Budhian et al. [387] no rindieron cambios significativos en el diámetro de las partículas producidas cuando se adicionó el agente a encapsular.

Por otro lado, el punto que debe de tenerse en cuenta en la encapsulación de cualquier biomolécula mediante esta técnica es que la nucleación del polímero y de la biomolécula puede ser homogénea o heterogénea. Esto quiere decir que la mezcla de ambos puede alcanzar la supersaturación a la vez, dándose la nucleación homogénea y quedando la biomolécula atrapada en el interior de la partícula polimérica o, por el contrario, que la supersaturación se alcance antes para uno de los dos componentes resultando en la nucleación heterogénea y, por consecuente, una precipitación del agente a encapsular temprana pudiendo quedar fuera de la partícula o, en el caso contrario, que la biomolécula quede atrapada en el interior de la partícula aun no habiendo precipitado [368].

**Tabla 3.1** Resumen de los factores que pueden influir en las partículas poliméricas obtenidas por nanoprecipitación y el efecto que produce el aumento de cada parámetro.

Parámetros del proceso de síntesis.		
Parámetro	Efecto	Ref.
Concentración de polímero.	Aumento del tamaño final de las partículas.	[388]
Peso molecular del polímero.	Aumento del tamaño final de las partículas.	[376]
	Reducción del tamaño final de las partículas	[377]
	Sin influencia	[378]
Surfactante	Reducción del tamaño final de las partículas, hasta un punto de concentración crítico, en el que empieza a aumentar.	[383][384] [385]
	Sin influencia.	[386]
Ratio FA/FO	Reducción del tamaño final de las partículas.	[387]
	Sin influencia	[388]
Mezcla	Reducción del tamaño final de las partículas.	[389]
	Sin influencia	[380]
Moléculas bioactivas	Sin influencia	[387]

### 3.1.1.3 Variaciones de la técnica de nanoprecipitación.

#### 3.1.1.3.1 Nanoprecipitación en dos pasos.

Esta variación de la técnica de síntesis de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitación, esquematizada en la Figura 3.4, se diseñó para mejorar las eficiencias de encapsulación de aquellas biomoléculas con baja solubilidad en los disolventes orgánicos utilizados. En este aspecto, Barichello et al. [392] obtuvieron eficiencias de encapsulación superiores al 80% para fármacos lipofílicos (ciclosporina A o indometacina, entre otros), sin embargo, no se superó el 10% de eficiencia de encapsulación para moléculas hidrofílicas (fenobarbital o ácido valproico).

En un primer intento de superar esta limitación en la encapsulación de moléculas hidrófilas, Bilati et al. [186] propusieron una amplia variedad de disolventes orgánicos, miscibles en agua, que podían ser utilizados para la síntesis por nanoprecipitación que no fuesen etanol y acetona. Sin embargo, a pesar de ampliar la posibilidad de disolventes que podían ser utilizados, se debía encontrar uno capaz de disolver al polímero y a la biomolécula, resultando difícil cuando no compartían la misma naturaleza química.

Por la dificultad que suponía encapsular moléculas hidrófilas en nanopartículas poliméricas mediante esta técnica de síntesis en un solo paso, Morales-Cruz et al. [393] propusieron la encapsulación de proteínas mediante la técnica de nanoprecipitación llevada a cabo en dos pasos: 1) precipitación del agente bioactivo por acción de un disolvente orgánico formando nanopartículas del bioagente a encapsular, 2) adición de estas nanopartículas del agente bioactivo a la disolución orgánica en la que se encuentra disuelto el polímero (FO) y que posteriormente se añade gota a gota sobre la fase acuosa (FA). Mediante esta variación de la técnica en discontinuo, consiguieron eficiencias de encapsulación superiores al 80% para proteínas (lisozima y  $\alpha$ -quimotripsina) en nanopartículas de PLGA.



Figura 3.4 Esquema de la variación de la técnica de nanoprecipitación en dos pasos.

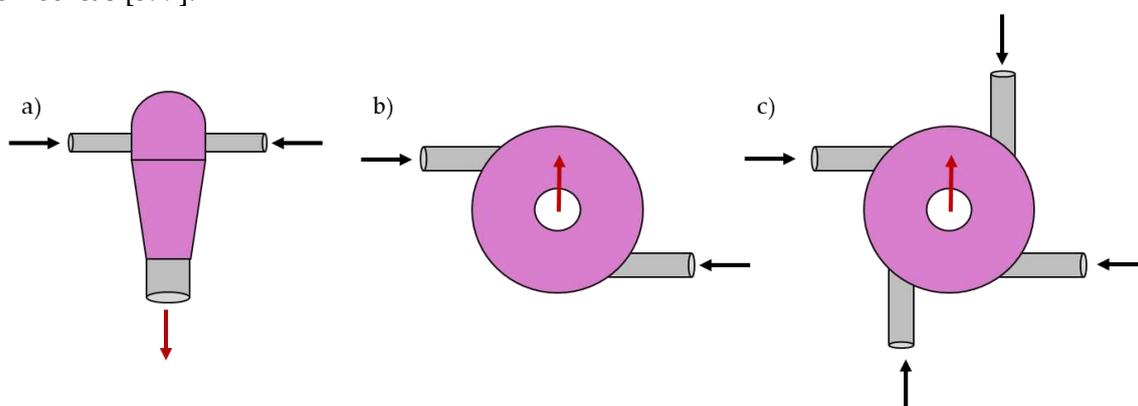
### 3.1.1.3.2 Nanoprecipitación Flash (FNP).

Esta variación de la técnica convencional de nanoprecipitación se basa en la localización de la mezcla entre ambas fases con la finalidad de alcanzar la sobresaturación y comenzar la nucleación de forma mucho más rápida, en cuestión de segundos o, incluso, milisegundos, gracias al rápido mezclado de ambas [394].

Para que esta mezcla sea posible, es necesario un régimen turbulento en un volumen confinado, por eso ha sido ampliamente estudiado el uso de mezcladores de corrientes confinadas (CIJM, del inglés "*Confined impinging jets mixer*" [395]). Johnson et al. [396] confirmaron que el uso de dichos dispositivos hacía posible que el mezclado se diese de forma turbulenta y localizada, de forma que cumplían dos importantes claves para el proceso de mezclado: 1) que el dispositivo sea capaz de generar un régimen turbulento localizado de mezclado y 2) que ambas corrientes se hagan pasar por el régimen turbulento generado.

Dichos dispositivos se han utilizado para la síntesis rápida de nanopartículas mediante esta variante denominada *Flash Nanoprecipitation* - FNP. Gracias al buen mezclado de las fases se ha estudiado exhaustivamente su aplicación para la síntesis de nanopartículas tanto mediante la inyección de corrientes mediada por bombas [397] como mediante la inyección manual de las mismas [398], resultando en todos los casos en una mejora en la distribución final de tamaño de las nanopartículas producidas.

Como se muestra en la Figura 3.5, se desarrollaron diferentes geometrías y dispositivos multicanales (MIVM, del inglés "*Multi-Inlet Vortex Mixer*") con la finalidad de escalar la síntesis de nanopartículas poliméricas de manera económica y sencilla para aplicaciones biomédicas [399].



**Figura 3.5** Diferentes geometrías de dispositivos multicanales: a) CIJM de dos corrientes, b) MIVM de dos corrientes, c) MIVM de cuatro corrientes. Las flechas negras indican las corrientes de entrada y las rojas las corrientes de salida.

### 3.1.2 Sistemas de microfluídica.

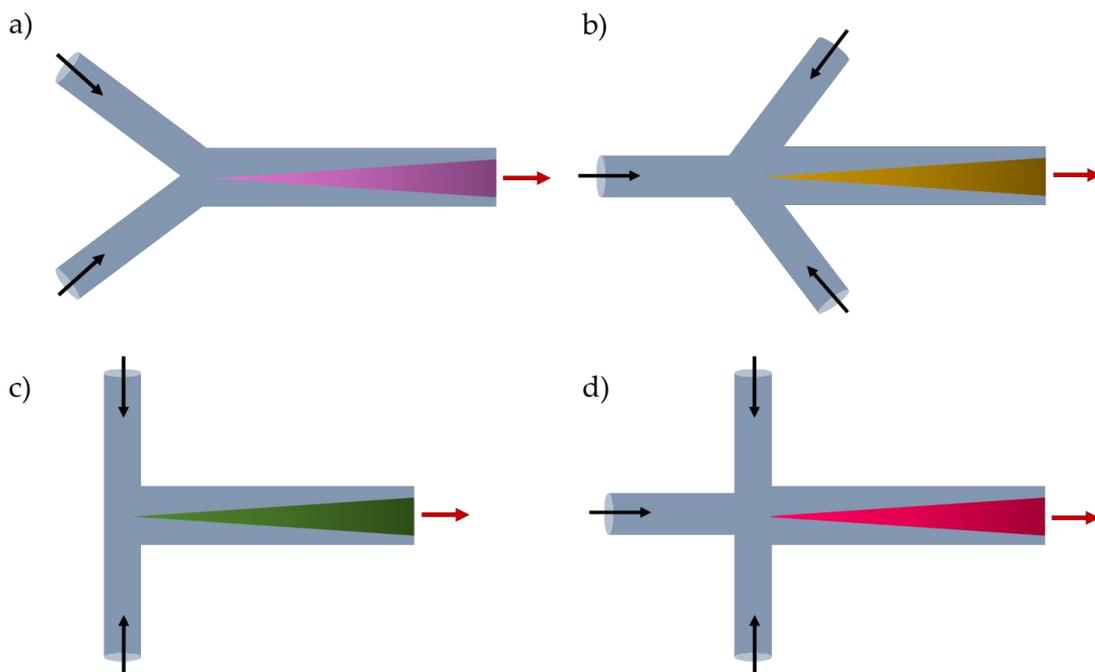
A partir del desarrollo del método de FNP, se desarrollaron gran variedad de dispositivos con el objetivo de conseguir un total control del punto clave que limita la metodología de síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación: la hidrodinámica. Es decir, el mezclado de las corrientes y la velocidad de reacción, ya que son parámetros importantes que influyen en la distribución de tamaños final de las nanopartículas [400].

La microfluídica ofrece la posibilidad de reducir las distancias en el mezclado de fases, incluso a decenas de micrómetros, facilitando así la difusión gracias a una mezcla rápida que puede llegar a darse en cuestión de milisegundos o microsegundos, reduciendo a microlitros el volumen de reacción [401]. Estos dispositivos permiten la manipulación de pequeñas cantidades de fluidos que, al hacerlos pasar por canales micrométricos, se consigue una relación área-volumen relativamente elevada que mejora el transporte de masa y, con ello, se consiguen cinéticas de reacción rápidas mediante un flujo laminar continuo. Por lo tanto, la mezcla de las fases mediante estos dispositivos se produce por la difusión de moléculas a

través de la interfase. Todo esto se traduce en un excelente control del proceso, buena reproducibilidad y un mayor rendimiento de síntesis [402].

En este capítulo de Tesis se trabaja con un tipo de sistemas microfluídicos denominados micromezcladores [403], mediante los cuales se pueden configurar parámetros como el tipo de mezclado y las velocidades de flujo de las corrientes de entrada que influirán directamente sobre las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas sintetizadas. Además, estos sistemas son capaces de trabajar en flujo continuo sin que las propiedades de sus productos se vean alteradas, lo que supone una gran ventaja ya que aumenta la producción y mejora la reproducibilidad. La producción de este tipo de sistemas se escala mediante réplica, posibilitando un fácil traslado desde el uso de laboratorio al clínico, para futuras aplicaciones [404].

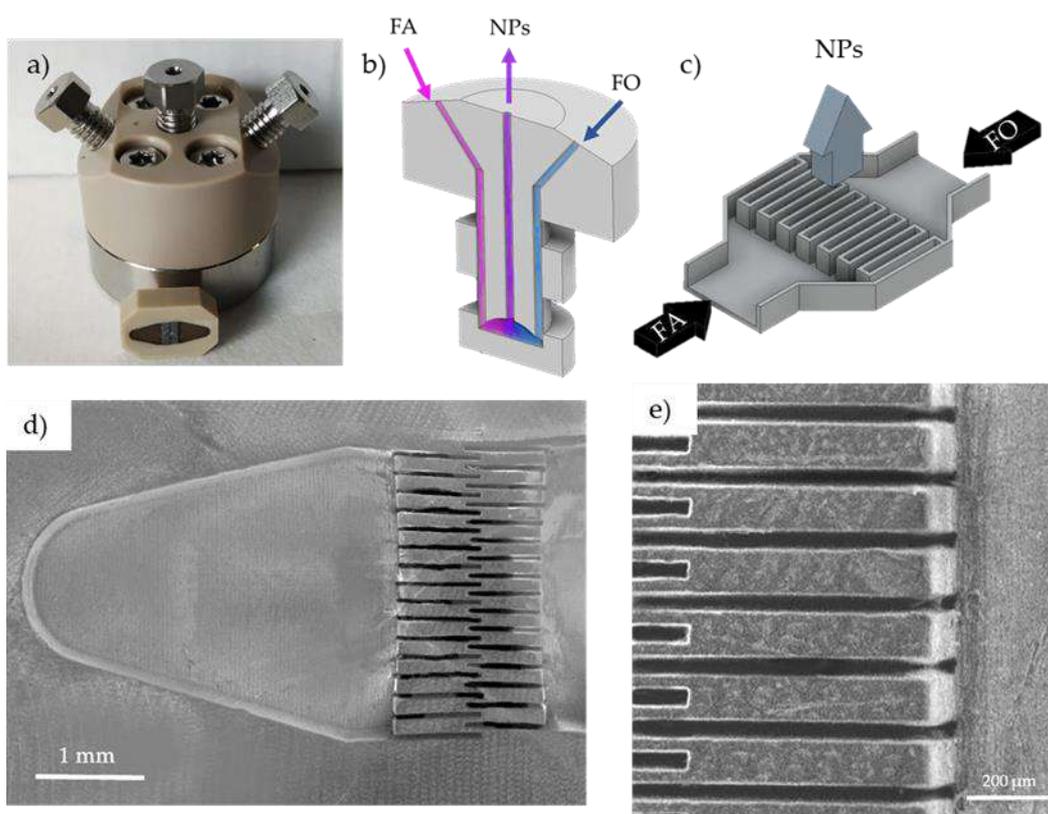
En la Figura 3.6 se muestran las configuraciones más sencillas de micromezcladores de flujo laminar, que se componen de dos corrientes de entrada y una de salida, resultando dispositivos simples pero eficaces para mezclar gases y líquidos [405]. El diseño es sencillo y está abierto a modificaciones, ya que podemos aplicar el micromezclador convencional en forma de Y (cuyas corrientes de entrada están orientadas a  $+45^\circ$ ) (Figura 3.6-a), en forma de Y inversa (con corrientes orientadas a  $-45^\circ$ ) (Figura 3.6-b), en forma de T (Figura 3.6-c), pudiendo añadir una tercera corriente de entrada obteniendo una configuración en forma de cruz (Figura 3.6-d) [406]. En todas estas variantes se persigue la laminación del fluido para incrementar el área de interfases y favorecer una mezcla rápida por difusión (flujo laminar).



**Figura 3.6** Diferentes configuraciones de sistemas de microfluídica: a) micromezclador en forma de Y, b) micromezclador en forma de Y inversa, c) micromezclador en forma de T y d) micromezclador en forma de cruz. Las flechas negras indican las corrientes de entrada y las rojas las corrientes de salida.

Zhao et al. [407] sintetizaron nanopartículas compuestas únicamente por el fármaco danzol con una estrecha distribución de tamaño mediante el sistema microfluídico en forma de Y. Karnik et al [408] sintetizaron nanopartículas de PLGA de menor tamaño y con una distribución de tamaño más estrecha mediante nanoprecipitación con un micromezclador en forma de cruz (30-35 nm), comparada con la síntesis por nanoprecipitación con agitación mecánica en discontinuo (~105 nm). Por otro lado, Chronopoulou et al. [409] emplearon la misma configuración de microrreactor para encapsular dexametasona en nanopartículas de PLGA (0.3 mg/mg PLGA) en un solo paso y con una elevada productividad (0.9 g/h que, trabajando en paralelo se podrían alcanzar 2.4 kg/día).

En este capítulo de tesis se utiliza un micromezclador multilaminado interdigital (Micro4 Industries GmbH, Mainz, Germany) de poli éter-éter cetona (PEEK). El micromezclador se muestra en la Figura 3.7-a, consta de dos corrientes de entrada (FO y FA) que divergen en 16 microcanales (Figura 3.7-b) de 45  $\mu\text{m}$  de ancho cada uno, los cuales permiten un rápida multilaminación (Figura 3.7-d,e) saliendo finalmente a través de una corriente orientada con una trayectoria de  $90^\circ$  (Figura 3.7-c).



**Figura 3.7** a) Imagen óptica del micromezclador interdigital multilaminado, cavidad y unidad de mezcla, b) esquema de la distribución de las corrientes de entrada (FA y FO) y la corriente de salida producto de la nanoprecipitación, c) esquema que representa la multilaminación que permite la rápida transferencia de masa por difusión, d) y e) imágenes de microscopía electrónica de barrido de la estructura interna de los microcanales interdigitados del micromezclador.

Mediante este dispositivo, es posible controlar el tiempo de residencia de ambas corrientes en su interior, por lo tanto, el tiempo de mezcla de las fases. Como se expresa en la Ecuación 3.5, el tiempo de residencia ( $t_R$ ) es dependiente del flujo de inyección de las corrientes en el micromezclador ( $Q_t$ ) y del volumen capaz de albergar el microrreactor ( $V_{\text{micromezclador}} = 8 \mu\text{L}$ ).

$$t_R = \left( \frac{V_{\text{micromezclador}}}{Q_t} \right) \quad \text{Ecuación 3.4}$$

En un trabajo previo, Bally et al [410] optimizaron las condiciones óptimas para obtener partículas de diferentes tamaños del polímero acrílico PMMA mediante la modificación de las diversas variables que influyen significativamente en el diámetro final de las nanopartículas poliméricas producidas, como puede ser: la concentración polimérica, el ratio entre ambas fases o los caudales de flujo, entre otros.

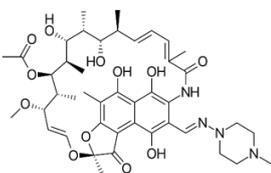
### 3.1.3 Antibiótico. Rifampicina.

Como se expone en el apartado 1.6, existe la necesidad de modificar o encapsular diversos fármacos debido a la escasa solubilidad de los mismos en fluidos fisiológicos, lo que conlleva a una baja biodisponibilidad tras su administración y el aumento de las dosis para alcanzar el efecto deseado [411]. Otra razón de esta necesidad es la pérdida de estabilidad del fármaco al exponerlo a condiciones drásticas, como el pH gástrico, en su administración oral y, con ella, la pérdida de su actividad terapéutica [412].

En este capítulo se presenta la encapsulación de un fármaco modelo, el antibiótico rifampicina (Rifa), fármaco de clase II en el Sistema de clasificación biofarmacéutico (BCS). Es un fármaco de alta permeabilidad y baja solubilidad que, además, sufre degradación a los valores de pH ácidos del estómago, por ello, el reto en su administración consiste en mejorar su solubilidad en el organismo y protegerlo de la degradación [413].

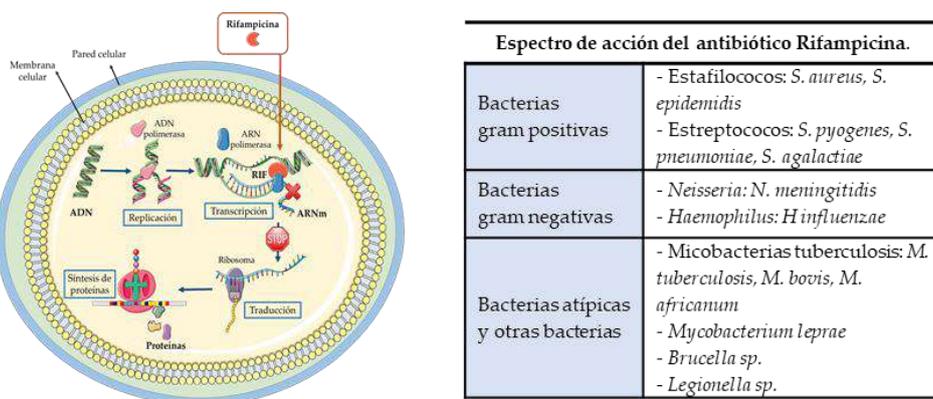
Las propiedades físico-químicas del fármaco rifampicina se muestran en la Tabla 3.2.

**Tabla 3.2** Información molecular y algunas propiedades físico-químicas del antibiótico rifampicina. Datos obtenidos de la base de datos PubChem®.

Rifampicina		
	Peso molecular	823 g/mol
	Color	Rojo anaranjado
	Solubilidad (25 °C):	
	- Agua pH 7.3	2.5 mg/mL
	- Agua pH 4.3	1.3 mg/mL
	- Cloroformo	349 mg/mL
	- EtOH	10 mg/mL
	- Acetona	14 mg/mL
	- DMSO	100 mg/mL

**Rifampicina.**

Se trata de un agente bactericida semisintético del grupo de las rifamicinas utilizado desde 1966. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con la subunidad  $\beta$  de la RNA polimerasa bacteriana, como esquemáticamente se muestra en la Figura 3.8. Mediante esta interacción, bloquea el promotor de inicio de la transcripción, por lo que inhibe el inicio de la formación de cadena de ARN. Por lo tanto, inhibe la síntesis de proteínas provocando la muerte bacteriana [414].



**Figura 3.8** Esquema del mecanismo de acción de la rifampicina y resumen de microorganismos sensibles al antibiótico rifampicina (adaptado de [415])

Se ha reportado la administración de este antibiótico ante diversas enfermedades infecciosas, entre ellas: tuberculosis [416], meningitis [417], lepra [418] y otras infecciones bacterianas [419][420][421].

Sin embargo, como ya se ha explicado antes, es un fármaco de baja solubilidad en los medios fisiológicos, por lo que, una vez administrado, la biodisponibilidad será reducida. El punto más importante a destacar es la descomposición que la rifampicina sufre a valores de pH ácido, lo que genera un problema para su administración oral. Estudios demuestran que esta inestabilidad, al valor de pH ácido del estómago, llega a una pérdida del 26.5% del fármaco, que aumenta al 48,8% cuando se administra junto con los fármacos isoniazida, pirazinamida y etambutol, es decir, durante el tratamiento de primera elección de la tuberculosis (FDC) [422]. Singh et al. [422] publicaron que los productos de descomposición de este antibiótico son 3-formil-rifampicina y 1-amino-4-metil-piperazina, perdiendo así la actividad. Estos resultados fueron apoyados por los publicados por Shishoo et al. [423], quienes llevaron a cabo un estudio en voluntarios sanos.

Es de gran relevancia mejorar la biodisponibilidad de este antibiótico en su administración oral ya que la tuberculosis es una infección que genera 1,2 millones de muertes por año y, por ello, es declarada enfermedad de emergencia mundial por la OMS [424].

Por esta razón, en este capítulo de Tesis se propone la encapsulación de este antibiótico con la finalidad de protegerlo en su paso por el estómago para terminar siendo liberado en el intestino. Además de asegurar su bioactividad, se favorecerá el aumento de la biodisponibilidad del mismo al ser transportado en un vector biocompatible, resistente a las condiciones ácidas del estómago y mucoadhesivo.

## **3.2 Encapsulación de antibióticos en nanopartículas sintetizadas por nanoprecipitación: método discontinuo y aplicación de sistemas microfluídicos.**

### **3.2.1 Materiales y métodos.**

#### **3.2.1.1 Materiales**

En este capítulo de tesis se ha utilizado el polímero Eudragit® RS100 (Evonik, Essen, Alemania). Los reactivos acetona 99%, ácido clorhídrico (HCl), buffer salino de fosfatos (PBS), Pluronic F68, rifampicina se compraron en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania) y fueron utilizados tal y como se recibieron. El etanol absoluto (EtOH) se compró a PanReac AppliChem (Castellar del Vallés, Barcelona).

También se utilizaron los medios de cultivo de bacterias de Triptona Soja (TSB) y el agar de Triptona Soja (TSA), de Laboratorios Conda-Pronadisa S.A (Torrejón de Ardoz, España), y las bacterias gram positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), que fueron compradas a Ielab (Alicante, España).

Por último, se utilizó la línea celular Caco2-TC7, cedida por la Dra. M.J. Rodríguez Yoldi y fibroblastos dérmicos humanos, comprados a Lonza (Bornem, Bélgica), junto con el medio de cultivo DMEM (Biowest, Nuaille, Francia), la mezcla de antibióticos y antimicóticos (PSA, Biowest, Nuaille, Francia), suero fetal bovino (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) y el kit Blue Cell Viability (Abnova GmbH).

#### **3.2.1.2 Optimización de los parámetros de síntesis de nanopartículas por el método discontinuo.**

Se sintetizaron nanopartículas (NPs) de Eudragit® RS100 mediante la técnica de nanoprecipitación discontinua. Para ello, se disolvió el polímero a determinadas concentraciones en diferentes disolventes: etanol, acetona y una mezcla de etanol:acetona (1:1). Una vez disuelto, esta disolución polimérica, denominada fase orgánica (FO) se adicionó gota a gota, mediante una bomba de jeringa (Hardvard Apparatus; Holliston, MA, USA) a un caudal de 0.5 mL/min, sobre una determinada cantidad de agua milliQ, denominada fase acuosa (FA) en agitación continua moderada. Se estudió el efecto de la adición de un agente

estabilizante, Pluronic F68, llevando a cabo el protocolo descrito con y sin Pluronic F68 al 0.5% (p/v) en la FA, bajo agitación. La evaporación del disolvente orgánico se llevó a cabo mediante agitación magnética, 600 rpm, durante 12h a temperatura ambiente. Las partículas se centrifugaron durante 5 min a 3000 rpm (Spectrafuge 24D, Labnet International, Madrid, España) para eliminar grandes agregados. El sobrenadante disperso en agua milliQ se guardó para la caracterización de la síntesis.

En este apartado se estudió la influencia de diferentes parámetros en la síntesis de nanopartículas mediante el método discontinuo de nanoprecipitación: concentración de polímero, disolvente y efecto de agente tensioactivo, tal y como se muestra en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3** Parámetros y condiciones empleadas en la síntesis de NPs de Eudragit® RS100 mediante el método discontinuo de nanoprecipitación.

Muestra	Concentración polimérica (% (p/v))	Disolvente	Valor R	FA
NP1	5	EtOH	5	Agua milliQ
NP2	10			
NP3	5	EtOH:acetona (1:1)	5	Agua milliQ
NP4				Pluronic F68 0.5 % (p/v)
NP5	10	EtOH:acetona (1:1)	5	Agua milliQ
NP6				Pluronic F68 0.5 % (p/v)
NP7	5	Acetona	5	Agua milliQ
NP8	10			

### 3.2.1.3 Optimización de los parámetros de síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación en continuo: microfluídica.

Para la síntesis de nanopartículas de este apartado, se utilizó el dispositivo de microfluídica presentado en el apartado 3.1.3, un micromezclador multilaminado interdigital que consta de 16 microcanales de 45  $\mu\text{m}$  de ancho. Para ello, se disolvieron diferentes cantidades de polímero en etanol, acetona y una mezcla de etanol:acetona (1:1), esta disolución polimérica se denominó fase orgánica (FO). La disolución polimérica se filtró a través de un filtro de 0.45  $\mu\text{m}$  para eliminar las posibles impurezas presentes. La fase acuosa (FA) se componía únicamente de agua milliQ. La mezcla de ambas fases en el micromezclador se llevó a cabo mediante la inyección de las corrientes (FO y FA) utilizando dos bombas de jeringa (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE. UU.) conectadas con el micromezclador a través de una tubería de politetrafluoroetileno (PTFE) de 1/6'' de diámetro externo. Las relaciones de flujo con las que se inyectaron ambas corrientes se relacionan mediante el valor de R ( $R = \text{FA}/\text{FO}$ ).

Las nanopartículas sintetizadas fueron recogidas por el conducto de salida del micromezclador, orientado a 90° respecto a ambas entradas de las fases, y el disolvente fue evaporado durante 12h a temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C) bajo agitación magnética, 600 rpm.

En este apartado se estudió la influencia de diferentes parámetros en la síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación mediante la aplicación de un sistema microfluídica, tal y como se resume en Tabla 3.4.

**Tabla 3.4** Parámetros y condiciones empleadas en la síntesis de NPs de Eudragit® RS100 mediante el método de nanoprecipitación por microfluídica.

Muestra	Concentración polimérica (% (p/v))	Disolvente	Caudal total (mL/min)	Valor R
NP9				10
NP10				5
NP11	10	EtOH:acetona	50	2
NP12				0.5
NP13				0.2
NP14				0.125
NP15				10
NP16	10	EtOH:acetona	5	5
NP17				2
NP18	10	Acetona	50	10
NP19				5
NP20	10	Acetona	5	10
NP21				5
NP22	5	EtOH:acetona	50	10
NP23				5
NP24				2
NP25	5	EtOH:acetona	5	10
NP26				5
NP27				2
NP28	5	Acetona	50	10
NP29				5
NP30	5	Acetona	5	10
NP31				5

### 3.2.1.4 Síntesis de nanopartículas y encapsulación de un antibiótico modelo.

Se encapsuló rifampicina en las nanopartículas de Eudragit® RS100 por ambos métodos de nanoprecipitación, tanto por el método discontinuo como por microfluídica, adicionando el fármaco junto al polímero en la FO.

Mediante el método discontinuo de síntesis, se disolvió una concentración de 5% (p/v) de Eudragit® RS100 en una mezcla de disolventes etanol:acetona (1:1) y se añadieron diferentes cantidades del antibiótico a encapsular (50, 20, 10, 5% (p/p) respecto al polímero. 1 mL de esta FO se añadió gota a gota (0.5 mL/min) sobre la FA compuesta por 5 mL de agua milliQ.

Mediante el método de síntesis por microfluídica, en la FO se disolvió una concentración de 5% (p/v) de Eudragit® RS100 en una mezcla de disolventes etanol:acetona (1:1) y se añadió la cantidad de rifampicina optimizada a partir del método discontinuo. La FA estaba compuesta únicamente por agua milliQ. Ambas fases se introdujeron en una jeringa y fueron inyectadas como se ha descrito en el apartado 3.2.1.3. En esta síntesis, se utilizó un valor R de relación de caudales (FA/FO) de  $R = 5$  y un caudal total de 5 mL/min.

En ambos métodos de síntesis, se recogieron las nanopartículas producidas con el fármaco rifampicina encapsulado y el disolvente orgánico fue evaporado durante 12h a temperatura ambiente ( $23 \pm 2$  °C) bajo agitación magnética, 600 rpm.

### 3.2.1.5 Caracterización de las nanopartículas.

Se determinaron las viscosidades de las disoluciones poliméricas de Eudragit® RS100 a concentraciones de 5 y 10% (p/v) disueltas en etanol:acetona (1:1) y en acetona con un viscosímetro Visco Basic Plus (FungiLab S.A., New York, USA) con un adaptador para líquidos de baja viscosidad (LCP) a 50 rpm. Se realizaron cuatro medidas para dar como resultado una media y su desviación estándar.

La caracterización de la morfología de las diferentes partículas producidas se realizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) y se analizaron las distribuciones de tamaño (apartado 2.2.1.4).

También se caracterizó la morfología y las dimensiones de las partículas mediante microscopía de transmisión electrónica utilizando un microscopio T20-FEI (Fei Company, Hillsboro, OR, USA). Las muestras fueron preparadas mediante la adición de las partículas en dispersión coloidal en agua milliQ sobre una rejilla de cobre. Para poder observar las partículas poliméricas mediante esta técnica, fue necesario la tinción negativa de las mismas con ácido fosfotúngstico. Se analizaron las distribuciones de tamaño de la misma forma en la que se trataron las obtenidas por SEM (apartado 2.2.1.4).

Por otro lado, se estudió el tamaño hidrodinámico de las partículas mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, Brookhaven Instruments, Holtsville, Nueva York),

considerando un índice de refracción de 1.385. Se determinó el índice de polidispersidad (PDI) mediante la Ecuación 3.5. Además, también se determinó la carga superficial de las partículas mediante la medida del potencial zeta.

$$\text{PDI} = \left( \frac{\sigma}{\bar{x}} \right)^2 \quad \text{Ecuación 3.5}$$

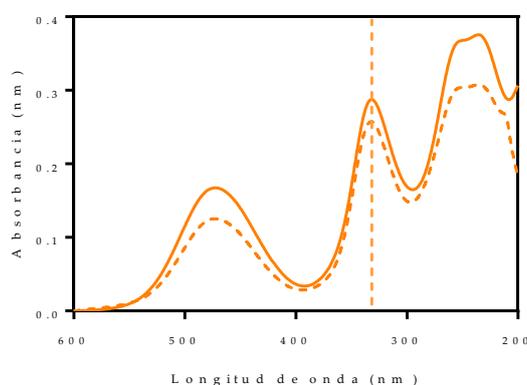
El valor PDI indica el grado de dispersión de tamaños de las partículas que componen la muestra, considerando un valor  $\text{PDI} = 0.1$  como límite superior para considerar la distribución de tamaños de una muestra homogénea [425].  $\bar{x}$  representa el valor medio del tamaño y  $\sigma$  es la varianza.

Se calculó la concentración final de partículas y, con ella, el rendimiento del proceso de síntesis y lavado. Para ello, 1 mL de las nanopartículas se lavaron varias veces con agua milliQ utilizando tubos de centrífuga Amicon® Ultra-15, los cuales contienen membranas de celulosa de alta recuperación con corte de peso molecular de 30 kDa. Se centrifugaron durante 10 min a 6000 rpm (EBA21, Hettich, Tuttlingen, Alemania). Se guardaron los sobrenadantes de los lavados para el posterior análisis. Tras el proceso de lavado, se recogieron las partículas en 1 mL de volumen final. Se adicionaron a pocillos previamente tarados 50  $\mu\text{L}$  de muestra, dejándose secar 24h a 40 °C. Se realizaron tres réplicas por síntesis y tres síntesis independientes. Tras este tiempo, se pesaron de nuevo los pocillos con las partículas depositadas y completamente secas y se calculó la concentración y el rendimiento de síntesis mediante la Ecuación 3.6 y Ecuación 3.7, respectivamente.

$$\text{Concentración (mg/mL)} = \frac{(\text{mg pocillo con partículas} - \text{mg pocillo tarado})}{50 \mu\text{L} \times 1000 \mu\text{L}/1 \text{ mL}} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{(\text{mg pocillo con partículas} - \text{mg pocillo tarado})}{\text{mg total reactivos (en 1 mL)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.7}$$

Para determinar la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga de fármaco en las partículas, se llevó a cabo una determinación indirecta, cuantificando el fármaco que no había sido encapsulado. Tras el proceso de lavado, los sobrenadantes de cada uno de los lavados se analizaron mediante espectrofotometría UV-Vis (apartado 2.3.1.5). La longitud de onda a la que se determinó la rifampicina fue 334 nm, uno de los máximos de dicha biomolécula en agua milliQ, como se muestra en la Figura 3.9. Para llevar a cabo la cuantificación, previamente se elaboró una recta de calibrado del fármaco en agua. La cuantificación se realizó aplicando la Ecuación 3.8 y la Ecuación 3.9. Se realizó el análisis de tres síntesis independientes.



**Figura 3.9** Espectro ultravioleta-visible de rifampicina (10 ppm) en agua milliQ (línea continua) y en PBS (línea discontinua).

$$EE (\%) = \frac{(\text{mg fármaco inicial} - \text{mg fármaco no encapsulado})}{\text{mg fármaco inicial}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.8}$$

$$DL (\text{mg/mg}) = \frac{(\text{mg fármaco inicial} - \text{mg fármaco no encapsulado})}{\text{mg partículas}} \quad \text{Ecuación 3.9}$$

La presencia de posibles interacciones intermoleculares entre las partículas y el antibiótico encapsulado se estudió mediante espectroscopía infrarroja FTIR (apartado 2.2.1.6) teniendo en cuenta los picos de absorbancia característicos de cada material.

Por último, se obtuvieron los difractogramas de rayos X (XRD) de las muestras con un difractómetro de rayos X (Empyrean, Malvern Panalytical, Malvern, Reino Unido). Los difractogramas se realizaron a partir de un barrido  $2\theta$  de  $2$  a  $50^\circ$  en modo continuo de escaneo, con una velocidad de escaneo de  $0.017^\circ/\text{seg}$  y un tamaño de paso de  $0.013^\circ$ .

Además de analizar la cristalinidad de la rifampicina en el interior de las nanopartículas mediante las técnicas de caracterización mencionadas, se analizó el polimorfismo del producto de partida ya que, debido a la compleja estructura molecular del antibiótico, puede existir en su forma I, forma II o estado amorfo, sin haber sido reportadas ventajas de solubilidad asociadas con las formas polimórficas para su aplicación en clínica [426].

### 3.2.1.6 Cuantificación de la liberación *in vitro* del fármaco encapsulado.

Se llevó a cabo el estudio del perfil de liberación acumulativa del fármaco encapsulado en las nanopartículas producidas en este capítulo de Tesis. Para ello, se añadieron las partículas a una concentración de  $1 \text{ mg/mL}$  en fluido gástrico simulado ( $\text{pH} = 1\text{-}2$ ) durante 2 horas. Tras este tiempo, que se fijó como  $t=0$ , se centrifugaron las partículas utilizando los tubos de centrifuga Amicon® Ultra-15 (30 kDa) durante 10 min a 6000 rpm, y se substituyó el

medio de liberación por PBS. El sobrenadante se guardó para su posterior análisis. Se fueron tomando muestras de 1 mL a determinados intervalos de tiempo. Estas muestras se centrifugaron utilizando tubos de centrifuga Amicon® Ultra-15 durante 10 min a 6000 rpm y se guardaron alícuotas de 800 µL de los sobrenadantes para su análisis. Se añadieron 800 µL de medio de liberación fresco al resto de la muestra y fue devuelto al sistema de liberación, manteniendo así un volumen de liberación constante. Se cuantificó la cantidad de fármaco liberado mediante espectroscopía ultravioleta UV-Vis, habiendo preparado previamente las respectivas rectas de calibración en fluido gástrico simulado y PBS.

Se realizaron los análisis de un total de tres muestras en cada una de las medidas realizadas y se trataron estadísticamente para obtener la media y desviación estándar. Finalmente, se analizó la estabilidad y morfología de las partículas a lo largo del tiempo durante el proceso de liberación mediante SEM (apartado 2.2.1.4).

### **3.2.1.7 Estudio *in vitro* de la acción bactericida de los antibióticos encapsulados.**

Para evaluar la acción bactericida de las partículas sintetizadas con y sin antibiótico encapsulado se utilizó como modelo la bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus* [427]. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de las diluciones seriadas explicado en el apartado 2.3.1.6.

Se cultivó la cepa durante una noche a 37 °C con agitación constante (150 rpm) hasta alcanzar la fase estacionaria de crecimiento ( $10^{10}$ - $10^{11}$  UFC/mL). Cuando se alcanzó, la carga bacteriana se diluyó poniendo en contacto las bacterias en fase exponencial de crecimiento ( $10^5$  UFC/mL), fase en la cual las bacterias se encuentran en continua replicación, con el antibiótico a estudiar a diferentes concentraciones, hasta encontrar la concentración mínima a la que el crecimiento se viese reducido en dos logaritmos respecto a la fase estacionaria, es decir, que el crecimiento se viese inhibido (concentración mínima inhibitoria, MIC) y la mínima concentración a la que no se observase crecimiento bacteriano (concentración mínima bactericida, MBC).

Posteriormente, se mantuvieron las nanopartículas sintetizadas por el método discontinuo y las sintetizadas por microfluídica en condiciones gástricas simuladas durante 2h a 37 °C. Tras este tiempo, se centrifugaron utilizando los tubos de centrifuga Amicon® Ultra-15 durante 10 min a 6000 rpm y se lavaron hasta eliminar el ambiente ácido. Mediante sustitución del medio, se pusieron en contacto las bacterias en fase exponencial de crecimiento con las partículas (en un rango de concentraciones de 1 a 0.005 mg/mL). Tras 24h a 37°C y agitación constante (150 rpm), se cuantificaron las colonias viables mediante el método de las diluciones seriadas. Paralelamente, se evaluó la supervivencia bacteriana frente a la cantidad teórica liberada en 24h de fármaco libre, sin encapsular, poniendo en contacto las bacterias con la cantidad de rifampicina correspondiente, siguiendo el mismo procedimiento.

Finalmente, se estudió la influencia del contacto entre las nanopartículas y las bacterias analizando la acción antimicrobiana del antibiótico liberado de las nanopartículas en TSB a diferentes concentraciones (de 1 a 0.005 mg/mL) y a 24h, eliminando las partículas del medio. Para ello, se pusieron en contacto las partículas con TSB y, tras el periodo de tiempo determinado, se recogió el sobrenadante, que se puso en contacto con las bacterias en fase exponencial durante 24h para evaluar la actividad bactericida del fármaco liberado de las nanopartículas, mediante el método de las diluciones seriadas.

Previamente a la realización de los ensayos, las nanopartículas fueron esterilizadas bajo luz UV durante dos ciclos de 30 min, moviéndolas entre ciclo y ciclo, para asegurar una correcta esterilización. Los ensayos *in vitro* de la acción bactericida del fármaco y de las partículas sintetizadas se realizaron por triplicado, con una media de tres réplicas por ensayo.

#### **3.2.1.8 Ensayo de la viabilidad celular *in vitro*.**

Las líneas celulares Caco2-TC7 y fibroblastos se cultivaron a 37 °C en medio DMEM. Para evaluar el efecto citotóxico de las partículas sintetizadas por nanoprecipitación se sembraron en placas de 96 pocillos a densidades de  $1.5 \times 10^4$  células/pocillo las Caco2-TC7 y a  $6 \times 10^3$  células/pocillo los fibroblastos. Se dejaron adherir y proliferar hasta alcanzar la confluencia total. Se agregaron las partículas vacías sin fármaco, las partículas con fármaco encapsulado y la cantidad teórica liberada en el tiempo de exposición de las células con las partículas de fármaco libre, a diferentes concentraciones en un rango de 1 a 0.005 mg/mL. La cuantificación de la viabilidad celular se evaluó con el kit Blue Cell Viability, tal y como se explica en el apartado 2.2.1.7.

Previamente a la realización de los ensayos, las nanopartículas fueron esterilizadas bajo luz UV durante dos ciclos de 30 min, moviéndolas entre ciclo y ciclo, para asegurar una correcta esterilización. Los datos fueron obtenidos de un total de tres experimentos independientes con un promedio de cuatro réplicas por experimento.

#### **3.2.1.9 Análisis estadísticos.**

Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante el análisis de la varianza unidireccional y bidireccional (ANOVA) tal y como se indica en el apartado 2.3.1.8.

### **3.2.3 Resultados y discusión.**

#### **Optimización de los parámetros de síntesis de nanopartículas por el método en discontinuo.**

Para poder sintetizar partículas poliméricas mediante la técnica de nanoprecipitación, es necesario un disolvente de baja temperatura de ebullición, que sea capaz de mantener el

polímero disuelto de manera estable y que sea miscible con el agua. Por lo tanto, se estudió la solubilidad polimérica en diferentes disolventes y las viscosidades de las diferentes FO propuestas. Además, se propusieron disolventes de toxicidad mínima, clasificados como clase 3 (Agencia Europea del Medicamento) [361], por lo que se estudiaron el etanol, acetona y la mezcla de ambos.

En las condiciones de concentración de polímero estimadas para tener una concentración de partículas lo suficientemente elevada sin afectar a la viscosidad del medio, se observó que al disolver el polímero Eudragit® RS100 en etanol, se formó una suspensión heterogénea blanquecina en la que el polímero no se encontraba disuelto en su totalidad, por lo que este disolvente fue descartado. Por otro lado, tanto la acetona como la mezcla en relación volumétrica 1:1 de etanol y acetona disolvieron completamente y de manera estable en el tiempo el polímero. En la Tabla 3.5 se presentan los datos de viscosidad de las concentraciones poliméricas y los disolventes elegidos como FO para este trabajo.

**Tabla 3.5** Valores de viscosidad ( $\eta$ , mPa·s) a una temperatura de 20 °C de las disoluciones poliméricas elegidas como FO.

	Eudragit® RS100		
	- <sup>a</sup>	5% (p/v)	10% (p/v)
Etanol	1.07	-	-
Acetona	0.31	1.57 ± 0.04	3.61 ± 0.01
Etanol:acetona (1:1)	0.69	4.56 ± 0.16	6.08 ± 0.58

<sup>a</sup>Datos de [428]

Una vez elegidas las diferentes FO se realizaron los experimentos propuestos en la Tabla 3.3 por el método discontinuo, mediante la adición gota a gota (0.5 mL/min) de la FO sobre la FA.

Primero, se estudió la influencia de la concentración de polímero en la síntesis mediante la caracterización de dos concentraciones poliméricas diferentes: 5 y 10 % (p/v) de Eudragit® RS100. Como se muestra en la Tabla 3.6, existe cierta influencia de la concentración de polímero significativas ( $p < 0.05$ ). El tamaño de las nanopartículas sintetizadas disminuye de  $62.2 \pm 25.6$  nm a  $53.8 \pm 17.9$  nm cuando la concentración se reduce del 10% al 5% (p/v), respectivamente. Estos resultados coinciden con aquellos mostrados en estudios previos de síntesis de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitación, en los que se demuestra que a mayores concentraciones de polímero se obtienen partículas de diámetros medios mayores debido a: 1) el aumento de viscosidad que produce una difusión del disolvente más lenta a través de la fase acuosa, que resulta altamente influyente ya que la difusión del disolvente orgánico en este método de síntesis es un factor que controla la sobresaturación y nucleación

del polímero para formar las nanopartículas [429], y 2) una mayor concentración polimérica es probable que produzca mayor número de núcleos, lo que favorece a un mayor crecimiento de las nanopartículas producidas por agregación de dichos núcleos [394].

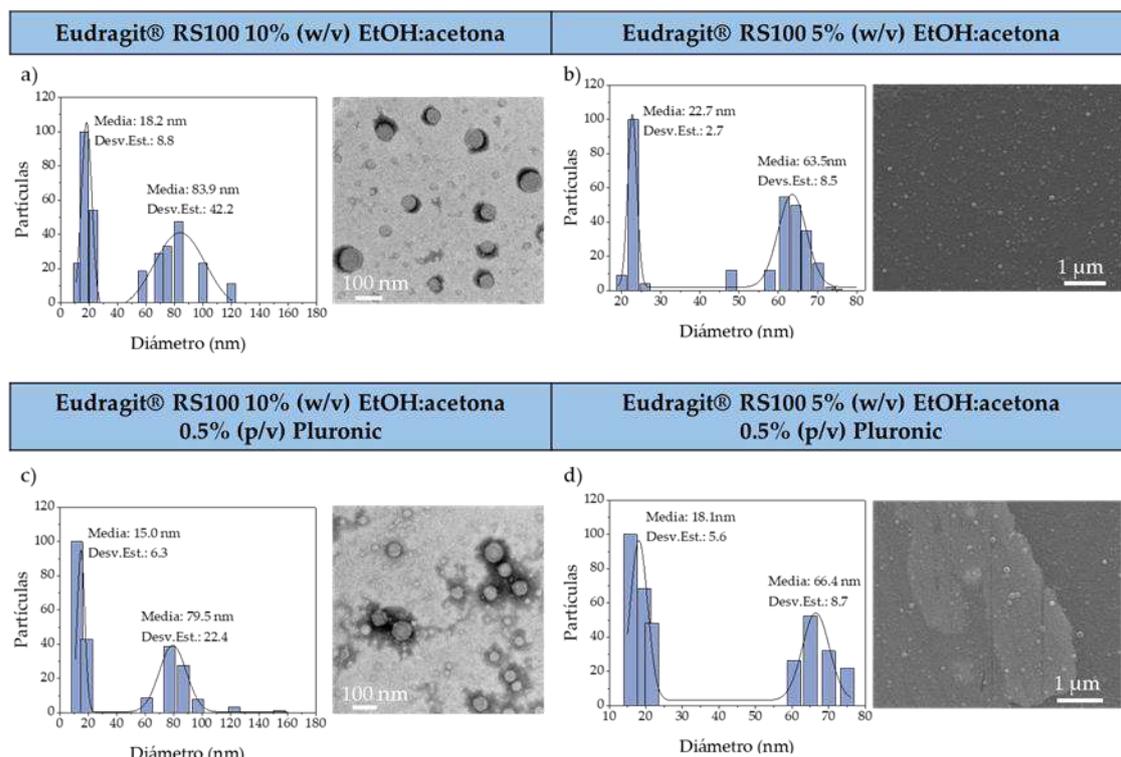
Por otro lado, se estudió el efecto de los diferentes disolventes utilizados sobre el tamaño final de las nanopartículas producidas. Como se ha explicado, una de las propiedades de esta influencia sobre el tamaño final de la partícula es la difusión del disolvente en la fase antidisolvente. Sin embargo, en este caso, la difusión del disolvente orgánico no parece ser decisiva para el diámetro final de las nanopartículas poliméricas ya que los coeficientes reportados en bibliografía de ambos disolventes son similares:  $D_{\text{acetona/agua}} 1.28$ ,  $D_{\text{etanol/agua}} 1.24$ ,  $10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ , a temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  [428]. Otra de las propiedades que se considera parámetro crítico en el diámetro medio final de las nanopartículas producidas es la viscosidad de la disolución [394] que, en este caso, difiere de un disolvente a otro. Según se observa en la Tabla 3.6, hay una notable disminución del tamaño medio de partícula en función del disolvente utilizado ( $p < 0.05$ ). El diámetro medio varió de  $62.2 \pm 25.6$  a  $27.9 \pm 11.4$  cuando el disolvente es la mezcla etanol:acetona o acetona, respectivamente, sin modificar notablemente el índice de polidispersidad de las síntesis. Estos resultados concuerdan con una variación en la viscosidad de ambas disoluciones poliméricas, como se muestra en la Tabla 3.5, observándose una disminución de casi dos veces la viscosidad de la FO al cambiar el disolvente orgánico ( $\eta_{\text{etanol:acetona}} 6.08 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ ,  $\eta_{\text{acetona}} 3.61 \text{ mPa}\cdot\text{s}$ , a temperatura de  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), con la consecuente reducción de tamaño de las partículas. Por lo tanto, se puede deducir que la FO compuesta por un fluido de viscosidad baja rinde partículas de pequeño tamaño.

Según se reporta en la literatura sobre el método de síntesis por nanoprecipitación, no es necesario el uso de agentes tensioactivos para la producción de nanopartículas poliméricas [382]. Se analizó el efecto ejercido por la presencia de un surfactante anfifílico no iónico, el cual podría reducir la tensión superficial entre la FO y la FA, acelerando la mezcla entre ambas [430]. La concentración del agente tensioactivo se limitó mediante la concentración micelar crítica ( $\sim 1\%$  (p/v)) [431] para así evitar el autoensamblaje del agente surfactante. En el caso de trabajar por encima de esta concentración crítica, además de nanopartículas poliméricas podríamos obtener micelas de Pluronic, obteniendo una distribución de tamaño altamente heterogénea. Por lo tanto, la concentración con la que se trabajó fue  $0.5\%$  (p/v) en base a estudios realizados previamente [382]. Como se refleja en los resultados de la Tabla 3.6, se observó que la adición del agente tensioactivo a la FA no influyó significativamente ( $p > 0.05$ ) sobre el tamaño de partícula final. A partir de los resultados obtenidos, se pudo concluir con que no se observaba influencia alguna mediante la adición de surfactante sobre el diámetro de las nanopartículas producidas, por lo que el efecto de la tensión superficial tampoco resultaba ser crítico para la síntesis por nanoprecipitación [371].

**Tabla 3.6** Caracterización DLS y potencial Z de las nanopartículas sintetizadas por nanoprecipitación mediante el método discontinuo.

Muestra	Síntesis	Diámetro ± Desv.Est. (nm)	PDI	Potencial Z (mV)
NP3	5% (p/v) EtOH:acetona	53.8 ± 17.9	0.11	13.2 ± 3.5
NP4	5% (p/v) EtOH:acetona + Pluronic 0.5% (p/v)	50.6 ± 18.9	0.14	14.3 ± 4.1
NP7	5% (p/v) acetona	20.6 ± 9.2	0.20	17.6 ± 0.6
NP5	10% (p/v) EtOH:acetona	62.2 ± 25.6	0.17	21.3 ± 6.9
NP6	10%(p/v) EtOH:acetona + Pluronic 0.5% (p/v)	65.4 ± 25.4	0.15	22.0 ± 7.6
NP8	10% (p/v) acetona	27.9 ± 11.4	0.17	19.6 ± 2.5

Tal y como se reporta en la literatura especializada en la nanoprecipitación de nanopartículas poliméricas, el gran inconveniente de la síntesis por nanoprecipitación por el método discontinuo, además de la baja productividad, es que el grado de mezcla de las fases es muy heterogéneo [432]. Que el grado de mezcla sea ineficaz produce un crecimiento de partículas heterogéneo, aunque la nucleación sea un proceso bastante homogéneo, ya que el gradiente de concentración de interfase no se distribuirá de la misma manera por todo el volumen del fluido de síntesis. Por lo tanto, como se observa en el análisis de las distribuciones de tamaños de la Figura 3.10, existe una tendencia general de las nanopartículas producidas por el método discontinuo en la que se observan dos poblaciones de partículas de diferentes tamaños perfectamente diferenciadas. Esta evidencia es más pronunciada en el caso de las síntesis con concentraciones poliméricas de la FO de 10% (p/v), en la que se observa una población de partículas de  $83.9 \pm 42.2$  nm y una segunda de  $18.2 \pm 8.8$  nm (Figura 3.10-a). Para el caso de concentraciones de Eudragit® RS100 de 5% (p/v) de la FO se observa una población de  $63.5 \pm 8.5$  nm y una segunda de  $22.7 \pm 2.7$  nm (Figura 3.10-c). En el caso de las síntesis con surfactante (Figura 3.10-b y d) se observa la misma tendencia, confirmando la nula influencia del surfactante, de acuerdo con lo descrito anteriormente. Los resultados muestran una población común para todas las síntesis, independientemente de la concentración polimérica, de alrededor de 20 nm, la cual corresponde posiblemente a las partículas que nuclearon y crecieron en los puntos de mezcla más homogénea. La segunda población, de mayor tamaño y dependiente de la concentración de síntesis, podría ser el resultado de las partículas nucleadas y crecidas en los puntos de mezcla heterogénea e ineficiente.



**Figura 3.10** Distribuciones de tamaño de DLS e imágenes de TEM (a y c) y SEM (b y d) de cada una de las síntesis: a) Eudragit® RS100 10% (p/v) EtOH:acetona, R=5, sin surfactante, b) Eudragit® RS100 10% (p/v) EtOH:acetona, R=5, Pluronic 0.5% (p/v), c) Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona, R=5, sin surfactante y d) Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona, R=5, Pluronic 0.5% (p/v).

### Optimización de los parámetros de síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación en continuo: microfluídica.

Para la síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación mediante un dispositivo de microfluídica se ha empleado un micromezclador multilaminado interdigital descrito en el apartado 3.1.2 (Figura 3.7). En publicaciones previas ha sido empleado un microsistema similar para el método de síntesis de nanoprecipitación de manera exitosa [410], pero también ha sido aplicado en síntesis de partículas poliméricas mediante el método de emulsión [52][82] ya que proporciona un buen grado de mezcla de las fases inmiscibles y supone un aumento de rendimiento en la producción de nanopartículas respecto al método discontinuo.

Ambas fases, FA y FO se inyectaron por dos entradas diferentes del micromezclador (Figura 3.7-a) y se hicieron pasar por un conjunto de 16 microcanales, con una anchura de 45  $\mu\text{m}$  (Figura 3.7-d y e). La mezcla de ambas fases se produce por transferencia de masa por difusión, que se produce de manera eficiente debido a la elevada superficie de contacto entre ambas fases y la localización de la mezcla al trabajarse con pequeños volúmenes [402]. Para este estudio se modificó el caudal total de inyección, trabajando a una velocidad de flujo de 5 mL/min y a una velocidad diez veces mayor, de 50 mL/min. Como el volumen interno del

micromezclador es de 8  $\mu\text{L}$ , según la Ecuación 3.4, los tiempos de residencia de las síntesis fueron de 96 y 9.6 ms para los flujos de 5 y 50 mL/min, respectivamente. La corriente de la FO estaba compuesta por una disolución orgánica del polímero Eudragit® RS100 a diferentes concentraciones, 5 y 10% (p/v) en acetona y en la mezcla de disolventes etanol:acetona (1:1), siendo la corriente FA tan sólo agua-milliQ. La relación entre ambas fases de entrada (R, FA/FO) también se varió en el estudio realizado.

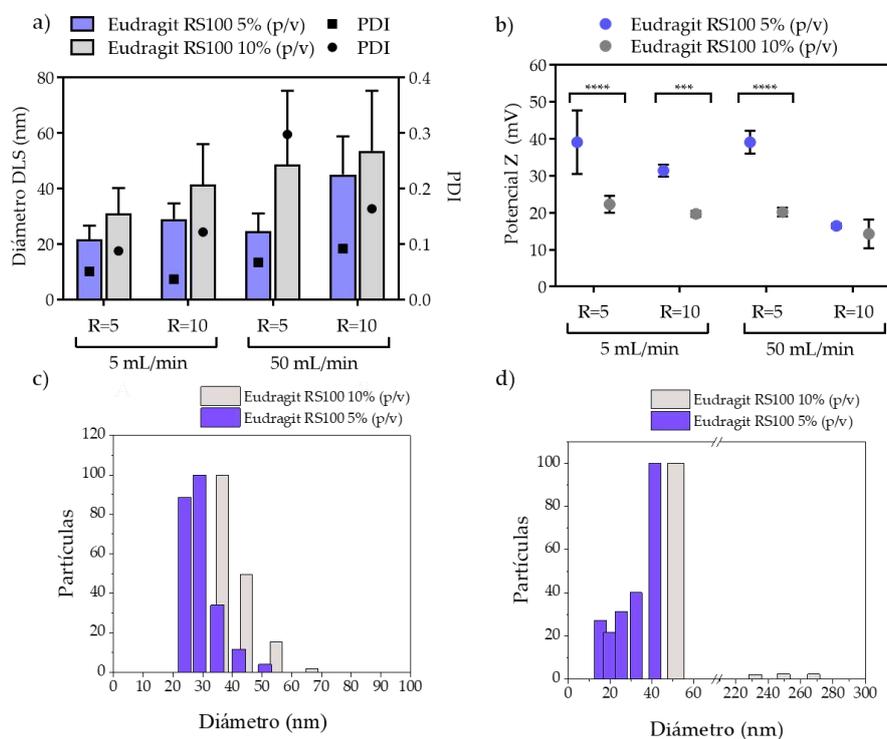
### Influencia de la concentración del polímero.

Se estudió el efecto de la concentración polimérica en la FO mediante la síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación a través de un micromezclador. Para ello, las concentraciones que se ensayaron fueron 5 y 10% (p/v) utilizando como disolvente una mezcla de etanol:acetona. Para completar la comparativa y el estudio, se varió el caudal total, suma de los caudales de ambas fases (5 y 50 mL/min) y el valor de R (5 y 10). En la Figura 3.11 se encuentran los datos representados, pudiéndose apreciar una fuerte influencia de la concentración sobre el producto final, de la misma forma que se observaba para el método de síntesis discontinuo. Como era previsible, se observó un aumento del tamaño de las nanopartículas conforme se aumentaba la concentración polimérica (Figura 3.11-a), lo que coincide con los trabajos ya publicados [387][375], y con los resultados obtenidos con el sistema discontinuo. Esta tendencia se explica en base a la teoría de la nucleación, puesto que la concentración polimérica determina el número de núcleos de manera que, cuando llega la etapa de crecimiento, las moléculas poliméricas disueltas accesibles para adherirse a los núcleos formados y aumentar el tamaño de las nanopartículas serán más abundantes cuanto mayor sea la concentración polimérica. Además, cuanto mayor sea la concentración polimérica, más probabilidad hay de que se den fenómenos de floculación entre las nanopartículas pudiendo formar agregados de las mismas.

Por otro lado, se obtuvieron índices de polidispersidad mayores para las concentraciones altas de polímero, lo que puede razonarse con una ineficaz mezcla incluso con el micromezclador. Este hecho puede estar relacionado con los datos de viscosidad que se encuentran en la Tabla 3.5, ya que este parámetro aumenta conforme aumenta la concentración polimérica. El aumento de la viscosidad puede producir una velocidad de difusión del disolvente a través de la fase acuosa mucho más lenta, lo que genera gradientes de concentraciones dando un crecimiento y una distribución final de nanopartículas más heterogéneo. También se puede observar que, de manera independiente de la concentración polimérica, la distribución de tamaños es mayor en las síntesis en las que se utilizaron velocidades de flujo más altas (Figura 3.11-c,d). Estos resultados son contrarios a la dinámica de fluidos de microfluídica [402], ya que la tendencia esperada sería obtener nanopartículas más homogéneas a las velocidades de flujo más elevadas debido a un alto grado de mezcla. Sin embargo, los resultados obtenidos parecen ser fruto de una carencia de acoplamiento entre

los eventos de nucleación y crecimiento en el entorno de síntesis. En concreto, cuando el flujo volumétrico es de 50 mL/min, el tiempo de residencia es muy reducido (9.6 ms), lo que podría favorecer una nucleación muy homogénea, pero, en cambio, la etapa de crecimiento podría no darse completamente en el micromezclador por un tiempo de residencia insuficiente. Es decir, la etapa de crecimiento y estabilización de las nanopartículas se puede dar parcialmente en el vial en el que se recogen para ser evaporadas. Este fenómeno generaría perfiles de concentración y una mayor heterogeneidad en los tamaños de las nanopartículas de lo esperado.

En la Figura 3.11-b, en la que se comparan los valores de las cargas superficiales de las nanopartículas producidas para ambas concentraciones poliméricas, se puede apreciar una misma tendencia para todos los casos. Se observan mayores valores de potencial Z cuando los diámetros de las nanopartículas son menores, lo que puede dar lugar a una estabilización extra de las nanopartículas de menor tamaño, evitando así el posterior proceso de crecimiento mediante la repulsión por carga y la formación de partículas más grandes. La carga superficial de las partículas puede verse influenciada por las propiedades de los medios de dispersión como el pH, la composición del disolvente, la fuerza iónica, entre otras, y por la presencia de moléculas adsorbidas. Sin embargo, en este caso, esas variables no fueron modificadas por lo que no se esperaría una modificación de la carga superficial. Según el análisis estadístico realizado, la carga superficial resultó significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) cuando se modificó el tamaño de las nanopartículas. Este efecto puede ser explicado mediante la perturbación de la densidad de carga difusa debido al movimiento de las partículas que resulta sensible al tamaño de las mismas [434][435]. Por otro lado, hay evidencias de que un valor absoluto más alto del potencial-Z significa un estado estable más alto de los sistemas coloidales y, valores de carga superficial superiores a 30 mV permiten una dispersión estable. Por otro lado, las nanopartículas con potenciales inferiores a 30 mV tienden a aglomerarse más fácilmente que aquellas cuyas cargas se encuentran por encima de este umbral. Debido a esto, parece razonable obtener una carga superficial dependiente del tamaño. Este efecto también lo describieron Holmberg et al. [436], observando que a medida que disminuye el tamaño de las nanopartículas de  $\text{TiO}_2$ , la densidad de carga superficial aumenta, particularmente para las partículas de diámetro inferior a 10 nm. En otros estudios, se ha confirmado que la modificación química de polímeros con grupos cargados positiva y negativamente contribuía en el control del tamaño de las nanopartículas, evitando su crecimiento, sintetizadas mediante el método de nanoprecipitación [437]. Además, este control de tamaño puede promover las propiedades tanto mucoadhesivas debido a la carga superficial positiva, como de internalización celular.



**Figura 3.11** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona (azul) y 10% (p/v) (gris) a diferentes valores de R y caudales totales. Índices de polidispersidad (PDI) de Eudragit® RS100 5% (p/v) (■) y 10% (p/v) (●), b) potencial Z de NPs de Eudragit® RS100 5% (p/v) (● azul) y 10% (p/v) (● gris) (\*\*p < 0.001, \*\*\*p < 0.0001). Distribuciones de tamaño de DLS c) con R =10, 5 mL/min, d) con R =10, 50 mL/min.

En la siguiente tabla (Tabla 3.7) se resumen el efecto de la variación de la concentración de polímero sobre el tamaño medio de las nanopartículas y su distribución de tamaños comparando ambas metodologías de síntesis, el método discontinuo y mediante un dispositivo micromezclador. La síntesis mediante microfluídica mejora el grado de mezcla de ambas fases, obteniéndose nanopartículas de menor tamaño con valores de PDI inferiores. En el caso de la concentración polimérica de Eudragit® RS100 al 5% (p/v), se redujeron un 48.7 y un 47.1% el tamaño y la dispersidad, respectivamente, al comparar el método discontinuo y el microfluídico.

**Tabla 3.7** Resultados obtenidos por la caracterización de DLS de diámetro medio y PDI del método discontinuo y el microfluídico para diferentes concentraciones poliméricas.

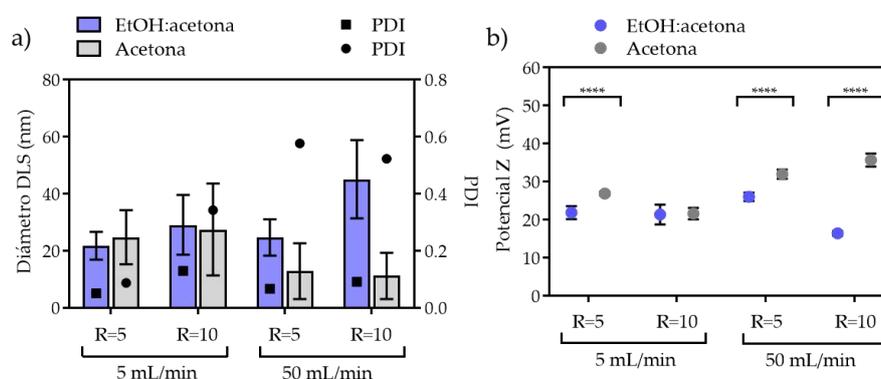
Muestra	Método de síntesis	Síntesis	Diámetro ± Desv.Est. (nm)	PDI
NP3	Discontinuo	10% (p/v) EtOH:acetona	62.2 ± 25.6	0.17
NP5	(R = 5)	5% (p/v) EtOH:acetona	53.8 ± 17.9	0.11
NP16	Microfluídica	10% (p/v) EtOH:acetona	31.0 ± 9.2	0.09
NP26	(R = 5, Q = 5 mL/min)	5% (p/v) EtOH:acetona	21.8 ± 4.9	0.05

Influencia del tipo de disolvente.

Los disolventes, etanol y acetona, se escogieron por cumplir con los requisitos necesarios para la síntesis por el método de nanoprecipitación: baja temperatura de ebullición, solubilidad estable del polímero Eudragit® RS100 y miscibilidad y, además, eran disolventes considerados de baja toxicidad. De acuerdo con la literatura [378] y, tal como se observaba para el método discontinuo, se obtienen tamaños menores de nanopartículas cuando el disolvente utilizado es acetona, respecto a la mezcla de etanol:acetona debido, posiblemente, a las diferentes viscosidades. Además, se obtienen distribuciones de tamaño (PDI) más estrechas cuando el disolvente es etanol:acetona, como se observa en la Figura 3.12-a.

Las cargas superficiales obtenidas fueron mayores para las nanopartículas producidas utilizando acetona como disolvente, coincidiendo con la tendencia anteriormente comentada de mayor valor de potencial Z para menores tamaños de nanopartículas (Figura 3.12-b), obteniéndose valores superiores a + 25 mV para estas nanopartículas de menos tamaño.

Se obtuvieron resultados similares para ambas concentraciones de polímero, en la Figura 3.12 se presentan los resultados obtenidos para una concentración polimérica de Eudragit® RS100 5% (p/v), los correspondientes a la concentración de 10% (p/v) se adjuntan en la Figura A3.1 del Anexo III.



**Figura 3.12** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona (azul) y 5% (p/v) acetona (gris) a diferentes valores de R y caudales totales. Índices de polidispersidad (PDI) de Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona (■) y 5% (p/v) acetona (●), b) potencial Z de NPs de Eudragit® RS100 5% (p/v) EtOH:acetona (● azul) y 5% (p/v) acetona (● gris) (\*\*\*\*p < 0.0001).

En la Tabla 3.8 se resumen el efecto de la variación de los disolventes sobre el tamaño medio de las nanopartículas y su distribución de tamaños comparando ambas metodologías de síntesis, el discontinuo y mediante un dispositivo micromezclador. La síntesis mediante microfluídica mejora el grado de mezcla de ambas fases ya sea en la síntesis con acetona como en la síntesis con la mezcla de disolventes etanol:acetona, obteniéndose nanopartículas de menor PDI en comparación con los obtenidos mediante el método discontinuo.

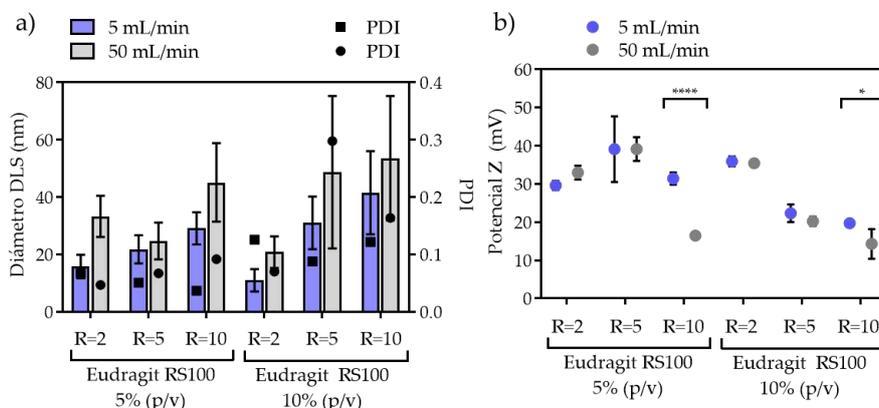
**Tabla 3.8** Resultados obtenidos por la caracterización de DLS de diámetro medio y PDI del método discontinuo y el microfluídico para diferentes disolventes.

Muestra	Método de síntesis	Síntesis	Diámetro ± Desv.Est. (nm)	PDI
NP7	Discontinuo	5% (p/v) acetona	20.6 ± 9.2	0.20
NP5	(R = 5)	5% (p/v) EtOH:acetona	53.8 ± 17.9	0.11
NP31	Microfluídica	5% (p/v) acetona	24.8 ± 9.5	0.15
NP26	(R = 5, Q = 5 mL/min)	5% (p/v) EtOH:acetona	21.8 ± 4.9	0.05

Influencia del caudal total.

Se estudió la influencia del caudal total comparando diferentes variables, entre ellas: por un lado la concentración polimérica (5 y 10% (p/v)) en la mezcla de disolventes etanol:acetona, y por otro la relación R (FA/FO) con valores 2, 5 y 10. En la Figura 3.13 se muestran los resultados de la comparativa en función del caudal total utilizado en la síntesis en el micromezclador, 5 y 50 mL/min. En este apartado, se comparan sólo los resultados obtenidos para la mezcla de disolventes etanol:acetona en la FO, pero como se muestra en la Figura 3.12, el comportamiento de las síntesis con acetona como disolvente sigue la misma tendencia.

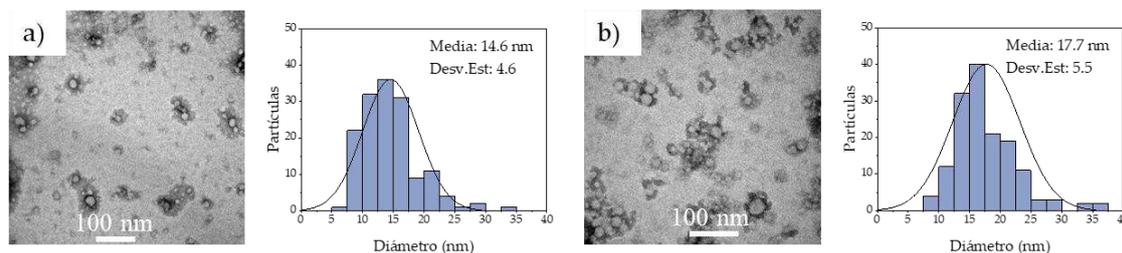
Se obtuvieron nanopartículas de menor tamaño y mayor homogeneidad para las síntesis con un caudal total de 5 mL/min, siendo un comportamiento común para todos los valores de R y ambas concentraciones estudiadas. Las diferencias de tamaño entre las síntesis de ambos caudales totales resultaron significativas ( $p \leq 0.05$ ). Sin embargo, el comportamiento esperado de acuerdo con la hidrodinámica y el diseño del micromezclador hubiera sido el de mejorar la eficiencia de la mezcla conforme se aumentaba el flujo total [402][410], siendo contrario a lo que se observa en los resultados obtenidos y reproducidos. Además, el índice de polidispersidad también fue mayor para los caudales más elevados.



**Figura 3.13** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 5% y 10% (p/v) EtOH:acetona a caudal total 5 mL/min (azul) y a 50 mL/min (gris) a diferentes valores de R. Índices de polidispersidad (PDI) de 5 mL/min (■) y 50 mL/min (●), b) potencial Z de NPs a 5 mL/min (● azul) y 50 mL/min (● gris) (\* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

En relación a la carga superficial (Figura 3.13-b) se observó un comportamiento similar la tendencia que se ha observado en los casos anteriores, obteniéndose los mayores valores de potencial Z para las nanopartículas de menor tamaño.

Las micrografías de TEM y el posterior análisis de la distribución de tamaños, que se muestra en la Figura 3.14, corroboran los resultados anteriormente comentados. Por lo tanto, se puede concluir con una influencia directa del tiempo de residencia en el micromezclador en la distribución de tamaños final de las nanopartículas producidas. Como se ha comentado previamente, posiblemente el proceso de nucleación y crecimiento se completen en el interior del micromezclador cuando el caudal total es 5 mL/min, ya que el tiempo de residencia en el interior del dispositivo (96 ms) resultaría ser suficiente para que se den ambos eventos y, así, se produzca un crecimiento controlable. Sin embargo, para el tiempo de residencia correspondiente a la síntesis cuando el caudal total es 50 mL/min (9.6 ms) posiblemente no se complete el fenómeno de crecimiento, dándose en el vial donde se recogen las nanopartículas producidas donde la mezcla no es tan eficiente como en el interior del microrreactor. Por lo tanto, esta descoordinación de los fenómenos ocurridos podría promover el crecimiento incontrolado de los núcleos producidos en el micromezclador e, incluso, podría suceder una segunda nucleación en el vial donde se da la evaporación del disolvente [438].



**Figura 3.14** Micrografías de TEM y distribución de tamaños (N=150) de las síntesis con una concentración polimérica e Eudragit® RS100 de 5% (p/v), R = 10: a) 5 mL/min y b) 50 mL/min.

Como conclusión, cuando el caudal total utilizado en la síntesis es 5 mL/min y el tiempo de residencia de 96 ms hay un mayor control del crecimiento de las nanopartículas, obteniendo partículas de menor tamaño y de PDI inferiores. Este resultado recalca la importancia de controlar el grado de mezcla en cada una de las fases de síntesis por nanoprecipitación, tanto durante la nucleación como en el crecimiento de las nanopartículas.

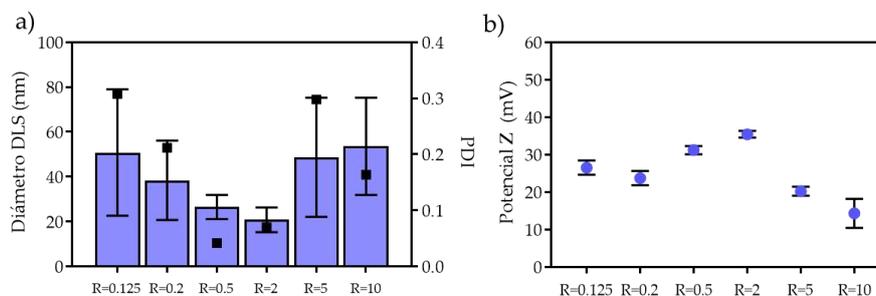
### Influencia del valor de R (FA/FO).

Se investigó el efecto de la variación de la relación R (FA/FO) ya que modificando R se puede alterar el grado de supersaturación. Los resultados de tamaño y carga superficial obtenidos de la caracterización de las nanopartículas sintetizadas con los diferentes valores de R en un rango de 0.125-10 se resumen en la Figura 3.15. Las condiciones de análisis que se

consideraron en este estudio fueron una concentración polimérica del 10% (p/v) en una mezcla de etanol:acetona y un flujo total de 50 mL/min. Como se observa en los resultados (Figura 3.15-a) se obtuvo un tamaño de partículas mínimo cuando el valor de R se encontraba entre 0.2 y 2, rindiendo polidispersidades inferiores a 0.1, lo que se traduce en distribuciones de tamaño uniformes. En el caso de ambos extremos, cuando la FO o la FA se elevaban, como es el caso de  $R = 0.125$  o  $R = 10$ , el tamaño final de las partículas aumentaba significativamente y, con él, también aumentaba el valor de PDI. Para las relaciones FA/FO extremas, los tamaños de partícula obtenidos no presentaban diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ). El mecanismo que explica este fenómeno no está totalmente claro, ya que en literatura se pueden encontrar diferentes conclusiones y razonamientos que apoyan diferentes teorías [387][429][439]. Sin embargo, tal y como se ha explicado anteriormente, podría razonarse esta tendencia mediante la teoría de nucleación y crecimiento [440]. En este caso, cuando la FO es elevada, siendo  $R < 0.5$ , la sobresaturación es baja, por lo que no se favorece la nucleación polimérica, por lo que habrá baja densidad de núcleos y alta concentración de polímero en el disolvente que favorecerá el crecimiento de los núcleos formados y, por lo tanto, la producción de nanopartículas de mayor tamaño. En el caso contrario, cuando la FA es elevada, siendo  $R > 5$ , la solubilidad polimérica se reduce drásticamente, dándose los eventos de nucleación rápidamente y favoreciendo el crecimiento de las nanopartículas por aglomeración, resultando en partículas heterogéneas de mayor tamaño.

Por lo tanto, se puede concluir que el control en el tamaño medio de las partículas producidas y en su dispersidad de tamaños se encuentra regulado por el equilibrio entre los eventos de nucleación y agregación.

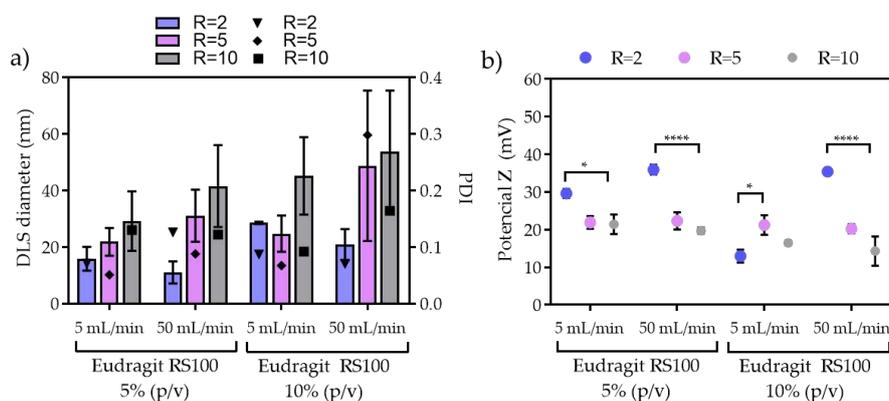
En la Figura 3.15-b se muestran los resultados relacionados con la carga superficial de las nanopartículas producidas, observándose de nuevo la tendencia de los apartados anteriores en los que las partículas de menor tamaño presentan mayores cargas superficiales que las de mayor tamaño. Este hecho también puede influir en la estabilidad coloidal y, por lo tanto, en el tamaño final de las nanopartículas de Eudragit® RS100 obtenidas en este estudio trabajando con diferentes valores de R de 0.2 a 5.



**Figura 3.15** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 10% (p/v) EtOH:acetona a caudal total 50 mL/min y diferentes valores de R y los índices de polidispersidad (PDI) (■), b) potencial Z de NPs a diferentes valores de R (● azul).

También se estudió si la tendencia de presentar un tamaño mínimo para valores de R intermedios, tal y como se había visto en el barrido de condiciones anteriormente, se daba para todas las condiciones estudiadas en este capítulo de tesis. Para este estudio se compararon diferentes valores de R (2, 5 y 10) con las diferentes concentraciones (5 y 10% (p/v) de Eudragit® RS100), y con los caudales 5 y 50 mL/min (Figura 3.16-a). Observamos el mismo comportamiento que se ha observado en los apartados anteriores: tamaños finales de partículas mayores cuando la concentración de polímero es mayor, cuando se utiliza un flujo volumétrico más alto (tiempo de residencia menor) y cuando la FA es más elevada. Sin embargo, en el caso de los caudales más lentos, 5 mL/min, no se observa el mínimo de tamaño para R = 2, sino que se obtienen partículas de tamaño final similar y con polidispersidades menores para valores de R = 5, lo cual puede ser debido a la nucleación y al crecimiento que se da de manera controlada en el interior del micromezclador para dicho caudal.

En la Figura 3.16-b se muestran los resultados obtenidos referentes al potencial Z de las diferentes nanopartículas en los que se observa que los mayores valores de carga superficial corresponden a los diámetros inferiores de nanopartículas lo que se traduce en una mayor estabilidad coloidal que, quizás, colabore en el menor crecimiento de estas partículas. Sin embargo, no se observan diferencias significativas para todas las comparativas respecto al tamaño, por lo que tampoco se puede concluir con que la tendencia de comportamiento de la carga superficial frente al tamaño se observe en todos los casos.



**Figura 3.16** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit® RS100 5% y 10% (p/v) EtOH:acetona a caudal total 5 mL/min y 50 mL/min a valores de R = 2 (azul), R = 5 (rosa) y R = 10 (gris). Índices de polidispersidad (PDI) de R = 2 (▼), R = 5 (◆) y R = 10 (■), b) potencial Z de NPs a valores de R=2 (● azul), R = 5 (● rosa) y R = 10 (\*p < 0.05, \*\*\*\*p < 0.0001).

### Caracterización de las partículas sintetizadas por nanoprecipitación y de la encapsulación de rifampicina.

Considerando que los mejores resultados obtenidos en cuanto al control del tamaño y a la monodispersidad de la muestra de nanopartículas producidas fueron para la condición de

concentración polimérica del 5% (p/v) de Eudragit® RS100 en una mezcla de etanol:acetona (1:1) para el método de síntesis por nanoprecipitación mediante la técnica discontinua, se estudió la encapsulación de un fármaco hidrófobo, rifampicina. La rifampicina, como se ha desarrollado en el apartado 3.1.3, es un antibiótico cuya administración está impedida por su hidrofobicidad y, además, es susceptible a la degradación ácida a su paso por el estómago [441][442].

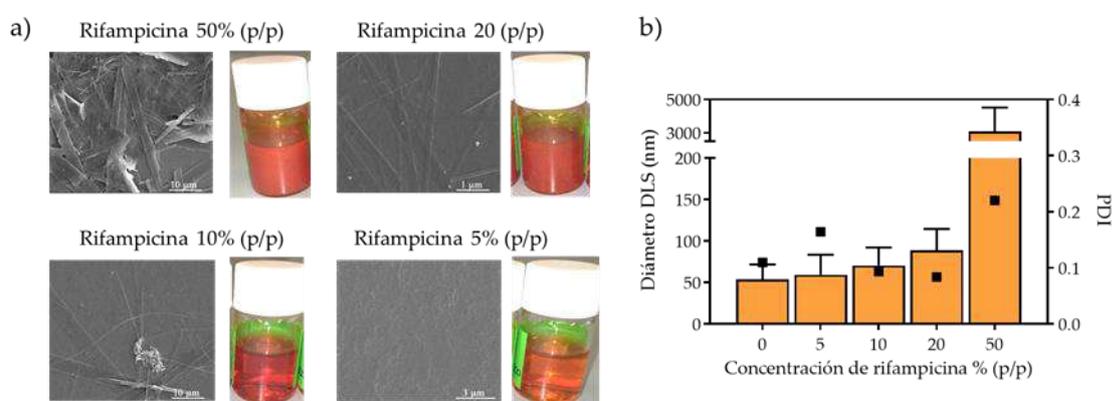
Cuando se diseña un sistema de liberación controlada, uno de los principales objetivos es maximizar la carga de agente bioactivo que se quiere incluir en su interior para su posterior administración. Sin embargo, no sólo la capacidad de carga es importante, sino también el rendimiento de la encapsulación, minimizando la pérdida del bioagente, para reducir de esta forma el coste de fabricación. Es decir, una encapsulación óptima es aquella en la que se logra una elevada eficiencia de encapsulación con una elevada capacidad de carga sin influenciar en la dispersión de tamaños de la muestra.

En primer lugar, para encapsular el antibiótico rifampicina por nanoprecipitación, se optimizó la concentración de fármaco idóneas para conseguir una precipitación homogénea o, al menos, evitar que el fármaco alcanzase la sobresaturación antes que el polímero. Con ello se pretende que la cinética de precipitación del fármaco sea igual de rápida o mayor que la del polímero. Si no fuese así, se obtendría como producto final la formación de grandes cristales de fármaco libre que no han sido atrapados por el polímero. Para esta optimización, se trabajó mediante el método de nanoprecipitación discontinuo, para evitar también así la posible obstrucción de los canales del micromezclador si se daba la precipitación incontrolada del fármaco. Como se observa en la **Figura 3.17-a**, se ensayaron diferentes concentraciones de rifampicina en un rango de 50 a 5% (p/p) respecto del polímero. Para las concentraciones de 50 y 20 % (p/v) de fármaco se observaron grandes precipitados de fármaco macroscópicos y, mediante la visualización de las muestras por microscopía electrónica de barrido, se observaron precipitados externos a las nanopartículas producidas para aquellas concentraciones superiores al 5% (p/p) respecto al polímero. En el caso de la concentración de rifampicina al 5% (p/p) respecto al polímero, no se observaron cristales de fármaco en el exterior de las nanopartículas, por lo que pudieron producirse dos situaciones: 1) una precipitación de fármaco y polímero homogénea o 2) pudo reducirse el punto de sobresaturación del fármaco de forma que no se favoreciese su nucleación y quedase en el interior de la nanopartícula polimérica sin precipitar [368]. En conclusión, se consiguieron las condiciones más óptimas para la encapsulación de rifampicina sin la pérdida de fármaco en forma de grandes precipitados externos a las nanopartículas formadas, alcanzando o no las condiciones de saturación acopladas del polímero y de la rifampicina.

En la **Figura 3.17-b** se observa un aumento en el diámetro hidrodinámico de las nanopartículas obtenidas al adicionar el fármaco desde 53.8 nm para las nanopartículas vacías, hasta 88.8 nm para las nanopartículas producidas con un 20% (p/p) de rifampicina añadida.

Para las condiciones establecidas como óptimas, el aumento en el diámetro hidrodinámico fue ligeramente superior, de 59.4 nm

Una vez establecida la concentración de fármaco más óptima para la síntesis de nanopartículas poliméricas por nanoprecipitación mediante el método discontinuo, se implementó a la tecnología microfluídica, tomando las condiciones de síntesis que rendían las nanopartículas más homogéneas. Por lo tanto, estas condiciones fueron: Eudragit® RS100 a la concentración de 5% (p/v) en una mezcla de etanol:acetona, utilizando un caudal total de 5 mL/min y un valor de R (FA/FO) de 5.



**Figura 3.17** a) Aspecto macroscópico e imágenes de SEM del producto formado al adicionar rifampicina a concentraciones de 50, 20, 10 y 5% (p/p) respecto al polímero en la síntesis de nanoprecipitación por el método discontinuo, b) efecto de la adición de rifampicina en el diámetro hidrodinámico. Datos obtenidos por medidas de DLS.

En la Tabla 3.9 se muestran los resultados de la caracterización de las nanopartículas sintetizadas mediante el método discontinuo y mediante microfluídica, así como sobre la encapsulación de rifampicina mediante ambas tecnologías. Mediante el método discontinuo, se observaron diámetros medios similares para las partículas vacías y para las cargadas con el fármaco, pero cabe destacar el aumento en la polidispersidad de la muestra, variando de 0.11 a 0.17, debido a la adición de rifampicina en la FO. Por otro lado, se observa una eficiencia de encapsulación de  $30.1 \pm 5.7\%$  y una capacidad de carga de  $1.4 \pm 0.3\%$ . Se obtuvieron mejores resultados para las nanopartículas producidas por microfluídica. Se observan menores tamaños de nanopartículas, siendo el tamaño medio de las nanopartículas con rifampicina obtenido mediante el estudio de las imágenes de microscopía de transmisión electrónica de  $17.7 \pm 5.0$  nm, similar al de las nanopartículas sin carga. También se consigue una reducción del valor de PDI mediante la tecnología microfluídica, observándose de igual forma un aumento en la polidispersidad de la muestra cuando se introduce la rifampicina en el medio, variando de 0.05 a 0.07. En este caso, la eficiencia de encapsulación aumentó significativamente de  $30.1 \pm 5.7\%$ , mediante el método discontinuo, a  $42.3 \pm 2.4\%$ , mediante microfluídica. Consecuentemente, la capacidad de carga también aumentó en la encapsulación a través de

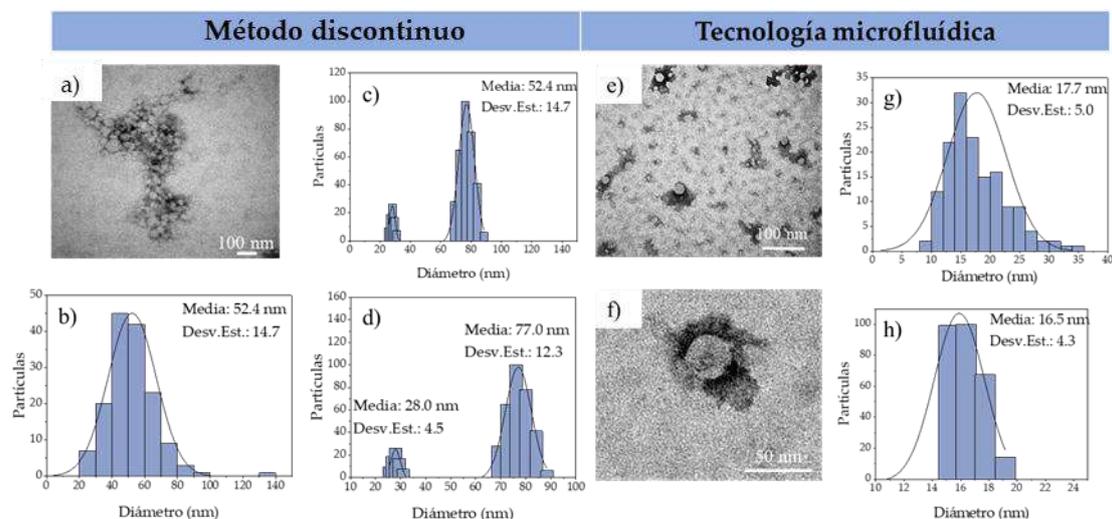
dispositivos de micromezclado, alcanzando un valor de  $2.0 \pm 0.1\%$ . A partir de estos resultados, se puede concluir con que la tecnología microfluídica favorece el control de la síntesis de nanopartículas por nanoprecipitación rindiendo tamaños inferiores, poblaciones más homogéneas y mayores rendimientos de encapsulación.

**Tabla 3.9** Caracterización DLS y potencial Z de las NPs sintetizadas por nanoprecipitación mediante el método discontinuo y mediante microfluídica con las condiciones consideradas más idóneas de las NPs vacías y de la encapsulación de rifampicina

Método de síntesis	Síntesis	Diámetro ± Desv.Est. (nm)	Diámetro DLS ± Desv.Est. (nm)	PDI
Discontinuo (R = 5)	5% (p/v) EtOH:acetona	55.3 ± 15.96	53.8 ± 17.9	0.11
	5% (p/v) EtOH:acetona + 5% (p/p) rifampicina	52.4 ± 14.7	59.4 ± 24.1	0.17
Microfluídica (R = 5, Q = 5 mL/min)	5% (p/v) EtOH:acetona	18.4 ± 5.5	21.8 ± 4.9	0.05
	5% (p/v) EtOH:acetona + 5% (p/p) rifampicina	17.7 ± 5.0	16.5 ± 4.3	0.07

Método de síntesis	Síntesis	Potencial Z (mV)	EE (%)	DL (%)
Discontinuo (R = 5)	5% (p/v) EtOH:acetona	13.2 ± 3.5	-	-
	5% (p/v) EtOH:acetona + 5% (p/p) rifampicina	13.7 ± 7.6	30.1 ± 5.7	1.4 ± 0.3
Microfluídica (R = 5, Q = 5 mL/min)	5% (p/v) EtOH:acetona	31.9 ± 8.6	-	-
	5% (p/v) EtOH:acetona + 5% (p/p) rifampicina	17.4 ± 2.2	42.3 ± 2.4	2.0 ± 0.1

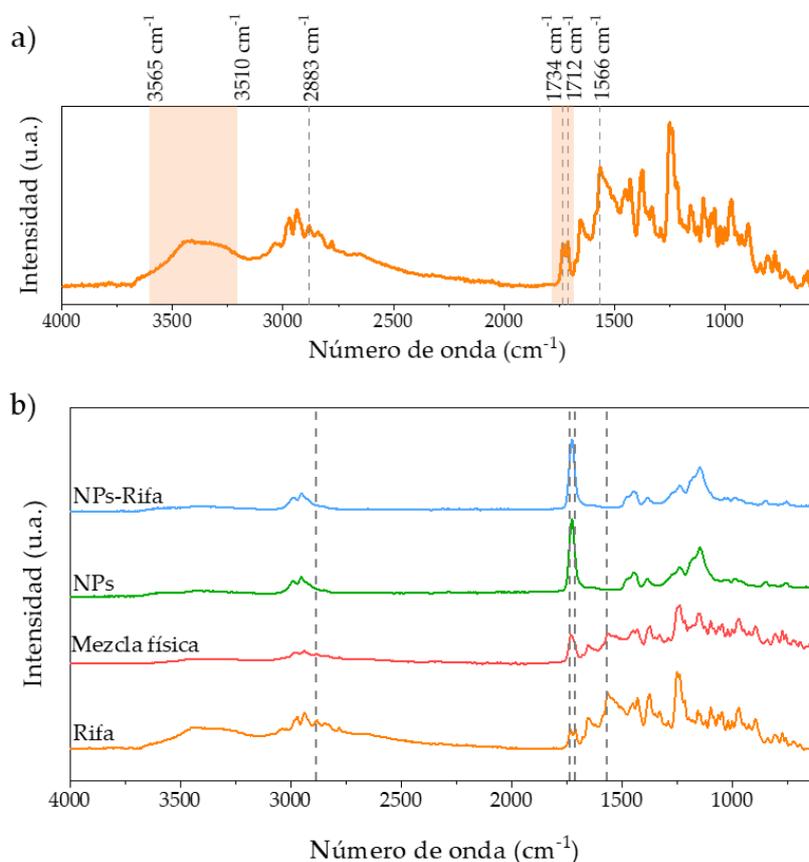
Mediante el análisis de las distribuciones de tamaños de las nanopartículas cargadas con rifampicina que se presenta en la Figura 3.18 se observaron resultados coherentes con los observados en la optimización de los parámetros de la síntesis por el método discontinuo. Mediante el análisis de los datos de DLS (Figura 3.18-c-d) se observan dos poblaciones de diferente tamaño, una de  $28 \pm 4.5$  nm y una más grande de  $77.0 \pm 12.3$  nm, lo que parece ser producto de una agitación heterogénea de la mezcla de fases y un crecimiento de las nanopartículas descontrolado, ya que se producen gradientes de concentración. Por otro lado, el análisis de los datos de DLS de las nanopartículas sintetizadas mediante microfluídica mostraron una sola población de reducido tamaño, centrada en  $17.7 \pm 5.0$  nm, lo que demuestra una vez más la mejora que supone la implementación de la microfluídica en el control de la mezcla y de la producción de nanopartículas homogéneas mediante nanoprecipitación.



**Figura 3.18** a-d) NPs con rifampicina sintetizadas mediante el método discontinuo: a) imagen de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños se SEM (N = 150), c) distribución de tamaños de DLS, d) análisis de los picos de las distribuciones del histograma del DLS. e-h) NPs con rifampicina sintetizadas mediante la tecnología microfluídica: e) imagen de TEM, f) zoom de una NP, g) histograma de la distribución de tamaños se TEM (N = 150), h) distribución de tamaños de DLS.

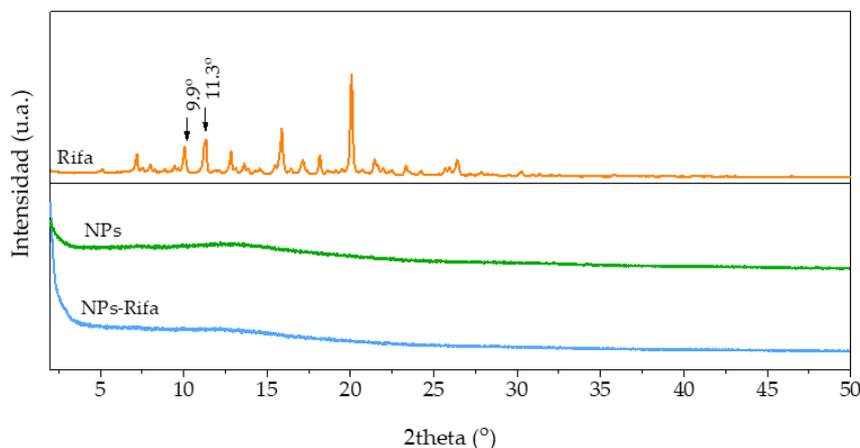
Mediante FTIR se realizó un análisis para estudiar la posibilidad de que se formara alguna interacción entre el polímero y el antibiótico. En primer lugar, en la Figura 3.19-a puede observarse que en el espectro infrarrojo de la rifampicina (línea naranja) se observan los picos característicos del fármaco: la banda  $3565\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo OH, el pico a  $2883\text{ cm}^{-1}$  del grupo N-CH<sub>3</sub>, los picos  $1734$  y  $1712\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a los grupos furanona C=O y acetyl C=O y el pico a  $1566\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al grupo amida C=O, correspondiendo a la forma II de dicho fármaco, caracterizada principalmente por el doble pico a  $1734$  y  $1712\text{ cm}^{-1}$  tal y como reporta Agrawal et al [426]. El pico más característico del polímero Eudragit® RS100 se encuentran a  $1726\text{ cm}^{-1}$ , y se asigna al estiramiento de los grupos C=O [443].

En la Figura 3.19-b podemos observar la presencia de los picos característicos del antibiótico y del polímero en la mezcla física. Sin embargo, el espectro de las nanopartículas sin fármaco y el de las que contienen fármaco resultan idénticos, predominando el espectro correspondiente al polímero Eudragit® RS100, siendo imposible detectar la presencia de rifampicina debido a que la sensibilidad del método no resulta suficiente para detectar cantidades de fármaco tan reducidas. Por lo tanto, no se puede asegurar ni descartar la existencia de interacciones entre el polímero y el fármaco.



**Figura 3.19** a) Espectro FTIR del antibiótico rifampicina y sus picos característicos, b) espectros FTIR de las NPs sintetizadas mediante microfluídica. Se muestra el espectro de rifampicina (naranja), de la mezcla física del polímero y el antibiótico (rojo), de las NPs vacías (verde) y de las NPs con rifampicina encapsulada (azul).

De la misma manera que se determinó mediante FTIR, se comprobó que el fármaco de partida se encontraba en su forma II mediante la caracterización XPS. Como se muestra en la Figura 3.20, a partir del difractograma obtenido, se detectaron los picos característicos a 9.9 y 11.3° propios de la forma II. La curvatura en forma de halo que se observa tanto en la nanopartículas sin antibiótico como en las nanopartículas con antibiótico corresponde al estado amorfo del polímero. En el difractograma correspondiente a las nanopartículas con antibiótico resulta posible observar la presencia del fármaco ni en su estado amorfo ni cristalino.

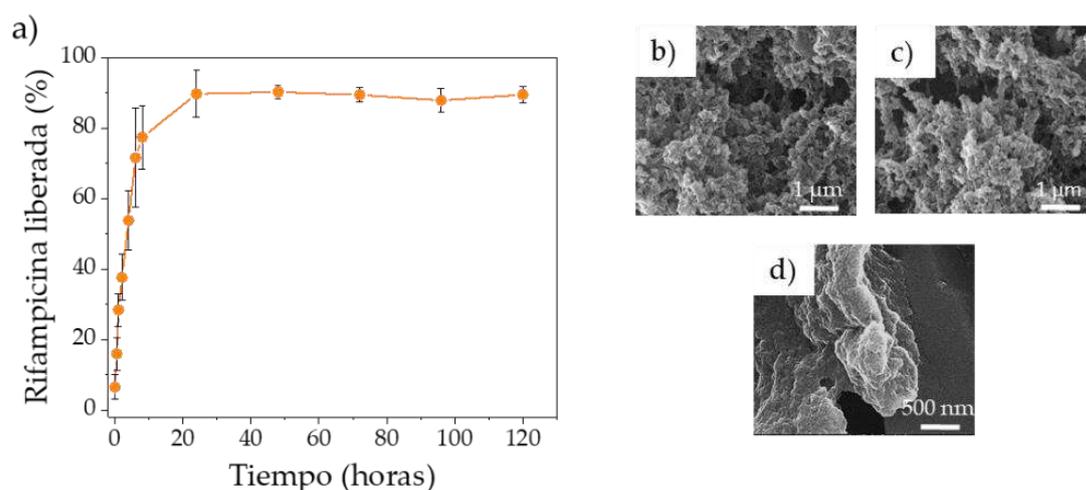


**Figura 3.20** Caracterización del antibiótico rifampicina y de las NPs sintetizadas por microfluídica en estado sólido mediante difracción por rayos X (XRD). Se muestra la rifampicina (naranja), las NPs sin rifampicina (verde) y las NPs con rifampicina encapsulada (azul).

### Cuantificación de la liberación *in vitro* del fármaco encapsulado.

Para llevar a cabo cuantificación del fármaco liberado y encapsulado, se realizaron las curvas de calibrado en los diferentes medios: fluido gástrico simulado y PBS, las cuales se adjuntan en la Figura A3.2 del anexo.

Se realizó el estudio de la cinética de liberación de las nanopartículas que liberaron un  $6.5 \pm 3.5\%$  de la rifampicina contenida tras 2h de incubación en fluido gástrico simulado. Tras este tiempo, se pusieron en contacto con el medio de liberación (PBS) durante 5 días, momento en el que se obtuvo una liberación aproximada al 100% de manera estable. Como se observa en el perfil de liberación de la Figura 3.21-a, tras las 2h de incubación en medio gástrico simulado, en las primeras 24h en PBS se libera prácticamente la totalidad del fármaco encapsulado. En las imágenes de SEM de las partículas tras la liberación (Figura 3.21-b-d) no se observa degradación del polímero, resultado esperado puesto que se trata de un polímero no biodegradable. No se observa diferencia morfológica entre las imágenes tras 2h en contacto con fluido gástrico simulado ni tras 24h en medio fisiológico. Sin embargo, en este último caso, tras 24h se ha observado una liberación total del fármaco. En la imagen correspondiente de las nanopartículas tras 7 días en fluido intestinal simulado se observa una aglomeración polimérica en la que las partículas parecen fundirse y aglomerarse entre ellas perdiendo la morfología esférica.



**Figura 3.21** a) perfil de liberación de las NPs de Eudragit® RS100 en PBS b-d) micrografías de SEM de las NPs: a) tras 2h en FGS, b) tras 24h en FIS, d) tras 7 días en FIS.

Se realizaron los ajustes matemáticos de primer orden, Higuchi, Peppas-Sahlin, Lindner-Lippold y Korsmeyer-Peppas. (Figura A3.3) y se estudiaron los mecanismos que contribuían a cada una de las liberaciones, de la misma manera que se explica en el Capítulo II.

El modelo cinético que mejor se ajusta a la liberación del fármaco de las nanopartículas sintetizadas mediante microfluídica por el método de nanoprecipitación fue el propuesto por Lindner y Lippold ( $R^2 = 0.986$ ) [444]. En dicho ajuste se reflejan dos mecanismos de liberación: uno dependiente de las características estructurales y geométricas del sistema de liberación (constante  $k$ ) y otro dominado por una rápida y sostenida liberación inicial (constante  $b$ ). Como se muestra en la Tabla 3.10 el valor de la constante  $k$  fue de 20.1, mientras que la contribución mediante una rápida liberación gobernada por la constante  $b$  fue de 6.1. Estos valores dejan ver que el proceso de liberación difusional tiene mayor contribución que el proceso de rápida liberación inicial ( $k > b$ ). También hay que tener en cuenta el coeficiente  $n$ , que implica el mecanismo de liberación que se da en la liberación, dependientemente de la morfología del sistema. Cuando la liberación del fármaco se da mediante difusión a través del polímero y debido a la erosión polimérica a partes iguales, el valor del coeficiente  $n$  toma el valor de 0.66, aumentando el valor de dicho coeficiente conforme aumenta el control del proceso de liberación mediado por la erosión. En este caso, el valor de  $n = 0.6$ , por lo que el proceso de liberación se encuentra ligeramente dominado por la erosión del polímero que forma las nanopartículas.

**Tabla 3.10** Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación de los mejores modelos matemáticos ajustados al perfil de liberación *in vitro*.

Vector	Modelo matemático	Ecuación*	Parámetros
NPs - rifampicina	Lindner-Lippold	$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n + b$	R <sup>2</sup> = 0.986 k = 20.1 k = 6.1 n = 0.62

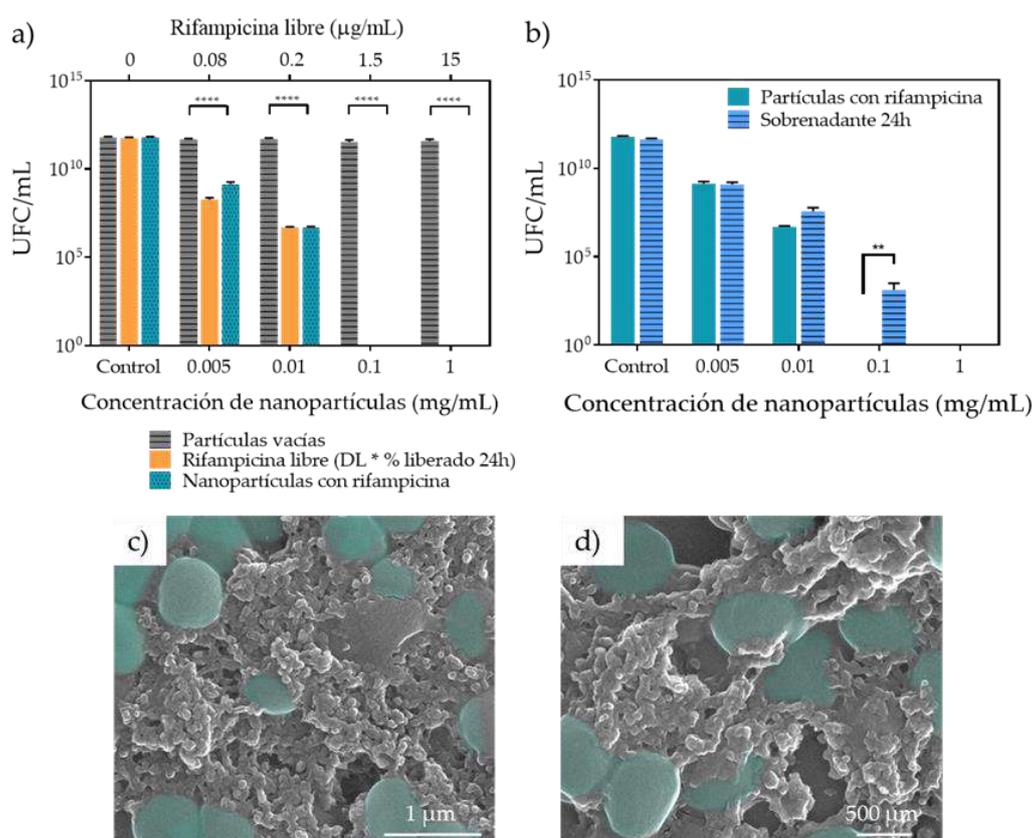
### Estudio *in vitro* de la acción bactericida del fármaco encapsulado.

Para poder evaluar el efecto bactericida de las partículas con y sin antibiótico en su interior, se estudió la concentración mínima necesaria del antibiótico para reducir la carga bacteriana en al menos dos logaritmos (MIC) y para acabar con la totalidad de esta carga bacteriana (MBC). Los valores resultantes de este primer estudio, cuyos resultados se adjuntan en la Figura A3.4, fueron: MIC < 0.05 µg/mL y MBC entre los valores 0.25-0.5 µg/mL, coincidiendo con la literatura [445][446].

Los resultados de la puesta en contacto de las nanopartículas con rifampicina con las bacterias se muestran en la Figura 3.22-a. Se puede observar que las nanopartículas sin antibiótico no producen efecto bactericida, permitiendo que las bacterias alcancen su estado estacionario de crecimiento. Por otro lado, se comprobó que, cuando se ponían en contacto las bacterias con las nanopartículas que contenían el antibiótico, tanto las nanopartículas como el fármaco libre ejercían la misma actividad antibacteriana en dosis superiores o próximas a la MBC (concentración de nanopartículas > 0.01 mg/mL, que corresponde a 0.2 µg/mL de rifampicina liberada en 24h) sin encontrar diferencias significativas entre las nanopartículas y el fármaco libre. Para una concentración de nanopartículas de 0.005 mg/mL (0.08 µg/mL de rifampicina libre), se observa que el efecto del fármaco libre es ligeramente superior al de las nanopartículas a tan baja dosis, pero no resulta significativo.

Como se ha caracterizado anteriormente, las nanopartículas presentaban una carga superficial positiva, es decir, su potencial-Z era de 17.4± 2.2 mV. Este hecho podría favorecer el efecto de contacto entre la partículas y la bacteria, ya que la pared bacteriana tiene carga superficial negativa debido a la presencia de ácidos teicoicos, y podrían darse interacciones electrostáticas [447]. Para estudiar esta posible interacción, se investigó si había efecto de contacto entre las nanopartículas y las bacterias mediante la puesta en contacto de los sobrenadantes de liberación de las nanopartículas a diferentes concentraciones con las bacterias. Se observó que el efecto bactericida no se encontraba influenciado por el efecto de contacto entre la bacteria y la partícula (Figura 3.22-b) ya que no se encontraron diferencias significativas entre ambas acciones antibióticas. Sin embargo, a elevadas dosis, de 0.1 mg/mL, sí que se aprecian diferencias significativas entre el antibiótico liberado sin presencia de

nanopartículas y con presencia de nanopartículas, ejerciendo mayor efecto bactericida las nanopartículas. Además, en las imágenes de SEM (Figura 3.22-c y d), se observa que las partículas se aglomeran y las bacterias se adhieren a la superficie de las mismas, por lo que probablemente, a estas concentraciones inferiores de la MIC. Por esta razón, probablemente se puede confirmar una sinergia de efectos entre la capacidad antibacteriana del antibiótico y el contacto de la nanopartícula con las bacterias haciendo en este caso que el antibiótico se encuentre más accesible para las bacterias.



**Figura 3.22** a) Viabilidad de *S. aureus* en presencia de NPs vacías, antibiótico libre (concentración teóricamente liberada en el tiempo de contacto con las bacterias, 24h) y NPs con antibiótico (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001), b) viabilidad de *S. aureus* del sobrenadante liberado en 24h de las NPs, c-d) imágenes de SEM de *S. aureus* (coloreadas de verde) en contacto con las NPs.

### Ensayo de viabilidad celular *in vitro*.

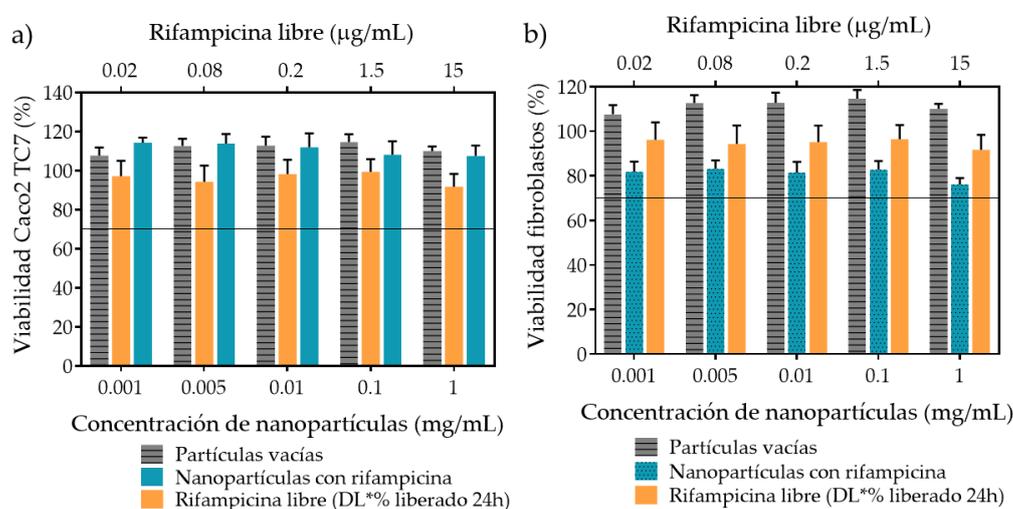
Se evaluó el efecto citotóxico de las nanopartículas a las mismas concentraciones que se realizó el estudio bactericida. Como se trata de un posible vector de administración oral, se realizó el ensayo de viabilidad celular con células Caco2-TC7 y con fibroblastos. La línea celular Caco2 TC7, como se ha explicado en el apartado 2.2.2, mimetiza la morfología y

funcionalidad de los enterocitos del epitelio intestinal humano. Por otro lado, los fibroblastos son una línea celular presentes en los tejidos conectivos del organismo, aparte de también formar parte de la capa mucosa. En el epitelio intestinal, la capa de tejido conectivo se encuentra situada bajo de la capa de enterocitos [448]. Por lo tanto, ambas líneas celulares resultan representativas del epitelio intestinal.

Como indica la norma internacional ISO 10993-5, un material citotóxico reduce la viabilidad celular en más de un 30% respecto al control, el cual son las células sin tratar.

En la Figura 3.23-a se muestran los resultados obtenidos en el ensayo con las células de la línea celular Caco-2, y en la Figura 3.23-b los obtenidos en el ensayo con fibroblastos. Tal y como puede observarse, todas las viabilidades celulares resultaron ser superiores al 70% respecto al control (células sin tratar), por lo que tanto las nanopartículas vacías como las que contenían rifampicina no resultaban nocivas para las líneas celulares ensayadas, incluso a las concentraciones a la que eran capaces de reducir a cero la supervivencia bacteriana (0.1 y 1 mg/mL).

Estos resultados, resaltaron la aplicabilidad de estas nanopartículas como vectores de liberación controlada de antibióticos de muy reducido tamaño, con capacidades bactericidas sin ejercer toxicidad en las células del organismo, para la administración oral de fármacos, entre otros casos, sensibles al pH del gástrico.



**Figura 3.23** Viabilidad celular de las NPs de Eudragit® RS100 en células Caco2 TC7 y fibroblastos. Los resultados se presentan como media ± DE (n=4). La viabilidad del 100% fueron células control no tratadas. a) células Caco2-TC7 y b) células fibroblastos.

### 3.2.3 Conclusiones.

En este capítulo de la Tesis Doctoral se ha desarrollado un estudio exhaustivo de los diferentes parámetros que pueden afectar a la síntesis de partículas mediante el método de nanoprecipitación. Se ha desarrollado un estudio preliminar del método discontinuo y,

posteriormente se ha derivado el estudio al trabajo con un micromezclador multilaminar interdigital para solventar así los inconvenientes del proceso discontinuo.

Mediante este estudio, se ha demostrado que la aplicación de la tecnología microfluídica resulta altamente recomendable para controlar las condiciones de mezcla y así conseguir distribuciones estrechas del tamaño de partícula de los vectores sintetizados de manera continua y escalable. En este aspecto, se debe mencionar que la producción de nanopartículas aumentó hasta 1.7 veces cuando se aplicó la tecnología microfluídica para la síntesis de partículas de Eudragit® RS100, la productividad de 1.5 g/h de nanopartículas mediante el método discontinuo y se incrementó a 2.5 g/h de nanopartículas con la síntesis microfluídica.

Para las condiciones consideradas más idóneas para la síntesis se obtuvieron nanopartículas de tamaño medio de  $55.3 \pm 15.9$  nm, distribuidas en dos poblaciones de tamaño diferentes (PDI 0.11). Mediante la síntesis microfluídica, este diámetro medio se redujo a  $18.4 \pm 5.5$  nm, presentando una única población de nanopartículas (PDI 0.05). Cuando se encapsuló el antibiótico hidrófobo rifampicina, el tamaño permaneció prácticamente inalterado, aunque la distribución de tamaños sí que aumentó ligeramente (0.17 y 0.07 para el método discontinuo y el microfluídico, respectivamente). También se mejoró la eficiencia de encapsulación del antibiótico mediante la aplicación de la microfluídica, aumentando de un  $30.1 \pm 5.7\%$  (DL  $1.4 \pm 0.3\%$ ) con el método discontinuo hasta un  $42.3 \pm 2.4\%$  (DL  $2.0 \pm 0.1\%$ ) con la aplicación de la microfluídica. Finalmente, se obtuvieron partículas de  $17.7 \pm 5.0$  nm de Eudragit® RS100 cargadas de rifampicina con una carga superficial positiva de  $17.4 \pm 2.4$  mV.

Se observó una liberación de  $6.5 \pm 3.5\%$  del fármaco encapsulado en contacto con fluido gástrico durante 2h, tratándose posiblemente del fármaco más superficial, y una posterior liberación en el medio intestinal simulado prácticamente total al cabo de 40h. Durante las primeras 24h se observa una pendiente de liberación mucho más pronunciada que, posteriormente, se estabiliza y se ralentiza.

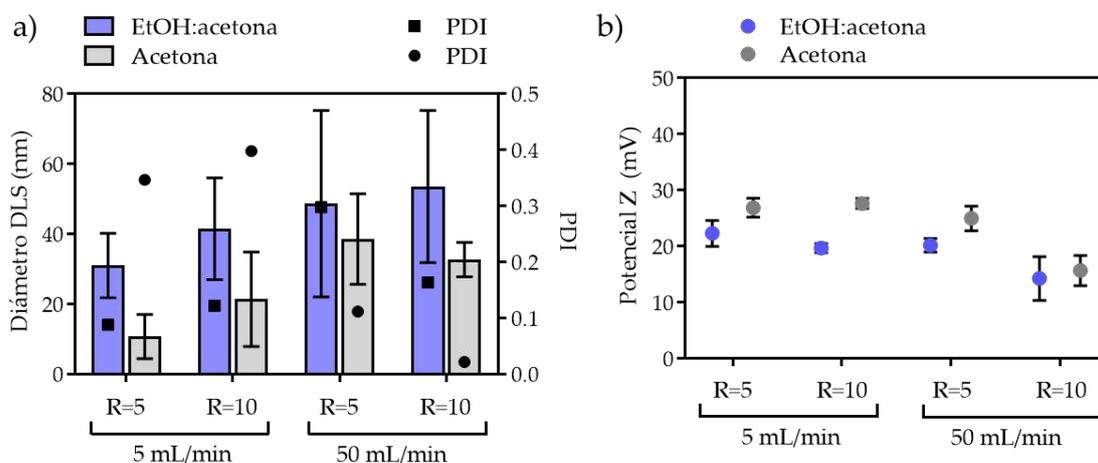
El fármaco encapsulado no se vio modificado estructuralmente puesto que se comprobó que su actividad antibacteriana mantenía el mismo efecto que la del fármaco libre sin encapsular. También es posible un efecto de contacto cuando se ensayaron las partículas a bajas dosis (0.001 mg/mL).

Las partículas con y sin fármaco sintetizadas en este capítulo de tesis resultaron ser no citotóxicas para las líneas celulares Caco2-TC7 y fibroblastos hasta concentraciones de 1 mg/mL.

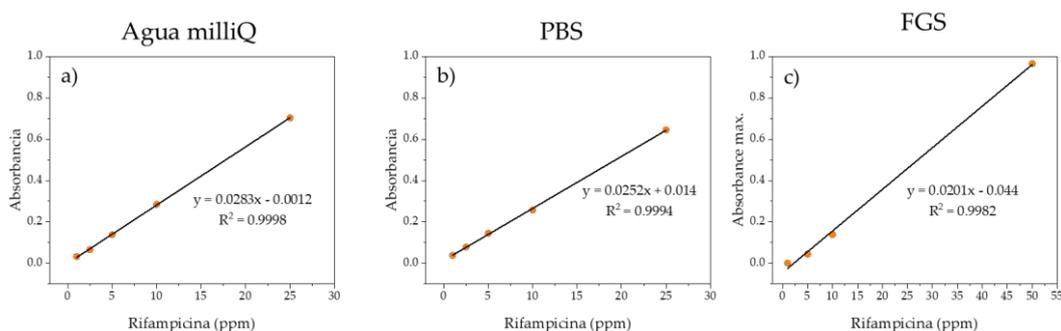
Los resultados resultaron prometedores para el desarrollo de sistemas de liberación de tamaño nanométrico, estables coloidalmente, mucoadhesivos y de liberación controlada en el tiempo para la administración de fármacos susceptibles a algún tipo de degradación en su paso por el sistema gastrointestinal mediante su administración oral.

**Anexo III.**



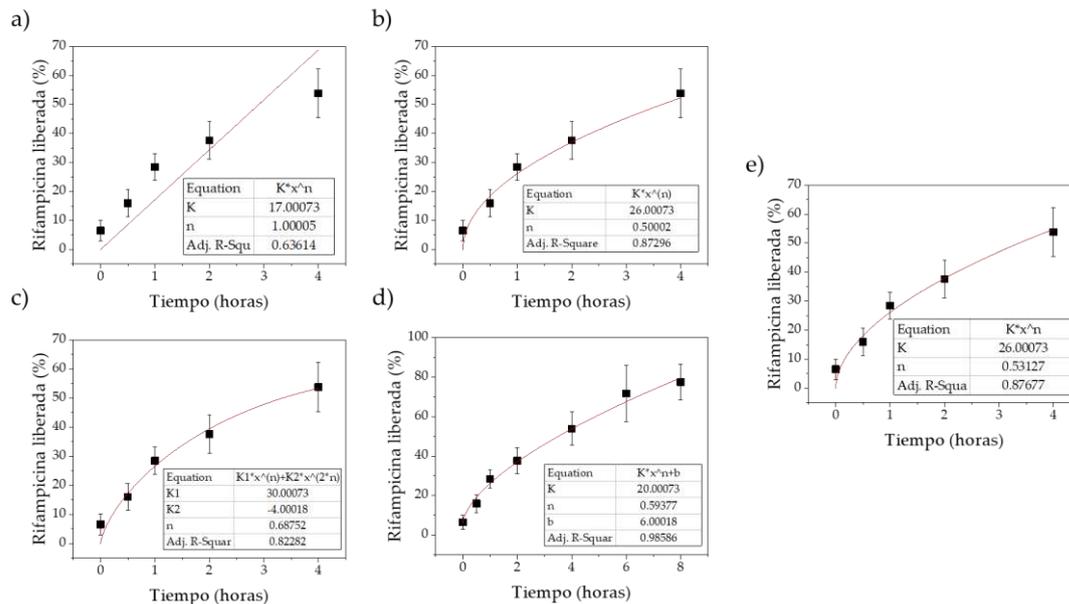


**Figura A3.1** a) Diámetros de DLS de NPs de Eudragit RS100 10% (p/v) EtOH:acetona (azul) y Eudragit RS100 10% (p/v) acetona (gris) a diferentes valores de R y caudales totales. Índices de polidispersidad (PDI) de Eudragit RS100 10% (p/v) EtOH:acetona (■) y Eudragit RS100 10% (p/v) acetona (●), b) potencial Z de NPs de Eudragit RS100 10% (p/v) EtOH:acetona (● azul) y Eudragit RS100 10% (p/v) acetona (● gris).

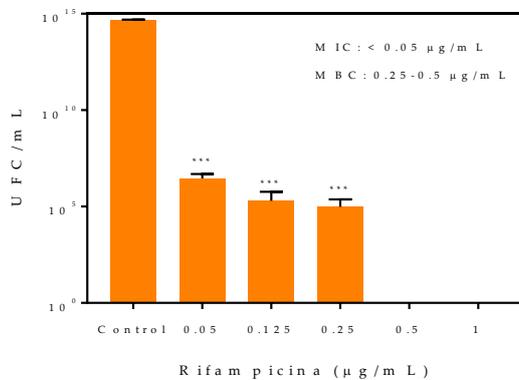


**Figura A3.2** Rectas de calibrado del fármaco encapsulado obtenidas de las medidas de UV-Vis: a) rifampicina en agua milliQ, b) rifampicina en PBS, c) rifampicina en fluido gástrico simulado (FGS).

### Anexo III.



**Figura A3.3** Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación: a) Primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold y e) Korsmeier-Peppas, de las NPs sintetizadas por nanoprecipitación.



**Figura A3.4** Gráfica de los resultados experimentales de la supervivencia de la bacteria *S. aureus* frente al antibiótico libres rifampicina.

# **CAPITULO IV.**

**TÉCNICAS ELECTROHIDRODINÁMICAS  
como técnicas de síntesis de partículas entéricas y fibras para sistemas  
de liberación de antibióticos.**





## 4.1 Introducción.

### 4.1.1 Síntesis de fibras por electrohilado y partículas por electroespray.

Este capítulo se centra en la aplicación de técnicas de síntesis basadas en fuerzas electrostáticas llamadas técnicas electrohidrodinámica. Se trata de técnicas muy versátiles que posibilitan la síntesis de fibras poliméricas de muy diversos diámetros mediante electrohilado, y de partículas poliméricas nano y micrométricas mediante electroespray.

Los campos de aplicación de los materiales obtenidos mediante dichas técnicas son numerosos y muy variados, entre ellos destacan: nanocatálisis [449], producción de andamios para ingeniería de tejidos [450], aplicaciones biomédicas [451], biotecnología [452], defensa [453] seguridad [454] e ingeniería del medio ambiente [455].

Dichas técnicas electrohidrodinámicas se basan en un mecanismo antiguo, que fue descrito por primera vez en 1882 por Rayleigh [456], pero no fue estudiado en detalle hasta 1914 por Zeleny [457] y patentado por Formhals en 1934 [458]. A pesar de los avances, no fue hasta la década de los 90 cuando se empezó a popularizar la técnica entre los diferentes grupos de investigación [459][460]. Este aumento de interés, con su consecuente aumento de publicaciones, fue posible gracias a que se empezó a tener mayor accesibilidad a los microscopios electrónicos para la caracterización de los materiales producidos [461].

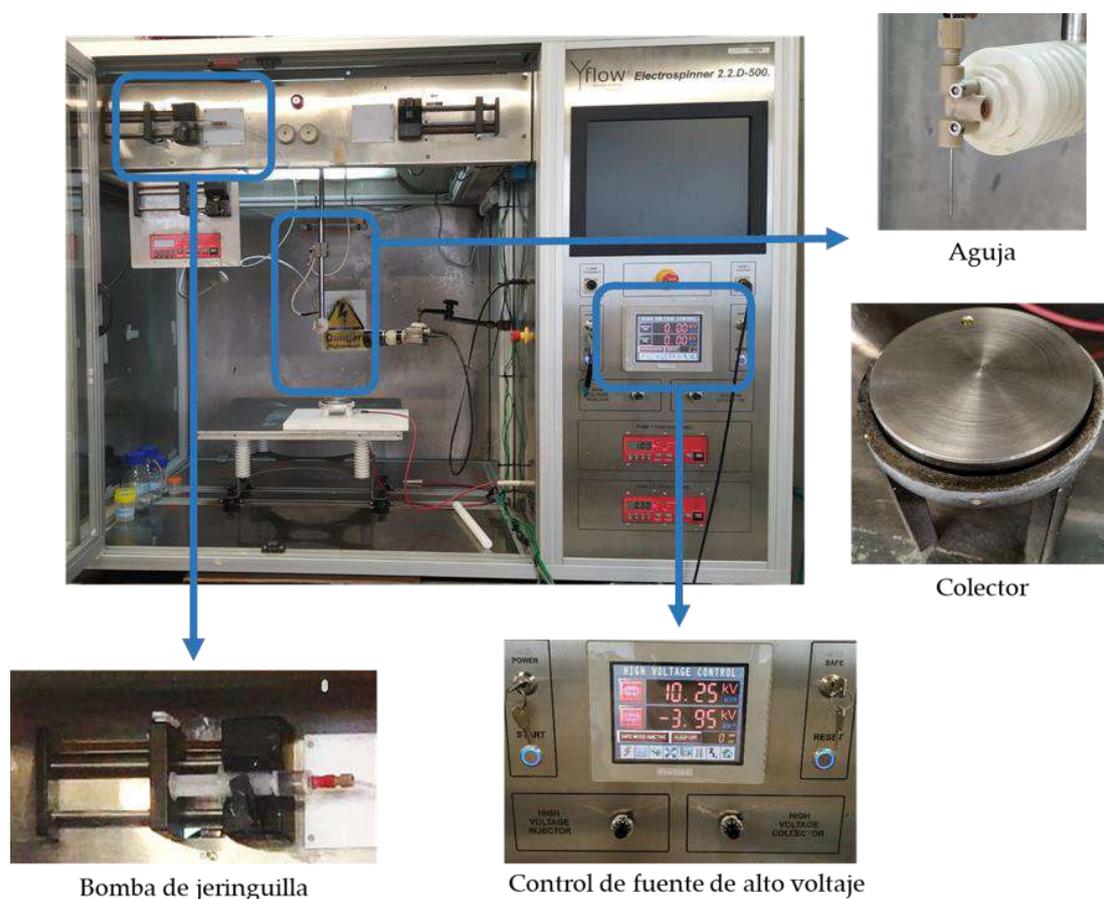
Hoy en día, se trata de una técnica implementada también en la producción industrial para la obtención de nanofibras en continuo. En el mercado podemos encontrar comercializados desde filtros de agua y de aire, mascarillas faciales y hasta injertos biomédicos aprobados para su uso clínico [462].

#### 4.1.1.1 Principios y funcionamiento de las técnicas electrohidrodinámicas.

Las técnicas electrohidrodinámicas se basan en un proceso en el que, mediante fuerzas electrostáticas, se producen fibras o partículas a partir de una disolución polimérica.

La disolución polimérica se inyecta mediante una bomba a una aguja. Cuando esta disolución alcanza la punta de la aguja, se forma una gota debido a la tensión superficial. A esta gota se le aplica un elevado voltaje, de manera que se carga y, por las repulsiones electrostáticas de Coulomb, se estira formando un cono denominado cono de Taylor [463]. En el momento en el que esta repulsión electrostática supera la tensión superficial de la disolución, se obtiene un *jet* en forma de fibras o, en el caso de que el *jet* se descomponga en pequeñas gotas, partículas, que solidifican por la evaporación del disolvente, llegando en forma sólida al colector [464].

Por lo tanto, los principales componentes de un *electrospinner* son: a) una fuente de alto voltaje, b) una bomba de jeringa, c) una aguja y d) un colector de material conductor. En la Figura 4.1 se muestra el *electrospinner* utilizado en esta Tesis Doctoral.



**Figura 4.1** Principales componentes del *electrospinner* Yflow *Electrospinner 2.2.D-500* empleado en esta Tesis Doctoral para la producción de fibras, micro y nanopartículas.

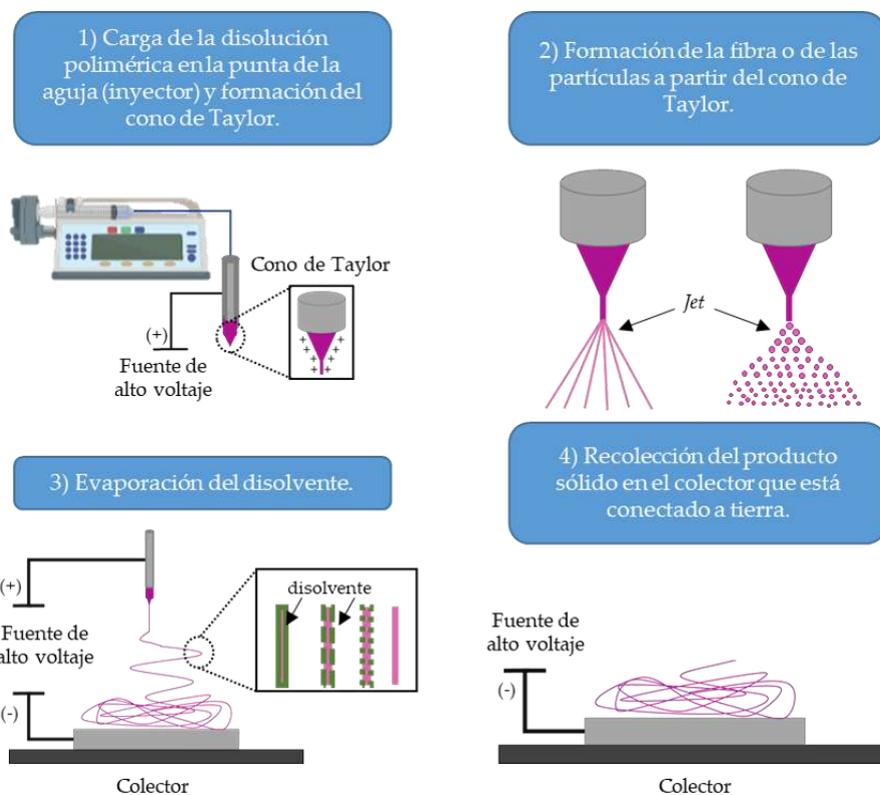
En resumen, se trata de una técnica en la que pueden distinguirse cuatro etapas de especial relevancia para controlar las propiedades de los materiales producidos, esquematizadas en la Figura 4.2:

- 1) Carga de la disolución polimérica en la punta de la aguja (inyector) y formación del cono de Taylor: cuando se aplica una elevada diferencia de potencial entre la aguja (conectada al polo positivo) y el colector (conectado al negativo), se produce una separación de cargas dentro de la disolución polimérica. Las cargas positivas se acumulan en la superficie de la gota, hasta que se crea un exceso de cargas. Es en este punto cuando las repulsiones electrostáticas deforman la gota de manera que, mientras que la tensión superficial favorece la geometría esférica, la repulsión electrostática favorece el aumento de área de superficie, estirando de esta forma la gota hasta adquirir la geometría cónica (cono de Taylor) [465].
- 2) Formación de la fibra o de las partículas a partir del cono de Taylor: cuando las fuerzas electrostáticas superan a la tensión superficial se origina un chorro de disolución polimérica cargado denominado *jet* a partir del cono de Taylor. Este *jet* se elonga o se

rompe en pequeñas gotas en la dirección del campo eléctrico, es decir, hacia el colector [466].

Como se explica más adelante, el *jet* se elonga o se rompe en gotas formando fibras o partículas respectivamente dependiendo de la composición de la disolución polimérica, entre otros factores [467].

- 3) Evaporación del disolvente: cuando el *jet* o las gotas se dirigen hacia el colector formando fibras o partículas, éste se solidifica por la evaporación del disolvente. Dependiendo del disolvente y de su presión de vapor la solidificación será más rápida o más lenta, lo que también influirá directamente en el diámetro y morfología del producto final [461].
- 4) Recolección del producto sólido en el colector: el producto puede ser recogido en un colector estático o dinámico. En el caso de las fibras, pueden encontrarse finalmente de manera alineada o con complejos patrones con orientación aleatoria. Se ha comprobado que, aunque en el proceso de recolección la mayoría de las cargas se disipan, el producto sólido recogido tiene cargas superficiales remanentes que se van disipando con el tiempo, pudiendo generar inestabilidades *in situ* si se acumulan en el colector [468].



**Figura 4.2** Esquema de las etapas principales del procedimiento de producción de materiales mediante las técnicas electrohidrodinámicas.

#### 4.1.1.2 Parámetros de las técnicas electrohidrodinámicas.

En base al funcionamiento del instrumento, hay múltiples factores que influyen en el producto obtenido final. Estos factores se pueden dividir en: a) propiedades de la disolución polimérica, b) parámetros del proceso de síntesis, c) factores medioambientales.

##### a) Propiedades de la disolución polimérica.

###### - Peso molecular y concentración.

Se trata de un parámetro que afecta tanto a las propiedades eléctricas como a las reológicas de la disolución polimérica ya que influye en la viscosidad y en la tensión superficial de la disolución. Cuando el peso molecular es bajo o la concentración de polímero en la disolución polimérica es baja se obtienen partículas, debido a que el *jet* se rompe con la elevada tensión superficial. Por el contrario, conforme aumenta el peso molecular o la concentración de polímero en la disolución, aumenta la viscosidad, obteniéndose fibras [469].

###### - Disolvente.

Un buen disolvente para esta técnica debe cumplir una serie de propiedades como: 1) baja temperatura de ebullición, 2) alta presión de vapor y 3) ser buen medio para mantener al polímero disuelto de manera estable. El disolvente influye también en la tensión superficial, la viscosidad y la conductividad de la disolución polimérica, pero estas propiedades dependen además del tipo de polímero y de su concentración.

Los disolventes más utilizados en la técnica de electrospinning y sus propiedades se resumen en la Tabla 4.1.

**Tabla 4.1** Propiedades de diferentes disolventes utilizados en la técnica de electrospinner. Adaptado de [199] con la licencia de Elsevier.

Disolvente	Tensión superficial (mN/m)	Constante dieléctrica	Temperatura ebullición (°C)	Densidad (g/mL)
Cloroformo	26.5	4.8	61.6	1.498
Dimetilformamida	37.1	38.3	153	0.994
Tetrahidrofurano	26.4	7.5	66	0.886
Acetona	25.2	21	56.1	0.786
Agua	72.8	80	100	1.000
Ácido acético	26.9	6.2	118.1	1.049
Diclorometano	27.2	9.1	40	1.326
Etanol	21.9	24	78.3	0.789
Ácido trifluoroacético	13.5	8.4	72.4	1.525

### - Viscosidad.

La viscosidad de una disolución está directamente relacionada, además de con las propiedades intrínsecas del polímero, del disolvente y de la temperatura, con la concentración polimérica.

Cuando la viscosidad es baja, el *jet* se rompe en gotas antes de llegar al colector y se obtienen morfologías esféricas mientras que, cuando la viscosidad es elevada, el *jet* formado se elonga y se obtienen fibras, siendo de mayor diámetro conforme aumenta el valor de este parámetro [470].

### - Tensión superficial.

Cuando las fuerzas de repulsión superan la tensión superficial, se forma el *jet* y se elonga de manera que se consiguen fibras uniformes. Sin embargo, la tensión superficial intenta reducir el área superficial por unidad de masa, por lo que si la tensión superficial de la disolución es más elevada las fuerzas de repulsión rompen el *jet* en gotas, formándose geometrías esféricas, que son las que minimizan la energía libre [471].

### - Conductividad.

Esta propiedad se encuentra determinada por el tipo de polímero y el disolvente en el que se encuentra disuelto.

Cuando la conductividad de la disolución es demasiado baja, el *jet* se desestabiliza y se obtiene productos más heterogéneos o ni siquiera se llega a formar. Hayati et al. [472] publicaron su investigación en la que analizaban la formación de gotas, a partir de mezclas de n-butanol como componente polar e Isopar M como componente apolar, con diferentes valores de conductividad al aplicarles un campo eléctrico. En este estudio dedujeron que la conductividad es un parámetro necesario para que se forme el cono, pero que, para cada mezcla, existe un valor óptimo de conductividad para obtener el *jet* más homogéneo y estable.

En la Tabla 4.2 se reúne de manera resumida la influencia de las propiedades de la disolución polimérica en el producto de síntesis por la técnica electrohidrodinámica.

**Tabla 4.2** Efectos de las propiedades de la disolución polimérica sobre la probabilidad de obtener fibras o partículas como producto de síntesis mediante las técnicas electrohidrodinámicas.

Propiedades de la disolución polimérica.		
Parámetro	Mayor valor	Menor valor
Peso molecular o concentración	Fibras.	Partículas.
Viscosidad (mPa·s)	Fibras.	Partículas.
Tensión superficial (mN/cm)	Partículas.	Fibras.
Conductividad (μS/cm)	Fibras.	Partículas.

### **b) Parámetros del proceso de síntesis.**

#### - Voltaje aplicado.

La diferencia de voltaje aplicada entre el inyector y el colector influye en el diámetro de las fibras y partículas producidas. Además, el voltaje a aplicar depende de las propiedades viscoelásticas de la disolución polimérica. Por lo tanto, para cada polímero y disolvente el voltaje aplicado será diferente para conseguir un cono de Taylor estable [473].

Sin embargo, se han realizado estudios en los que se ha comprobado que elevados voltajes, que implican mayores campos eléctricos, generan fibras o partículas de menor diámetro, pero también provocan una mayor inestabilidad a la síntesis [474][475].

#### - Flujo de la disolución.

El caudal con el que se alimenta la disolución polimérica a través de la aguja determina la velocidad a la que se va a obtener el producto y, por lo tanto, la productividad. Es un parámetro que influye directamente sobre la evaporación del disolvente ya que, si el flujo es muy elevado, el disolvente puede no evaporarse por completo en la trayectoria hacia el colector, pudiendo esto producir poros o deformaciones morfológicas en las fibras o en las partículas. Sin embargo, si el flujo es reducido, el disolvente puede evaporarse en la punta de la aguja y obstruirla.

El diámetro de las fibras y partículas también se encuentra bajo la influencia de este parámetro, ya que cuando el flujo es mayor, la disponibilidad de polímero también lo es, por lo que las fibras o partículas tendrán mayores diámetros, pero también es mayor probabilidad de formación de poros debido a que la cantidad de disolvente inyectada también es más elevada [476].

#### - Distancia inyector-colector.

Se trata de un parámetro que varía en función de la disolución polimérica. Se precisa una distancia mínima para que el disolvente se evapore antes de que las fibras o las partículas alcancen el colector. Si la distancia fuese demasiado pequeña, se podrían observar poros y deformaciones morfológicas, obteniéndose partículas y fibras planas, además de aglomeraciones. En cambio, si la distancia fuese demasiado grande, se podría desestabilizar la síntesis, aumentando la distribución de tamaños del producto obtenido, o se podrían romper las fibras por su propio peso o ver reducido el rendimiento de recolección de las partículas [477]. Dentro del rango de valores óptimos de cada síntesis, una mayor distancia favorece el estiramiento del *jet* lo que produce fibras y partículas de menor diámetro [478].

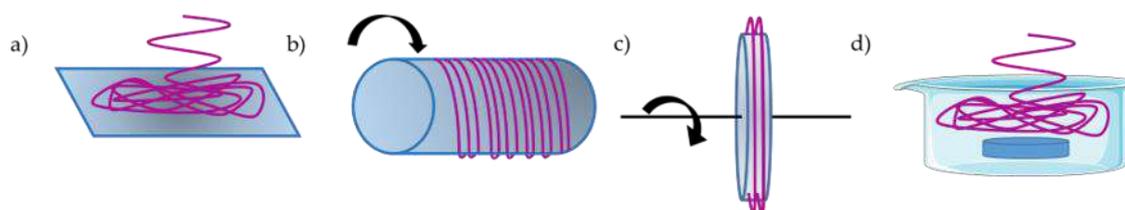
#### - Tipo de colector.

Hay una amplia variedad de colectores y diferentes formas de recoger los materiales sintetizados por las técnicas electrohidrodinámicas. El empleo de un colector u otro, no influye

en gran medida sobre la morfología de las fibras o de las partículas sintetizadas, sino en su aspecto final en conjunto. Brevemente, si se emplea un colector plano normal (Figura 4.3-a), tendremos una superficie en la que se deposita el producto de síntesis con orientación al azar mientras que, si empleamos un colector de tipo tambor rotatorio (Figura 4.3-b), el material sintetizado puede recogerse de manera orientada. Además, incluyendo movimiento a la aguja, es posible controlar el espesor de material depositado, siendo homogéneo a lo largo de toda el área.

Por otro lado, si se emplea el disco rotatorio se confina el área de recogida (Figura 4.3-c) y, además, gracias a la velocidad de giro, en el caso de la producción de fibras, se puede favorecer su alineamiento sobre el borde del disco [479].

Por último, también existe la posibilidad de recoger el material sintetizado en disolución, introduciendo el colector en agua o etanol, entre otros, para así preservar la morfología coloidal, especialmente en estructuras 3D [480] (Figura 4.3-d).



**Figura 4.3** Dibujos esquemáticos de los diferentes tipos de colectores: a) colector plano, b) colector tambor rotatorio, c) colector disco rotatorio y d) colector en disolución.

En la Tabla 4.3 se detalla de forma resumida la influencia de los parámetros del proceso de síntesis sobre el producto obtenido por la técnica electrohidrodinámica.

**Tabla 4.3** Efectos de los parámetros del proceso de síntesis sobre el diámetro y la morfología de productos de síntesis mediante las técnicas electrohidrodinámicas.

Parámetros del proceso de síntesis.		
Parámetro	Incremento ↑.	Disminución ↓.
Voltaje (kV)	Menor diámetro de fibras o partículas. Más heterogeneidad.	Mayor diámetro de fibras o partículas.
Flujo (mL/h)	Mayor diámetro de fibras o partículas. No evaporación del disolvente: poros y posibles deformaciones morfológicas.	Menor diámetro de fibras o partículas. Obstrucción de la aguja por rápida evaporación del disolvente.
Distancia inyector-colector (cm)	Menor diámetro de fibras o partículas Rotura de fibras y bajo rendimiento de partículas.	Mayor diámetro de fibras y partículas No evaporación del disolvente: poros y posibles deformaciones morfológicas.

### c) Factores medioambientales.

#### - Temperatura.

La temperatura tiene influencia directa sobre la conductividad y la viscosidad de la disolución polimérica. De esta manera, cuando la temperatura aumenta, la conductividad también, disminuyendo la viscosidad de la disolución. Aparte de esto, también tiene influencia sobre la evaporación del disolvente ya que, con una mayor temperatura esta evaporación se llevará a cabo en un menor tiempo (mayor presión de vapor), pudiendo acelerar tanto este proceso que se produzca, como ya se ha indicado, la obstrucción de la aguja.

Por todo esto, se puede concluir que, cuando la temperatura se eleva, la síntesis se ve favorecida para obtener partículas y fibras de menor diámetro [481].

#### - Humedad relativa.

La humedad también tiene influencia directa sobre la evaporación del disolvente, siendo ésta más lenta cuando el porcentaje de humedad en el ambiente es elevado. Además, puede alterar la superficie de las partículas y fibras hidrófobas, ya que cuando la humedad es elevada se forman poros en la superficie de los materiales obtenidos [481].

En la Tabla 4.4 se detalla de manera resumida la influencia de los factores medioambientales sobre el producto de síntesis por la técnica electrohidrodinámica.

**Tabla 4.4** Efectos de los factores medioambientales sobre el diámetro y la morfología de productos de síntesis mediante la técnica del electrohidrodinámicas.

Parámetro	Factores medioambientales.	
	Incremento ↑.	Disminución ↓.
Temperatura (°C)	Menor diámetro de fibras o partículas. Obstrucción de la aguja por rápida evaporación del disolvente.	Mayor diámetro de fibras o partículas.
Humedad relativa (%)	Mayor diámetro de fibras o partículas. Lenta evaporación del disolvente: poros.	Menor diámetro de fibras o partículas.

Todas las propiedades de la disolución polimérica, los parámetros del proceso de síntesis y los factores medioambientales no pueden optimizarse individualmente para cada síntesis. Se trata de un complejo proceso en el que todos los parámetros nombrados deben de tenerse en cuenta en conjunto para poder conseguir una síntesis adecuada de fibras o partículas homogéneas y del diámetro requerido.

### 4.1.1.3. Tipos y variaciones de las técnicas electrohidrodinámicas.

Existen diferentes variaciones de esta técnica para poder encapsular fármacos, moléculas o nanopartículas. Estas variaciones se escogen dependiendo de la naturaleza del polímero y del agente a encapsular tanto en fibras como en partículas (Figura 4.3).

#### 4.1.1.3.1 Técnica uniaxial.

Este tipo de síntesis se puede utilizar cuando el agente a encapsular se puede solubilizar en la misma disolución polimérica, es decir, tienen la misma naturaleza química. De esta forma, la disolución de polímero y fármaco se inyectan conjuntamente en la aguja (Figura 4.4-a y b). Se trata de la técnica más sencilla que permite encapsular tan sólo moléculas de naturaleza hidrófoba en partículas y fibras poliméricas orgánicas o, sólo moléculas de naturaleza hidrófila cuando el polímero es soluble en medios acuosos [482].

Actualmente, la técnica uniaxial es la más utilizada ya que se trata de la variación más simple y cómoda, permitiendo la encapsulación de uno o varios fármacos conjuntamente con tan sólo disolverlos junto al polímero de trabajo [483].

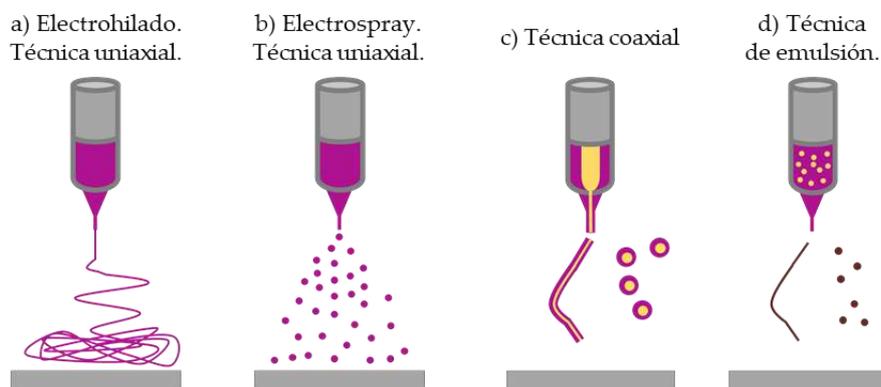
#### 4.1.1.3.2 Técnica coaxial.

Cuando la naturaleza del polímero y del agente a encapsular no coinciden, o se quieren obtener estructuras más complejas, se utiliza una modificación de la técnica uniaxial convencional denominada técnica coaxial. Recibe este nombre porque las disoluciones se inyectan por dos agujas, una de mayor diámetro que otra, concéntricas. Así, se hace fluir la disolución del agente a encapsular por la aguja central y la disolución de polímero por la exterior (Figura 4.4-c) [484]. Otra aplicación de esta variante es la realización de recubrimientos de manera que se obtiene una estructura final de tipo núcleo-corteza [485].

También se han publicado trabajos en los que son necesarias tres corrientes de disoluciones de diferentes disolventes, por lo que esta variedad de la técnica tiene un amplio alcance en la encapsulación de cualquier agente, de la naturaleza que sea [486].

#### 4.1.1.3.3 Técnica de emulsión.

Otra variación de la técnica convencional de encapsulación de fármacos de diferente naturaleza que el polímero es mediante una previa emulsión (Figura 4.4-d). Esta variación se basa en la formación de una emulsión simple estable (w/o) de la fase que contiene el fármaco en la fase orgánica que contiene el polímero. En algunos casos, para formar una emulsión estable, se precisa incorporar algún agente tensioactivo a la mezcla de fases con el único objeto de estabilizar la interfase entre ambas. Seguidamente, dicha emulsión se inyecta por la aguja y se recogen partículas o fibras con el fármaco embebido en la matriz polimérica, evitando de esta forma que quede en la superficie del material [487].



**Figura 4.4** Esquema de las diferentes variantes de las técnicas electrohidrodinámicas: a) electrohilado uniaxial, b) electro spray uniaxial, c) técnica coaxial y d) técnica de emulsión.

### 4.1.2 Antibióticos. Rifampicina y ciprofloxacino.

Como se presenta en el apartado 3.1.3, la encapsulación de fármacos en vectores poliméricos mejora la biodisponibilidad de los mismos en el organismo y los protege de condiciones externas adversas [411] [412].

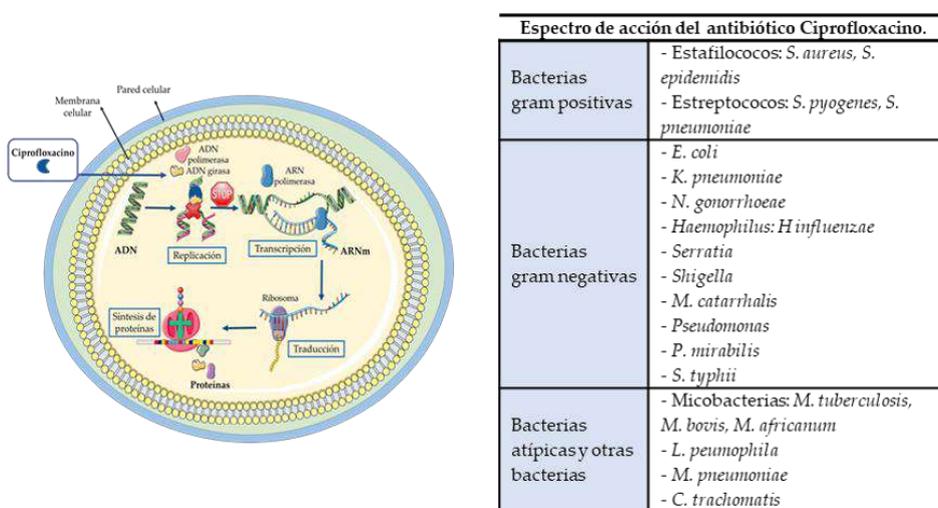
En este capítulo se presenta la encapsulación de dos fármacos modelo. Por un lado, el antibiótico rifampicina (Rif), cuya necesidad de encapsulación y propiedades físico-químicas se encuentran desarrolladas en el apartado 3.1.3. Por otro lado, el antibiótico ciprofloxacino (Cpx), fármaco clasificado de clase IV en el BCS por la Federación Internacional Farmacéutica, es decir, de baja solubilidad y baja permeabilidad [488]. Sin embargo, este fármaco presenta una solubilidad en forma de “U” respecto al pH, siendo mínima a los valores de pH fisiológicos y aumentando a valores de pH altos y bajos. Debido a esto, hay autores que lo clasifican como clase III e, incluso, clase II [489]. La baja solubilidad y permeabilidad hacen que el tiempo de vida media (~5h) del fármaco en el torrente sea demasiado corto para conseguir un tratamiento prolongado en el tiempo [490], siendo necesarias varias dosis diarias del fármaco [491]. Sin embargo, es un antibiótico con efecto bactericida de muy amplio espectro que se distribuye bien dentro del organismo, por lo que el reto es la encapsulación de dicho antibiótico para conseguir una administración prolongada en el tiempo. Las propiedades físico-químicas de ambos fármacos se muestran en la Tabla 4.5.

**Tabla 4.5** Información molecular y algunas propiedades físico-química del antibiótico ciprofloxacino. Datos obtenidos de la base de datos PubChem®.

Ciprofloxacino		
	Peso molecular	331.4 g/mol
	Color	Blanco amarillento
	Solubilidad (25 °C):	
	- Agua pH 7.3	< 1 mg/mL
	- Agua pH 4.3	30 mg/mL
	- Cloroformo	Insoluble
	- EtOH	Insoluble
- Acetona	Insoluble	
- DMSO	3.3 mg/mL	

**Ciprofloxacino.**

Se trata de un agente bactericida perteneciente al grupo de las fluoroquinolonas, que se utiliza en el espectro farmacéutico desde hace 20 años. Su mecanismo de acción se basa en la interacción con la enzima ADN girasa bacteriana como se muestra en la Figura 4.5. Mediante esta interacción, la proteína que interviene en la replicación del material genético desenrollando la doble cadena de ADN y permitiendo así que actúen el resto de enzimas, queda bloqueada. De este modo, la bacteria es incapaz de dividirse, lo que provoca la muerte bacteriana [492].



**Figura 4.5** Esquema del mecanismo de acción del ciprofloxacino sobre la ADN girasa inhibiendo el proceso de replicación y resumen de microorganismos sensibles al antibiótico ciprofloxacino (adaptado de [493]).

Actualmente, se trata de un antibiótico que se administra en casos de infecciones clínicas respiratorias, urinarias, intestinales, intraabdominales, ginecológicas, infecciones de huesos y articulaciones y como tratamiento sistémico en diversas enfermedades [494][56][57] debido a su amplio espectro.

Este fármaco no es fácilmente soluble a valores de pH neutros, sin embargo, esta solubilidad aumenta a valores de pH altos y bajos y, a su vez, presenta una baja permeabilidad a través de las membranas gastrointestinales, con su consecuente secreción intestinal [497]. Por esto, el pico de máxima absorción y de máxima concentración sérica se produce en menos de una hora y su tiempo de vida media en el organismo no supera las 5h. Esto hace que varias dosis orales diarias sean necesarias y, en caso de infecciones más graves, incluso es necesaria su administración intravenosa.[498].

En la actualidad, existen diferentes vectores desarrollados para llevar a cabo la liberación controlada de ciprofloxacino de forma activa [61][62][501], pero la necesidad de prolongar la liberación del fármaco para así conseguir una acción total ante infecciones

crónicas sigue presente. Por esta razón, en este capítulo de Tesis se propone la encapsulación de este antibiótico con la finalidad de mejorar su solubilidad en medios fisiológicos, prolongando su biodisponibilidad y consiguiendo una liberación controlada y prolongada en el tiempo gracias a la característica liberación del polímero, su biocompatibilidad y su mucoadhesividad, que permite la rápida absorción del fármaco que se va liberando del vector.

## 4.2 Encapsulación de antibióticos en partículas sintetizadas por electroespray.

### 4.2.1 Materiales y métodos.

#### 4.2.1.1 Materiales.

En este capítulo de tesis se ha utilizado el polímero Eudragit® RS100 (Evonik, Essen, Alemania) y los reactivos cloroformo, acetona 99%, ácido trifluoroacético (TFA), ácido clorhídrico (HCl), buffer salino de fosfatos (PBS), Tween80, rifampicina y ciprofloxacino. Todos estos reactivos se compraron en Sigma-Aldrich (Darmstadt, Alemania) y fueron utilizados tal y como se recibieron. El etanol absoluto (EtOH) se compró a PanReac AppliChem (Castellar del Vallés, Barcelona).

También se utilizaron los medios de cultivo de bacterias de Triptona Soja (TSB) y el agar de Triptona Soja (TSA), de Laboratorios Conda-Pronadisa S.A (Torrejón de Ardoz, España) y bacterias gram positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), que fueron compradas a Ielab (Alicante, España).

Por último, se utilizó la línea celular Caco2-TC7, cedida por la Dra. M.J. Rodríguez Yoldi y fibroblastos dérmicos humanos, comprados a Lonza (Bornem, Bélgica), junto con el medio de cultivo DMEM (Biowest, Nuaille, Francia), la mezcla de antibióticos y antimicóticos (PSA, Biowest, Nuaille, Francia), suero fetal bovino (Thermo Fischer Scientific, MA, USA) y el kit Blue Cell Viability (Abnova GmbH).

#### 4.2.1.2 Optimización de la síntesis de sub-micropartículas y micropartículas.

Como se ha explicado en el apartado anterior, en la síntesis de partículas mediante electroespray, pueden influir numerosos factores. Para la optimización de la síntesis de partículas se estudió la influencia de diversos disolventes, o mezclas de ellos, y diferentes cantidades de polímero Eudragit® RS100, modificando, de esta manera, las propiedades fisicoquímicas de la disolución polimérica a ensayar. En la Tabla 4.6 se resumen las variables estudiadas.

**Tabla 4.6** Tabla resumen de las variables estudiadas en la optimización de la síntesis de partículas por electroespray para la encapsulación de fármacos utilizando el polímero Eudragit® RS100.

Muestra	Concentración polimérica (% (p/v))	Disolvente	Flujo (mL/h)	Distancia (cm)
ES1	3	DCM	0.5	10
ES2	8			
ES3	10			
ES4	13			
ES5	3	DCM: DMF (1:1)	0.5	10
ES6	8			
ES7	10			
ES8	13			
ES9	3	Cloroformo:DCM (1:1)	0.5	10
ES10	5			
ES11	10			
ES12	13			
ES13	3	Cloroformo:DMF (1:1)	0.5	10
ES14	5			
ES15	10			
ES16	13			
ES17	3	EtOH: acetona	0.5	10
ES18			1	
ES19	5	EtOH: acetona	0.5	10
ES20	8	EtOH: acetona	0.2	10
ES21			0.5	
ES22			1	
ES23	10	EtOH: acetona	0.5	10
ES24			1	
ES25	3	Cloroformo	0.5	10
ES26	8			
ES27	10			
ES28	13	Cloroformo	0.5	10
ES29			1	
ES30	15	Cloroformo	0.5	10
ES31			1	
ES32	20	Cloroformo	0.5	10
ES33	30	Cloroformo	0.5	15
ES34			1	

### 4.2.1.3 Síntesis de sub-micro y micropartículas y encapsulación de antibióticos modelo.

Se sintetizaron partículas de Eudragit® RS100 de diferentes dimensiones, unas en la escala nanométrica y otras en la micrométrica.

#### **Síntesis de sub-micropartículas por electroespray.**

Las sub-micropartículas de Eudragit® RS100 se sintetizaron utilizando un *electrospinner* Yflow 2.2 D-500 (apartado 4.1.1.1). Tras el proceso de optimización se obtuvieron los mejores parámetros para obtener estas partículas.

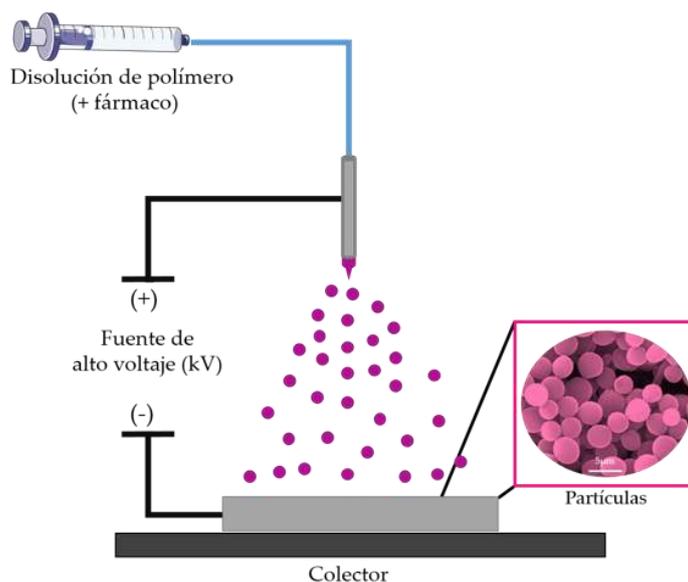
Se encapsuló rifampicina añadiendo diferentes cantidades de este fármaco a la disolución polimérica y disolviéndola en agitación continua durante 30 min. Las cantidades de rifampicina que se ensayaron fueron 10, 15 y 20% (p/p) respecto al polímero y las sub-micropartículas se sintetizaron siguiendo el mismo protocolo que para las partículas no cargadas, ajustando los voltajes hasta estabilizar el cono de Taylor (diferencia de voltaje 15-18 kV). Por otro lado, se encapsuló ciprofloxacino disolviéndolo en HCl (0.1N), con una solubilidad máxima de 30 mg/mL, y en TFA, aumentando la solubilidad hasta 4 veces. El fármaco disuelto se añadió a la solución polimérica y se agitó en continuo 24h a temperatura ambiente. Se observó que se producía la síntesis de sub-micropartículas por nanoprecipitación antes de introducirlo al electrospinner, por lo que se descartó la mezcla de disolventes como condiciones adecuadas para la encapsulación de este antibiótico.

#### **Síntesis de micropartículas por electroespray.**

Las micropartículas de Eudragit® RS100 se sintetizaron de la misma manera que las sub-micropartículas, eligiendo los mejores parámetros para la síntesis.

Se encapsuló rifampicina en diferentes proporciones: 10, 15 y 20% (p/p) respecto al polímero y las micropartículas se sintetizaron siguiendo el mismo protocolo que para las partículas no cargadas, ajustando los voltajes hasta estabilizar el cono de Taylor (diferencia de voltaje 10-12 kV). Se encapsuló ciprofloxacino, mediante la técnica de emulsión, disolviéndolo en HCL (0.1N) y en TFA. El fármaco disuelto (en 200 µL en ambos casos) se añadió a la disolución polimérica junto con Tween80 0.5% (p/v), como estabilizante de la emulsión, y se agitó en continuo 24h a temperatura ambiente. Se observó que la emulsión resultante era homogénea y estable por lo que se sintetizaron micropartículas siguiendo el mismo protocolo anterior, ajustando los voltajes (20-25 kV en el caso de ciprofloxacino disuelto en HCl, y 15-20 kV en el caso de TFA) y ajustando la distancia a 7 cm hasta estabilizar el cono de Taylor.

En la Figura 4.6 se esquematiza el proceso de síntesis de nano y micropartículas por electroespray.



**Figura 4.6** Esquema de la síntesis de nano y micropartículas del polímero Eudragit® RS100 por electroespray.

#### 4.2.1.4 Caracterización de las partículas.

Previamente a la síntesis, se determinó la viscosidad de la disolución polimérica mediante un viscosímetro Visco Basic Plus (Fungilab S.A., New York, USA) con un adaptador para líquidos de baja viscosidad (LCP) a 50 rpm. Se realizaron cuatro medidas para dar como resultado una media y su desviación estándar.

La caracterización de la morfología de las diferentes partículas producidas se realizó por microscopía electrónica de barrido (SEM) y se analizaron las distribuciones de tamaño (apartado 2.2.1.4).

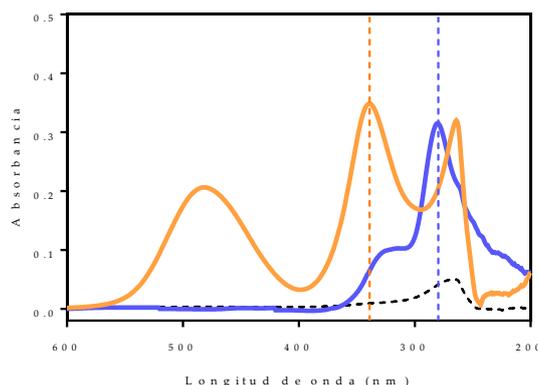
El rendimiento de la síntesis se calculó mediante la diferencia de pesada del papel de aluminio que recubría el colector, siendo este aumento de masa las partículas totales recuperadas en la síntesis, como describe la Ecuación 4.1.

$$\text{Rendimiento (\%)} = \frac{\text{mg (papel+partículas)} - \text{mg papel}}{\text{flujo (mL/h)} \times \text{tiempo} \times \text{concentración \% (p/v)}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.1}$$

Por otro lado, se estudió el tamaño hidrodinámico de las partículas y el índice de polidispersidad (PDI) mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS, Brookhaven Instruments, Holtsville, Nueva York), considerando un índice de refracción de 1.385 y el valor de la carga superficial mediante la medida del potencial zeta.

Para determinar la eficiencia de encapsulación y la cantidad de fármaco cargado en el interior de las partículas, se disolvió una cantidad conocida de partículas en DMSO. Cuando se disolvió totalmente el sólido, se midió mediante espectrofotometría UV-Vis (apartado

2.3.1.5). Las diferentes longitudes de onda características de estas biomoléculas fueron, 340 nm para rifampicina y 280 nm para ciprofloxacino, máximos que se muestran en la Figura 4.7. Para llevar a cabo la cuantificación, previamente se elaboraron las rectas de calibrado de los fármacos en DMSO. La cuantificación se realizó aplicando la Ecuación 4.2 y la Ecuación 4.3. Se realizaron tres cuantificaciones de tres síntesis independientes.



**Figura 4.7** Espectros ultravioleta-visibles de los fármacos rifampicina (naranja, 10 ppm), ciprofloxacino (azul, 1 ppm) y Eudragit® RS100 (negro, 1mg/mL) en DMSO.

$$EE (\%) = \frac{\text{mg fármaco encapsulado}}{\text{mg fármaco inicial}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4.2}$$

$$DL (\text{mg/mg}) = \frac{\text{mg fármaco encapsulado}}{\text{mg partículas}} \quad \text{Ecuación 4.3}$$

Las interacciones intermoleculares entre las partículas y el antibiótico encapsulado se estudiaron mediante espectroscopía infrarroja, FTIR (apartado 2.2.1.6) teniendo en cuenta los picos de absorbancia característicos de cada material en el espectro electromagnético.

Por último, se obtuvieron los difractogramas de rayos X (XRD) de las muestras (apartado 3.2.1.5). Los difractogramas se realizaron a partir de un barrido  $2\theta$  de 2 a  $50^\circ$  en modo continuo de escaneo, con una velocidad de escaneo de  $0.017^\circ/\text{seg}$  y un tamaño de paso de  $0.013^\circ$ .

#### 4.2.1.5 Cuantificación de la liberación *in vitro* del fármaco encapsulado.

El estudio del perfil de liberación acumulativa del fármaco encapsulado en las partículas producidas en esta Tesis doctoral se llevó a cabo de manera similar al expuesto en el apartado 3.2.6.

Brevemente, se pusieron en contacto 5 mg de partículas con 5 mL de fluido gástrico simulado ( $\text{pH} = 1\sim 2$ ) durante 2 horas. Después de este tiempo, se centrifugaron durante 10 min a 13.300 rpm (Spectrafuge 24D, Labnet International, Madrid, España), y se sustituyó el

sobrenadante por PBS. El sobrenadante retirado se guardó para su posterior análisis y se tomó como  $t=0$ . Posteriormente, para cada tiempo determinado (desde 30 min hasta 75 días) se tomó una muestra de 1 mL, que se centrifugó durante 10 min a 13.300 rpm. Se guardó una alícuota de 800  $\mu$ L de sobrenadante para su posterior análisis y el pellet se dispersó de nuevo en 800  $\mu$ L de medio fresco, que fue devuelto al sistema de liberación manteniendo así un volumen de liberación constante. La cantidad de fármaco en cada muestra se cuantificó mediante espectroscopía ultravioleta UV-Vis. Las diferentes longitudes de onda características de estas biomoléculas fueron, 334 nm para rifampicina y 270 nm para ciprofloxacino en PBS, máximos que se muestran en la Figura A4.1. Para llevar a cabo la cuantificación, previamente se elaboraron las rectas de calibrado de los fármacos en fluido gástrico y PBS.

Los resultados de un total de cuatro experimentos de liberación *in vitro* de partículas independientes se analizaron y trataron estadísticamente para obtener la media y desviación estándar. Igualmente, se evaluó la estabilidad y morfología de las partículas a lo largo del tiempo durante el proceso de liberación mediante SEM (apartado 2.2.1.4).

### 4.2.1.6 Estudio *in vitro* de la acción bactericida del fármaco encapsulado.

Para evaluar la acción bactericida de las partículas sintetizadas con y sin antibiótico encapsulado se utilizó como modelo la bacteria gram positiva *Staphylococcus aureus* [427]. La cuantificación se llevó a cabo mediante el método de las diluciones seriadas explicado en el apartado 2.3.1.6.

Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) y la concentración mínima bactericida (MBC), tanto del antibiótico rifampicina como del antibiótico ciprofloxacino, siguiendo la metodología indicada en el apartado 3.2.7. Brevemente, se pusieron en contacto las bacterias en fase exponencial de crecimiento ( $10^5$  CFU/mL), con el antibiótico a estudiar, rifampicina o ciprofloxacino, a diferentes concentraciones, hasta encontrar la concentración mínima a la que el crecimiento se viese reducido en dos logaritmos (MIC) y la mínima concentración a la que no se observase crecimiento bacteriano (MBC).

Posteriormente, se evaluó la supervivencia bacteriana frente a las partículas y frente a la cantidad teórica liberada en 24h de fármaco libre, siguiendo la misma metodología. Se mantuvieron las partículas en condiciones ácidas gástricas a 37 °C. Tras 2h, se centrifugaron 15 min a 13.300 rpm y se sustituyó el medio ácido por medio de cultivo junto con las bacterias en fase exponencial de crecimiento (en un rango de concentraciones de 1 a 0.005 mg/mL). Se cuantificaron las colonias viables mediante el método de las diluciones seriadas. Por otro lado, se pusieron en contacto las bacterias con la cantidad de antibiótico correspondiente, siguiendo el mismo procedimiento.

Finalmente, se estudió la influencia del contacto entre las partículas y las bacterias analizando la acción antimicrobiana del antibiótico liberado de las partículas en TSB a

diferentes concentraciones (de 1 a 0.005 mg/mL) y a distintos tiempos (24h, 48h y 7 días), eliminando las partículas del medio. Para ello, se siguió la misma metodología que la explicada en el apartado 3.2.7.

Previamente a la realización de los ensayos, las partículas fueron esterilizadas bajo luz UV durante dos ciclos de 30 min, moviéndolas entre ciclo y ciclo, para asegurar una correcta esterilización. Los ensayos *in vitro* de la acción bactericida del fármaco y de las partículas sintetizadas se realizaron por triplicado, con una media de tres réplicas por ensayo.

### 4.2.1.7 Ensayo de viabilidad celular *in vitro*.

Se evaluó la citocompatibilidad de las partículas sintetizadas por electroespray con líneas celulares Caco2 TC7 y fibroblastos, tal y como se presenta en el apartado 3.2.8.

Se estudiaron concentraciones de partículas en un rango de 0.005 a 1 mg/mL. La siembra de bacterias se llevó a cabo en placas de 96 pocillos a densidades de  $1.5 \times 10^4$  células/pocillo las Caco2-TC7 y a  $6 \times 10^3$  células/pocillo los fibroblastos. La cuantificación de la viabilidad celular se evaluó con el kit Blue Cell Viability, tal y como se explica en el apartado 2.2.1.7.

Previamente a la realización de los ensayos, las partículas fueron esterilizadas bajo luz UV durante dos ciclos de 30 min, moviéndolas entre ciclo y ciclo, para asegurar una correcta esterilización. Los datos fueron obtenidos de un total de tres experimentos independientes con un promedio de cuatro réplicas por experimento.

Además, se realizó el estudio de muerte celular y ciclo celular tras el tratamiento con las partículas ensayadas mediante citometría de flujo (FACS Aria BD cytometer, BD Biosciencie) realizado en el Servicio Científico Técnico de Separación Celular y Citometría del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud (IACS).

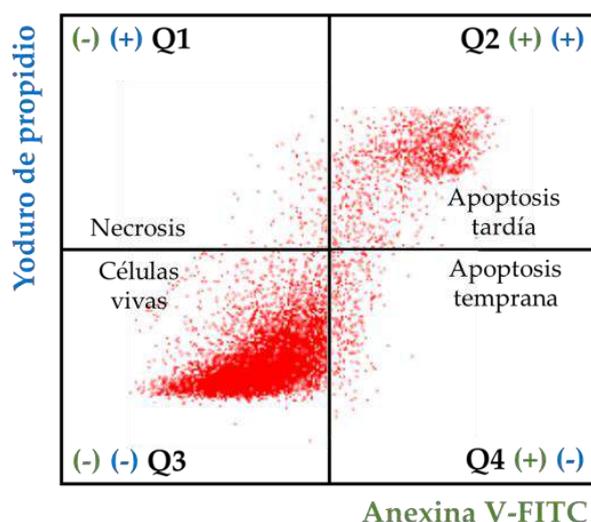
### Estudio de la muerte celular.

Mediante este estudio se diferencia entre células vivas, células muertas y células apoptóticas. La apoptosis es un proceso de muerte celular programada, que se desregulariza cuando las células se encuentran expuestas a condiciones desfavorables o a un tratamiento que resulta dañino para ellas. Cuando comienza a desencadenarse este proceso de muerte programada, la célula sufre unos cambios morfológicos tanto en la membrana, en el citoplasma, como en el núcleo. A partir de estos cambios, moléculas de fosfatidilserina (PS), entre otras, se exponen en la membrana externa celular como señalización para ser fagocitadas por los macrófagos.

Para llevar a cabo este ensayo, se pusieron en contacto las células en confluencia con las partículas con y sin fármaco a la concentración subcitotóxica obtenida en el ensayo de metabolismo celular realizado previamente. Tras 24h, las células se lavaron cuidadosamente tres veces y, finalmente, se recogieron en PBS. Las células tratadas se tiñeron con anexina V-

FITC, yoduro de propidio y tampón de unión de anexina V durante 15 min. También se realizó la evaluación de la muerte celular en células sin tratamiento mediante la misma tinción. El anticoagulante vascular humano, anexina V, tiene una fuerte afinidad por las moléculas de fosfatidilserina expuesto en la membrana de la célula apoptótica. Por otro lado, el yoduro de propidio tiene una elevada afinidad por las moléculas de DNA, pero no es capaz de atravesar la membrana celular, por ello, sólo se une al DNA celular cuando la membrana ha perdido totalmente su morfología, es decir, cuando la célula muere [502].

De esta forma se puede diferenciar entre células vivas (señal negativa), células en estado temprano de apoptosis (señal Anexina V-FITC positiva), células en estado tardío de apoptosis (señales Anexina V-FITC y yoduro de propidio positivas) y células necróticas (señal de yoduro de propidio positiva). En la Figura 4.8 se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos tras el procesamiento de las señales obtenidas mediante la citometría de flujo para el ensayo de muerte celular.



**Figura 4.8** Ejemplo del gráfico de los resultados procesados de citometría de flujo para el estudio de muerte celular en el que se muestran las señales de Anexina V-FITC (verde) y de yoduro de propidio (azul).

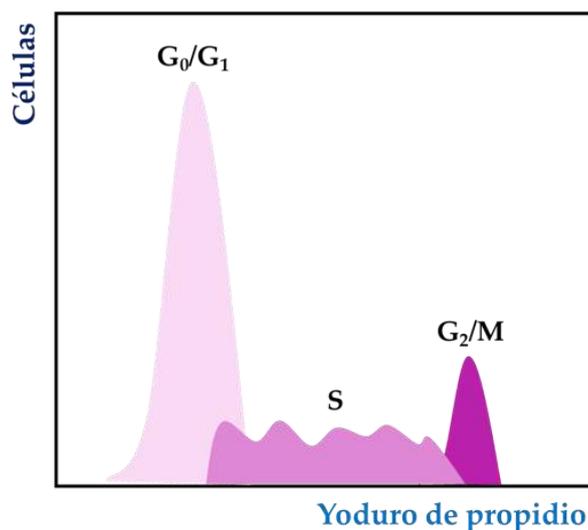
### Estudio de ciclo celular.

Mediante este estudio se estudia la etapa proliferativa en la que se encuentran las células: las interfases  $G_0$  y  $G_1$  en las que las células crecen físicamente, la fase de síntesis de material genético S en la que las células copian el ADN, la interfase  $G_2$  en la que las células organizan el contenido para la separación, y termina el ciclo con una fase de división mitótica M en la que las células dividen el ADN duplicado y el citoplasma en dos nuevas células.

Para llevar a cabo este ensayo, se pusieron en contacto las células en confluencia con las partículas con y sin fármaco a la concentración subcitotóxica obtenida en el ensayo de

metabolismo celular realizado previamente. Tras 24h, las células se lavaron cuidadosamente tres veces y, finalmente, se recogieron en PBS. Las células tratadas se fijaron con etanol 70% (v/v) frío. Tras 24h de incubación a 4°C se trataron con el Kit RNAsa/yoduro de propidio (Inmunostep, Salamanca, España) durante 15 min a temperatura ambiente [503]. La proteína RNAsa digiere el contenido de ARN de las células para evitar la interferencia de este material genético. Por otra parte, el yoduro de propidio tiene una elevada afinidad por las moléculas de ADN de doble cadena, por lo que permite cuantificar la cantidad de ADN contenido en cada célula y, así, relacionarlo con la etapa de ciclo celular en la que se encuentra dicha célula.

De esta forma se puede diferenciar entre las fases  $G_0/G_1$ , en las que la intensidad de señal será menor, la fase S que tendrá una intensidad de señal intermedia, y las fases  $G_2$  y M, en las que la intensidad de señal mayor. Se esquematiza en la Figura 4.9 un ejemplo de los resultados que se obtienen mediante este estudio celular.



**Figura 4.9** Ejemplo del gráfico de los resultados procesados de citometría de flujo para el estudio del ciclo celular en el que se muestran las señales de yoduro de propidio en función de la cantidad de ADN cuantificado. Siendo  $G_0$ : fase quiescente,  $G_1$ : primera fase de crecimiento, S: fase de síntesis,  $G_2$ : segunda fase de crecimiento y M: fase de mitosis.

### 4.2.1.8 Análisis estadísticos.

Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante el análisis de la varianza unidireccional y bidireccional (ANOVA) tal y como se indica en el apartado 2.3.1.8.

## 4.2.2 Resultados y discusión.

### Optimización de la síntesis.

La optimización de una síntesis mediante la técnica de electrospray es un proceso complejo debido al elevado número de variables que pueden influir en la misma. Por esta razón, se fijaron algunas de estas variables y se fueron modificando otras, tal y como se muestra en la Tabla 4.6. Basándose en la experiencia previa del grupo de investigación, se fijó la distancia entre la aguja y el colector a 10 cm y el flujo de inyección de la disolución polimérica a 0.5 mL/h, aumentándolo a 1 mL/h únicamente cuando se obtenían resultados positivos para ver, así, si se podía aumentar el rendimiento de producción sin desestabilizar del cono de Taylor.

Los resultados obtenidos en este proceso de optimización se muestran en la Figura A4.2. En las síntesis con disolventes como DCM (ES3-ES4), DCM:DMF (1:1) (ES5-ES8), cloroformo:DCM (ES9-ES12), cloroformo:DCM (ES13-ES16) y cloroformo (ES25-ES34), cuando la concentración de la disolución polimérica es de 3% (p/v) (Figura A4.2-ES1, ES5, ES9, ES13 y ES25) y algunas de concentración 8% (p/v) (ES2, ES10, ES26), se obtienen partículas que tienen una morfología en forma de discos. Mejia et al. [504] atribuyeron esta morfología aplanada, descrita como forma de glóbulos rojos, a la evaporación del disolvente. Brevemente, la composición de la gota se encuentra inicialmente distribuida de forma isotrópica, pero es cuando el disolvente se evapora y la cantidad de polímero es inferior a la de disolvente en la gota, éste último se deposita en una de las caras de la esfera formando estas morfologías cilíndricas planas. Cuando se utiliza la mezcla de disolventes etanol:acetona, no se observan las morfologías aplanadas, posiblemente debido a que las gotas formadas sean de menor diámetro, como se observa en la Figura A4.2-ES17. En las síntesis de concentraciones de 10-13% (p/v) se observa que, conforme se aumenta la cantidad de polímero en la disolución, va aumentando la esfericidad (Figura A4.2-ES3-4, ES7-8, ES11, ES15-14 y ES27-31). En el caso de los disolventes cloroformo:DCM observamos que a partir de una concentración de 13% (p/v) (ES12) se obtienen fibras y partículas, igual que ocurre a partir de la concentración de 10% (p/v) en el caso de etanol:acetona (ES23-24) o de la concentración de 20% (p/v) en el caso de cloroformo, obteniendo sólo fibras cuando se aumenta la concentración a 30% (p/v) en cloroformo[505].

En el proceso de optimización también se observaron diferencias entre disolventes. Estas diferencias se encuentran influenciadas por la viscosidad y densidad de la disolución, pero también por la conductividad del disolvente, la tensión superficial de la mezcla y la presión de vapor del disolvente. Por ejemplo, para la misma concentración polimérica, cuando el disolvente es DCM (ES4) se obtienen partículas de mayor diámetro que cuando el disolvente es una mezcla DCM:DMF (1:1) (ES8). Una posible explicación es la diferencia de la tensión superficial ya que la de DCM tiene un valor de 27.2 mN/m y la de DMF es 37.1 mN/m (Tabla

4.1), por lo que al aumentar la proporción de DMF tenderá a aumentar y, con ello, el *jet* puede romperse en gotas más pequeñas. Observación que coincide con lo publicado en el estudio de Marín et al. [506], en el que observaron que, para una misma conductividad y flujo, al reducir la concentración de agentes tensioactivos de la disolución y, por lo tanto, al aumentar la tensión superficial, se obtuvieron diámetros mayores del *jet*.

Sin embargo, en un estudio más exhaustivo llevado a cabo por Zhang et al. [507] compararon los efectos de las diferentes concentraciones y distintos disolventes sobre el diámetros del *jet* formado. Entre sus resultado obtenidos se puede observar que aquella condición con mayor tensión superficial fue la generado por el disolvente anisol, también fue la que rindió mayor diámetro del *jet*, sin embargo también se trata de la condición que mayor viscosidad presentaba, lo que coincide con lo descrito en el apartado 4.1.1.2, no se puede atribuir un cambio de comportamiento a tan sólo un parámetro de la síntesis ya que se deben tener en cuenta también el resto de propiedades de la disolución polimérica que, en conjunto, van a influenciar en el tamaño y en la morfología del *jet* obtenido en el proceso de *electrospinner*.

En la Figura A4.2 se encuentra enmarcada en azul la imagen de las partículas obtenidas con las condiciones óptimas con las que se trabajó en esta Tesis doctoral, correspondiendo a síntesis de sub-micropartículas y micropartículas. Las correspondientes a la síntesis de sub-micropartículas fueron: Eudragit® RS100 3% (p/v) disuelto en etanol:acetona (1:1), con un caudal 0.5 mL/h y una distancia fija de 10 cm (ES17), mientras que las de la síntesis de micropartículas fueron: Eudragit® RS100 13% (p/v) disuelto en cloroformo, con un caudal 0.5 mL/h y una distancia fija de 10 cm (ES28). El diámetro de partícula obtenido en ambas síntesis difiere en un orden de magnitud aproximadamente. A parte del diferente comportamiento debido a que los disolventes utilizados son distintos, se puede concluir con que un parámetro altamente influyente en esta diferencia de diámetros es la concentración polimérica y, por lo tanto, la viscosidad. Es decir, siendo la viscosidad de la menos concentrada  $3.9 \pm 0.04$  mPa/s y la de la disolución más concentrada  $56.8 \pm 7.8$  mPa/s, el diámetro de partícula obtenido es mayor conforme aumenta esta propiedad. Las partículas obtenidas fueron estables, homogéneas y con una superficie libre de poros.

### **Caracterización de las partículas sintetizadas por electroespray y de la encapsulación de antibióticos modelo.**

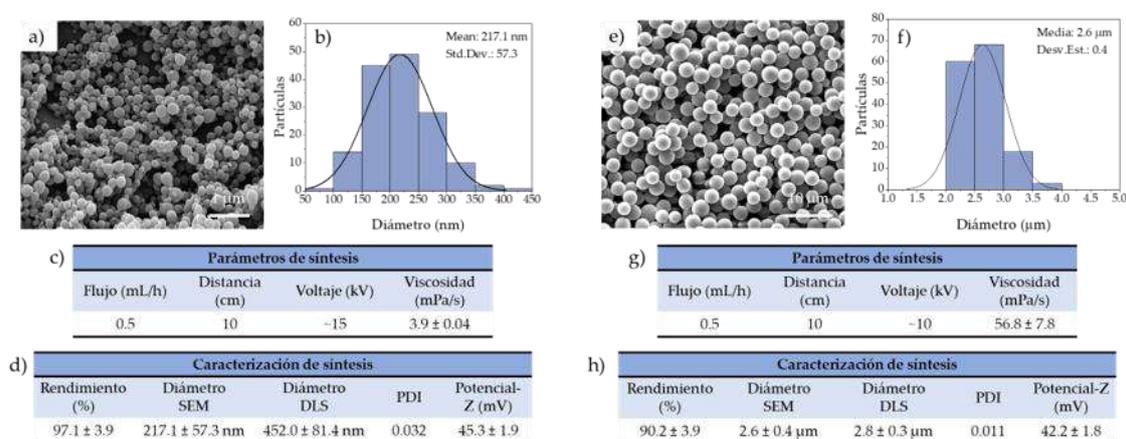
Resulta de elevado interés la comparación de ambos tipos de partículas como vectores de transporte, tema en el cual se profundiza en el Capítulo V, para la administración oral de antibióticos modelo debido a la diferencia de diámetros. Florence et al. [508] investigaron los factores que afectan a la biodistribución de los vectores en su administración oral. Entre los factores se encuentran la superficie, el tamaño, la presencia de ligandos específicos, la forma y elasticidad o la carga superficial, entre otros. Tras el proceso de optimización, en este capítulo de Tesis se han sintetizado sub-micropartículas ( $217.1 \pm 57.3$  nm) y micropartículas ( $2.6 \pm 0.4$   $\mu$ m) compuestas del mismo polímero (Figura 4.10), por lo que el diámetro será el factor de

mayor interés en la comparación. Hay estudios que demuestran que las nanopartículas se acumulan en los tejidos mucho más fácilmente que las micropartículas [52]. Pero, además de obtener una buena distribución de tamaños, resulta imprescindible tener en cuenta la capacidad de carga del vector y el perfil de liberación del mismo.

Se sintetizaron sub-micropartículas a partir de una disolución al 3% (p/v) Eudragit® RS100 disuelto en etanol:acetona (1:1), que se cargó en una jeringa de plástico de 10 mL de volumen y se inyectó a través de una aguja (22 gauge), a un caudal de 0.5 mL/h, conectada a una fuente de alimentación con un voltaje positivo de 12.5 kV. El plato colector, de 80 mm de diámetro, se fijó a 10 cm de distancia a la aguja y se le aplicó un voltaje negativo de -4.7 kV, hasta que se estabilizó el cono de Taylor, en condiciones de temperatura ambiente y con una humedad relativa del 30 al 50%. Se sintetizaron sub-micropartículas con una elevada productividad, ya que el rendimiento de la síntesis fue un  $97.1 \pm 3.9\%$ , siendo esta elevada productividad característica de las síntesis mediante técnicas electrodinámicas [509]. Estas sub-micropartículas mostraron una distribución de tamaños homogénea, con un diámetro medio de  $217 \pm 57.3$  nm, determinado a partir de la medida de las partículas de las imágenes de SEM (N = 150). Por otro lado, el diámetro hidrodinámico en suspensión coloidal fue de  $452.0 \pm 81.4$  nm, determinado mediante dispersión dinámica de luz (DLS). El índice de polidispersidad (PDI), demostró la homogeneidad de las partículas, siendo su valor 0.032 (considerándose 0-0.1 distribución homogénea, mientras que  $>0.1$  distribución de tamaños heterogénea [425]). Además, cabe destacar la carga superficial positiva, con un valor de potencial Z de  $45.3 \pm 1.9$  mV, lo que les confiere propiedades mucoadhesivas (Figura 4.10-d).

Por otro lado, se sintetizaron micropartículas (MPs) a partir de una disolución de 13% (p/v) Eudragit® RS100 disuelto en cloroformo, que se cargó en una jeringa de plástico de 10 mL de volumen y se inyectó a través de una aguja (22 gauge), a un caudal de 0.5 mL/h, conectada a una fuente de alimentación con un voltaje positivo de 6.4 kV. El plato colector, de 80 mm de diámetro, se fijó a 10 cm de distancia a la aguja y se le aplicó un voltaje negativo de -3.4 kV, hasta que se estabilizó el cono de Taylor en condiciones de temperatura ambiente y con una humedad relativa del 30 al 50%. También se sintetizaron micropartículas con un elevado rendimiento en la producción de  $90.2 \pm 3.9\%$ . Las micropartículas se caracterizaron por SEM, resultando una distribución de tamaños muy homogénea, siendo el diámetro medio de  $2.6 \pm 0.4$   $\mu\text{m}$ , y confirmando por lo tanto que las condiciones óptimas seleccionadas permiten conseguir una buena estabilización del jet. Por otro lado, el diámetro hidrodinámico de las micropartículas en dispersión coloidal fue algo mayor, de  $2.8 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$ . El PDI calculado a partir de la distribución de tamaños de SEM fue de 0.011 ( $< 0.1$ ), lo que apoyó también la homogeneidad de la síntesis. La carga superficial determinada por el potencial Z también resultó positiva para las micropartículas,  $42.2 \pm 1.8$  mV, por lo que también presentaban propiedades mucoadhesivas (Figura 4.10-h).

La relación entre la carga superficial y la propiedad mucoadhesiva de partículas poliméricas la demostraron Bonferoni et al. [510] mediante la interacción de nanopartículas de quitosano con valores de potencial Z positivos con mucina, cargada negativamente debido a la presencia mayoritaria de ácido siálico. La interacción electrostática y el carácter mucoadhesivo se determinó mediante la media del potencial Z, el cual disminuyó al neutralizarse las cargas por la interacción electrostática.



**Figura 4.10** Caracterización de las partículas de Eudragit® RS100 optimizadas y sintetizadas por electroespray: a) imagen de la morfología de las sub-MPs de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños (N=150), c) parámetros utilizados en la síntesis, d) resultados de la caracterización de las sub-MPs, e) imagen de la morfología de las MPs de SEM, f) histograma de la distribución de tamaños (N=150), g) parámetros utilizados en la síntesis y h) resultados de la caracterización de las MPs.

Respecto a la influencia de los parámetros de síntesis puede concluirse que, mediante la técnica de electroespray, se pueden obtener partículas de diferentes rangos de diámetros mediante la modificación de la disolución polimérica. Como se explica en el apartado 4.1.1.2 de la introducción, aumentando la concentración de polímero y modificando el disolvente se obtienen soluciones con diferentes viscosidades. En este caso, las sub-micropartículas fueron sintetizadas a partir de una disolución polimérica con una viscosidad de  $3.9 \pm 0.04$  mPa/s (Figura 4.10-c) y las micropartículas a partir de una disolución polimérica con una viscosidad de  $56.8 \pm 7.8$  mPa/s (Figura 4.10-g). Se observó, por lo tanto, un aumento de diámetro con el aumento de la viscosidad, aunque ésta no sea la única propiedad de la disolución que influye en el tamaño de partícula.

### Encapsulación de rifampicina.

Considerando que en la formulación y producción de vectores terapéuticos es muy importante obtener la mayor carga posible del componente terapéutico, se ensayaron diferentes concentraciones de antibiótico en la solución polimérica, entre 10 y 20% (p/p) respecto a la masa del polímero. Se analizó la cantidad de antibiótico encapsulado en cada una

de las síntesis mediante la recta de calibrado realizada previamente (Figura A4.3). Las cantidades de rifampicina con las que se trabajaron fueron aquellas con las que se obtuvo una carga en la partícula mayor y una mejor estabilización del cono de Taylor. Una pérdida de fármaco en la encapsulación por electroespray puede deberse a una inestabilidad del *jet*, que provoque que éste quede en el exterior de la partícula producida y se pierda al formarse el spray [190]. La Figura A4.4 muestra como existe una tendencia clara entre la carga del fármaco conseguida y la concentración inicial del mismo en la disolución de partida. Es por este motivo por el que, en el caso de las sub-micropartículas, se trabajó con un 20% (p/p) respecto al polímero, aunque en todos los ensayos se obtuvieron eficiencias de encapsulación superiores al 70%. La tendencia del aumento de la carga de fármaco con la concentración inicial del mismo también se reproduce en el caso de las micropartículas (Figura A4.4-b), aunque en este caso se ha considerado óptimo trabajar con un 15% (p/p) respecto al polímero ya que a concentraciones mayores aparecían fibras, posiblemente debido al aumento de la viscosidad de la disolución.

Cuando las partículas se cargaron con el antibiótico rifampicina se observaron ligeras diferencias respecto a las que no contenían dicho antibiótico. En el caso de las sub-micropartículas, el diámetro medio fue muy similar ( $217.1 \pm 57.3$  nm y  $224.3 \pm 73.5$  nm para partículas no cargadas y cargadas, respectivamente), mientras que el diámetro hidrodinámico fue de  $448.1 \pm 25.0$  nm, considerándose también homogéneas con un valor del índice de polidispersidad de  $0.032 (< 0.1)$ . Por otro lado, su carga superficial se vio disminuida alcanzando un valor de  $23.9 \pm 2.7$  mV, frente a los  $45.3 \pm 1.9$  mV de las sub-micropartículas sin rifampicina. Como se observa en la Figura 4.11, la eficiencia de encapsulación fue de  $82.9 \pm 1.0\%$ , alcanzando una capacidad de carga de  $0.14$  mg de rifampicina por mg de partícula total.

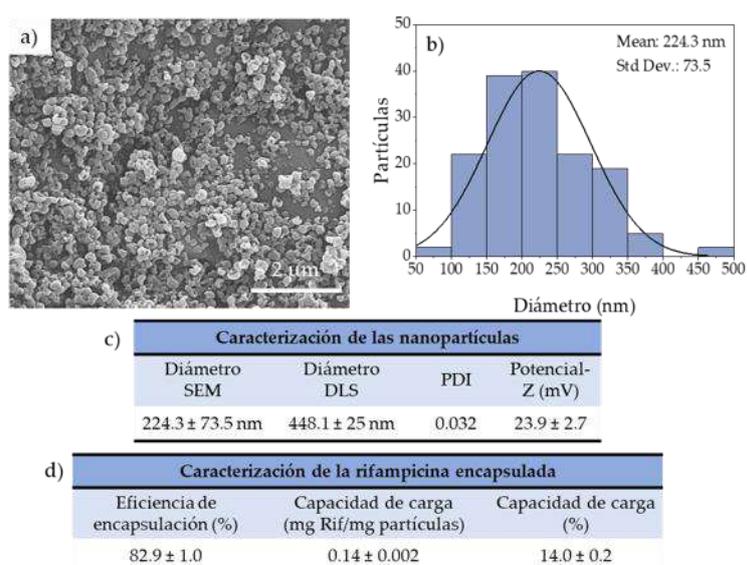
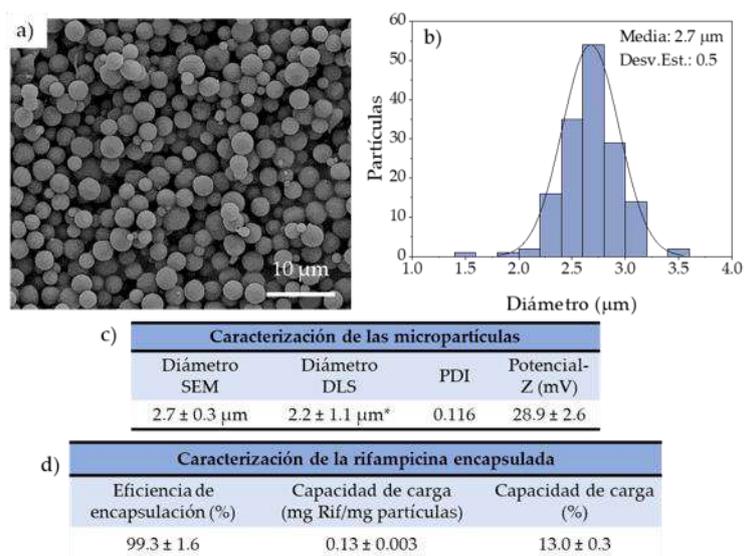


Figura 4.11 Caracterización de la encapsulación de rifampicina al 20% (p/p) en sub-MPs: a) imagen de la morfología de las sub-MPs de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños (N=150), c) resultados de la caracterización de las sub-MPs y d) resultados de la encapsulación de rifampicina.

Las micropartículas obtenidas que encapsulaban rifampicina mantuvieron el diámetro medio, siendo este de  $2.7 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , respecto a  $2.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$  de las micropartículas sin rifampicina. Sin embargo, la carga superficial redujo su valor desde  $42.2 \pm 1.8 \text{ mV}$  de las micropartículas sin rifampicina hasta alcanzar el valor de  $28.9 \pm 2.6 \text{ mV}$  de las micropartículas con rifampicina, manteniendo aun así las propiedades mucoadhesivas. Como se muestra en la Figura 4.12, la eficiencia de encapsulación fue de  $99.3 \pm 1.6\%$ , alcanzando una capacidad de carga de  $0.13 \text{ mg}$  de rifampicina por  $\text{mg}$  de partícula total.

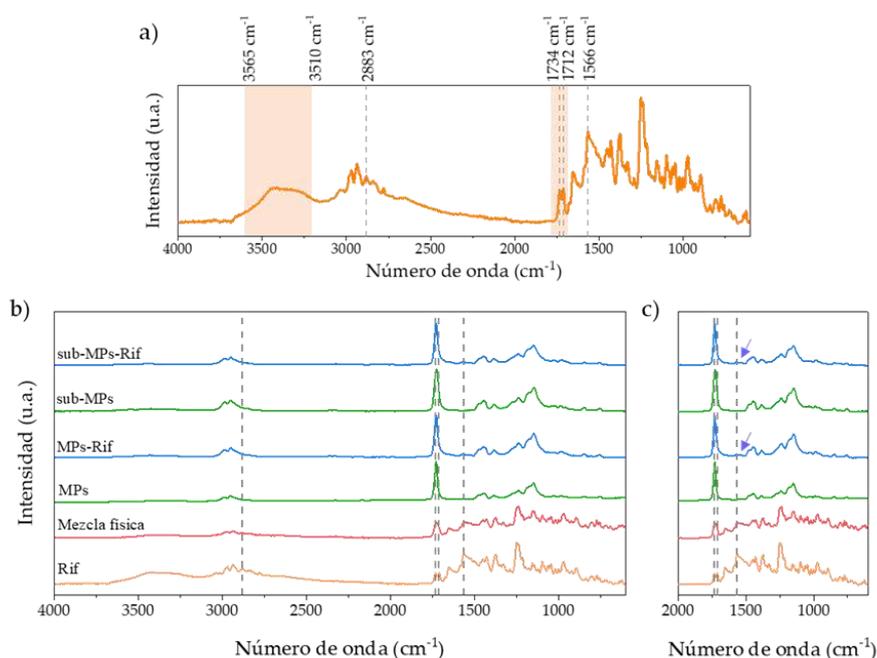
En estudios previamente publicados, se encuentran eficiencias de encapsulación y capacidades de carga del antibiótico rifampicina inferiores a las obtenidas. En el estudio de Mei et al. [511] obtuvieron eficiencias de encapsulación de  $61.9\%$  con una capacidad de carga de  $1.5\%$  mediante el método de emulsión simple. Por otro lado, Pandit et al. [512] encapsularon rifampicina en partículas de PLGA y PCL obteniendo como máxima eficiencia de encapsulación un  $63.5\%$  mediante el método de emulsión simple y  $54.7\%$  mediante el método de emulsión doble. En otro trabajo, Soto et al. [513] cargaron partículas polisacáridas de glucanos a través de un atrapamiento químico, con eficiencias de encapsulación de  $80\%$  y capacidad de carga de  $10\%$  (p/p).



**Figura 4.12** Caracterización de la encapsulación de rifampicina al 15% (p/p) en MPs: a) imagen de la morfología de las MPs de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños, c) resultados de la caracterización de las MPs y d) resultados de la encapsulación de rifampicina.

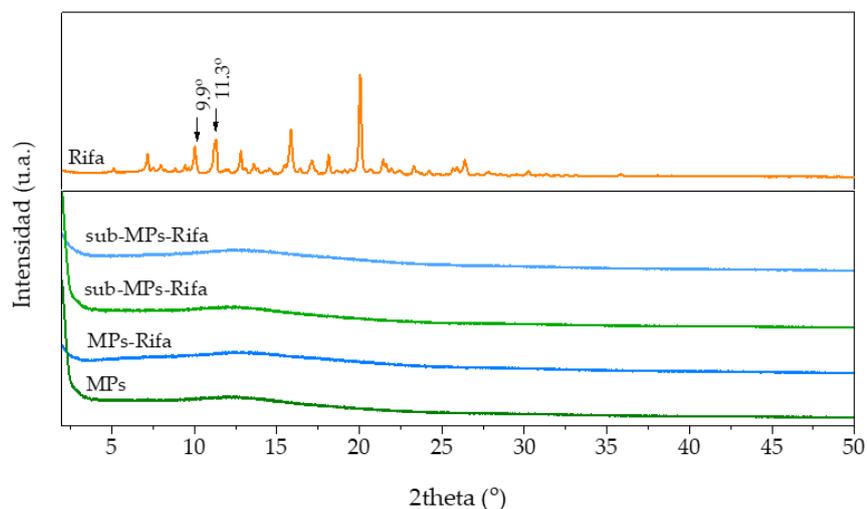
Mediante FTIR se realizó un estudio para evidenciar la presencia de posibles interacciones entre el polímero y el antibiótico, tanto en el caso de las sub- micropartículas como de las micropartículas producidas mediante electroespray. En la Figura 4.13-a puede observarse el espectro infrarrojo de la rifampicina en su forma II, indicándose los picos característicos del fármaco, tal y como se desarrolla en el Capítulo III.

En la Figura 4.13-b se observa la presencia de los picos característicos tanto del antibiótico como del polímero en el espectro correspondiente a la mezcla física (línea roja). Por otro lado, comparando el espectro de las partículas sin fármaco con el de las partículas con fármaco se observa que el espectro predominante corresponde al polímero Eudragit® RS100. Se puede observar en los espectros de ambas partículas cargadas con el antibiótico el pico correspondiente al grupo amida C=O correspondiente al número de onda  $1566\text{ cm}^{-1}$  del antibiótico (Figura 4.13-c). Sin embargo, debido a la sensibilidad del método, que no resulta suficiente para detectar de manera eficaz la rifampicina encapsulada, no se puede descartar la presencia de algún otro tipo de interacción.



**Figura 4.13** a) Espectros FTIR del antibiótico rifampicina y sus picos característicos, b) espectros FTIR de las sub-MPs y MPs con y sin fármaco encapsulado. Se muestra el espectro de rifampicina (línea naranja) con los picos característicos con líneas punteadas, de las MPs y sub-MPs sin fármaco (líneas verdes) y de las MPs y sub-MPs con rifampicina encapsulada (líneas azules), c) región ampliada entre 2000 y 600  $\text{cm}^{-1}$ .

En la Figura 4.14 se muestra el difractograma de rayos X del antibiótico y de ambos tipos de partículas con y sin antibiótico. Se pueden observar en el difractograma del antibiótico los picos característicos a  $9.9$  y  $11.3^\circ$  propios de la forma II [426]. En el correspondiente a las sub-micropartículas y micropartículas sin antibiótico se observa la curvatura en forma de halo propia del polímero en su estado amorfo. En el difractograma de ambos tipos de partículas con el antibiótico encapsulado, se observa la misma curvatura en forma de halo correspondiente al polímero, sin poder detectar los picos correspondiente a la rifampicina correspondiente, por lo que no se puede asegurarse dicho estado amorfo del antibiótico [426].



**Figura 4.14** Caracterización del antibiótico rifampicina y de las partículas sintetizadas por electrospray con y sin antibiótico por difracción de rayos X (XRD). Se muestra la rifampicina (naranja), las MPs y sub-MPs sin rifampicina (verde) y las MPs y sub-MPs con rifampicina encapsulada (azul).

#### **Encapsulación de ciprofloxacino.**

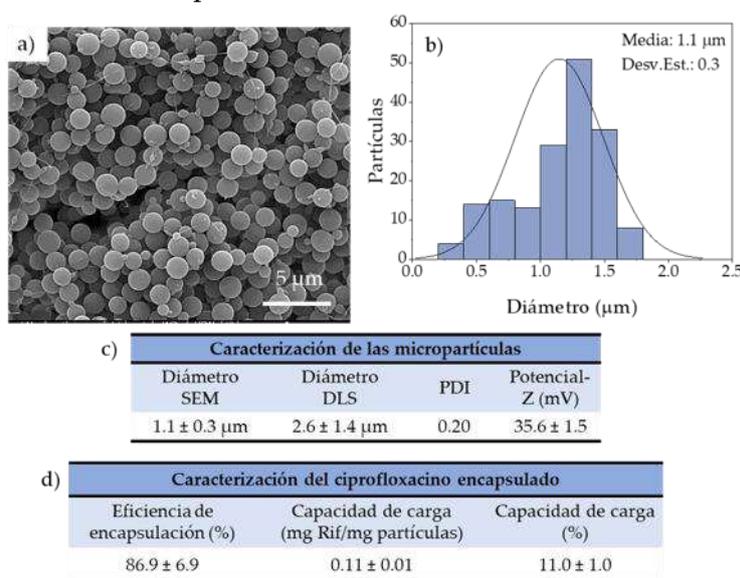
Cuando se encapsuló el antibiótico ciprofloxacino se presentaron diferentes problemas. El primero de ellos fue la solubilidad del compuesto, puesto que el máximo de solubilidad de este antibiótico en HCl 0.1N es de 30 mg/mL. Para inyectar, a través de la aguja, este compuesto de diferente naturaleza que el polímero en el que se quiere encapsular, se probó la técnica coaxial, ya que la emulsión previa reducía drásticamente la concentración de fármaco que iba a ser introducido en las partículas. Para ello, se inyectó por la aguja externa la disolución polimérica y por la aguja interna la disolución de base acuosa del fármaco. Al aplicar la técnica coaxial, tanto en la síntesis de sub-micropartículas como en la de micropartículas, se desestabilizaba el cono de Taylor y no se consiguieron obtener partículas debido a la elevada cantidad de medio acuoso. Se buscaron alternativas para la disolución del fármaco (Figura A4.5) hasta que finalmente se consiguió una elevada disolución de ciprofloxacino en TFA (~100 veces más).

Para evitar la desestabilización del jet al utilizar la técnica coaxial y utilizando TFA como disolvente del ciprofloxacino, se llevó a cabo la técnica de emulsión, estabilizando dicha emulsión con el surfactante Twenn80. En el caso de las sub-micropartículas en etanol:acetona, al cabo de 1 hora, se producía una separación de las fases, obteniéndose un precipitado blanco en el fondo de la jeringa. Los disolventes implicados en este proceso de “emulsión” eran miscibles, por lo que se estaba produciendo una síntesis de partículas por nanoprecipitación, lo que se confirmó mediante las imágenes de SEM de la disolución que se adjuntan en la Figura A4.6, por lo que se descartó la encapsulación del antibiótico con estos disolventes.

En el caso de la encapsulación de ciprofloxacino en las micropartículas, utilizando TFA como disolvente del ciprofloxacino y generando una emulsión con la disolución polimérica de

cloroformo estabilizada con Tween80, se obtuvieron partículas de menor diámetro,  $1.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , frente a  $2.6 \pm 0.4 \mu\text{m}$  de las micropartículas sin fármaco (Figura 4.15). Este hecho, probablemente se debe a las propiedades modificadas de la disolución polimérica al añadir tanto TFA como un agente tensioactivo. El diámetro hidrodinámico de las partículas en dispersión coloidal aumento hasta  $2.6 \pm 1.4 \mu\text{m}$ , obteniéndose un índice de polidispersidad de 0.2 ( $> 0.1$ ), lo que quiere decir que el tamaño de las partículas era heterogéneo. Probablemente este aumento en el índice de polidispersidad se deba a aglomeraciones de partículas. Por otro lado, la carga superficial también redujo su valor hasta alcanzar  $35.6 \pm 1.5 \text{ mV}$ , frente al potencial Z de  $42.2 \pm 1.8 \text{ mV}$  de las micropartículas vacías, presentando también propiedades mucoadhesivas. La eficiencia de encapsulación alcanzó un valor de  $86.9 \pm 6.9\%$  y la capacidad de carga de  $0.11 \text{ mg}$  de ciprofloxacino por  $\text{mg}$  de partícula total.

La eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga del ciprofloxacino en las micropartículas mediante la técnica de electroespray obtenidas resultaron ser mayores que lo reportado en bibliografía. En estudios previamente realizados, Arafa et al. [514] encapsularon en nanopartículas de PLGA y de PLGA recubiertas con quitosano el antibiótico ciprofloxacino mediante el método de doble emulsión con eficiencias de encapsulación reportadas de 64% y 78% respectivamente. Sin embargo, en el trabajo de Ho et al. [515] observaron que en nanovectores basados en polisacáridos la eficiencia de encapsulación resultó aproximada al 90%, pero la capacidad de carga no alcanzaba el 9%. Cabe destacar que en ambos casos se utilizaron otras técnicas de encapsulación.

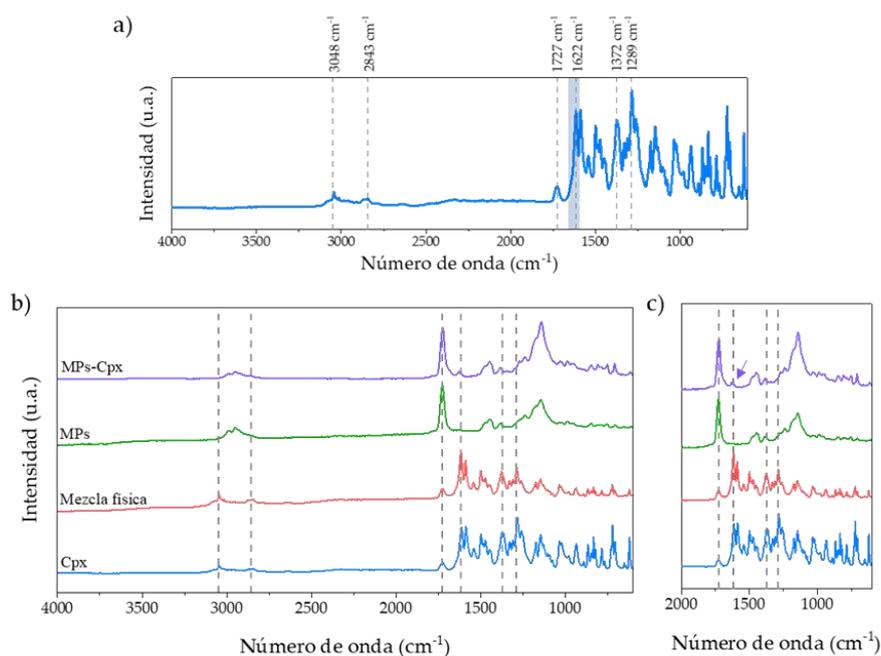


**Figura 4.15** Caracterización de la encapsulación de ciprofloxacino al 15% (p/p) en TFA estabilizado con 0.5% (p/p) de Tween80 en MPs: a) imagen de la morfología de las MPs de SEM, b) histograma de la distribución de tamaños, c) resultados de la caracterización de las MPs y d) resultados de la encapsulación de ciprofloxacino.

Como en la encapsulación de rifampicina, se analizaron los espectros FTIR para evaluar las posibles interacciones intermoleculares entre el polímero y el antibiótico ciprofloxacino

encapsulado. En la Figura 4.16-a se observan los picos característicos del ciprofloxacino, los cuales son: 3048 y 2843  $\text{cm}^{-1}$  correspondientes a los  $-\text{CH}-$  del grupo fenilo, 1622  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al grupo carboxilo  $-\text{COOH}$ , 1289  $\text{cm}^{-1}$  del enlace C-F y los picos 1727 y 1372  $\text{cm}^{-1}$  del grupo carbonilo ( $\text{C}=\text{O}$ ) y de las vibraciones de los grupos  $-\text{CH}_2-$  y  $-\text{CH}_3$ , respectivamente [516].

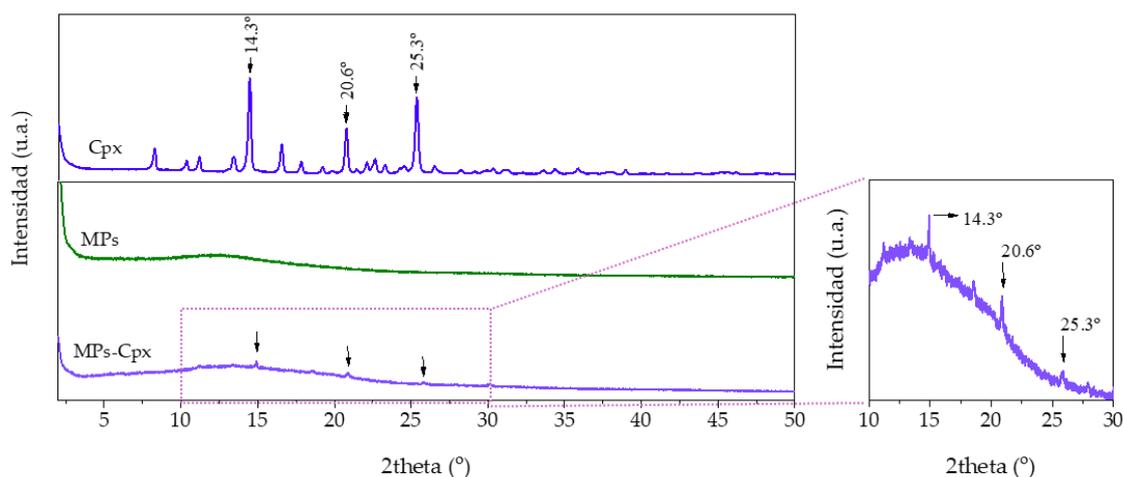
En la Figura 4.16-b se observa la presencia de los picos característicos tanto del antibiótico como del polímero en el espectro correspondiente a la mezcla física (línea roja). De la misma forma que se ha comentado anteriormente, comparando el espectro de las partículas sin fármaco con el de las partículas con fármaco se observa que el espectro predominante corresponde al polímero Eudragit® RS100. Se puede observar en el espectros de las partículas cargadas con el antibiótico el pico correspondiente al grupo carboxilo correspondiente al número de onda 1622  $\text{cm}^{-1}$  del antibiótico (Figura 4.16-c). Como en el caso de la rifampicina, no resulta suficiente la sensibilidad del método para detectar de manera eficaz el ciprofloxacino encapsulado, por lo que tampoco se puede descartar la presencia de algún otro tipo de interacción.



**Figura 4.16** Espectros FTIR de las MPs-Cpx . Se muestra el espectro de ciprofloxacino (línea azul) con los picos característicos con líneas punteadas, de las partículas con ciprofloxacino encapsulado (línea morada) y de Eudragit® RS100 (línea gris), b) región ampliada entre 1800 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ .

En la Figura 4.17 se muestra el difractograma de rayos X del antibiótico y de las partículas con y sin antibiótico. Se pueden observar en el difractograma del ciprofloxacino los picos característicos a 14.3, 20.6 y 25.3° propios del antibiótico, como se reporta en literatura

[517]. En el difractograma de las partículas sin antibiótico se observa la curvatura en forma de halo correspondiente al estado amorfo del polímero, mientras que, en el de las partículas con el antibiótico encapsulado, se observan unos pequeños picos que corresponden con los del fármaco en su estado cristalino, aunque se observan con menor intensidad debido al bajo contenido de fármaco en la muestra comparado con el antibiótico puro.



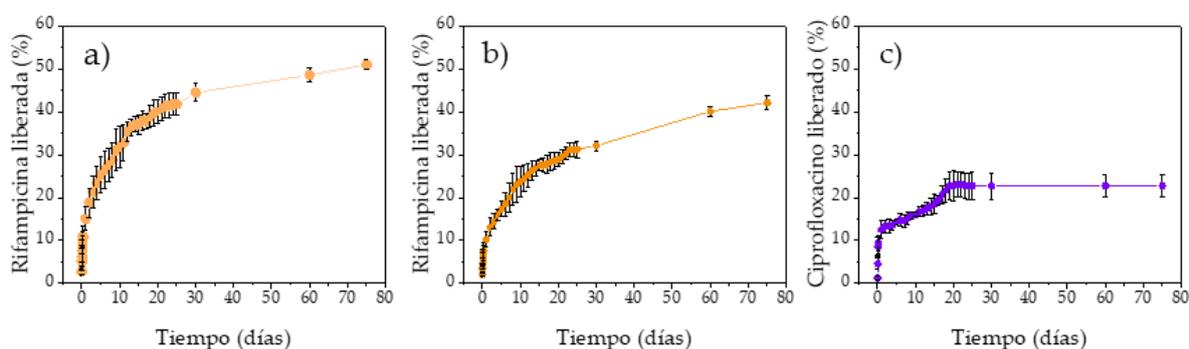
**Figura 4.17** Caracterización del antibiótico ciprofloxacino y de las partículas sintetizadas por electro-spray con y sin antibiótico por difracción de rayos X (XRD). Se muestra el ciprofloxacino (azul), las MPs sin ciprofloxacino (verde) y las MPs con ciprofloxacino (morado).

### Cuantificación de la liberación *in vitro* del fármaco encapsulado.

Para llevar a cabo la cuantificación del fármaco liberado y encapsulado, se realizaron las curvas de calibrado en los diferentes medios: fluido gástrico simulado y PBS, las cuales se adjuntan en la Figura A4.3 del anexo.

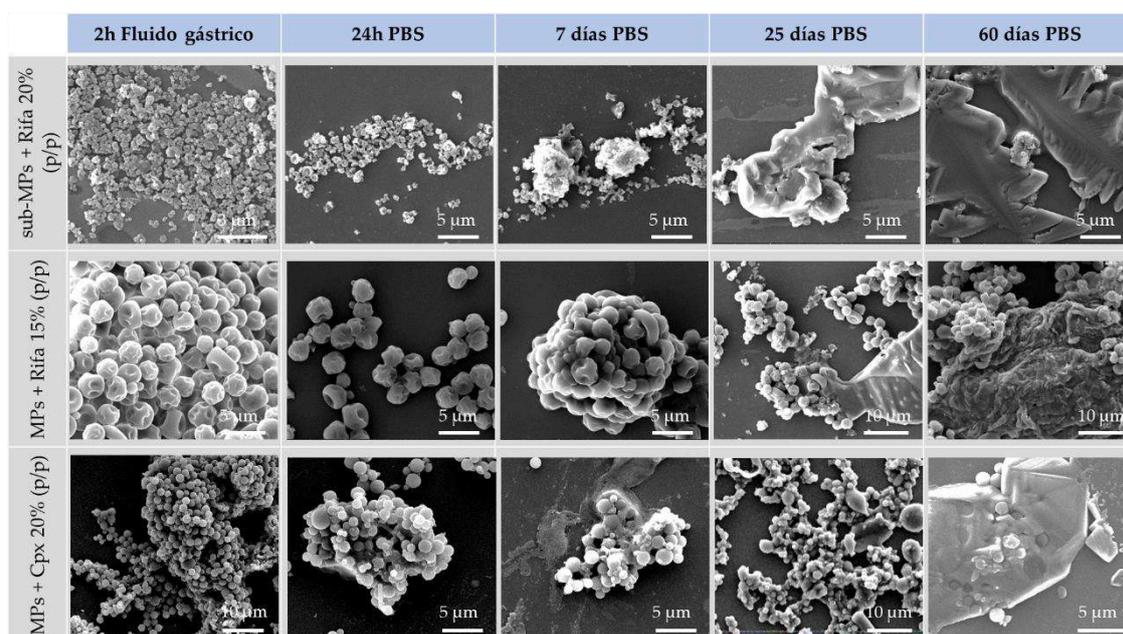
Se estudiaron los perfiles de liberación acumulativa tanto de las sub-micropartículas de rifampicina como de las micropartículas tanto de rifampicina como de ciprofloxacino. Se observó una reducida liberación del fármaco encapsulado durante las 2h de incubación en fluido gástrico simulado. Se cuantificó tan sólo un  $2.1 \pm 0.2 \%$ ,  $2.8 \pm 0.6 \%$  y  $1.3 \pm 0.4\%$  durante este periodo de tiempo para las sub-micropartículas -rifampicina, micropartículas-rifampicina y micropartículas-ciprofloxacino, respectivamente. Posteriormente, se llevó a cabo una liberación durante 75 días en la que no se alcanzó una liberación del 100% en ninguno de los casos. En la Figura 4.18 se muestran las curvas de liberación de los antibióticos. En todos los perfiles se observa una liberación más pronunciada durante las primeras 24 horas, siendo posteriormente la liberación sostenida y mucho más lenta. Sin embargo, a pesar del prolongado tiempo de liberación de 75 días, más del 50% del antibiótico encapsulado quedaba aún atrapado en el interior de las partículas, aunque estas habían perdido ya su morfología inicial, como se muestra posteriormente (resultados de SEM, Figura 4.19). Estos perfiles de

liberación parecen evidenciar algún tipo de interacción entre el polímero y el antibiótico encapsulado, aunque sea de carácter débil, a pesar no haber podido ser ratificadas mediante espectroscopía infrarroja. Una supuesta interacción entre el polímero y los antibióticos encapsulados resulta clave para comprender por qué el porcentaje de antibiótico liberado aumenta tan lentamente. No obstante, es necesario resaltar que una liberación prolongada en el tiempo evidencia que los vectores diseñados cumplen con las especificaciones para las cuales fueron diseñados.



**Figura 4.18** Perfiles de liberación de los diferentes tipos de partículas y distintos antibióticos encapsulados durante 75 días : a) sub-MPs con rifampicina encapsulada, b) MPs con rifampicina encapsulada y c) MPs con ciprofloxacino encapsulado.

En las imágenes de SEM de la Figura 4.19 se observa que todas las partículas, tras 2h en contacto con fluido gástrico simulado, mantenían su morfología. Además, estas imágenes, ayudan a entender las limitadas liberaciones que se obtuvieron para los tres tipos de vectores de transporte de antibióticos. Se observa que el polímero no se degrada ni se disuelve en el medio fisiológico, sino que se va perdiendo la morfología de las partículas, por un posible mecanismo de erosión, y parece que se funden entre ellas, dando lugar a una liberación posiblemente por difusión del interior de la matriz polimérica al exterior. Como se observa en las imágenes, parece ser que la aglomeración polimérica sea la responsable de dificultar e impedir la difusión del fármaco al medio externo, por eso se observa una liberación tan lenta y sostenida en el tiempo.



**Figura 4.19** Imágenes de SEM a diferentes puntos de la liberación *in vitro*: tras 2h en fluido gástrico simulado, tras 24h, 7, 25 y 60 días en PBS, de las sub-MPs y MPs con rifampicina encapsulada y de las MPs con ciprofloxacino encapsulado.

El mecanismo anteriormente supuesto mediante el análisis del cambio de morfología de las sub-micropartículas y micropartículas cargadas de fármaco y, posiblemente, la presencia de alguna interacción intermolecular, se puede corroborar mediante el estudio de la cinética de liberación. Mediante los ajustes matemáticos de primer orden, Higuchi, Peppas-Sahlin, Lindner-Lippold y Korsmeyer-Peppas. (Figura A4.7). Se estudiaron los mecanismos que contribuían a cada una de las liberaciones, de la misma manera que se explica en el Capítulo II.

El mejor ajuste matemático para la cinética de liberación de las sub-micropartículas con rifampicina ( $R^2 = 0.9937$ ) y de las micropartículas con rifampicina ( $R^2 = 0.9948$ ) corresponde a la ecuación propuesta por Peppas y Sahlin [518], reflejando la liberación mediante la difusión de Fick (constante  $k_1$ ) y una menor aportación del hinchamiento de la matriz polimérica (constante  $k_2$ ). Como puede observarse en los datos de la Tabla 4.7, en ambos casos la constante relacionada con la liberación del fármaco debida al hinchamiento polimérico tiene una contribución negativa, por lo que el proceso de liberación está dominado, principalmente, por la difusión desde y a través del polímero. Según describen Peppas y Sahlin, para un perfil de liberación dominado por el proceso liberación por difusión de Fick, el valor del coeficiente  $n$  debe de tener un valor de 0.43 aproximadamente. Sin embargo, cuando este valor es de  $0.3 \pm 0.1$ , puede deberse a una liberación dominada por difusión anómala o de un sistema de partículas con una elevada dispersidad de tamaños [519]. En el caso de estas partículas, el valor del coeficiente  $n$  es menor que 0.43, pero el sistema no presenta una gran dispersión de

tamaño, por lo que puede deducirse que la liberación está dominada por el proceso de difusión anómala a través del polímero, con un lento reordenamiento de las cadenas poliméricas [520].

En cuanto al ajuste matemático para la cinética de liberación de las micropartículas de ciprofloxacino ( $R^2 = 0.9219$ ), el modelo que mejor se ajustó fue el propuesto por Korsmeyers y Peppas [521], siendo la liberación únicamente dominada por el proceso de difusión (constante  $k$ ). Se observa de nuevo un valor del coeficiente  $n < 0.43$  para la liberación del antibiótico de un sistema de partículas homogéneo, por lo que, además de la liberación mediante la difusión anómala a través del polímero, se puede apreciar una posible contribución de alguna interacción intermolecular polímero-ciprofloxacino al darse sostenidamente en el tiempo [520].

**Tabla 4.7** Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación de los mejores modelos matemáticos ajustados a los perfiles de liberación *in vitro*.

Vector	Modelo matemático	Ecuación*	Parámetros
NPs - rifampicina 20% (p/p)	Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^{2n}$	$R^2 = 0.994$ $k_1 = 16.5$ $k_2 = -1.3$ $n = 0.39$
MPs - rifampicina 15% (p/p)	Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^{2n}$	$R^2 = 0.995$ $k_1 = 11.2$ $k_2 = -0.54$ $n = 0.37$
MPs - ciprofloxacino 15% (p/p)	Korsmeyer-Peppas	$\frac{M_t}{M_\infty} = k t^n$	$R^2 = 0.922$ $k = 11.5$ $n = 0.19$

En conjunto, los mecanismos de liberación basados en la difusión y las imágenes del proceso de liberación *in vitro*, parecen indicar que la liberación que se da en las primeras horas es la del antibiótico superficial o en las capas más próximas a la superficie de la matriz polimérica. Posteriormente, la liberación se ralentiza, pero continúa de forma sostenida, probablemente debido a la dificultad de difusión del antibiótico más interno, como se ha observado en las imágenes de SEM. Comportamientos similares se observaron en otros polímeros también basados en copolímeros acrílicos, como el poli(metil-metacrilato) (PMMA), ampliamente empleado para prótesis e implantes. Van de Belt et al. [522], desarrollaron un cemento óseo para prótesis con liberación controlada de fármacos basados en PMMA impregnado con gentamicina para estudiar su proceso de liberación para implantes y observaron que la liberación inicial se trataba de un fenómeno superficial siendo, posteriormente, controlado por la porosidad del cemento. Además, obtuvieron tasas de liberación muy prolongadas y sostenidas en el tiempo. Sin embargo, hay investigaciones sobre

estos perfiles de liberación de sistemas basados en PMMA que, si bien coinciden con que constan de dos fases: una más rápida inicial seguida de una segunda lenta y sostenida, discrepan en el mecanismo por el que se llevan a cabo. Algunos investigadores concluyen con que el proceso se da únicamente por difusión a través de la matriz de PMMA; otros piensan que tan sólo difunde el fármaco a través de poros y huecos en la matriz polimérica; también los hay que defienden que tan sólo se trata de un fenómeno pasivo superficial. Es decir, hay una amplia variedad de opiniones sobre el mecanismo de liberación de antibióticos de sistemas de PMMA [523].

### **Estudio *in vitro* de la acción bactericida del fármaco encapsulado.**

Para poder evaluar el efecto bactericida de las partículas con y sin antibiótico en su interior, se estudió la MIC y MBC del ciprofloxacino libre, habiendo determinado las concentraciones de interés de la rifampicina libre en el Capítulo III (Figura A3.4). Los valores resultantes de este primer estudio sobre el antibiótico ciprofloxacino, cuyos resultados se adjuntan en la Figura A4.8, fueron: MIC del ciprofloxacino 0.25 µg/mL, mientras que la MBC se encontró entre los valores 0.5-1 µg/mL, valores que coinciden con la literatura [524][525].

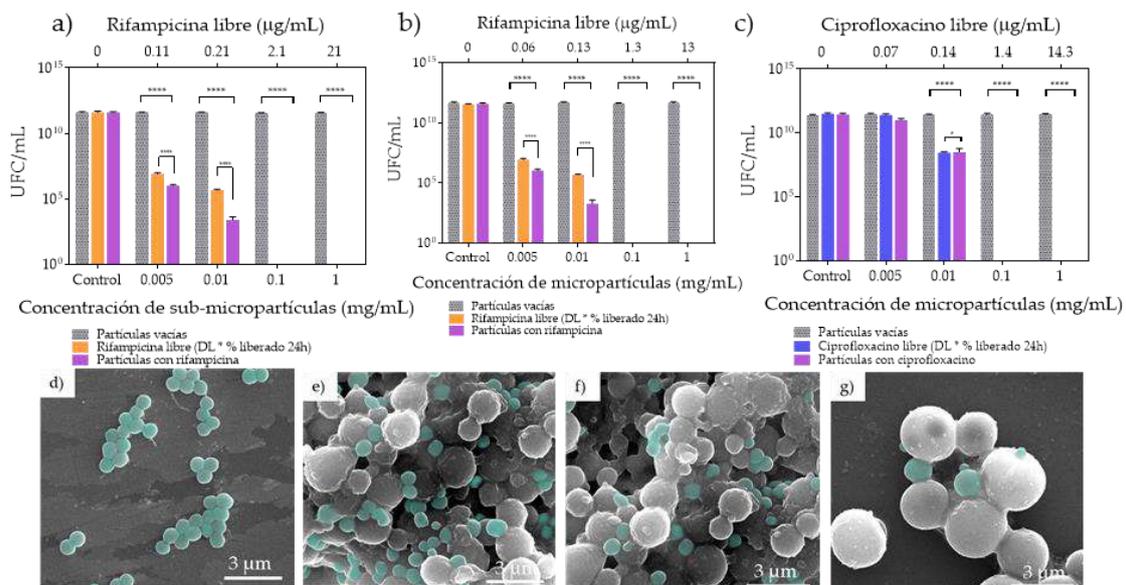
Como se observa en los resultados de la Figura 4.20 (a-c), las partículas sin antibióticos no ejercían efecto bactericida por sí mismas, permitiendo un crecimiento similar a las bacterias control, es decir, sin tratamiento.

Respecto a las sub-micropartículas y micropartículas de rifampicina (Figura 4.20-a), se comprobó que cuando se añadían partículas que liberaban en las primeras 24h una concentración de rifampicina que superaba la MBC no se producía crecimiento alguno (1 y 0.1 mg/mL de sub-micropartículas, correspondiente a una concentración de rifampicina teóricamente liberada mayor a 1.3 µg/mL). Para concentraciones menores (0.01 y 0.005 mg/mL de partículas, correspondiente a una concentración de rifampicina teóricamente liberada mayor de 0.06 µg/mL, cercana a la concentración MIC) se observaron diferencias significativas entre la actividad bactericida de las partículas frente a la del fármaco libre, observando mayor efecto de las sub-micropartículas y micropartículas. Por lo tanto, mediante la encapsulación del fármaco no se produjeron modificaciones estructurales que afectasen a la actividad antimicrobiana del mismo. Además, parece haber un efecto por contacto entre las partículas y las bacterias debido a esta mayor actividad antimicrobiana de las partículas. La carga superficial positiva de las partículas ( $23.9 \pm 2.7$  mV,  $28.9 \pm 2.6$  mV,  $35.6 \pm 1.5$  mV para las nano y micropartículas con rifampicina y micropartículas con ciprofloxacino, respectivamente) podría favorecer este efecto de contacto con la pared bacteriana. Se trataría de interacciones electrostáticas gracias a la carga negativa debido a la presencia de ácidos teicoicos aniónicos en la superficie de los microorganismos [447]

En las imágenes de SEM (Figura 4.20 (d-g)), se demuestra el contacto producido entre las bacterias y las micropartículas probablemente debido a la interacción electrostática entre

ambas debido a la diferencia de cargas superficiales. Este hecho puede ser el causante de que el antibiótico más superficial de las partículas sea más accesible a las bacterias y por eso actúe antes que el que se encuentra libre en la dispersión.

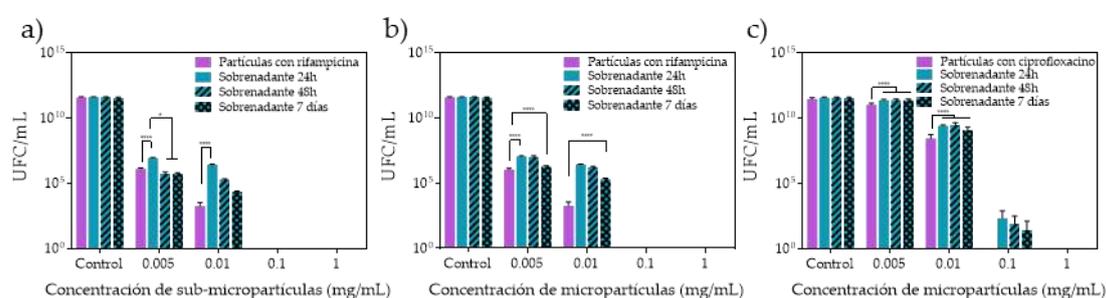
Por último, en el caso de la encapsulación de ciprofloxacino no se observó crecimiento a concentraciones teóricas de antibiótico superiores a la MBC (1 y 0.1 mg/mL de partículas, correspondiente a una concentración mayor a 1.4 µg/mL de ciprofloxacino). La actividad del ciprofloxacino encapsulado y del antibiótico libre resultó similar para concentraciones de partículas más bajas (0.01 y 0.005 mg/mL) sin apenas encontrar diferencias, probablemente debido a que, en este caso, la concentración MIC no se encuentre tan próxima como en los ensayos con rifampicina. Por lo que el ciprofloxacino no sufrió alteraciones estructurales que afectaran a su actividad antimicrobiana durante la encapsulación.



**Figura 4.20** Viabilidad de *S. aureus* en presencia de partículas vacías, antibiótico libre (concentración teóricamente liberada en el tiempo de contacto con las bacterias, 24h), partículas con antibiótico (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001). a) sub-MPs-rifampicina, b) MPs-rifampicina, c) MPs-ciprofloxacino, d-g) imágenes coloreadas de SEM del contacto entre partículas (MPs-rifampicina) y *S. aureus* (coloreadas de verde) a concentraciones 0, 0.005, 0.01 y 0.05 mg/mL de partículas respectivamente.

Se confirmó que el contacto entre las partículas y las bacterias debido a interacciones electrostáticas aumentaban el efecto de los antibióticos encapsulados, poniendo en contacto los sobrenadantes de las liberaciones a determinadas concentraciones y tiempos con las bacterias. Dillen et al. [526] investigaron esta adhesión entre partículas cargadas positivamente y las paredes bacterianas cargadas negativamente mediante partículas modificadas con un fluoróforo, resultando en un aumento de la señal de fluorescencia debido al aumento de tamaño del vector al unirse la partícula a la bacteria. En este caso, se observa en la Figura 4.21

que para los tres tipos diferentes de partículas las diferencias entre el efecto bactericida de las partículas con el antibiótico encapsulado y los sobrenadantes de fármaco liberado a determinados periodos de tiempo son significativas ( $p < 0.0001$ ). Se aprecia que, a largo plazo (sobrenadante 7 días) el efecto de contacto de las micropartículas es más significativo que el de las sub-micropartículas lo que puede deberse a que, como se puede observar en la Figura 4.19, las micropartículas a este tiempo aún conservaban la morfología esférica, mientras que las sub-micropartículas se encontraban muy agregadas, razón por la cual el contacto entre partícula y bacteria pueda tener menor efecto.



**Figura 4.21** Viabilidad de *S. aureus* en presencia de partículas con antibiótico y los sobrenadantes de la liberación de las partículas tras 24h, 48h y 7 días (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). a) sub-MPs-rifampicina, b) MPs-rifampicina, c) MPs-ciprofloxacino.

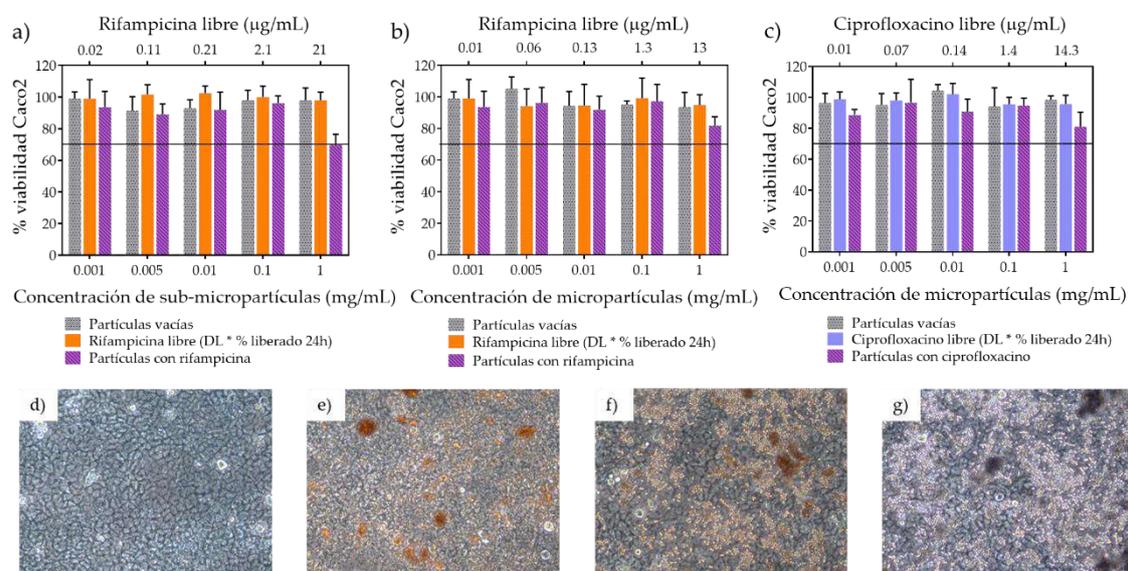
### Ensayo de viabilidad celular *in vitro*.

Con la finalidad de evaluar el posible efecto citotóxico de las sub-micropartículas y las micropartículas con y sin antibióticos encapsulados, se realizó un ensayo de viabilidad celular *in vitro* con células Caco2 TC7 y con fibroblastos. Como se ha explicado en el apartado 2.2.2 (Caco2-TC7) y en el apartado 3.1.3 (fibroblastos), ambas líneas celulares resultan representativas del epitelio intestinal.

Como indica la norma internacional ISO 10993-5, un material citotóxico reduce la viabilidad celular en más de un 30% respecto al control, el cual son las células sin tratar.

En primer lugar, se estudió el efecto sobre una monocapa confluyente de las células Caco2 TC7 que, como se ha explicado en el apartado 2.2.1.7, su fenotipo imita los enterocitos del intestino delgado. Como puede observarse en la Figura 4.22, los porcentajes de viabilidad obtenidos fueron superiores al 70% en todo el rango de concentraciones ensayadas para todos los casos (0.005 a 1 mg/mL de partículas). Además, de manera cualitativa, se pudo observar, por microscopía óptica convencional, que la monocapa formada no se veía alterada por la adición de las partículas (Figura 4.22 Viabilidad celular de las partículas de Eudragit® RS100 en la línea celular Caco2 TC7. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE ( $n=4$ ). La viabilidad del 100% fueron células control no tratadas. a) sub-MPs – rifampicina, b) MPs – rifampicina, c) MPs –

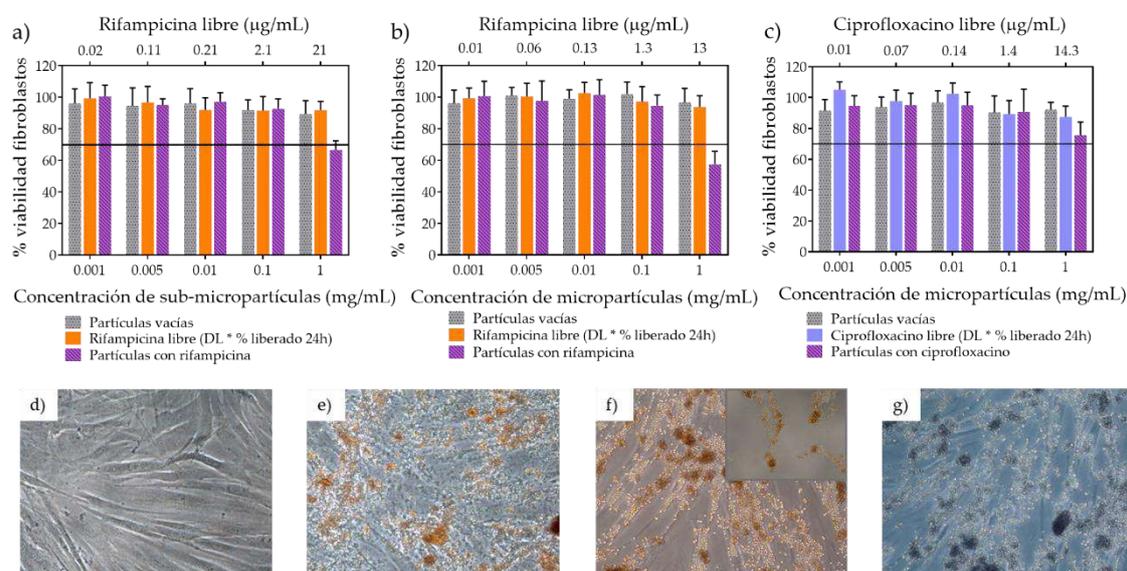
ciprofloxacino d-g) imágenes de microscopía óptica convencional de las células control y en contacto con cada tipo de partícula respectivamente.-d,g).



**Figura 4.22** Viabilidad celular de las partículas de Eudragit® RS100 en la línea celular Caco2 TC7. Los resultados se presentan como media ± DE (n=4). La viabilidad del 100% fueron células control no tratadas. a) sub-MPs – rifampicina, b) MPs – rifampicina, c) MPs – ciprofloxacino d-g) imágenes de microscopía óptica convencional de las células control y en contacto con cada tipo de partícula respectivamente.

Los resultados resaltaron la idoneidad de los vectores optimizados en este capítulo como potenciales sistemas de liberación de antibióticos de manera prolongada en el tiempo para la administración oral, puesto que, en el rango de concentraciones en el que las partículas resultaban efectivas como agentes antibacterianos (concentraciones superiores a la MBC, 0.1 mg/mL de partículas que contienen rifampicina y para las de ciprofloxacino), las partículas no resultaban nocivas para las células Caco2 TC7 ensayadas.

Por otro lado, se realizó exactamente el mismo estudio sobre fibroblastos humanos, células presentes en los epitelios de todo el organismo [527]. Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos para las células Caco2 TC7 (Figura 4.23). Sin embargo, cuando se estudió el efecto citotóxico de las partículas a la concentración de 1 mg/mL se observó una reducción de la viabilidad, siendo en el caso de las sub-micropartículas y micropartículas con rifampicina encapsulada ligeramente inferior al 70%. Como puede observarse en las imágenes de microscopía óptica (Figura 4.23-d-g), las partículas se adherían a la superficie de los fibroblastos, lo que podía ser la causa de esta reducción de la viabilidad celular.



**Figura 4.23** Viabilidad celular de las partículas de Eudragit® RS100 en fibroblastos. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE (n=4). La viabilidad del 100% fueron células control no tratadas. a) sub-MPs – rifampicina, b) MPs – rifampicina, c) MPs – ciprofloxacino, d-g) imágenes de microscopía óptica convencional de las células control y en contacto con cada tipo de partícula respectivamente.

En estudios previamente realizados se obtuvieron resultados que confirmaron la ausencia de citotoxicidad del polímero Eudragit® RS100 sobre líneas celulares como SW480, de adenocarcinoma de colon humano [528] o en células epiteliales de la córnea humana, ensayadas hasta concentraciones de 100  $\mu\text{g/mL}$  [154]. El antibiótico rifampicina, por sí solo, tampoco resultó citotóxico en tratamientos sobre células HepG2 de carcinoma de hígado para dosis de 25 a 100  $\mu\text{M}$  [442] o en macrófagos primarios murinos, cuando se administraba en dosis de 8  $\mu\text{g/mL}$  encapsulado durante tratamientos de hasta 9 días [529]. Sin embargo, estudios realizados demostraron que la rifampicina producía efectos nocivos sobre osteoblastos de hueso humano adulto, HOB, a concentraciones superiores a 5-10  $\mu\text{g/mL}$  [530]. Por otra parte, otros estudios afirmaban una ligera citotoxicidad del antibiótico ciprofloxacino en macrófagos, con una reducción de la viabilidad de aproximadamente 38.4% para una dosis de fármaco de 100  $\mu\text{g/mL}$  [531], y en células de osteosarcoma humano en tratamientos con 40  $\mu\text{g/mL}$  durante 24h o con 20  $\mu\text{g/mL}$  en 72h [532], mientras que en células epiteliales hTCEpi no resultaba tóxico en ensayo hasta concentraciones de 100  $\mu\text{M}$  [533].

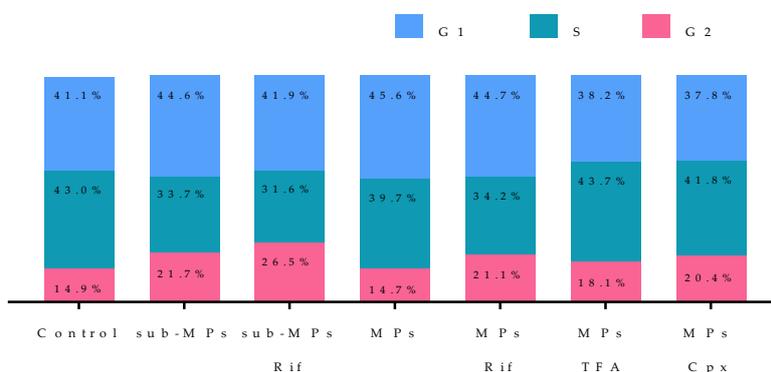
Para evaluar hasta qué punto resultaban citotóxicas las partículas de Eudragit® RS100 con antibióticos encapsulados se realizaron estudios del ciclo celular y de la apoptosis de las células en las que la viabilidad se había visto reducida, en fibroblastos. Para ello, se trabajó con 1 mg/mL como concentración subcitotóxica, es decir, se trabajó con la mayor concentración que, siguiendo la ISO 10993-5, no resultaba tóxica. Aunque en algún caso la viabilidad sí que disminuía de 70%, se encontraba muy próxima a este mínimo establecido.

La evaluación de la apoptosis celular (Tabla 4.8) mostró los efectos de las partículas sobre las membranas celulares de los fibroblastos. No se apreciaron importantes diferencias respecto al control, por lo que las partículas con y sin antibiótico en su interior, no ejercían efectos significativos sobre la necrosis. De hecho, la apoptosis no presentó apenas cambios de un estudio a otro, incluso se vio reducida en algunos casos (sub-MPs Rifa y MPs), y la necrosis mostró un aumento máximo de 5%.

**Tabla 4.8** Evaluación de la apoptosis celular por citometría de flujo de los tratamientos de las diferentes partículas y antibióticos encapsulados con una concentración de 1 mg/mL. Los controles se realizaron de células sin tratar. Resultados obtenidos de Figura A4.9.

	Control	sub-MPs	sub-MPs Rif	MPs	MPs Rif	MPs TFA	MPs Cpx
Células vivas	76.85	78.55	78.54	81.73	76.6	78.21	77.58
Apoptosis temprana	4.33	4.12	4.44	3.65	8.53	7.96	7.74
Apoptosis tardía	14.9	13.5	7.1	9.57	13.35	12.44	14.13
Necrosis	3.92	3.83	9.92	5.05	1.52	1.38	0.55

Los cambios en el ciclo celular después del tratamiento con las diferentes partículas se muestran en la Figura 4.24. No se observaron cambios importantes en la distribución del ciclo celular, concretamente, no se observaron grandes aumentos en la proporción correspondiente a la fase G1, lo que podría indicar una inhibición de la replicación celular. Por lo tanto, se concluyó con que el tratamiento de los fibroblastos con todos los distintos tipos de partículas sintetizadas por electroespray y con rifampicina o ciprofloxacino encapsulados, no inducían la detención del ciclo celular ni dañaban el ADN celular.



**Figura 4.24** Análisis del ciclo celular por citometría de flujo a concentración de 1 mg/mL. (sub-MPs: Eudragit® RS3% (p/v) etanol:acetona, MPs: Eudragit® RS100 13% (p/v) cloroformo). Los controles se realizaron de células sin tratar. Siendo G<sub>0</sub>: fase quiescente, G<sub>1</sub>: primera fase de crecimiento, S: fase de síntesis, G<sub>2</sub>: segunda fase de crecimiento y M: fase de mitosis. Resultados obtenidos de Figura A4.10.

En vista a los resultados, la reducción de viabilidad celular que se observaba en las sub-micropartículas y micropartículas con rifampicina a concentraciones de 1 mg/mL, se atribuyó a una dificultad experimental. Durante el procedimiento experimental, antes de añadir sobre las células el kit de tinción, hay varios pasos de lavados con la finalidad de retirar el material del tratamiento del medio y evitar interferencias. En este caso, como se observa en las imágenes de SEM (Figura 4.23-d-g), las partículas se adherían fuertemente a las células, quedando repartidas a lo largo de la morfología del fibroblasto, lo que hacía difícil la retirada de las partículas del medio. Posiblemente, la disminución de la viabilidad sea causada por el arrastre de alguna célula en el paso de lavado de las partículas por esta interacción. Por lo tanto, las partículas con y sin antibióticos resultaron altamente citocompatibles para ambas líneas celulares y, por lo tanto, altamente potenciales para la administración localizada y prolongada en el tiempo de antibióticos.

### 4.2.3 Conclusiones.

En este apartado de la Tesis Doctoral se han sintetizado sub-micropartículas y micropartículas mediante la técnica de electroespray. Se optimizaron los parámetros de síntesis, principalmente concentración polimérica y disolventes, para poder obtener vectores homogéneos en tamaño y forma, pero con de dimensiones diferentes (sub- micropartículas y micropartículas). Mediante la misma técnica, se encapsularon los antibióticos rifampicina y ciprofloxacino.

Se obtuvieron sub-micropartículas de  $150.8 \pm 30.9$  nm con una eficiencia de carga del  $82.9 \pm 1.0\%$  y una capacidad de carga del  $14.0 \pm 0.2\%$  de rifampicina y un potencial Z de  $+23.9 \pm 2.7$  mV Las micropartículas obtenidas fueron de  $2.7 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$  con una eficiencia de encapsulación del  $99.3 \pm 1.6\%$  y una capacidad de carga del  $13.0 \pm 0.3\%$  de rifampicina y un potencial Z de  $38.9 \pm 2.6$  mV, y de  $1.1 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$  con eficiencia de encapsulación del  $86.9 \pm 6.9\%$  y con una capacidad de carga del  $11.0 \pm 1.0\%$  de ciprofloxacino y un potencial Z de  $35.6 \pm 1.5$  mV. Todas ellas presentaron rendimientos de síntesis entre el 85 y el 98%.

Los antibióticos encapsulados no sufrieron modificaciones estructurales ni alteraciones en su acción bactericida, actuando el fármaco liberado de las partículas de manera idéntica al fármaco libre, siendo totalmente eficaz a concentraciones de 0.1 mg/mL, cuando la cantidad teórica es superior a la concentración MBC teórica Además, se observó un efecto de contacto entre las bacterias y las partículas, para las concentraciones de partículas de 0.005-0.01 mg/mL, con cantidades teóricas de fármaco próximas a la concentración MIC. Posiblemente este contacto se deba a interacciones electrostáticas, pronunciando los efectos de los antibióticos e indicando un efecto sinérgico.

Además, todas las partículas optimizadas en este capítulo resultaron altamente citocompatibles con las líneas celulares Caco2 TC7 y fibroblastos en las dosis necesarias para actuar como bactericidas.

Resulta muy relevante y de gran interés la posibilidad de controlar el tamaño del vector para poder controlar el perfil de liberación y la biodistribución del mismo en el interior del organismo, así como la consecución de elevadas eficiencias de encapsulación y del rendimiento de la técnica propuesta. Las técnicas electrohidrodinámicas permiten la producción sencilla y en continuo de dichos vectores, siendo muy elevada la productividad del proceso, obteniendo 17.5 mg/h de sub-micropartículas y hasta 67.4 mg/h de micropartículas. Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral resultan prometedores para el diseño de vectores de fármacos de escasa biodisponibilidad y baja solubilidad, para ser administrados por vía oral y ser liberados de la matriz polimérica de manera prolongada en el tiempo.

### **4.3 Encapsulación de antibióticos en fibras sintetizadas por electrohilado.**

#### **4.3.1 Materiales y métodos.**

##### **4.3.1.1 Materiales.**

Se utilizaron los materiales incluidos en el apartado 4.2.1.1.

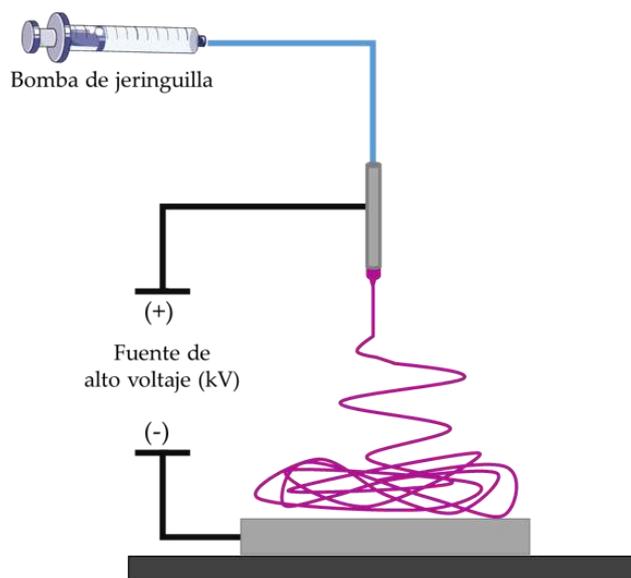
##### **4.3.1.2 Optimización de la síntesis de fibras.**

En el apartado 4.2.1.2 se estudiaron diferentes combinaciones de concentración de polímero, disolventes y condiciones de síntesis. Como se explica en el apartado 4.1.1.2, la diferencia entre electroespray y electrohilado se encuentra en los parámetros de síntesis estudiados, por lo que, a partir del proceso de optimización esquematizado en la Tabla 4.6, se obtuvieron también las condiciones idóneas para la síntesis de fibras de Eudragit® RS100 mediante electrohilado.

##### **4.3.1.3. Síntesis de fibras y encapsulación de antibióticos modelo.**

Se sintetizaron las fibras a partir de las condiciones optimizadas y se encapsuló rifampicina añadiendo diferentes cantidades de este fármaco a la solución polimérica y disolviéndolo en agitación continua durante 30 min. Las cantidades que se ensayaron fueron 2.5, 5 y 10% (p/p) respecto al polímero y se sintetizaron siguiendo el mismo protocolo ya descrito, ajustando los voltajes hasta estabilizar el cono de Taylor (diferencia de voltaje 20-23 kV).

En la Figura 4.25 se esquematiza el proceso de síntesis de fibras por electrohilado.



**Figura 4.25** Esquema de la síntesis de fibras del polímero Eudragit® RS100 por electrohilado.

#### 4.3.1.4. Caracterización de las fibras.

Se realizó la medida de la viscosidad de la disolución polimérica previa a la síntesis, la caracterización morfológica, la distribución de diámetros de las fibras, el rendimiento de la síntesis, la cuantificación de la encapsulación mediante los cálculos de eficiencia encapsulación y la cantidad de fármaco cargado y las interacciones intermoleculares mediante espectroscopía infrarroja según se explica en el apartado 4.2.1.4.

Además, se realizó la medida de ángulo de contacto mediante la adición de una gota de agua destilada sobre las fibras con un equipo Dataphysics de la serie OCA (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania) a temperatura ambiente. La medida de ángulo de contacto se realizó por duplicado.

#### 4.3.1.5. Cuantificación de la liberación *in vitro* del fármaco encapsulado.

El estudio de liberación se realizó según lo descrito en el apartado 4.2.1.5, reemplazando el medio de liberación de PBS por una disolución de PBS y Tween80 2% (v/v) debido a la hidrofobicidad de las membranas que formaban las fibras. También se evaluó el cambio en la morfología de las fibras a lo largo del proceso de liberación mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).

Se realizaron los experimentos de liberación por triplicado y los resultados obtenidos se dan como media y desviación estándar.

Se evaluó mediante microscopía electrónica de barrido la estabilidad de las diferentes fibras tras 14 días en condiciones fisiológicas.

### 4.3.1.6 Estudio *in vitro* de la acción bactericida del fármaco encapsulado.

La acción bactericida de las membranas se realizó tal y como se expresa en el apartado 4.2.1.6, variando las concentraciones ensayadas de 1 a 0.025 mg/mL. Debido a la morfología de las membranas, para ensayar bajas concentraciones de fibras frente a las bacterias en estado exponencial de crecimiento, resultaba complicado obtener muestras de bajo peso, por lo que se aumentaron los volúmenes de ensayo para, así, reducir la concentración. Mediante este aumento de volumen se minimizaba el efecto bactericida por contacto, resultando, en su caso, únicamente efectivo el efecto del antibiótico liberado. También se realizaron los estudios bactericidas de los sobrenadantes de la liberación de las membranas a 24h, 48h y 7 días y a diferentes concentraciones para evaluar el efecto del antibiótico liberado sin la presencia de las fibras en el medio.

Los ensayos *in vitro* de la acción bactericida del fármaco y de las fibras sintetizadas se realizaron por triplicado, con una media de tres réplicas por ensayo.

### 4.3.1.7 Ensayo de viabilidad celular *in vitro*.

Se evaluó la citocompatibilidad de las membranas con líneas celulares Caco2 TC7 y fibroblastos, tal y como se presenta en el apartado 4.2.1.7.

Se estudiaron concentraciones en un rango de 0.1 a 1 mg/mL. El estudio del efecto de concentraciones inferiores a 0.1 mg/mL resultó inviable debido a que los experimentos se realizaron en multiplaca de 24 pocillos, en la que no se pudo aumentar más el volumen de ensayo como se ha explicado en el apartado anterior para tratar de disminuir la concentración. La siembra de bacterias en estas placas se realizó de manera proporcional a la superficie de los pocillos de las diferentes placas (siendo el área de la multiplaca de 96 pocillos 0.32 cm<sup>2</sup> y un diámetro de 6.4 mm y el área de la multiplaca de 24 pocillos 1.9 cm<sup>2</sup>/pocillo y un diámetro de 15.6 mm), es decir  $9.0 \times 10^4$  células Caco2/pocillo y  $3.6 \times 10^4$  células fibroblastos/pocillo.

### 4.3.1.8 Análisis estadísticos.

Se realizó el análisis estadístico de los datos mediante el análisis de la varianza unidireccional y bidireccional (ANOVA) tal y como se indica en el apartado 2.3.1.8.

## 4.3.2 Resultados y discusión.

### Optimización de la síntesis.

Tal y como se ha expuesto en la Tabla 4.6, se fueron modificando variables influyentes en la síntesis de vectores poliméricos mediante técnicas electrohidrodinámicas. Los resultados obtenidos de este proceso de optimización se muestran en la Figura A4.2. El parámetro que

diferencia entre electroespray y electrohilado, para un mismo polímero y un mismo disolvente, es la concentración polimérica. A partir de las micropartículas optimizadas, aumentando la concentración, se obtuvieron fibras y partículas conjuntamente (*beads*) (Figura A4.2-ES32), hasta llegar a una concentración crítica a partir de la cual tan sólo se obtuvieron fibras [505].

La optimización de la síntesis de fibras se llevó a cabo utilizando como disolvente cloroformo y aumentando la concentración de Eudragit® RS100. Se partió de la disolución polimérica de la síntesis de micropartículas, con un valor de viscosidad de  $56.8 \pm 7.8$  mPa/s, y se aumentó hasta que se obtuvo la concentración a la que sólo se obtenían de fibras de manera homogénea, 30% (p/v), con el consecuente aumento de viscosidad alcanzando un valor de  $313.8 \pm 52.6$  mPa/s. La distancia, que se fijó a 10 cm, se aumentó hasta 15 cm porque el cono de Taylor no se estabilizaba correctamente y las fibras obtenidas no se recogían totalmente evaporadas. Con el caudal de trabajo establecido, 0.5 mL/h, se formaba un cono de Taylor estable y se obtuvieron fibras muy homogéneas. Con la finalidad de aumentar la producción final de las fibras, se aumentó a 1 mL/h, formándose también un cono de Taylor estable y se obtuvieron unas fibras homogéneas, por lo que éste último resultó el caudal establecido. Por lo tanto, las condiciones óptimas para la síntesis de fibras fue una concentración polimérica de Eudragit® RS100 al 30% (p/v) disuelta en cloroformo, a un caudal de 1 mL/h y fijando la aguja a 15 cm del colector.

En la Figura A4.2 se encuentra enmarcada en verde la imagen de las fibras obtenidas en las condiciones optimizadas (ES34). Las fibras obtenidas fueron estables, homogéneas y con una superficie libre de poros.

### **Caracterización de las fibras sintetizadas por electrohilado y determinación de la encapsulación de antibióticos modelo.**

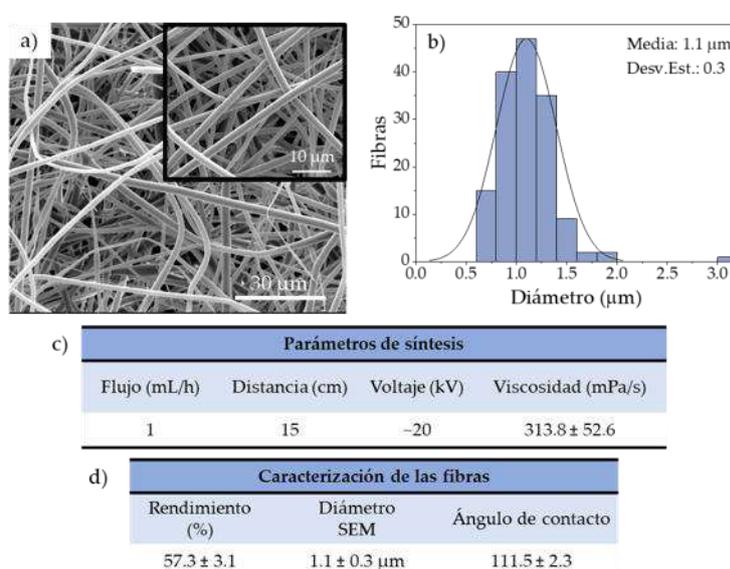
Se sintetizaron membranas compuestas por fibras por electrohilado a partir de una disolución polimérica de Eudragit® RS100 a una concentración al 30% (p/v) disuelto en cloroformo. La velocidad de flujo se fijó a 1 mL/h y la aguja se colocó a una distancia de 15 cm del colector. Se estabilizó el cono de Taylor con una diferencia de voltaje de 20 kV. Las fibras se sintetizaron a temperatura ambiente y con una humedad relativa del 30 al 50%.

Las fibras obtenidas se caracterizaron por SEM (Figura 4.26), resultando tener una distribución de tamaños muy homogénea, siendo el diámetro medio de  $1.1 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$  confirmando, por lo tanto, la estabilización del *jet* en el proceso de síntesis.

El valor del ángulo de contacto fue de  $111.5 \pm 2.3$  °, por lo tanto, las fibras obtenidas presentaban una superficie de carácter hidrófobo. La reducida solubilidad de las fibras resulta altamente favorable para aplicaciones locales a largo plazo. Santocildes-Romero et al. [534] realizaron un estudio en el que comprobaron que las fibras con capacidad mucoadhesiva permanecían periodos de tiempo más prolongados en el lugar de acción cuando la superficie

presentaba propiedades hidrófobas ya que el grado de hidrólisis resultaba menor y, por lo tanto, la consecuente solubilización también, manteniéndose durante tiempos más prolongados en el lugar de acción.

El rendimiento de síntesis resultó inferior en comparación con el de la síntesis de partículas (>90%). Un  $57.3 \pm 3.1\%$  del total de las fibras producidas fueron recogidas en el colector. La reducción en el rendimiento de la síntesis se debe a causas experimentales, es decir, en el proceso de síntesis de las fibras, el cono de Taylor que se forma (Figura A4.11) tiene mayor diámetro que el que se forma en la síntesis por electroespray, y la distancia al colector es mayor. Consecuentemente, las fibras producidas no sólo se recogían sobre el colector, sino que se dispersaban por la cámara electrohidrodinámica.



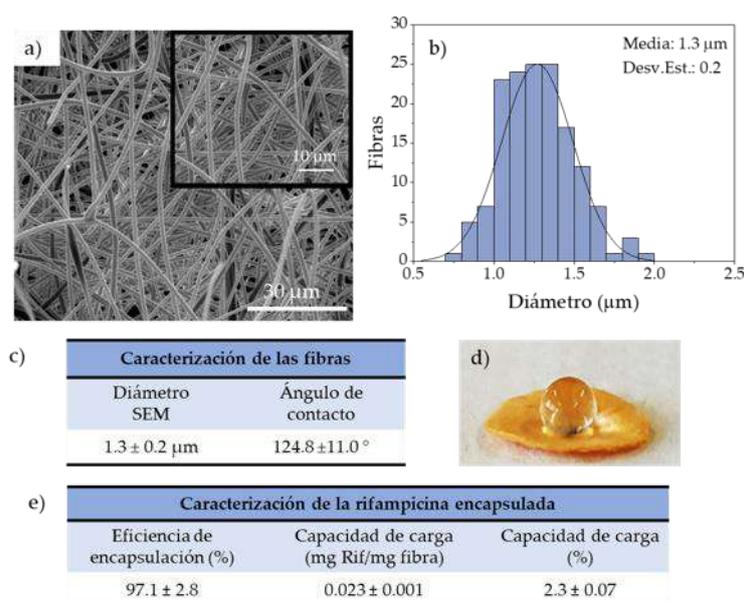
**Figura 4.26** Caracterización de las fibras de Eudragit® RS100 optimizadas y sintetizadas por electrohilado: a) imágenes de la morfología de las fibras de SEM, b) histograma de la distribución de diámetros, c) datos de los parámetros de síntesis y resultados de la caracterización de las fibras.

### Encapsulación de rifampicina.

Se encapsularon diferentes concentraciones de rifampicina entre 2.5 y 10% (p/p) respecto a la masa del polímero. Se realizó el análisis de la cantidad de antibiótico que se encapsulaba por cantidad total de fibra para cada uno de los experimentos propuestos mediante espectroscopía UV-Vis. El trabajo de este apartado de la Tesis Doctoral se realizó a partir de aquellas fibras que mostraron una eficiencia de encapsulación más elevada. En la Figura A4.12 puede observarse que las fibras que mayor capacidad de carga mostraban eran aquellas a las que se añadía el antibiótico al 10% (p/p), sin embargo, se perdía casi la mitad del fármaco en el proceso de síntesis debido a que la cantidad de fármaco añadida era lo suficientemente elevada para que se desestabilizara el cono de Taylor y esto redujera los

valores de eficiencia ( $EE = 57.1 \pm 1.9\%$ ). Por lo tanto, se trabajó paralelamente con un 2.5% y un 5% (p/p), respecto al polímero.

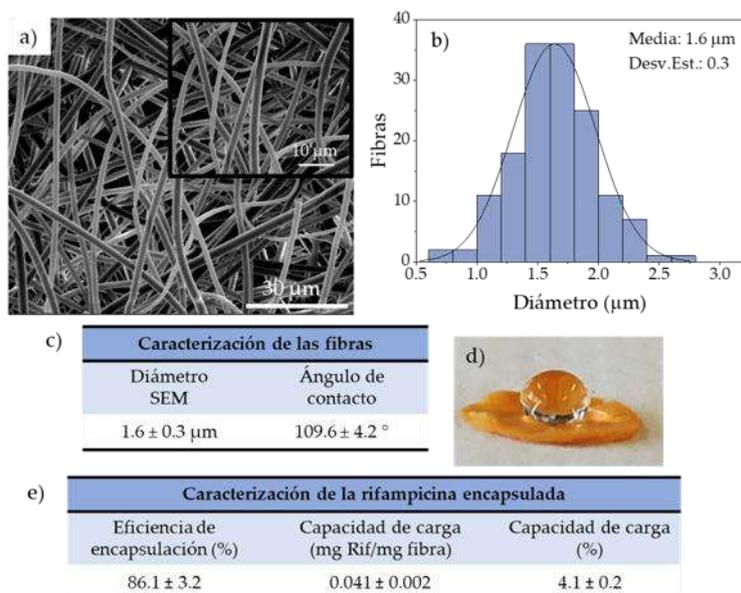
Cuando las fibras se cargaron con una cantidad de 2.5% (p/p) respecto al polímero, se observó un ligero aumento en el diámetro de las fibras respecto a las que no tenían fármaco en su interior ( $1.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ). Este hecho probablemente se debe al aumento de viscosidad al añadir fármaco a la disolución polimérica. El diámetro medio de estas fibras cargadas fue de  $1.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$ , y el valor del ángulo de contacto con el agua se mantuvo bastante similar, siendo el obtenido de  $124.8 \pm 11.0^\circ$ , frente a  $111.5 \pm 2.3^\circ$  de las fibras sin cargar. Según este valor y como se muestra en la Figura 4.27-d, esta membrana obtenida a partir de las fibras con rifampicina encapsulada también mantenía el carácter hidrófobo. Como se indica en la Figura 4.27, la eficiencia de encapsulación calculada fue de  $97.1 \pm 2.8\%$ , alcanzando una capacidad de carga de 0.023 mg de rifampicina por mg de fibra.



**Figura 4.27** Caracterización de la encapsulación de rifampicina al 2.5% (p/p) respecto al polímero en fibras de Eudragit® RS100 30% (p/v) en cloroformo sintetizadas por electrohilado: a) imágenes de la morfología de las fibras se SEM, b) histograma de la distribución de diámetros de las fibras (N=150), c) caracterización de las fibras, d) imagen de una membrana formada por fibras con rifampicina con una gota de agua en la superficie y e) caracterización de la rifampicina encapsulada..

Cuando las fibras se cargaron con una cantidad de 5% (p/p) respecto al polímero, se observó un mayor aumento en el diámetro de las mismas respecto a las que no tenían fármaco en su interior ( $1.1 \pm 0.3 \mu\text{m}$ ). Como se observa en la Figura 4.28, el diámetro medio de estas fibras cargadas fue de  $1.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$ , y el valor del ángulo de contacto con el agua se mantuvo bastante similar, siendo el obtenido de  $109.6 \pm 4.2^\circ$ , frente a  $111.5 \pm 2.3^\circ$  de las fibras sin cargar. Según este valor y como se muestra en la Figura 4.28-d, la membrana obtenida a partir de las fibras con rifampicina encapsulada mantenía el carácter hidrófobo. La eficiencia de

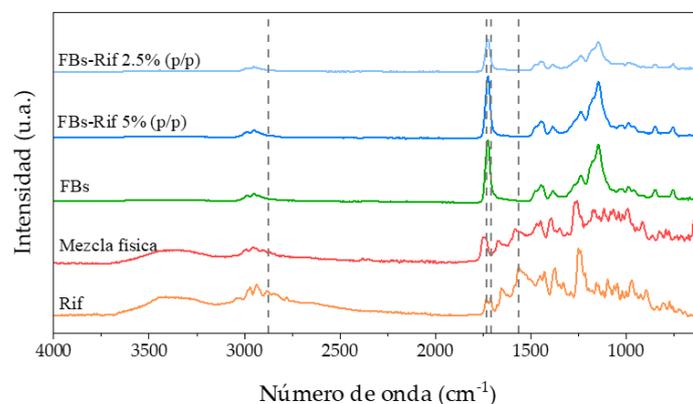
encapsulación calculada fue de  $86.1 \pm 3.2\%$ , alcanzando una capacidad de carga de  $0.041 \text{ mg}$  de rifampicina por  $\text{mg}$  de fibra.



**Figura 4.28** Caracterización de la encapsulación de rifampicina al 5% (p/p) respecto al polímero en fibras de Eudragit® RS100 30% (p/v) en cloroformo sintetizadas por electrohilado: a) imágenes de la morfología de las fibras se SEM, b) histograma de la distribución de diámetros de las fibras (N=150), c) caracterización de las fibras, d) imagen de una membrana formada por fibras con rifampicina con una gota de agua en la superficie y e) caracterización de la rifampicina encapsulada..

Del mismo modo que se realizó un estudio de las posibles interacciones que podrían formarse entre el polímero y el antibiótico en la síntesis de partículas por electroespray mediante FTIR, se realizó un estudio en la síntesis de fibras por electrohilado y la encapsulación de rifampicina. En la Figura 4.29 pueden observarse los espectro de ambas concentraciones de rifampicina ensayadas (azul), comparando las señales de la del espectro obtenido de la rifampicina en su forma polvo libre (naranja) y de las fibras sin antibiótico (verde) y de la mezcla física de ambos (rojo).

Al igual que en las partículas con rifampicina encapsulada, se observan los picos característicos tanto de la rifampicina como del polímero en el espectro de la mezcla física. Sin embargo, el espectro del polímero predomina en las fibras cargadas con el antibiótico, siendo imposible detectar la presencia de rifampicina debido a que la sensibilidad del método no resulta suficiente para detectar cantidades de fármaco tan reducidas, como se observó en el Capítulo III. Por lo tanto, no se pueden descartar interacciones entre el polímero y el antibiótico, de la misma forma que no se puede asegurar la presencia de las mismas.



**Figura 4.29** Espectros FTIR de las fibras-Rif. Se muestra el espectro de rifampicina (línea naranja) con los picos característicos con líneas punteadas, de las fibras con 2.5% (p/p) de rifampicina encapsulada (línea azul claro), de las fibras con 5% (p/p) de rifampicina encapsulada (línea azul oscura) y de las fibras sin antibiótico (línea verde) y la mezcla física del antibiótico y de las fibras (línea roja).

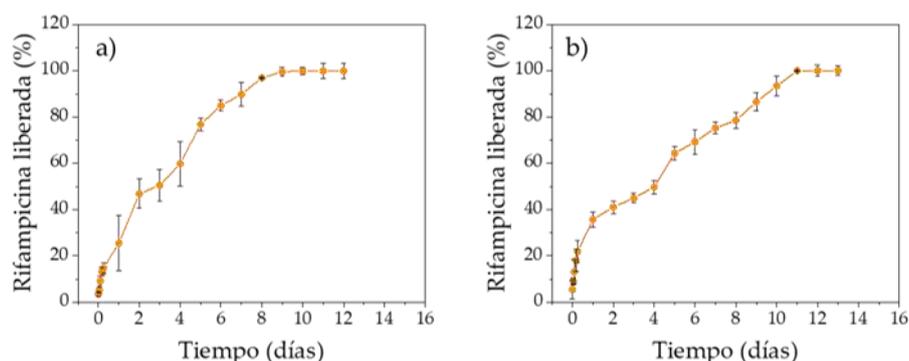
### Cuantificación de la liberación *in vitro* del fármaco encapsulado.

Se estudiaron los perfiles de liberación de las fibras con las diferentes cantidades de rifampicina encapsulada, 5 y 2.5% (p/p). Se llevaron a cabo los experimentos de liberación *in vitro* durante un total de 14 días hasta alcanzar la liberación total del fármaco encapsulado.

Debido a la hidrofobicidad de la membrana, se presentaban dificultades a la hora de que entrase en contacto con el medio de liberación compuesto únicamente por PBS, dificultando así la difusión y liberación de rifampicina contenida. Todo ello no facilitaba el proceso de cuantificación. Debido a esto, se añadió al medio de liberación Tween80 2% (p/v), medida que está recomendada para adaptar el medio de liberación *in vitro* cuando el vector y el fármaco presentan carácter hidrofóbico [535].

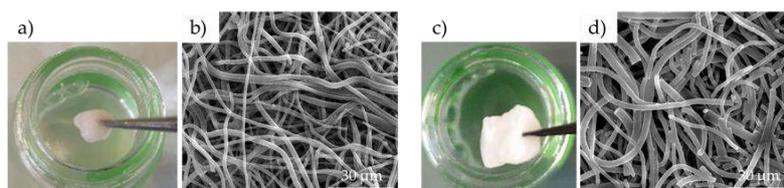
Se observó una liberación del fármaco encapsulado durante las 2h de incubación en fluido gástrico simulado de un  $3.5 \pm 0.7\%$  y un  $5.4 \pm 4.0\%$  para las fibras con una concentración de rifampicina de 2.5% y 5% (p/p) respecto al polímero, respectivamente. Posteriormente se llevó a cabo la cuantificación de la liberación en medio el medio intestinal. En la Figura 4.30 se muestran las curvas de liberación de ambas concentraciones de rifampicina encapsulada en las fibras de Eudragit® RS100. Se observa en ambos casos que se produce una liberación del fármaco mucho más rápida durante las primeras horas. En el caso de la rifampicina a una concentración de 2.5% (p/p), se liberó alrededor de un 26% durante las primeras 24 horas (Figura 4.30-a), mientras que en el caso de la rifampicina a una concentración de 5% (p/p), se cuantificó un total de fármaco liberado de alrededor del 35% del total encapsulado en las primeras 24 horas (Figura 4.30-b), dándose la liberación del resto del fármaco de manera más paulatina. Estos perfiles de liberación parecen encajar con una liberación inicial del fármaco más expuesto en la superficie de las fibras.

Si comparamos estos resultados con los expuestos en el apartado anterior 4.2.2 de las partículas (en los que se mostraba como en 75 días no se liberaba más del 50% de la rifampicina encapsulada), puede deducirse que en este caso el fármaco se encuentre distribuido por la parte más externa de las fibras y gracias al agregado de un surfactante, se consigue una liberación controlada pero más eficaz.



**Figura 4.30** Perfiles de liberación de las fibras de Eudragit® RS100 con a) 2.5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero y b) 5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero.

En las imágenes de la Figura 4.31 se observa que, tras 14 días de liberación, la matriz polimérica no se degradó (a y c), sin embargo, perdió totalmente la coloración anaranjada debido a la rifampicina contenida. Dicha observación se ve apoyada en las imágenes de SEM (b y d), mediante las cuales se pudo comprobar que las fibras no se habían degradado en el medio de liberación, ni tan siquiera se había visto modificada su morfología, tan sólo aparecieron algunas fragmentadas y su diámetro se vio ligeramente aumentado. Sin embargo, la pérdida total de la coloración coincide con las curvas de liberación en las que se vio que en 14 días se había dado la liberación de la totalidad del fármaco encapsulado. Una posible hipótesis de esta rápida liberación es que, en este caso, el fármaco se encuentra de forma más superficial en las fibras. Además, el hecho de que no se aglomeren como ocurría con las partículas, también favorece la liberación total del fármaco contenido ya que el agregado polimérico dificulta la difusión del fármaco.



**Figura 4.31** Imágenes de las membranas tras 14 días en contacto con el medio de liberación PBS/Tween80: a) con 2.5% (p/p) rifampicina b) su respectiva imagen de SEM, c) con rifampicina 5% (p/p) y d) su respectiva imagen de SEM.

Mediante los ajustes matemáticos de primer orden, Higuchi, Peppas-Sahlin, Lindner-Lippold y Korsmeyer-Peppas. (Figura A4.13), se estudiaron los mecanismos que contribuían a cada una de las liberaciones, de la misma manera que se explica en el Capítulo II.

El mejor ajuste matemático para las cinéticas de liberación de las membranas con una concentración de 2.5% (p/p) y de 5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero ( $R^2 = 0.998$   $R^2 = 0.995$ , respectivamente), como se indica en la Tabla 4.9, fue la ecuación propuesta por Peppas-Sahlin [518] para ambos casos, reflejando una liberación mediante difusión (constante  $k_1$ ) y una aportación del hinchamiento de las cadenas poliméricas ( $k_2$ ), siendo predominante la contribución de la difusión sobre el hinchamiento polimérico debido (siendo  $k_1$  mucho mayor que  $k_2$ , cuyo valor es negativo, siendo  $k_1 = 36.0$  y  $43.2$  y  $k_2 = -2.7$  y  $-9.4$ , para 2.5 y 5% (p/p) respectivamente).

Ambos ajustes coinciden en un valor del coeficiente  $n$  distinto de 0.5, descrito para una liberación dominada por una difusión de Fick. Este valor refleja que la difusión que gobierna ambas liberaciones se da de forma anómala, debido probablemente a que el medio de liberación no llegue a todas las fibras por igual, siendo la zona interna menos accesible y dándose la difusión del fármaco depositado en este punto más lenta que aquel que se encuentre en otra zona más accesible [536].

**Tabla 4.9** Valores de los diferentes parámetros y de los coeficientes de correlación de los mejores modelos matemáticos ajustados a los perfiles de liberación *in vitro*.

Vector	Modelo matemático	Ecuación*	Parámetros
30% (p/v) cloroformo Rif 2.5% (p/p)	Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^{2n}$	$R^2 = 0.998$ $k_1 = 36.0$ $k_2 = -2.7$ $n = 0.59$
30% (p/v) cloroformo Rif 5% (p/p)	Peppas-Sahlin	$\frac{M_t}{M_\infty} = k_1 t^n + k_2 t^{2n}$	$R^2 = 0.995$ $k_1 = 43.2$ $k_2 = -9.4$ $n = 0.46$

Por lo tanto, se puede concluir con que la liberación del fármaco contenido en las fibras de Eudragit® RS 100 es liderado por el proceso de difusión a través del polímero. Debido a que el polímero no se degrada a lo largo del proceso de liberación, algunas fibras más internas de la membrana resultan menos accesibles, por lo que no se da la liberación desde toda la superficie por igual, dando lugar a una difusión anómala. Estos perfiles de liberación en los que se da una liberación rápida en un primer momento y ralentizada posteriormente coincide con la de algunas membranas basadas en polímeros acrílicos (PMMA). En un estudio realizado

por Zupancic et al., explican cómo puede modificarse esta liberación para hacerla más rápida con la adición de otros polímeros hidrofílicos [537]. Pero en vista de los resultados obtenidos, las membranas poliméricas con antibiótico encapsulado resultan idóneas para el tratamiento de infecciones localizadas a largo plazo, sin necesidad de modular la cinética de liberación. Resulta altamente atractivo el perfil antimicrobiano en el que, durante las primeras horas, se libera tanto antibiótico hasta alcanzar la MBC, y que posteriormente se mantenga esta concentración de manera prolongada en el tiempo [538].

### **Estudio in vitro de la acción bactericida del fármaco encapsulado.**

Para poder evaluar el efecto bactericida de las fibras con y sin antibiótico en su interior, como se presenta en el apartado 4.2.2, se evaluó la concentración mínima que inhibía el crecimiento bacteriano y la que ejercía un efecto bactericida, habiendo sido ensayada la rifampicina libre en el Capítulo III (Figura A3.4). Se estudió si el fármaco encapsulado se liberaba de forma efectiva y se veía influenciado en su estructura y, por lo tanto, en su actividad antimicrobiana. Para ello se pusieron en contacto las membranas con y sin antibiótico con las bacterias *S. aureus* durante 24h a 37 °C en movimiento constante (150 rpm).

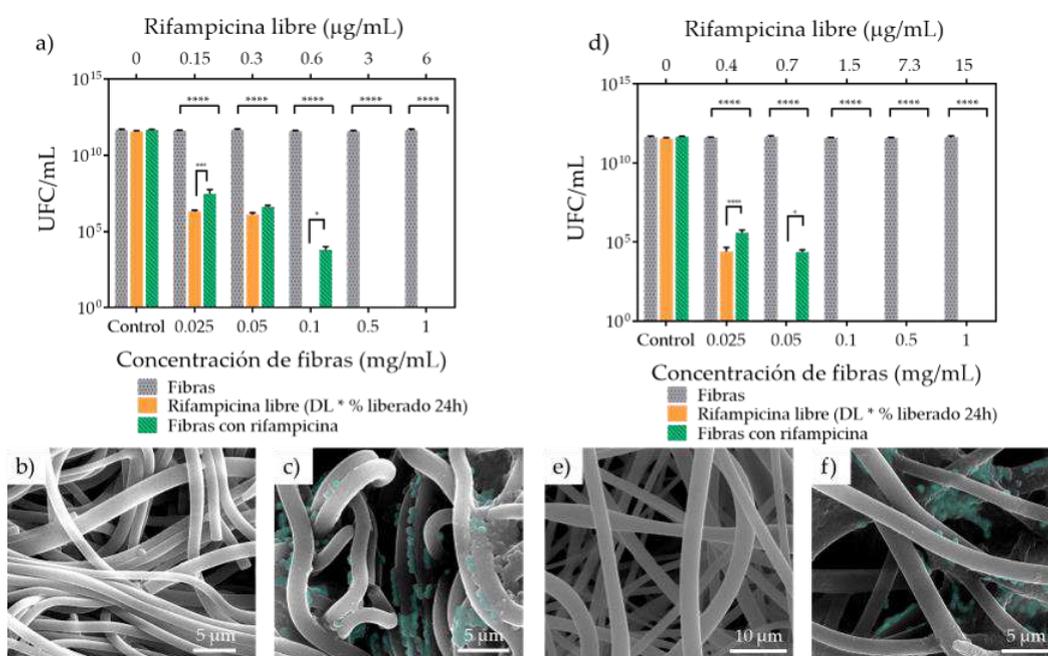
En la Figura 4.32 se puede observar que las fibras sin antibiótico no ejercían efecto bactericida por sí mismas, permitiendo que las bacterias creciesen hasta alcanzar su fase estacionaria de crecimiento, al igual que las bacterias control.

Cuando se evaluó el efecto bactericida de las membranas con 2.5% (p/p) (Figura 4.32-a) y 5 % (p/p) (Figura 4.32-d) de rifampicina respecto al polímero se observaron diferencias significativas entre el fármaco libre y el encapsulado en las fibras, mostrando mayor efecto la rifampicina libre. En el caso de las fibras cargadas con un 2.5% (p/p) de rifampicina (Figura 4.32-a), para una concentración de 0.5 y 1 mg/ml de fibras (correspondiente a concentraciones de rifampicina liberada mayor a 3 µg/mL, superior a la concentración MBC) se observa una acción bactericida total tanto de las fibras como del antibiótico libre. Sin embargo, a concentraciones de fibras más bajas, de 0.1 mg/mL a 0.025 mg/mL fibras (correspondiente a concentraciones de rifampicina liberada de 0.6 a 0.15 µg/mL, cercanas a la concentración MIC) se observa una actividad antimicrobiana mayor del antibiótico libre que del encapsulado en las fibras. Igualmente ocurre en el experimento de las fibras cargadas con un 5% (p/p) (Figura 4.32-d) para las concentraciones de 1 a 0.1 mg/mL (correspondiente a concentraciones mayores a 1.5 µg/mL de rifampicina teóricamente libre, superior a la concentración MBC) son capaces de inhibir completamente el crecimiento bacteriano, de la misma forma que actúa el antibiótico libre. Por el contrario, para concentraciones menores (0.05 y 0.025 mg/mL de fibras, correspondiendo a concentraciones de rifampicina teóricamente liberada de 0.7 a 0.4 µg/mL) la actividad del fármaco libre resulta significativamente mayor que la del fármaco liberado de las fibras.

Este hecho, posiblemente, se deba a que el antibiótico difunde, como se ha visto, de manera anómala. Esta difusión anómala podría ser debida a la dificultad a la que el fármaco

se ve expuesto en la liberación desde las zonas más interiores de las membranas hidrófobas, lo que hace que el antibiótico se encuentre menos accesible para las bacterias. Como puede apreciarse en las imágenes de SEM (Figura 4.32-b y e), a la concentración de 0.5 mg/mL no se observaron bacterias adheridas a las fibras ya que la concentración liberada superaba la MBC del fármaco. Sin embargo, en las imágenes correspondientes a la concentración de 0.025 mg/mL de fibras, aunque las concentraciones de rifampicina superiores a la concentración MIC, (Figura 4.32-c y f), las bacterias quedaban adheridas a las fibras, lo que seguramente ralentizaba la difusión del antibiótico al medio exterior y necesitaba más de tiempo para alcanzar la cantidad teóricamente liberada. Además, el procedimiento experimental puede influir en los resultados obtenidos de la actividad antimicrobiana de las fibras, puesto que, debido a su morfología, las concentraciones reducidas implican un aumento del volumen del ensayo y, con ello, el antibiótico liberado de las fibras puede alcanzar la población bacteriana de manera más lenta o desigual.

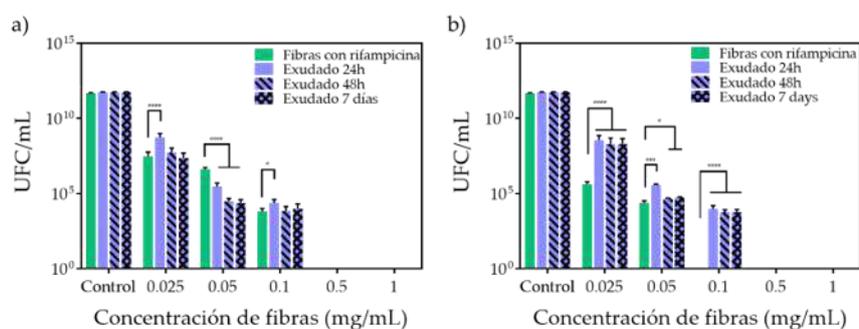
Por lo tanto, el antibiótico encapsulado en las fibras parece no haber sufrido ningún tipo de modificación estructural que afectase a su actividad antimicrobiana, ya que, aunque no coincide su concentración teórica libera con la actividad que se debería apreciar, el fármaco sigue mostrando actividad.



**Figura 4.32** Viabilidad de *S. aureus* en presencia de fibras vacías, antibiótico libre (concentración teóricamente liberada en el tiempo de contacto con las bacterias, 24h) y fibras con antibiótico (\* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001, \*\*\*\* p<0.0001). a) con 2.5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero, b y c) imágenes de SEM de *S. aureus* (coloreadas de verde) en contacto con 0.5 mg/mL y 0.025 mg/mL de fibras respectivamente, d) con 5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero, e y f) imágenes de SEM de *S. aureus* (coloreadas de verde) en contacto con 0.5 mg/mL y 0.025 mg/mL de fibras respectivamente.

Por otro lado, se evaluó si había influencia por el contacto entre las bacterias y las fibras. En la Figura 4.33 se muestran los resultados de la puesta en contacto de los sobrenadantes de la liberación y las fibras conteniendo el antibiótico con *S. aureus*. Para ambas fibras con distintas concentraciones de antibiótico encapsulado en las fibras, se observaron diferencias significativas cuando se comparó la viabilidad bacteriana en presencia y ausencia de las membranas. El crecimiento bacteriano fue mayor cuando no se encontraban presentes las fibras en el medio. En el caso de las fibras con una concentración de rifampicina del 2.5% (p/p) respecto al polímero, sin embargo, se observa el efecto contrario en el caso de la concentración de fibras 0.05 mg/mL, para la cual se observa mayor actividad antimicrobiana del sobrenadante que la de las fibras. Este comportamiento puede ser debido a la difusión anómala del antibiótico. Para el caso de las fibras cargadas con un 5% (p/p) de rifampicina respecto al polímero, se observa mayor actividad antibacteriana cuando las membranas están presentes. Por lo tanto, se observa efecto de contacto entre la membrana y las bacterias, siendo más eficaz en el caso de las fibras con mayor carga de antibiótico, teoría que se refuerza con las imágenes de SEM de Figura 4.32-c y f, en las que se observan las bacterias adheridas en la superficie de las fibras.

Terada et al. [539] estudiaron el efecto de las cargas positivas de grupos amino insertadas en superficies poliméricas. Pudieron comprobar que cuanto mayor era el valor de esas cargas positivas, mayor era la velocidad de adhesión de las bacterias a dichas superficies, pero no por ello se veía inhibido el crecimiento bacteriano.



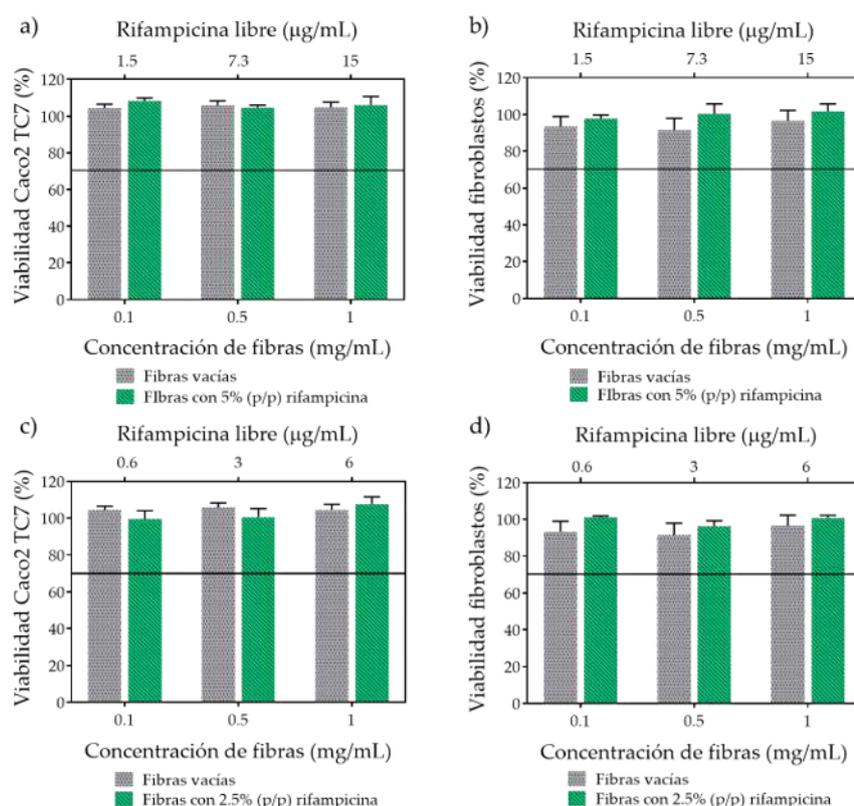
**Figura 4.33** Viabilidad de *S. aureus* en presencia de fibras con antibiótico y los sobrenadantes de liberación de las fibras tras 24h, 48h y 7 días (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). a) 2.5% (p/p) de rifampicina, b) 5% (p/p) de rifampicina.

### Ensayo de viabilidad celular in vitro.

Con la finalidad de evaluar la citocompatibilidad de las fibras con células representativas del epitelio intestinal se pusieron en contacto dichas fibras con células Caco2 TC7 y con fibroblastos.

Como ya se ha explicado, un material es citotóxico cuando reduce la viabilidad celular en más de un 30% respecto al control sin tratar, como indica la norma internacional ISO 10993-5. Tal y como se muestra en la Figura 4.34, tanto las fibras con un 5% (p/p) como las que

contenían un 2.5% (p/p) resultaron altamente citocompatibles para todas las concentraciones ensayadas. Tanto para las células Caco2 TC7 (a y c), como para los fibroblastos (b y d), se obtuvieron viabilidades celulares cercanas al 100% respecto a las células sin tratar. Este hecho también apoya a la teoría de que las partículas anteriormente estudiadas no ejercían efecto citotóxico alguno, sino que la observada reducción de la viabilidad celular se debía a la manipulación experimental. En este caso, las fibras resultaban mucho más fáciles de retirar del medio y, por eso, no se despegaban células del fondo del pocillo en el proceso de lavado.



**Figura 4.34** Viabilidad celular de las fibras de Eudragit® RS100 en células Caco2 TC7 y fibroblastos. Los resultados se presentan como media  $\pm$  DE (n=4). La viabilidad del 100% fueron células control no tratadas. a) 2.5% (p/p) de rifampicina en Caco2 TC7, b) 2.5% (p/p) de rifampicina en fibroblastos, c) 5% (p/p) de rifampicina en Caco2 TC7 y d) 5% (p/p) de rifampicina en fibroblastos.

En otros estudios realizados, los parches basados en membranas de Eudragit® RS100 o de polímero metacrílicos (PMMA) tampoco presentaban incompatibilidades celulares. Colley et al. comprobaron que membranas de 0.4-0.5 g totales no eran citotóxicas sobre queratinocitos orales FNB6-TERT, además de que se trataba de un material no irritante (test de irritación OECD) y tampoco producían daño epitelial en ensayos *in vivo* [540]. Por otra parte, se determinó la buena viabilidad celular de fibroblasto L929 en presencia de membranas de aproximadamente 5 mg de PMMA [541] y, Liu et al., observaron cómo los fibroblastos

dérmicos humanos adultos proliferaban sobre  $90 \mu\text{m}^2$  de fibras poliméricas de PMMA e incluso eran capaces de orientarse en función de la distribución de las fibras [542]. Por otra parte, del antibiótico rifampicina sí que se conocen resultados nocivos para la viabilidad celular en osteoblastos (para dosis 25-100  $\mu\text{M}$ ) [530], pero sin embargo no resultó tóxica sobre células de carcinoma de hígado, para dosis de 5 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [442], o macrófagos, en dosis de hasta 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  [529], como ya se ha mencionado anteriormente.

### 4.3.3 Conclusiones.

En esta sección de la Tesis Doctoral se han sintetizado fibras mediante la técnica de electrohilado. Se optimizaron los parámetros de síntesis a partir de la síntesis de micropartículas, principalmente la concentración polimérica, para poder obtener únicamente fibras. Mediante la misma técnica, se encapsuló el antibiótico rifampicina de fármaco modelo. Se obtuvieron fibras de diámetro de  $1.3 \pm 0.2 \mu\text{m}$  y un ángulo de contacto de  $124.8 \pm 11.0^\circ$ , en las que se encapsuló rifampicina con una eficiencia de encapsulación del  $97.1 \pm 2.8\%$  y una capacidad de carga del  $2.3 \pm 0.07\%$ . Por otro lado, se obtuvieron membranas compuestas por fibras con un diámetro de  $1.6 \pm 0.3 \mu\text{m}$  y un ángulo de contacto de  $111.5 \pm 2.3^\circ$ , que se cargaron con una eficiencia de encapsulación del  $86.1 \pm 3.2\%$  y una capacidad de carga del  $4.1 \pm 0.2\%$  de rifampicina.

Las moléculas de rifampicina encapsuladas se liberaban mediante un proceso de difusión anómala. Se comprobó que el antibiótico liberado de las fibras no sufrieron modificaciones estructurales, ya que mantenían su actividad bactericida. Sin embargo, para bajas concentraciones de fibras de ambas concentraciones (0.05 y 0.025  $\text{mg}/\text{mL}$ ) presentaron menor actividad antimicrobiana que el fármaco libre teóricamente liberado. Cuando la concentración de fármaco teóricamente liberada superaba la concentración MBC (0.5 y 1  $\text{mg}/\text{mL}$  de fibras, correspondientes a concentraciones superiores a 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), las fibras presentaron una acción antimicrobiana total. Se observó efecto de contacto entre las membranas y las bacterias siendo, en presencia de las fibras, cuando se observaba mayor actividad antibacteriana en el caso de ambas fibras cargadas con las diferentes cantidades de antibiótico.

Se confirmó una elevada citocompatibilidad de las fibras, hasta concentraciones de 1  $\text{mg}/\text{mL}$ , con líneas celulares Caco2 TC7 y con fibroblastos.

Como conclusión, las fibras sintetizadas en esta Tesis Doctoral por electrohilado presentan propiedades altamente interesantes para su aplicación como vector de liberación controlada, sostenida y localizada, en este caso, de antibióticos modelo. La hidrofobicidad permite la liberación prolongada en el tiempo y, por lo tanto, la acción a largos tiempos, el efecto de contacto entre la membrana y las bacterias acentúan la actividad terapéutica del antibiótico y la elevada citocompatibilidad hace de estas membranas unos vectores

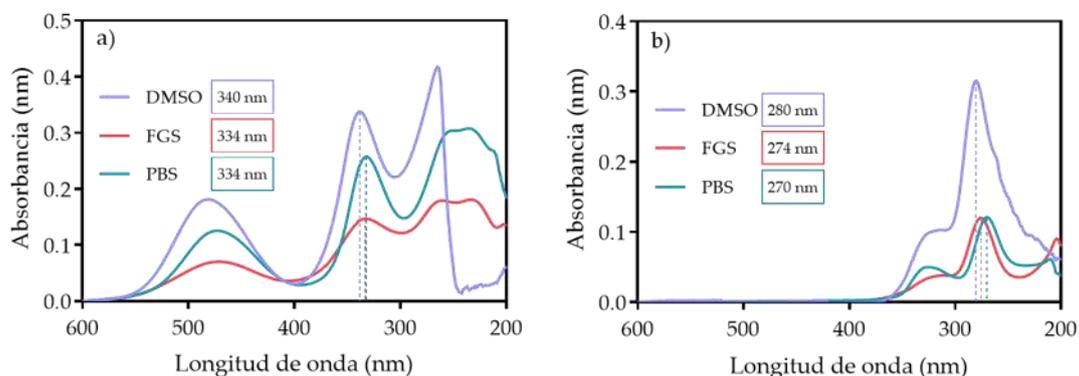
## TÉCNICAS ELECTROHIDRODINÁMICAS.

potencialmente interesantes para su aplicación biomédica en apósitos bucales, vaginales, intestinales o, incluso, tópicos, como tratamiento localizado de infecciones, tanto agudas como crónicas.

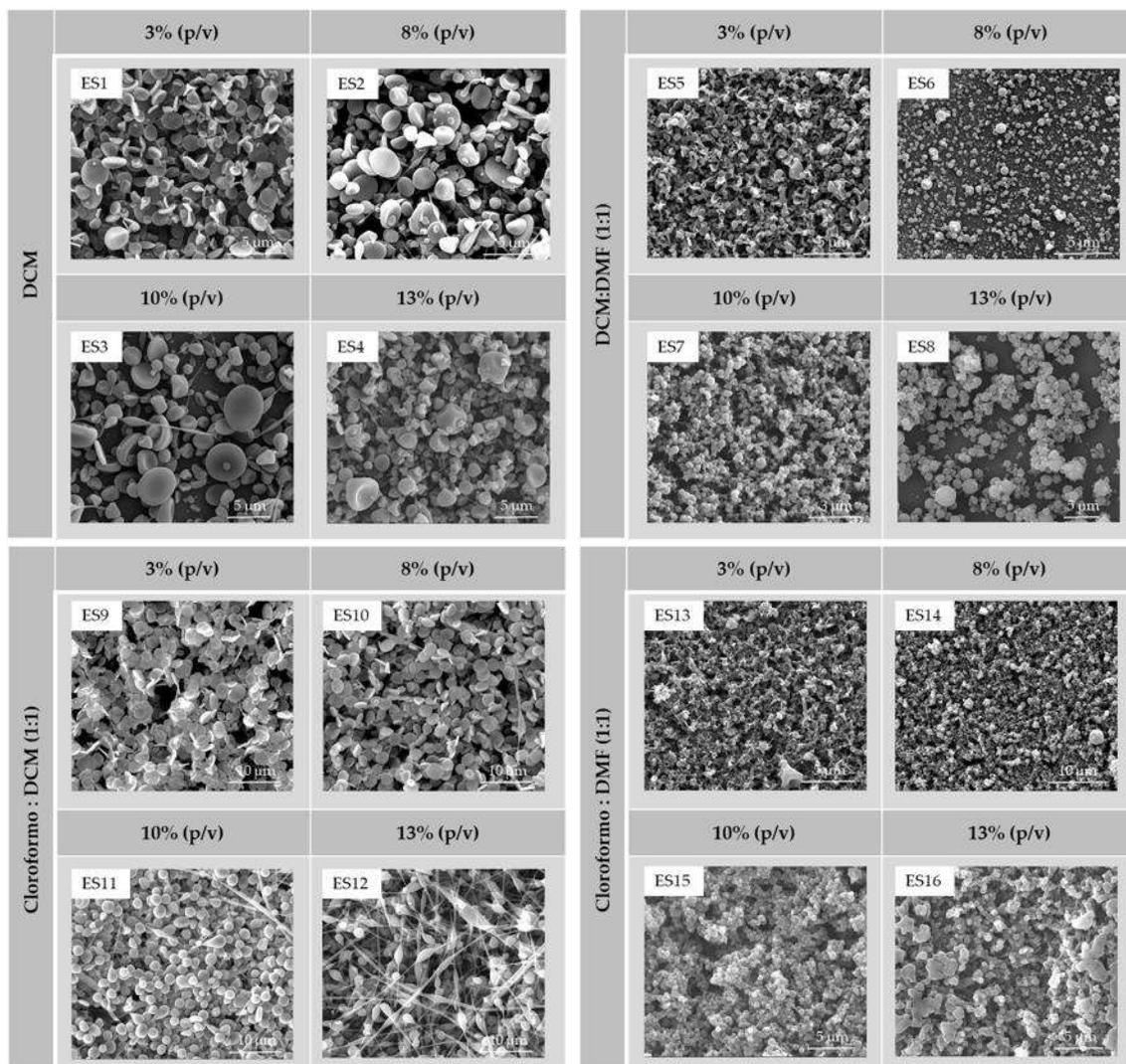


**Anexo IV.**

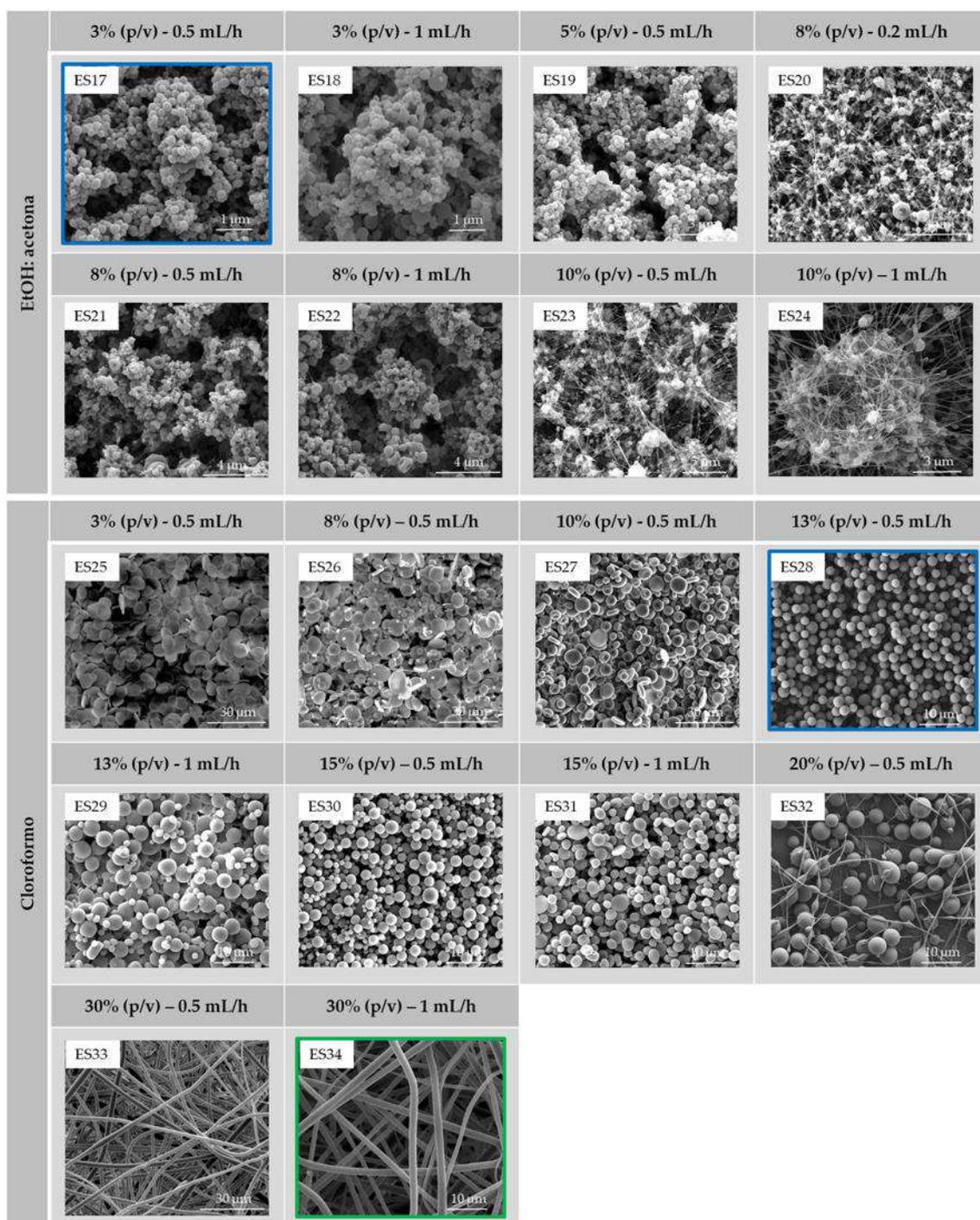




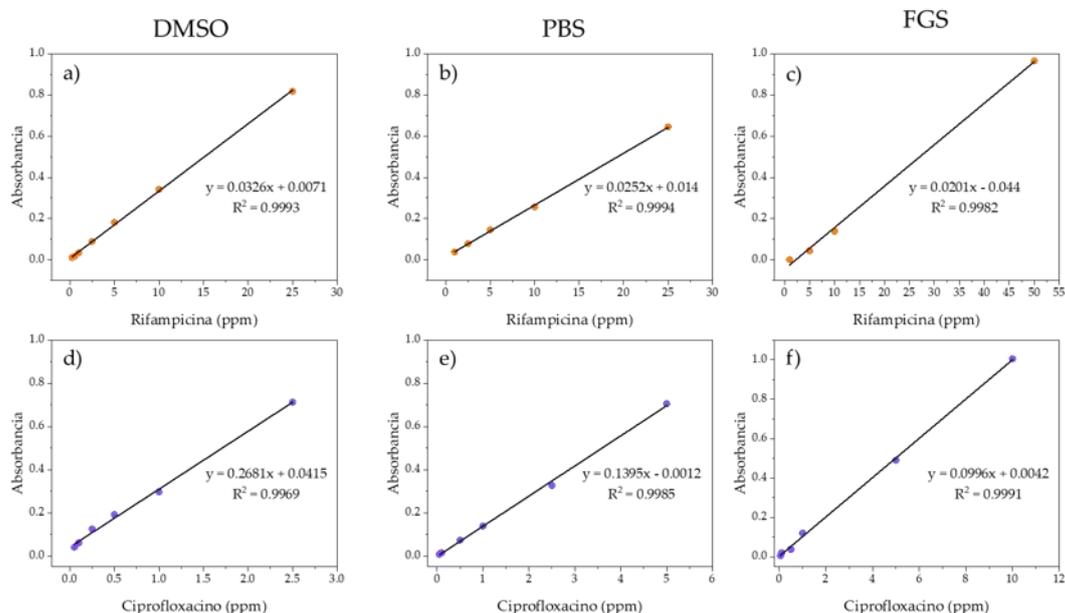
**Figura A4.1** Espectros ultravioleta-visible en DMSO, fluido gástrico simulado (FGS) y PBS de los fármacos a) rifampicina y b) ciprofloxacin. Se indican los máximos de absorbancia empleados en las cuantificaciones de cada uno de los antibióticos.



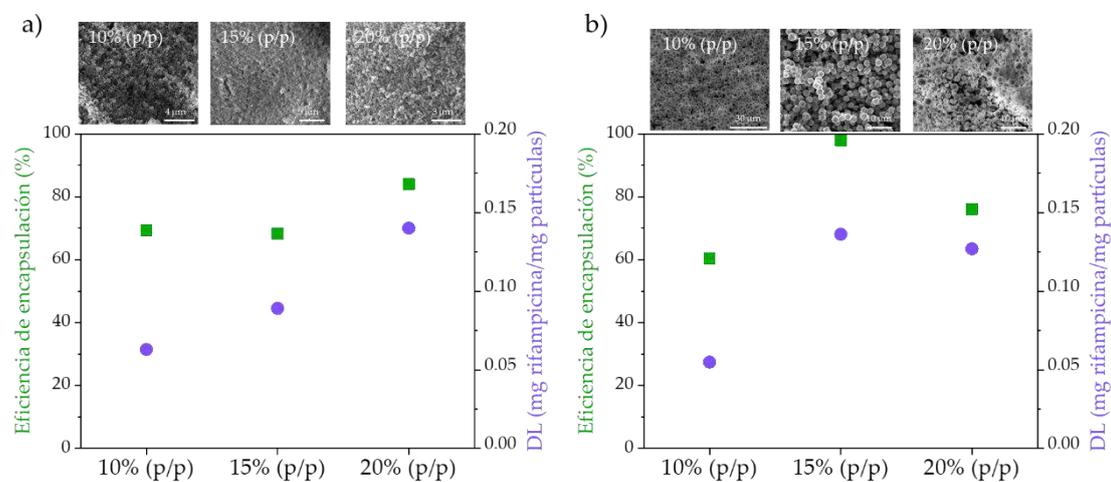
## Anexo IV.



**Figura A4.2** Optimización de la síntesis de por electro spray para la encapsulación de fármacos. Las condiciones de síntesis de partículas empleadas en esta Tesis Doctoral se encuentran marcadas en azul y de las fibras en verde.

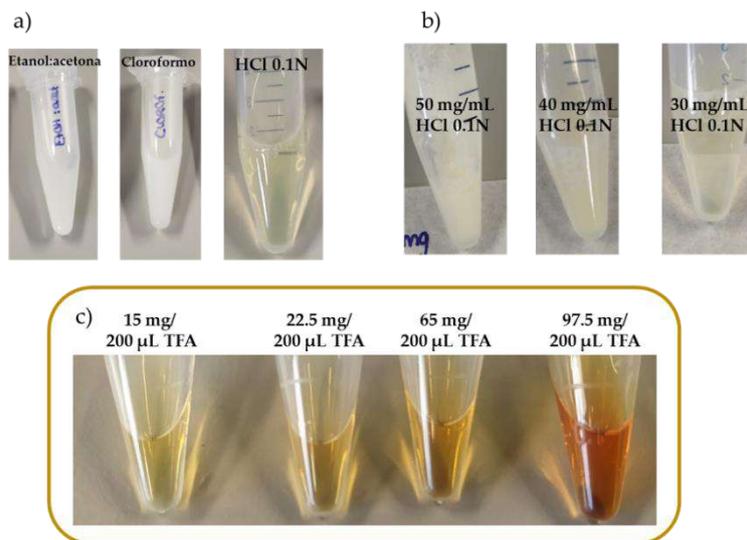


**Figura A4.3** Rectas de calibrado de los fármacos encapsulados obtenidas de las medidas de UV-Vis: a) rifampicina en DMSO, b) rifampicina en PBS, c) rifampicina en fluido gástrico simulado (FGS), d) ciprofloxacino en DMSO, e) ciprofloxacino en PBS y f) ciprofloxacino en FGS.

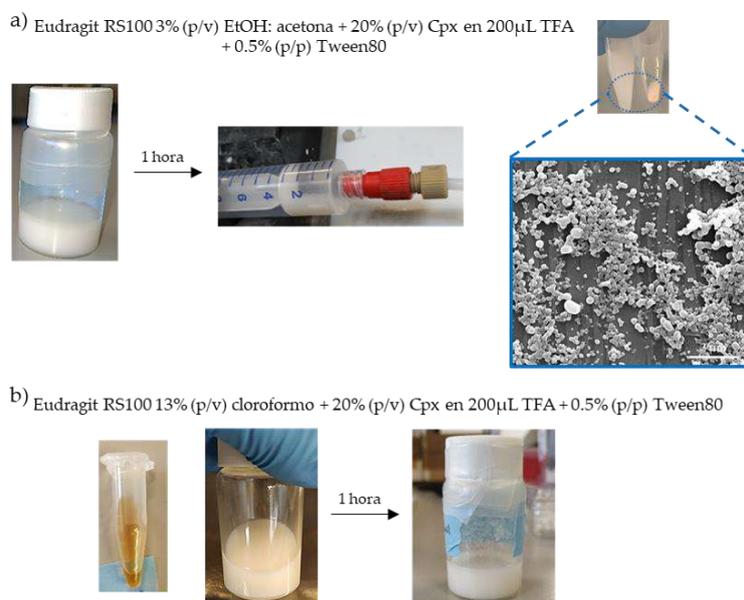


**Figura A4.4** Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de las diferentes pruebas de optimización de la cantidad de antibiótico: a) sub-MPs Eudragit RS100 3% (p/v) en etanol:acetona y b) MPs de Eudragit RS100 13% (p/v) en cloroformo.

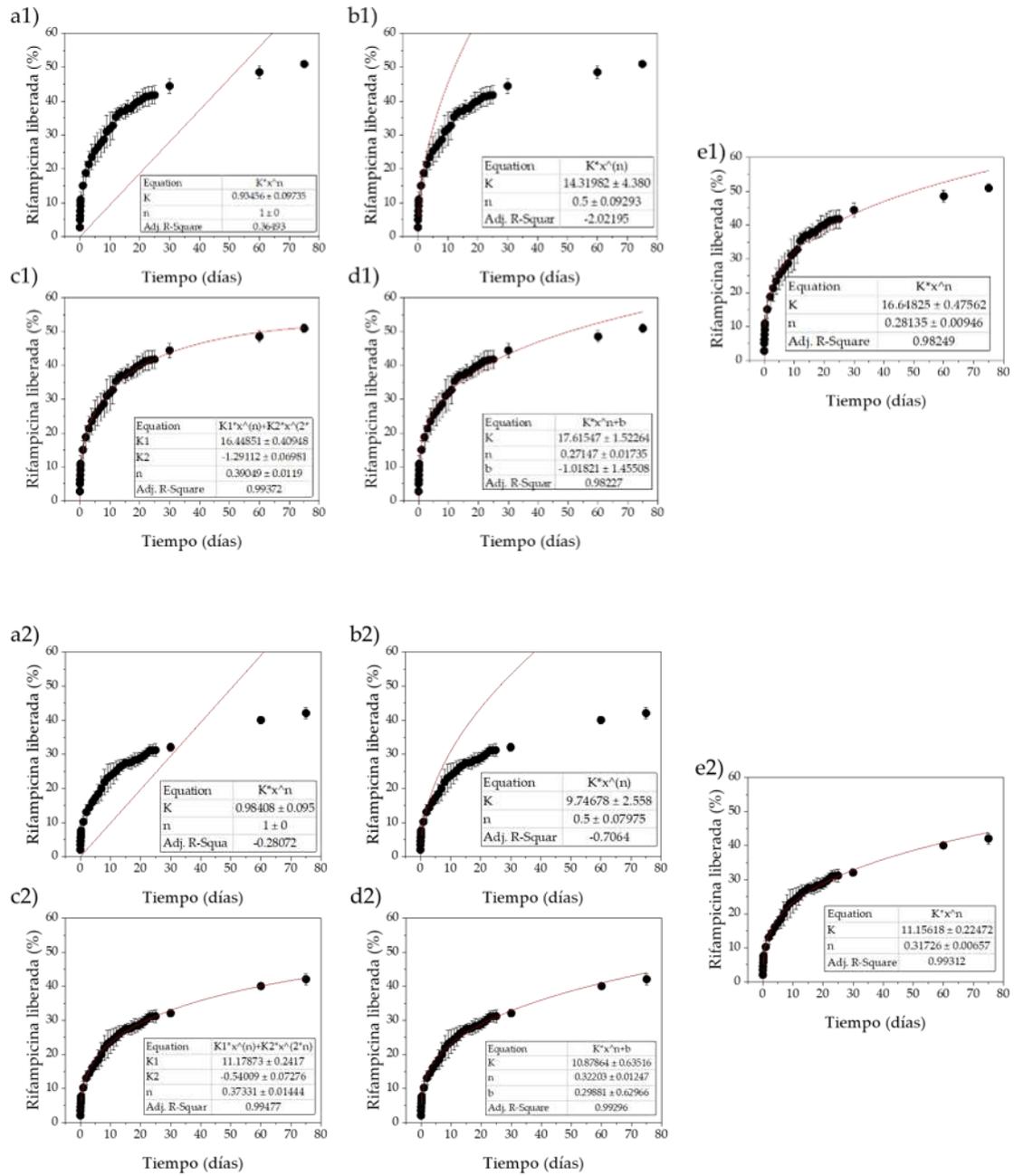
## Anexo IV.



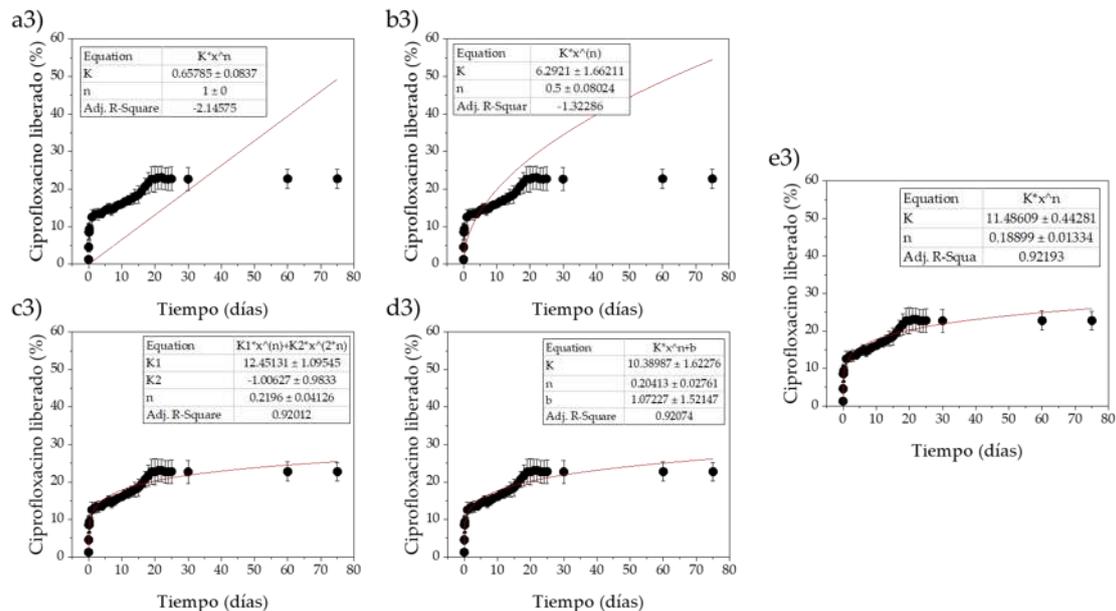
**Figura A4.5** a) Pruebas de solubilidad del antibiótico ciprofloxacino en etanol:acetona, cloroformo y HCl 0.1N. b) Pruebas de solubilidad máxima en HCl 0.1N. c) Pruebas de solubilidad máxima en TFA.



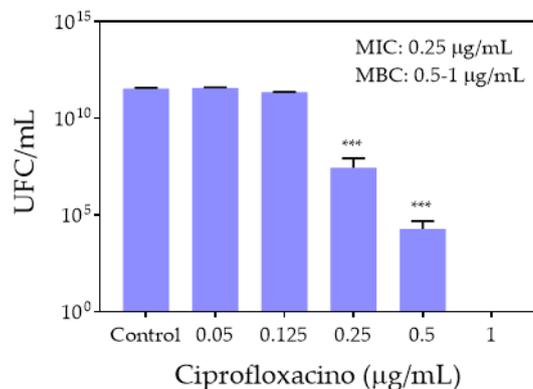
**Figura A4.6** a) Caracterización de la síntesis de sub-MPs por nanoprecipitación tras preparar la disolución polimérica para encapsular ciprofloxacino de Eudragit RS100. b) Emulsión estable previa al electrosprayado de micropartículas con ciprofloxacino encapsulado.



## Anexo IV.



**Figura A4.7** Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación: a) Primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold y e) Korsmeier-Peppas, de los sistemas de liberación obtenidos por electrospay: a1-e1) sub-MPs + rifampicina 20% (p/p), a2-e2) MPs + rifampicina 15% (p/p) y a3-e3) MPs + ciprofloxacino 15% (p/p).



**Figura A4.8** Gráfica de los resultados experimentales de la supervivencia de la bacteria *S. aureus* frente al antibiótico libres ciprofloxacino.

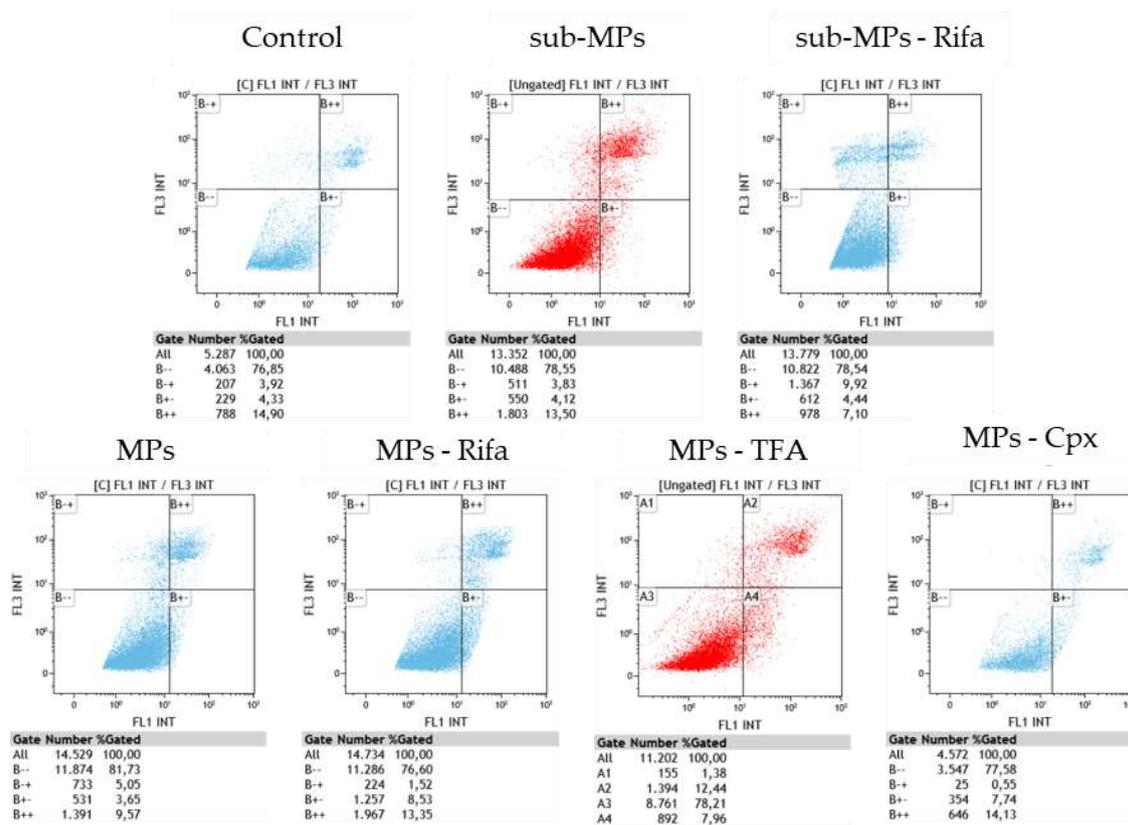


Figura A4.9 Resultados obtenidos por citometría de flujo de la evaluación de la muerte celular en fibroblastos.

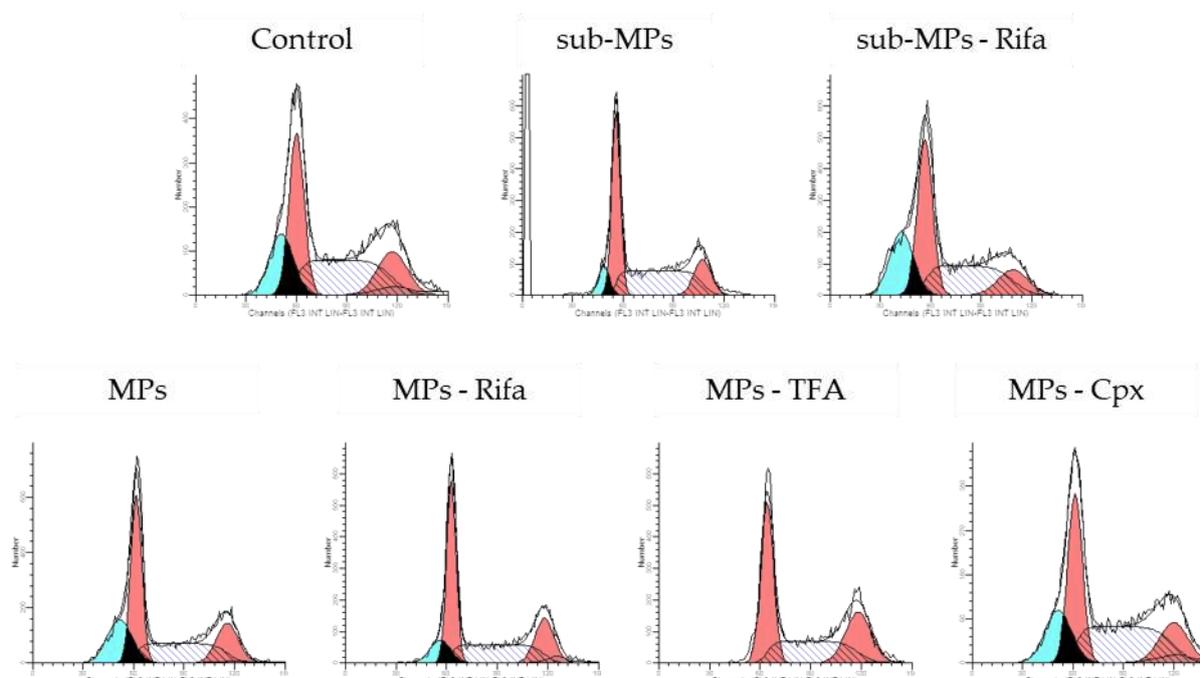
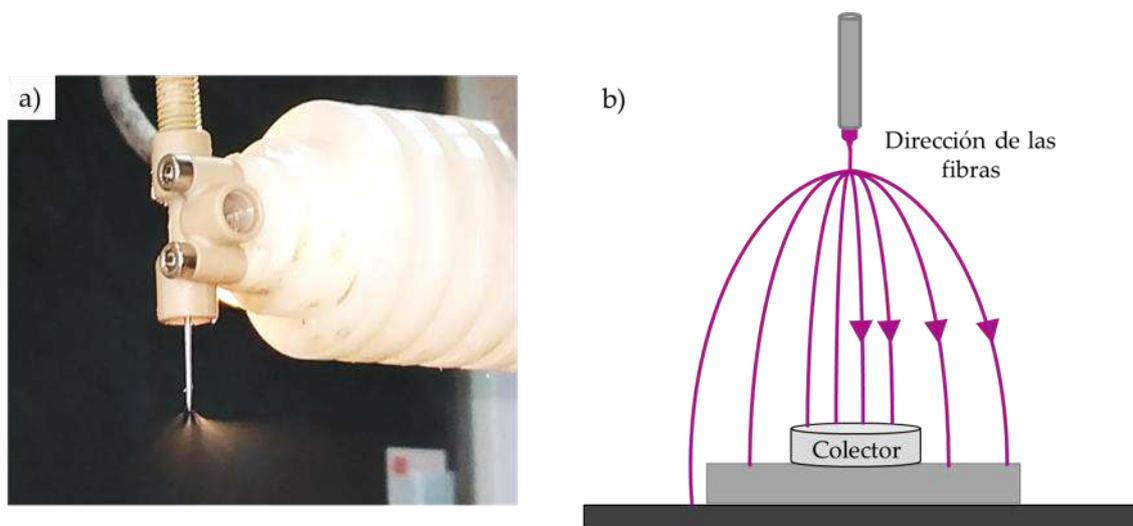
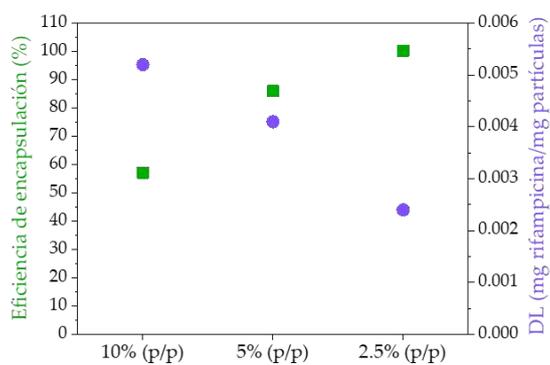


Figura A4.10 Resultados obtenidos por citometría de flujo de la evaluación del ciclo celular en fibroblastos.

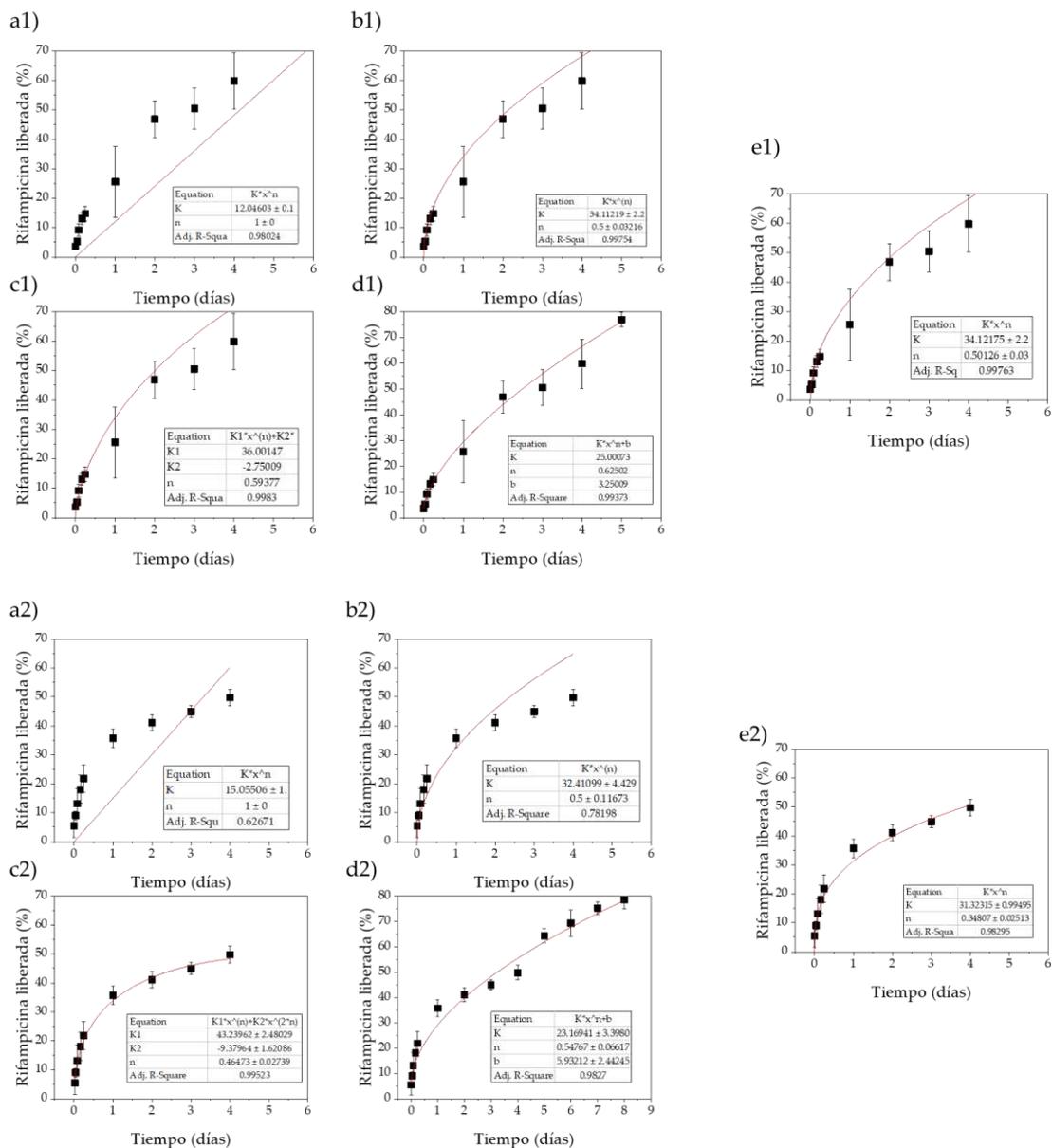
## Anexo IV.



**Figura A4.11** a) Imagen del cono de Taylor estabilizado en la producción de fibras mediante electrohilado de una disolución polimérica de Eudragit® RS100 a una concentración de 30% (p/v) en cloroformo, b) esquema de la dirección de las fibras desde el jet al colector.



**Figura A4.12** Eficiencia de encapsulación y capacidad de carga de las diferentes pruebas de optimización de la cantidad de rifampicina en las fibras de Eudragit® RS100.



**Figura A4.13** Ajustes matemáticos de las cinéticas de liberación: a) Primer orden, b) Higuchi, c) Peppas-Sahlin, d) Lindner-Lippold y e) Korsmeyer-Peppas, de los sistemas de liberación obtenidos por electrospray: a1-e1) Eudragit® RS100 30% (p/v) cloroformo + rifampicina 5% (p/p), a2-e2) Eudragit® RS100 30% (p/v) cloroformo + rifampicina 2.5% (p/p).



# **CAPITULO V.**

## **DISCUSIÓN GENERAL DE LOS RESULTADOS.**

**Comparativa de distintos métodos de síntesis que producen partículas de diferentes tamaños y morfologías y su estudio de degradación y cinética de liberación.**





## 5.1 Ventajas y desventajas de las técnicas de síntesis utilizadas en esta Tesis Doctoral.

En el trabajo de esta Tesis Doctoral se han desarrollado vectores de liberación controlada de agentes terapéuticos bioactivos mediante diferentes técnicas de síntesis. Cada una de las técnicas ha permitido la optimización de vectores poliméricos de tamaños y morfologías distintos, presentando cada técnica una serie de ventajas y desventajas que se deben tener en cuenta a la hora de seleccionar un método de síntesis para una aplicación biomédica concreta.

Se han podido observar diferencias evidentes principalmente en cuanto al tamaño de los vectores sintetizados, pero también en cuanto a morfología de los mismos, dependiendo de la técnica de síntesis empleada, como se resumen en la Tabla 5.1. En todas las síntesis empleadas en este trabajo es necesario partir de una disolución orgánica polimérica, utilizando un disolvente de baja temperatura de ebullición, sin embargo, las técnicas de nanoprecipitación y las electrohidrodinámicas admiten disolventes de baja toxicidad como son el etanol o la acetona, mientras que la técnica de emulsión precisa de disolventes de mayor toxicidad no miscibles con el agua (diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, entre otros).

Cada técnica se basa en distintos principios físico-químicos y emplea una fuente energética diferente para la producción de los vectores. El método de doble emulsión necesita elevada energía, ya que la emulsión es un sistema termodinámicamente inestable debido a la tensión interfacial entre las dos fases inmiscibles, razón por la que, además, resulta necesaria la adición de agentes tensioactivos para estabilizarlas [543]. Cuando la energía aplicada es mediante una sonda de ultrasonidos, la manipulación experimental resulta clave para su aplicación de manera homogénea. La sonda debe colocarse de tal manera que la mezcla de fases ocurra de manera homogénea en la totalidad del líquido, hecho que dificulta la escalabilidad del método puesto que el aumento del volumen de síntesis implicaría la variación de la intensidad de los ultrasonidos, del tiempo de aplicación, quizás, hasta la propia sonda. Por otra parte, es necesario indicar que la cavitación existente en el fluido cercano a la sonda deteriora la sonda de ultrasonidos e incluso contamina la emulsión con metales no deseados [433]. También se presenta en este trabajo una emulsión basada en la aplicación de energía mediante agitación mecánica a partir de un imán magnético. Como se trata de una fuente menos energética, se incrementó el tiempo necesario para obtener una emulsión estable. Esta fuente de energía también resulta difícil de extrapolar a sistemas de mayores volúmenes, puesto que el mismo tiempo o la misma agitación no serán igualmente efectivos. Es debido a ese difícil control en la aplicación de la fuente energética para generar las emulsiones que las partículas obtenidas son de mayor tamaño y también con mayor dispersión de diámetros [165]. Esta técnica requiere uno o dos procesos de emulsión, que deben ser eficaces y estables y, además, un paso de evaporación del disolvente y un proceso de lavado para eliminar el agente

tensioactivo sobrante una vez estabilizadas las partículas y el bioagente no encapsulado. Si no se tuviesen en cuenta estas fases de post-producción, la productividad del método sería más elevada, sin embargo, estas fases resultan ineludibles, disminuyendo notablemente la productividad debido a las dificultades en la escalabilidad de la síntesis (Tabla 5.1). Por otro lado, cabe destacar que se trata de una técnica muy versátil ya que existen variaciones según sea la naturaleza química del polímero o del agente terapéutico, haciendo de esta técnica un método válido para prácticamente la totalidad de bioagentes y materiales posibles [354].

En cambio, para la técnica de nanoprecipitación la necesidad energética es menor puesto que el proceso de formación de partículas se da por el desplazamiento del disolvente gracias a la miscibilidad de las fases y la insolubilidad del polímero en la fase acuosa, en forma de pequeños núcleos poliméricos, por lo que no se producen grandes tensiones entre fases inmiscibles y, por esta misma razón, no resulta necesaria la adición de agentes tensioactivos [363]. Esta técnica ofrece los menores tamaños de partículas de Eudragit® RS100, como se presenta en la Tabla 5.1, resultando muy sencilla, en un solo paso, y se ha comprobado que puede reducir la dispersión de tamaños y aumentar la productividad controlando el grado de transferencia de masa con la sencilla aplicación de la tecnología microfluídica [544]. La limitación que presenta esta técnica se encuentra en la naturaleza química de los agentes a encapsular, ya que las sustancias hidrofílicas presentan muy bajas eficiencias de encapsulación mediante este método [392]. Este método de síntesis también conlleva una evaporación del disolvente desplazado y un proceso de lavado de las partículas obtenidas para eliminar el exceso de bioagente no encapsulado y del polímero no precipitado si lo hubiera [388].

Por último, mediante las técnicas electrohidrodinámicas hacen falta aplicar grandes campos eléctricos para superar la tensión superficial de las gotas de disolución polimérica formadas en la punta de la aguja, por lo que estas técnicas requieren de una fuente de alto voltaje [545]. Sin embargo, cabe destacar que a partir de un mismo instrumental la versatilidad de la técnica para la obtención de diferentes sistemas de liberación controlada es muy elevada como se ha demostrado en este trabajo, que a partir de diferentes concentraciones poliméricas y disolventes se han obtenido vectores de diferentes tamaños y morfologías. En cuanto a niveles de producción, resultan bajos (Tabla 5.1) puesto que los caudales con los que se trabaja no son excesivamente elevados ya que la técnica requiere que estos caudales no sean excesivamente altos para poder alcanzar la máxima estabilidad del cono y una elevada monodispersidad. Sin embargo, se debe tener en cuenta que es una técnica de trabajo en continuo que no necesita ningún proceso adicional de post-producción de los vectores, puesto que el disolvente ya ha sido evaporado y el vector obtenido se encuentra en estado sólido y estable. Además, se han realizado estudios para la síntesis simultánea a través de múltiples agujas, de modo que se pueda aumentar considerablemente la producción. Tal es el caso del estudio de Bocanegra et al. [546] en el que demostraron que con un sistema multiemisor, es decir, con hasta 37 bocas de emisión de la disolución polimérica, se podía aumentar

considerablemente la producción de partículas sin modificar los resultados obtenidos con el método convencional con tan sólo una aguja. O la investigación de Almería et al. [547], los cuales aumentaron hasta en tres órdenes de magnitud la producción de micropartículas de PLGA, sin comprometer la morfología ni la dispersión de tamaños de las mismas, mediante la aplicación de un sistema multi-aguja de 19 inyectores.

Respecto a la producción de los vectores mediante cada método de síntesis, el método de emulsión, el cual precisa de un mayor gasto energético, es el que ofrece mayores productividades (6.9 g/h), seguido de la síntesis en continuo por nanoprecipitación (5 g/h). Sin embargo, ambas productividades se ven disminuidas si se tiene en cuenta la etapa de evaporación, alcanzando los valores obtenidos mediante las técnicas electrohidrodinámicas, resultando estas últimas las más productivas al darse la evaporación *in situ*.

**Tabla 5.1** Comparación entre las técnicas empleadas en el desarrollo del trabajo de esta Tesis Doctoral.

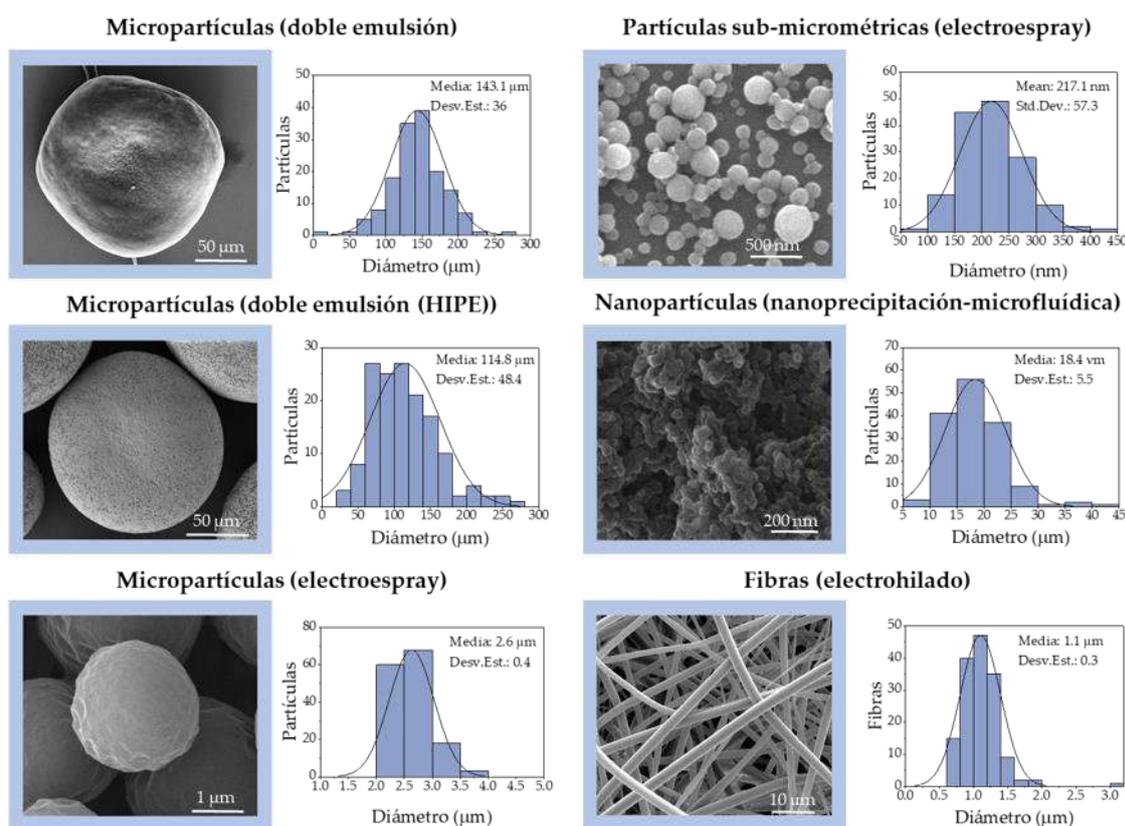
	Emulsión-evaporación del disolvente	Nanoprecipitación	Técnicas electrohidrodinámicas
Morfología y tamaño del vector	Esféricas y porosas >100 µm	Esféricas 15-60 nm	Esféricas, discos, fibras, con y sin poros 200 nm-2 µm
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Encapsulación de cargas hidrófilas e hidrófobas.</li> <li>- Diferentes tipos de emulsiones posibles (w/o, o/w, w/o/w, o/w/o).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Síntesis en un solo paso.</li> <li>- Idóneo para cargas hidrófobas.</li> <li>- Disolventes poco tóxicos.</li> <li>- Reproducible.</li> <li>- Escalable.</li> <li>- Fácil aplicación a la síntesis en continuo (tecnología microfluídica).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Posibilidad de variar tamaño y forma del vector.</li> <li>- Admite múltiples disolventes.</li> <li>- Evaporación <i>in situ</i>.</li> <li>- Síntesis en continuo.</li> </ul>
Desventajas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Necesidad de surfactantes.</li> <li>- Disolventes tóxicos.</li> <li>- Largo proceso de evaporación.</li> <li>- Necesidad de lavado del producto obtenido.</li> <li>- Difícil escalabilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Necesidad de gran control del proceso.</li> <li>- Encapsulación de agentes hidrófilos con baja eficiencia.</li> <li>- Largo proceso de evaporación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Sensible a las condiciones atmosféricas.</li> <li>- Necesidad de gran estabilidad del proceso.</li> </ul>
Producción	w/o/w: 6.9 g/h*, 40 mg/h** HIPE: 0.7 g/h*, 34 mg/h**	Discontinuo: 2.5 g/h*, 20 mg/h** Continuo: 5 g/h*	sub-MPs: 17 mg/h** MPs: 67 mg/h** Fibras: 170 mg/h**
Ref.	[548][549][550]	[551][552][553]	[554][555]

\*No se tiene en cuenta el tiempo de evaporación (3h).

\*\*Incluyendo el proceso de evaporación.

## 5.2 Comparativa de la degradación y cinética de liberación de los diferentes vectores diseñados.

La aplicación de las distintas técnicas de síntesis permitió la obtención de vectores con diferentes tamaños y morfologías que se muestran en la Figura 5.1.



**Figura 5.1** Resumen que engloba micrográficas de SEM y las distribuciones de tamaño de cada uno de los vectores que han sido diseñados a lo largo del trabajo realizado en esta Tesis Doctoral.

Se estudió la cinética de liberación de los agentes bioactivos de todos los vectores. Como el polímero no es biodegradable, se ha podido comprobar que los efectos producidos por las condiciones de liberación en la morfología de cada tipo de partícula fueron muy diferentes.

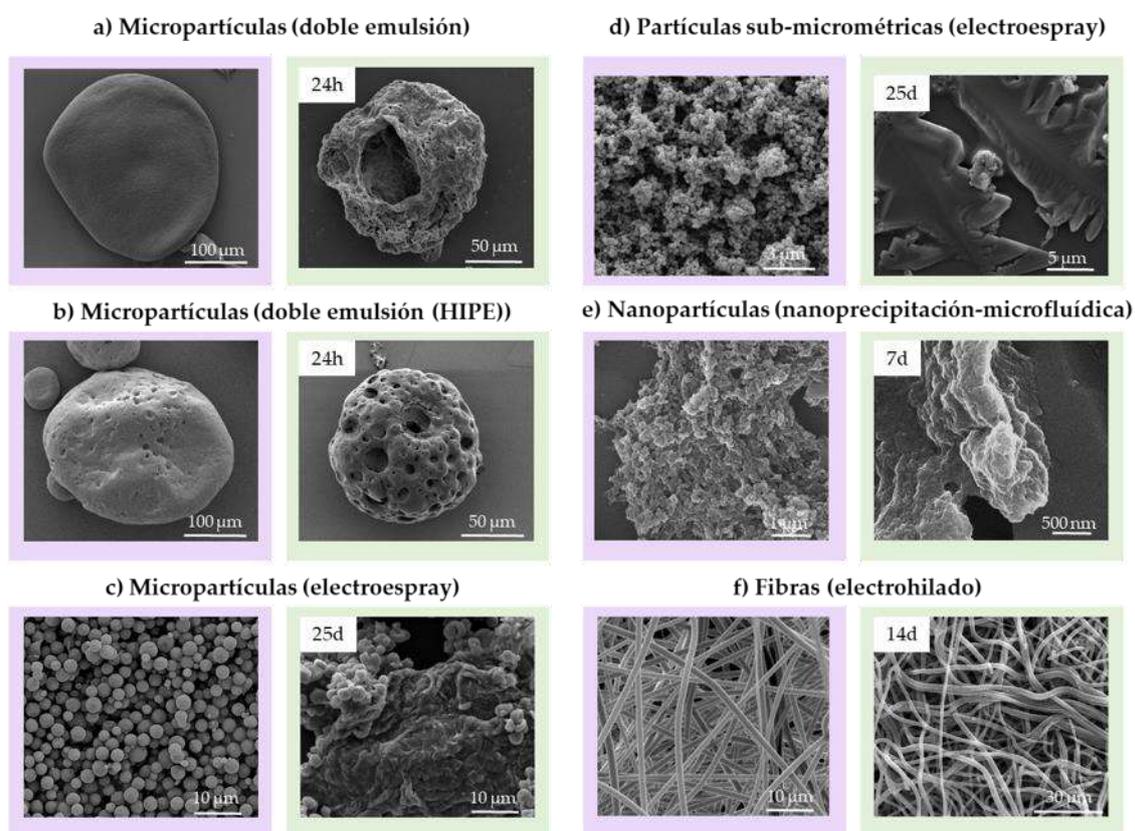
En el caso de las micropartículas más grandes, de cientos de micras, tanto en las que se encapsularon proteínas como en las que encapsularon bacterias, se observó que la erosión de la matriz polimérica generaba grandes poros por donde la carga podía difundir al medio de liberación rápidamente (Figura 5.2-a-b). Este perfil de degradación coincide con el publicado por Akram et al. [556], en el que estudiaron la degradación de micropartículas basadas en PMMA, observándose la aparición de poros en la superficie de la matriz polimérica.

Dependiendo de la carga de cada micropartícula se obtuvieron diferentes perfiles de liberación porque, es importante mencionar, que la liberación no está gobernada únicamente por la forma de erosionarse o degradarse la matriz polimérica, sino que también depende de las propiedades físico-químicas de la biomolécula y de la interacción polímero-biomoléculas. Se obtuvo una liberación más rápida en el caso de la proteína HRP o del fluoróforo FITC (Figura 2.12 y Figura 2.24) a través de los poros generados en la superficie que en la liberación de la proteína BSA. Esta diferencia se debe, probablemente, a que tanto la proteína HRP como el fluoróforo FITC no presentan cargas superficiales al pH de liberación, mientras que la proteína BSA tiene una carga neta superficial negativa al encontrarse en un  $\text{pH} > \text{pI}$  y es posible que, debido a esto, pueda ser retenida. Stockwell et al. [557] observaron que diferentes fármacos presentaban diferentes perfiles de liberación desde cápsulas del polianión alginato en función de su carga. Los de carga opuesta al polímero difundían más lentamente, quedando retenidos durante más tiempo en la matriz polimérica. Cuando la carga a liberar son microorganismos bacterianos, a pesar de erosionarse la matriz generando grandes poros, se observó un retraso de hasta 6h hasta comenzar a obtener crecimiento bacteriano. Esto indica que las bacterias quedaban retenidas en el interior de las micropartículas durante más tiempo antes de ser liberadas al medio externo, debido, posiblemente, a la interacción de las cargas entre la matriz polimérica positiva y la pared bacteriana negativa.

También se observaron diferencias en los perfiles de liberación de los antibióticos ciprofloxacino y rifampicina, cuando se encapsularon en micropartículas de Eudragit® RS100 (Figura 4.18). La erosión de la matriz polimérica, en este caso, no se produjo de la misma forma que la anteriormente comentada. No se observaron poros en la superficie, sino que las partículas se fueron erosionando y aglomerando hasta formar grandes agregados poliméricos sin ningún tipo de morfología definida (Figura 5.2-c). Esta degradación de las partículas coincide con los perfiles de liberación observados en la investigación de Dhana Lekshmiel et al. [558], en la que observaron que en un periodo de 15 días tan solo se liberaba de nanopartículas de PMMA alrededor de un 15% del fármaco total encapsulado, lo que se debía a la formación de una pared polimérica más compacta, coincidiendo así con las observaciones de aglomeraciones de este trabajo, dificultando la difusión del fármaco del interior de la partícula. Sin embargo, el perfil no fue el mismo para los dos antibióticos. Aunque se observaron cinéticas muy lentas para ambos casos, la rifampicina se liberó en mayor proporción que el ciprofloxacino, posiblemente debido a algún tipo de interacción débil entre el polímero y el antibiótico que dificultasen su difusión al medio externo. Sin embargo, la liberación inicial de las primeras horas fue mucho más pronunciada para caso del antibiótico ciprofloxacino. Este hecho puede deberse a que la distribución del antibiótico en la partícula no sea la misma, debido a que la disolución polimérica de partida tampoco fue la misma, ya que para encapsular el ciprofloxacino se preparó previamente una emulsión. Debido a esto el ciprofloxacino se encontraría distribuido en la superficie de la partícula y tendría una

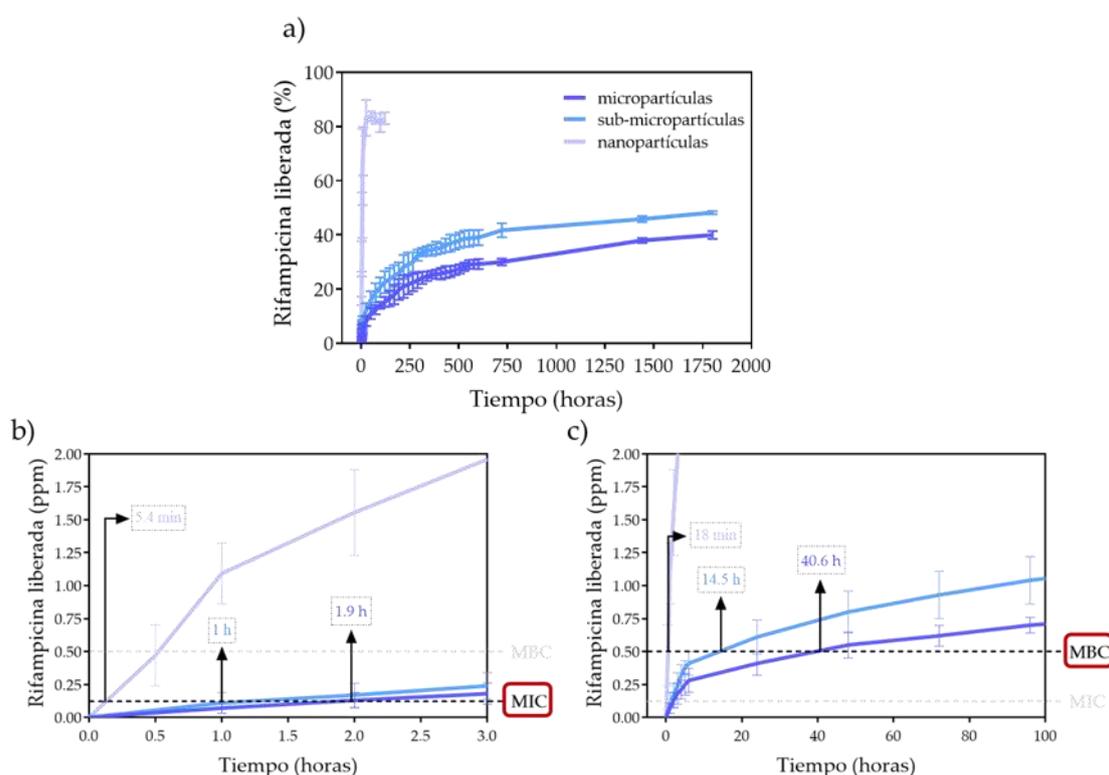
liberación inicial más pronunciada. De la misma forma que se observa en el trabajo de Yuan et al. [559], en el cual encapsulan en micropartículas de PLGA curcumina mediante electroespray y, dependiendo de la técnica y de la disolución de partida, obtienen diferentes perfiles de liberación, siendo más rápida la liberación del compuesto más accesible a la superficie.

En el caso de las fibras, se observó una liberación lenta pero sostenida dominada por el proceso de difusión. La cantidad de fármaco liberado durante las primeras horas fue mayor cuando la cantidad de antibiótico introducida en las fibras era mayor. Se produce la liberación de prácticamente la totalidad de la rifampicina sin observar grandes cambios morfológicos de las fibras, salvo rupturas y un aparente aumento del volumen de las mismas, pero no se observa a simple vista la erosión polimérica ni la agregación de las fibras (Figura 5.2-f). Estas observaciones coinciden con las realizadas por Carvalho et al. [560], observando que las fibras de PMMA no se mostraban degradadas ni erosionadas tras 7 días de liberación *in vitro*. Por lo tanto, la encapsulación del antibiótico en las fibras parece darse de forma cercana a la superficie, desde donde difunde. Además, debido a la ausencia de aglomeración del polímero que forma las fibras, se produce la liberación de mayor cantidad de rifampicina en menor tiempo, en comparación con las micropartículas.



**Figura 5.2** Micrografías de SEM de cada uno de los vectores que han sido diseñados en el trabajo de esta Tesis Doctoral (enmarcada en morado) junto con una micrografía representativa de la degradación para cada tiempo indicado (enmarcada en verde).

Como se ha demostrado, no sólo influye el vector en el perfil y la cinética de liberación, sino que el agente bioactivo contenido en su interior también tiene mucha influencia en el proceso. Para eliminar la influencia de la biomolécula en la liberación se comparan los vectores de diversos tamaños con un orden de magnitud de diferencia entre ellos en los que se ha encapsulado el antibiótico rifampicina. Morfológicamente parece que el proceso de liberación se da de manera similar, ya que las partículas se van erosionando y aglomerando independientemente del tamaño (Figura 5.2-c-d-e). Si comparamos las cinéticas de liberación de estos vectores, se observan diferentes perfiles (Figura 5.3).



**Figura 5.3** a) Gráfica comparativa de los perfiles de liberación de tres de los vectores diseñados en el trabajo de esta Tesis Doctoral: nanopartículas, sub-micropartículas y micropartículas, b) tiempo necesario para alcanzar la concentración MIC, c) tiempo necesario para alcanzar la concentración MBC.

En las partículas de menor tamaño, la cinética de liberación es más rápida, posiblemente debido a que el fármaco difunde más rápido al haber menos cantidad de polímero, haciéndose esa liberación más lenta y sostenida conforme el diámetro del vector aumenta. Para poder investigar este comportamiento más profundamente, se utilizó la cantidad necesaria de cada una de las partículas sujetas a este estudio para tener en todas ellas la misma cantidad de fármaco contenido, 0.05 mg. Por lo tanto, teniendo en cuenta la capacidad de carga de cada uno de los vectores, se partió de 2.5 mg de nanopartículas, 0.36

mg de sub-micropartículas y 0.39 mg de micropartículas, en un volumen final de 10 mL. Se fijaron como puntos de control el tiempo necesario para cada tipo de vector para alcanzar las concentraciones MIC y MBC. Como se observa en la Figura 5.3-b, para alcanzar una concentración cercana a 0.05  $\mu\text{g/mL}$  (concentración MIC) las nanopartículas necesitaron tan sólo 5.4 min (0.09h) para empezar a ejercer efecto antimicrobiano, las partículas sub-micrométricas 1h y las micropartículas 1.9h. Las diferencias son más evidentes cuando la concentración que se pretende alcanzar es de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  (MBC), como se muestra en la Figura 5.3-c tardando 18 min (0.3h) en alcanzarla las nanopartículas, mientras que hasta 14.5h después no la alcanzarían las sub-micropartículas y para las micropartículas habría que esperar hasta 40.6h.

Como se ha podido comprobar, se puede ajustar la cinética de liberación al perfil que sea necesario mediante el uso de diferentes protocolos de síntesis lo que resulta útil y potencialmente interesante dependiendo de la aplicación biomédica. Por ejemplo, hay terapias que necesitan un tratamiento antibiótico inmediato y una distribución sistémica rápida, mientras que hay infecciones que precisan de un tratamiento a largo plazo y sostenido en el tiempo. Los sistemas de liberación rápida son necesarios en infecciones agudas, para su profilaxis, como en el caso de heridas, quemaduras, reemplazos de articulaciones, cesáreas o en el tratamiento de enfermedades endógenas como sepsis, infecciones del tracto urinario, piel y tejidos blandos. En el caso de las infecciones respiratorias crónicas, como la tuberculosis, urinarias crónicas, úlceras, asociadas a patógenos intracelulares o infecciones asociadas a prótesis o implantes, los tratamientos prescritos son aquellos que actúan a largo plazo. Esta liberación sostenida en el tiempo sería altamente ventajosa en el caso de las infecciones periprotésicas con una prevalencia baja pero significativa de 1-2% con signos y síntomas que pueden durar desde 14 hasta más de 28 días [561], cuando se implanta un dispositivo de fijación en el caso de una fractura abierta la incidencia de infección aumenta hasta un 30% mientras que alrededor de un 5% de los implantes de fijación interna se infectan [562]. Estudios realizados demuestran que es conveniente una profilaxis a largo plazo para evitar estos casos que pueden desembocar en un cambio de prótesis total o una cronificación de la infección [563]. Sin embargo, infecciones locales no cronificadas son tratadas con dosis de acceso más inmediato de antibióticos.

Un estudio llevado a cabo por Klein et al. [564] mostró que desde el año 2000 hasta el año 2015, englobando un total de 76 países, el consumo de antibióticos aumentó un 65% y la tasa de consumo de antibióticos un 39%, con la alarmante consecuencia de las resistencias bacterianas a estos compuestos. Por lo tanto, el desarrollo de estos sistemas de liberación de antibióticos proporcionando una cantidad de antibiótico requerida a lo largo del tiempo sin necesidad de administrar dosis continuas para tratamientos de infecciones agudas o crónicas podría presentar una gran ventaja para evitar el consumo descontrolado que supone la administración de dosis de antibióticos diariamente.

Aunque en este trabajo de Tesis Doctoral se ha trabajado con antibióticos, proteínas y bacterias modelo, los sistemas de liberación desarrollados pueden ser implementados en diferentes aplicaciones en las que sean necesarias, por ejemplo, estas cinéticas de liberación a largo plazo. En el estudio de Brusaferrri et al.[565], se evaluó la influencia de un tratamiento a largo plazo de corticosteroides para prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad neuritis óptica, encontrando mejoras tras la administración durante 30 días. O en el estudio de Summers et al. [566], se demostró que la administración oral de tetrahidroaminoacridina durante más de 12 meses mostró mejoras significativas en pacientes con la enfermedad de Alzheimer de moderada a grave. Por otro lado, también se encuentran aplicaciones punteras para los vectores con perfiles de liberación a corto plazo. Por ejemplo, Fuhlbrigge et al. [567] publicaron que la prescripción médica para el tratamiento con corticoides para pacientes con asma es aquella en la que el fármaco se encuentra disponible inmediatamente, sin embargo, resulta difícil controlar la dosis exacta administrada, por lo que los sistemas de liberación controlada podrían ser de apoyo en estos casos. En conclusión, la posibilidad de poder seleccionar la cinética de liberación dependiendo del perfil del tratamiento abre numerosas puertas para las aplicaciones de los sistemas de liberación desarrollados para vías de administración no invasivas, principalmente la vía oral.



# CAPITULO VI.

CONCLUSIONES FINALES.





Para concluir el trabajo realizado en esta Tesis Doctoral titulada “Desarrollo de sistemas poliméricos mucoadhesivos de liberación controlada para la distribución localizada de agentes terapéuticos bioactivos”, se ha de mencionar que los aspectos clave en el diseño de vectores de liberación controlada de agentes bioactivos son: la morfología y el tamaño. El control de los mismos permite obtener la cinética de liberación requerida en las distintas aplicaciones. Para demostrarlo, en esta tesis se utilizó un polímero metacrílico, cuyo mecanismo de liberación es independiente del pH y que proporciona una liberación controlada en el tiempo.

En este trabajo se han desarrollado diferentes técnicas, optimizando sus diferentes variables, con el fin de obtener micropartículas de cientos de micras, micropartículas de unas pocas micras, partículas sub-micrométricas, nanopartículas y fibras. Resumiendo, se han obtenido sistemas de liberación controlada de diferentes tamaños y morfologías mediante la aplicación de diferentes técnicas de síntesis, lo que era el objetivo perseguido. Por lo tanto, las conclusiones finales del trabajo son las siguientes:

- En el Capítulo II, mediante la síntesis por doble emulsión- evaporación del disolvente convencional (agua en aceite en agua, w/o/w) se obtuvieron micropartículas de cientos de micras ( $143.1 \pm 36.0 \mu\text{m}$ ). En estas partículas, se encapsularon con elevadas eficiencias proteínas modelo (88.4 y 95.8% para BSA y HRP, respectivamente) como prueba de concepto para la aplicación en la administración oral de proteínas terapéuticas, asegurando la protección proteica de la desnaturalización ácida a su paso por el pH ácido gástrico. Además, se confirmó la ausencia de toxicidad celular de las micropartículas producidas.
- En el Capítulo II también se desarrolló la variación de la técnica convencional de encapsulación mediante doble emulsión denominada doble emulsión de elevada fase interna- evaporación del disolvente (HIPE), mediante la cual también se obtuvieron micropartículas grandes de ciento de micras ( $114.8 \pm 48.4 \mu\text{m}$ ). En estas micropartículas se encapsularon satisfactoriamente bacterias modelo, como pruebas de concepto para la encapsulación de bacterias probióticas para la administración oral de probióticos. Las bacterias encapsuladas resultaron viables tras el proceso de digestión simulada, sobreviviendo al propio proceso de síntesis y al paso por las condiciones ácidas gástricas. Además, se comprobó la viabilidad de los microorganismos encapsulados y liofilizados en el interior de las micropartículas en condiciones normales de luz, temperatura y humedad, durante un total de 5 meses. Estas micropartículas obtenidas tampoco resultaron citotóxicas.
- En el Capítulo III, tras una exhaustiva optimización de las condiciones de síntesis mediante el método de nanoprecipitación se obtuvieron nanopartículas con un tamaño inferior a 100 nm ( $55.3 \pm 15.9 \text{ nm}$ ). Además, se aplicó la tecnología microfluídica para

favorecer la monodispersidad y la producción del vector diseñado consiguiendo una producción de nanopartículas homogénea con bajo índice de polidispersidad ( $18.4 \pm 5.5$  nm). Se encapsuló satisfactoriamente el antibiótico rifampicina como fármaco modelo (EE  $30.1 \pm 5.7\%$  mediante el método discontinuo y  $42.3 \pm 2.4\%$  mediante la aplicación de microfluídica). Se confirmó la actividad antimicrobiana del antibiótico encapsulado y la ausencia de toxicidad celular del vector polimérico sintetizado.

- En el Capítulo IV, gracias a la gran cantidad de condiciones permitidas mediante las técnicas de síntesis electrohidrodinámicas, se desarrollaron diferentes vectores:

- Se sintetizaron micropartículas ( $2.6 \pm 0.4$   $\mu\text{m}$ ) en las que se encapsularon dos antibióticos modelo hidrófilo ciprofloxacino e hidrófobo rifampicina. La encapsulación fue altamente eficiente (EE  $99.3 \pm 1.6\%$  para la rifampicina y EE  $86.9 \pm 6.9\%$  para el ciprofloxacino) y se demostró la actividad antimicrobiana del fármaco liberado, incrementada por el efecto de contacto partícula-bacteria. Además, los vectores con y sin antibiótico encapsularon mostraron ausencia de toxicidad celular.

- Se sintetizaron partículas sub-microparticuladas ( $217.1 \pm 57.3$  nm), de unos cientos de nanómetros, en las que se encapsuló el antibiótico rifampicina y resultó inviable la encapsulación del antibiótico ciprofloxacino. La encapsulación de rifampicina resultó altamente eficaz (EE  $82.9 \pm 1.0\%$ ) y el antibiótico mantuvo su actividad, siendo ésta también incrementada por un ligero efecto de contacto entre las partículas y las bacterias, sin que el vector obtenido resultase citotóxico.

- También se sintetizaron microfibras poliméricas ( $1.1 \pm 0.3$   $\mu\text{m}$ ) en las que se encapsuló el antibiótico rifampicina con una elevada eficiencia de encapsulación (EE  $57.3 \pm 3.1\%$ ). El antibiótico, una vez liberado, mantuvo su actividad antimicrobiana y las fibras ejercieron cierto efecto de contacto por interacción entre las membranas y las bacterias. Las fibras poliméricas con y sin antibiótico incorporado resultaron compatibles con las líneas celulares estudiadas.

- En el Capítulo V se realiza una comparativa de las técnicas utilizadas y los resultados obtenidos para cada una de ellas. Además, se realiza un estudio de los perfiles de liberación en función del tamaño y morfología del vector sintetizado y de la carga encapsulada en cada uno de ellos. En este capítulo se demuestra la importancia del control del tamaño principalmente y de la morfología en la síntesis de los vectores de liberación controlada en función de la aplicación final buscada y del perfil de liberación requerido.

## **Bibliografía.**



- [1] Y. H. Yun, B. K. Lee, and K. Park, "Controlled Drug Delivery: Historical perspective for the next generation," *J. Control. Release*, vol. 10, no. 219, pp. 2–7, 2015.
- [2] E. P. Gelvin, T. H. McGavack, and S. Kenigsberg, "The anorexigenic effect of sustained-release dexedrine preparations," *Am. J. Dig. Dis.*, vol. 20, no. 10, pp. 307–312, 1953.
- [3] M. N. Pastore, Y. N. Kalia, M. Horstmann, and M. S. Roberts, "Transdermal patches: History, development and pharmacology," *Br. J. Pharmacol.*, vol. 172, no. 9, pp. 2179–2209, 2015.
- [4] K. Park, "The controlled drug delivery systems: Past forward and Future back," *J. Control. Release*, vol. 28, no. 190, pp. 3–8, 2014.
- [5] Y. Barenholz, "Doxil® - The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned," *J. Control. Release*, vol. 160, no. 2, pp. 117–134, 2012.
- [6] E. Miele, G. P. Spinelli, E. Miele, F. Tomao, and S. Tomao, "Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 4, no. 1, pp. 99–105, 2009.
- [7] H. Zhong, G. Chan, Y. Hu, H. Hu, and D. Ouyang, "A comprehensive map of FDA-approved pharmaceutical products," *Pharmaceutics*, vol. 10, no. 4, pp. 1–19, 2018.
- [8] K. Park, "Drug Delivery research: The Invention Cycle," *Mol. Pharm.*, vol. 13, no. 7, pp. 2143–2147, 2016.
- [9] S. E. A. Gratton *et al.*, "The pursuit of a scalable nanofabrication platform for use in material and life science applications," *Acc. Chem. Res.*, vol. 41, no. 12, pp. 1685–1695, 2008.
- [10] D. A. Canelas, K. P. Herlihy, and J. M. DeSimone, "Top-down particle fabrication: Control of size and shape for diagnostic imaging and drug delivery," *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*, vol. 1, no. 4, pp. 391–404, 2009.
- [11] K. Kawakami, "Modification of physicochemical characteristics of active pharmaceutical ingredients and application of supersaturatable dosage forms for improving bioavailability of poorly absorbed drugs," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 64, no. 6, pp. 480–495, 2012.
- [12] N. Shrestha *et al.*, "Multistage pH-responsive mucoadhesive nanocarriers prepared by aerosol flow reactor technology: A controlled dual protein-drug delivery system," *Biomaterials*, vol. 68, pp. 9–20, 2015.
- [13] K. Ueda, K. Higashi, M. Kataoka, S. Yamashita, K. Yamamoto, and K. Moribe, "Inhibition mechanism of hydroxypropyl methylcellulose acetate succinate on drug crystallization in gastrointestinal fluid and drug permeability from a supersaturated solution," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 62, pp. 293–300, 2014.
- [14] T. M. Allen and P. R. Cullis, "Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream," *Science (80-. )*, vol. 303, no. 5665, pp. 1818–1822, 2004.

- [15] D. D. Borawake, V. V. Pande, and M. A. Giri, "Nanomedicine and Nanoscience Research Mesoporous Silica Nanoparticles as Theranostic Platform for Smart Drug Delivery : A Review," vol. 2017, no. 05, 2017.
- [16] A. Albanese, P. S. Tang, and W. C. W. Chan, "The Effect of Nanoparticle Size, Shape, and Surface Chemistry on Biological Systems," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 14, no. 1, pp. 1–16, 2012.
- [17] R. Bhattacharya and P. Mukherjee, "Biological properties of 'naked' metal nanoparticles," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 60, no. 11, pp. 1289–1306, 2008.
- [18] J. B. Vines, J. H. Yoon, N. E. Ryu, D. J. Lim, and H. Park, "Gold nanoparticles for photothermal cancer therapy," *Front. Chem.*, vol. 7, no. APR, pp. 1–16, 2019.
- [19] S. S. Agasti, A. Chompoosor, C. You, P. Ghosh, C. K. Kim, and V. M. Rotello, "Photoregulated Release of Caged Anticancer Drugs from Gold Nanoparticles to regulate drug release , minimizing side effects and improving," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 131, pp. 5728–5729, 2009.
- [20] C. Wang, X. Liu, V. Wulf, M. Vázquez-González, M. Fadeev, and I. Willner, "DNA-Based Hydrogels Loaded with Au Nanoparticles or Au Nanorods: Thermoresponsive Plasmonic Matrices for Shape-Memory, Self-Healing, Controlled Release, and Mechanical Applications," *ACS Nano*, vol. 13, no. 3, pp. 3424–3433, 2019.
- [21] H. Bi *et al.*, "Doxorubicin-conjugated CuS nanoparticles for efficient synergistic therapy triggered by near-infrared light," *Dalt. Trans. RSC*, vol. 45, no. 12, pp. 5101–5110, 2016.
- [22] M. Manzano and M. Vallet-Regí, "Mesoporous Silica Nanoparticles for Drug Delivery," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 30, no. 2, pp. 3–5, 2020.
- [23] Q. He and J. Shi, "Mesoporous silica nanoparticle based nano drug delivery systems: Synthesis, controlled drug release and delivery, pharmacokinetics and biocompatibility," *J. Mater. Chem.*, vol. 21, no. 16, pp. 5845–5855, 2011.
- [24] E. Boisselier and D. Astruc, "Gold nanoparticles in nanomedicine: Preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, no. 6, pp. 1759–1782, 2009.
- [25] M. Arruebo, R. Fernández-Pacheco, M. R. Ibarra, and J. Santamaría, "Magnetic nanoparticles for drug delivery The potential of magnetic NPs stems from the intrinsic properties of their magnetic cores combined with their drug loading capability and the biochemical properties that can be bestowed on them by means of a suitab," *Nano Today*, vol. 2, no. 3, pp. 22–32, 2007.
- [26] D. R. Khan, E. M. Rezler, J. Lauer-Fields, and G. B. Fields, "Effects of drug hydrophobicity on liposomal stability," *Chem. Biol. Drug Des.*, vol. 71, no. 1, pp. 3–7, 2008.
- [27] L. Sercombe, T. Veerati, F. Moheimani, S. Y. Wu, A. K. Sood, and S. Hua, "Advances and challenges of liposome assisted drug delivery," *Front. Pharmacol.*, vol. 6, pp. 1–13,

2015.

- [28] M. Najlah *et al.*, "Development of injectable PEGylated liposome encapsulating disulfiram for colorectal cancer treatment," *Pharmaceutics*, vol. 11, no. 610, pp. 1–16, 2019.
- [29] L. U'Ren, R. Kedl, and S. W. Dow, "Vaccination with liposome-DNA complexes elicits enhanced antitumor immunity," *Cancer Gene Ther.*, vol. 13, no. 11, pp. 1033–1044, 2006.
- [30] H. Elsana, T. O. B. Olusanya, J. Carr-wilkinson, S. Darby, A. Faheem, and A. A. Elkordy, "Evaluation of novel cationic gene based liposomes with cyclodextrin prepared by thin film hydration and microfluidic systems," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, pp. 1–17, 2019.
- [31] Y. J. Kim *et al.*, "Co-Eradication of Breast Cancer Cells and Cancer Stem Cells by Cross-Linked Multilamellar Liposomes Enhances Tumor Treatment," *Mol. Pharm.*, vol. 12, no. 8, pp. 2811–2822, 2015.
- [32] H. M. N. Iqbal and T. Keshavarz, *Bioinspired polymeric carriers for drug delivery applications*. Elsevier Ltd., 2018.
- [33] O. Pillai and R. Panchagnula, "Polymers in Drug Delivery Omathanu Pillai and Ramesh Panchagnula," *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 5, pp. 447–451, 2001.
- [34] S. M. Ahsan, M. Thomas, K. K. Reddy, S. G. Sooraparaju, A. Asthana, and I. Bhatnagar, "Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 110, pp. 97–109, 2017.
- [35] A. O. Elzoghby, W. M. Samy, and N. A. Elgindy, "Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems," *J. Control. Release*, vol. 157, no. 2, pp. 168–182, 2012.
- [36] T. Kuntz, W. Weisbrod, S. Chakraborty, and B. Skalsky, "Application of Poly(meth)acrylate Copolymers for Oral Multiparticulate Drug Delivery Systems," *Adv. Deliv. Sci. Technol. CRS*, pp. 237–266, 2017.
- [37] M. Mir, N. Ahmed, and A. ur Rehman, "Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 159, pp. 217–231, 2017.
- [38] D. Schmaljohann, "Thermo- and pH-responsive polymers in drug delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 58, no. 15, pp. 1655–1670, 2006.
- [39] Y. Y. Yang, M. Zhang, K. Wang, and D. G. Yu, "pH-sensitive polymer nanocoating on hydrophilic composites fabricated using modified coaxial electrospraying," *Mater. Lett.*, vol. 227, pp. 93–96, 2018.
- [40] L. E. Theune, R. Charbaji, M. Kar, S. Wedepohl, S. Hedtrich, and M. Calderón, "Critical parameters for the controlled synthesis of nanogels suitable for temperature-triggered protein delivery," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 100, no. February, pp. 141–151, 2019.
- [41] E. Blanco, H. Shen, and M. Ferrari, "Principles of nanoparticle design for overcoming

- biological barriers to drug delivery," *Nat. Biotechnol.*, vol. 33, no. 9, pp. 941–951, 2015.
- [42] D. S. Williams, I. A. B. Pijpers, R. Ridolfo, and J. C. M. van Hest, "Controlling the morphology of copolymeric vectors for next generation nanomedicine," *J. Control. Release*, vol. 259, pp. 29–39, 2017.
- [43] H. S. Choi *et al.*, "Renal clearance of nanoparticles," *Nat. Biotechnol.*, vol. 25, no. 10, pp. 1165–1170, 2007.
- [44] F. Braet *et al.*, "Contribution of High-Resolution Correlative Imaging Techniques in the Study of the Liver Sieve in Three-Dimensions," *Microsc. Res. Tech.*, vol. 70, pp. 230–242, 2007.
- [45] L.-T. Chen and L. Weiss, "The role of the Sinus wall in the passage of erythrocytes through the spleen," *Blood*, vol. 41, no. 4, pp. 529–537, 1973.
- [46] P. Decuzzi *et al.*, "Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles," *J. Control. Release*, vol. 141, no. 3, pp. 320–327, 2010.
- [47] S. Muro *et al.*, "Control of endothelial targeting and intracellular delivery of therapeutic enzymes by modulating the size and shape of ICAM-1-targeted carriers," *Mol. Ther.*, vol. 16, no. 8, pp. 1450–1458, 2008.
- [48] S. A. Kulkarni and S. S. Feng, "Effects of particle size and surface modification on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles for drug delivery," *Pharm. Res.*, vol. 30, no. 10, pp. 2512–2522, 2013.
- [49] K. Nahar *et al.*, "In vitro, in vivo and ex vivo models for studying particle deposition and drug absorption of inhaled pharmaceuticals," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 49, no. 5, pp. 805–818, 2013.
- [50] R. Dhand and H. Sohal, "Pulmonary Drug Delivery System for inhalation therapy in mechanically ventilated patients," *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 5, no. 1, pp. 9–18, 2008.
- [51] C. Dhand, M. P. Prabhakaran, R. W. Beuerman, R. Lakshminarayanan, N. Dwivedi, and S. Ramakrishna, "Role of size of drug delivery carriers for pulmonary and intravenous administration with emphasis on cancer therapeutics and lung-targeted drug delivery," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 62, pp. 32673–32689, 2014.
- [52] P. Jani, G. W. Halbert, J. Langridge, and A. T. Florence, "Nanoparticle Uptake by the Rat Gastrointestinal Mucosa: Quantitation and Particle Size Dependency," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 42, no. 12, pp. 821–826, 1990.
- [53] M. P. Desai, V. Labhasetwar, G. L. Amidon, and R. J. Levy, "Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size," *Pharmaceutical Research*, vol. 13, no. 12, pp. 1838–1845, 1996.
- [54] R. Toy, P. M. Peiris, K. B. Ghaghada, and E. Karathanasis, "Shaping cancer nanomedicine: The effect of particle shape on the in vivo journey of nanoparticles," *Nanomedicine*, vol. 9, no. 1, pp. 121–134, 2014.

- [55] V. Giglio *et al.*, "Reshaping silica particles: Mesoporous nanodiscs for bimodal delivery and improved cellular uptake," *Chem. Eng. J.*, vol. 340, no. January, pp. 148–154, 2018.
- [56] N. Zheng, J. Li, C. Xu, L. Xu, S. Li, and L. Xu, "Mesoporous silica nanorods for improved oral drug absorption," *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, no. 6, pp. 1132–1140, 2018.
- [57] G. Sharma *et al.*, "Polymer Particle Shape Independently Influences Binding and Internalization by Macrophages," *J. Control. Release*, vol. 147, no. 1, pp. 408–412, 2010.
- [58] A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, and T. Hanawa, "Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, pp. 244–256, 2003.
- [59] X. Zhao *et al.*, "Cytotoxicity of hydroxyapatite nanoparticles is shape and cell dependent," *Arch. Toxicol.*, vol. 87, no. 6, pp. 1037–1052, 2013.
- [60] S. Nejati, E. Mohseni Vadeghani, S. Khorshidi, and A. Karkhaneh, "Role of particle shape on efficient and organ-based drug delivery," *Eur. Polym. J.*, vol. 122, no. November 2019, p. 109353, 2020.
- [61] R. K. Singh, J. C. Knowles, and H. W. Kim, "Advances in nanoparticle development for improved therapeutics delivery: nanoscale topographical aspect," *J. Tissue Eng.*, vol. 10, 2019.
- [62] A. Chompoosor *et al.*, "The role of surface functionality on acute cytotoxicity, ROS generation and DNA damage by cationic gold nanoparticles," *Small*, vol. 6, no. 20, pp. 2246–2249, 2010.
- [63] J. Xie, C. Xu, N. Kohler, Y. Hou, and S. Sun, "Controlled PEGylation of monodisperse Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for reduced non-specific uptake by macrophage cells," *Adv. Mater.*, vol. 19, no. 20, pp. 3163–3166, 2007.
- [64] P. Alberts, B. Johnson, A. Lewis, J. Raff, M. Roberts, K. and Walter, "Molecular biology of the cell," *Ann. Bot. 4th edn.*, vol. 91, no. 3, p. 401, Feb. 2003.
- [65] E. C. Cho, J. Xie, P. A. Wurm, and Y. Xia, "Understanding the role of surface charges in cellular adsorption versus internalization by selectively removing gold nanoparticles on the cell surface with a I<sub>2</sub>/KI etchant," *Nano Lett.*, vol. 9, no. 3, pp. 1080–1084, 2009.
- [66] F. Milletti, "Cell-penetrating peptides: Classes, origin, and current landscape," *Drug Discov. Today*, vol. 17, no. 15–16, pp. 850–860, 2012.
- [67] M. E. Herbig, F. Assi, M. Textor, and H. P. Merkle, "The cell penetrating peptides pVEC and W2-pVEC induce transformation of gel phase domains in phospholipid bilayers without affecting their integrity," *Biochemistry*, vol. 45, no. 11, pp. 3598–3609, 2006.
- [68] P. Nativo, I. A. Prior, and M. Brust, "Uptake and intracellular fate of surface-modified gold nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 2, no. 8, pp. 1639–1644, 2008.
- [69] M. J. Dalby *et al.*, "The control of human mesenchymal cell differentiation using

- nanoscale symmetry and disorder," *Nat. Mater.*, vol. 6, no. 12, pp. 997–1003, 2007.
- [70] H. Song *et al.*, "Silica Nanopollens Enhance Adhesion for Long-Term Bacterial Inhibition," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 138, no. 20, pp. 6455–6462, 2016.
- [71] A. N. Zelikin, C. Ehrhardt, and A. M. Healy, "Materials and methods for delivery of biological drugs," *Nat. Chem.*, vol. 8, no. 11, pp. 997–1007, 2016.
- [72] M. Goldberg and I. Gomez-Orellana, "Challenges for the oral delivery of macromolecules," *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 2, no. 4, pp. 289–295, 2003.
- [73] T. D. Brown, K. A. Whitehead, and S. Mitragotri, "Materials for oral delivery of proteins and peptides," *Nat. Rev. Mater.*, vol. 5, no. 2, pp. 127–148, 2020.
- [74] A. L. Golub, R. W. Frost, C. J. Betlach, and M. A. Gonzalez, "Physiologic considerations in drug absorption from the gastrointestinal tract," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 78, no. 4 PART 2, pp. 689–694, 1986.
- [75] J. Perez-Vilar and R. L. Hill, "The Structure and Assembly of Secreted Mucins," *J. Biol. Chem.*, vol. 274, no. 45, pp. 31751–31754, 1999.
- [76] X. Murgia, B. Loretz, O. Hartwig, M. Hittinger, and C. M. Lehr, "The role of mucus on drug transport and its potential to affect therapeutic outcomes," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 124, pp. 82–97, 2018.
- [77] E. J. Bottone and M. Prestia-Reitano, "Microbial colonization of mucous membranes," *Clin. Dermatol.*, vol. 5, no. 2, pp. 17–27, 1987.
- [78] H. M. Yildiz, C. A. McKelvey, P. J. Marsac, and R. L. Carrier, "Size Selectivity of Intestinal Mucus to Diffusing Particulates is Dependent on Surface Chemistry and Exposure to Lipids," *J. Drug Target.*, vol. 23, no. 7–8, pp. 768–774, 2016.
- [79] A. K. Shakya, B. O. Al-Najjar, P. K. Deb, R. R. Naik, and R. K. Tekade, *First-Pass Metabolism Considerations in Pharmaceutical Product Development*. Elsevier Inc., 2018.
- [80] R. C. Feitosa, D. C. Geraldés, V. L. Beraldo-De-Araújo, J. S. R. Costa, and L. Oliveira-Nascimento, "Pharmacokinetic aspects of nanoparticle-in-matrix drug delivery systems for oral/buccal delivery," *Front. Pharmacol.*, vol. 10, no. SEP, 2019.
- [81] M. M. De Villiers, *Oral Conventional Solid Dosage Forms*, no. November 2004. 2004.
- [82] H. R. Costantino, S. Liauw, S. Mitragotri, R. Langer, A. M. Klibanov, and V. Sluzky, "The Pharmaceutical Development of Insulin: Historical Perspectives and Future Directions," in *Therapeutic Protein and Peptide Formulation and Delivery*, vol. 675, American Chemical Society, 1997, pp. 2–29.
- [83] R. M. Ramesan and C. P. Sharma, "Challenges and advances in nanoparticle-based oral insulin delivery," *Expert Rev. Med. Devices*, vol. 6, no. 6, pp. 665–676, 2009.
- [84] D. Sakloetsakun, S. Dünnhaupt, J. Barthelmes, G. Perera, and A. Bernkop-Schnürch, "Combining two technologies: Multifunctional polymers and self-nanoemulsifying drug delivery system (SNEDDS) for oral insulin administration," *Int. J. Biol. Macromol.*,

vol. 61, pp. 363–372, 2013.

- [85] M. R. Prausnitz and R. Langer, "Transdermal drug delivery," *Nat Biotechnol.*, vol. 26, no. 11, pp. 1261–1268, 2009.
- [86] J. D. Bos and M. M. H. M. Meinardi, "The 500 Dalton rule for the skin penetration of chemical compounds and drugs," *Exp. Dermatol.*, vol. 9, no. 3, pp. 165–169, 2000.
- [87] I. Steinsträsser and H. P. Merkle, "Dermal metabolism of topically applied drugs: Pathways and models reconsidered," *Pharm. Acta Helv.*, vol. 70, no. 1, pp. 3–24, 1995.
- [88] J. Toole *et al.*, "Evaluation of irritation and sensitisation of two 50 µg/day oestrogen patches," *Maturitas*, vol. 43, no. 4, pp. 257–263, 2002.
- [89] J. Escobar-Chavez *et al.*, "Nanocarriers for transdermal drug delivery," *Res. Reports Transdermal Drug Deliv.*, p. 3, 2012.
- [90] M. B. Brown, G. P. Martin, S. A. Jones, and F. K. Akomeah, "Dermal and transdermal drug delivery systems: Current and future prospects," *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents*, vol. 13, no. 3, pp. 175–187, 2006.
- [91] M. Vikelis, K. C. Spingos, and A. M. Rapoport, "The iontophoretic transdermal system formulation of sumatriptan as a new option in the acute treatment of migraine: A perspective," *Ther. Adv. Neurol. Disord.*, vol. 8, no. 4, pp. 160–165, 2015.
- [92] T. Waghule *et al.*, "Microneedles: A smart approach and increasing potential for transdermal drug delivery system," *Biomed. Pharmacother.*, vol. 109, no. July 2018, pp. 1249–1258, 2019.
- [93] J. S. Patton, C. S. Fishburn, and J. G. Weers, "The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery.," *Proc. Am. Thorac. Soc.*, vol. 1, no. 4, pp. 338–344, 2004.
- [94] D. A. Groneberg, C. Witt, U. Wagner, K. F. Chung, and A. Fischer, "Fundamentals of pulmonary drug delivery," *Respir. Med.*, vol. 97, no. 4, pp. 382–387, 2003.
- [95] E. Vazquez-Espinosa *et al.*, "Tobramycin inhalation powder (TOBI Podhaler®) for the treatment of lung infection in patients with cystic fibrosis," *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 14, no. 1, pp. 9–17, 2016.
- [96] W. G. Ammari, M. Khalil Mohammad, R. F. Tayyem, G. P. Martin, and P. G. Royall, "Delivered Lung Dose and Aerodynamic Particle Size Distribution of Salbutamol Pressurized Metered Dose Inhaler after Living under Patients' Realistic Retention Environments," *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, vol. 32, no. 6, pp. 386–395, 2019.
- [97] B. P. Toole, "Hyaluronan: From extracellular glue to pericellular cue," *Nat. Rev. Cancer*, vol. 4, no. 7, pp. 528–539, 2004.
- [98] L. K. Widjaja, M. Bora, P. N. P. H. Chan, V. Lipik, T. T. L. Wong, and S. S. Venkatraman, "Hyaluronic acid-based nanocomposite hydrogels for ocular drug delivery applications," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 102, no. 9, pp. 3056–3065, 2014.
- [99] J. Liang, D. Jiang, and P. W. Noble, "Hyaluronan as a therapeutic target," *Adv Drug*

- Deliv Rev*, pp. 186–203, 2017.
- [100] D. A. Gianolio *et al.*, “Synthesis and evaluation of hydrolyzable hyaluronan-tethered bupivacaine delivery systems,” *Bioconjug. Chem.*, vol. 16, no. 6, pp. 1512–1518, 2005.
- [101] D. Liu *et al.*, “Oral delivery of insulin using CaCO<sub>3</sub>-based composite nanocarriers with hyaluronic acid coatings,” *Mater. Lett.*, vol. 188, pp. 263–266, 2017.
- [102] F. Shahidi and J. Synowiecki, “Isolation and Characterization of Nutrients and Value-Added Products from Snow Crab (*Chionoectes Opilio*) and Shrimp (*Pandalus Borealis*) Processing Discards,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 39, no. 8, pp. 1527–1532, 1991.
- [103] C. Saikia and P. Gogoi, “Chitosan: A Promising Biopolymer in Drug Delivery Applications,” *J. Mol. Genet. Med.*, vol. s4, 2015.
- [104] M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, and E. Chiellini, “Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications,” *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, no. 8, pp. 981–1014, 2011.
- [105] T. Garg, G. Rath, and A. K. Goyal, “Inhalable chitosan nanoparticles as antitubercular drug carriers for an effective treatment of tuberculosis,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 44, no. 3, pp. 997–1001, 2016.
- [106] C. Feng *et al.*, “Chitosan/o-carboxymethyl chitosan nanoparticles for efficient and safe oral anticancer drug delivery: In vitro and in vivo evaluation,” *Int. J. Pharm.*, vol. 457, no. 1, pp. 158–167, 2013.
- [107] V. Urtuvia, N. Maturana, F. Acevedo, C. Peña, and A. Díaz-Barrera, “Bacterial alginate production: an overview of its biosynthesis and potential industrial production,” *World J. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 33, no. 11, p. 0, 2017.
- [108] H. Grasdalen, B. Larsen, and O. Smidsrød, “<sup>13</sup>C-N.m.r. studies of alginate,” *Carbohydr. Res.*, vol. 56, no. 2, pp. 3–7, 1977.
- [109] D. Jain and D. Bar-Shalom, “Alginate drug delivery systems: Application in context of pharmaceutical and biomedical research,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 40, no. 12, pp. 1576–1584, 2014.
- [110] K. I. Draget, G. Skjåk-Bræk, and O. Smidsrød, “Alginate based new materials,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 21, no. 1–2, pp. 47–55, 1997.
- [111] F. Tuğcu-Demiröz, F. Acartürk, S. Takka, and Ö. Konuş-Boyunağa, “Evaluation of alginate based mesalazine tablets for intestinal drug delivery,” *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 67, no. 2, pp. 491–497, 2007.
- [112] P. Xu *et al.*, “Alginate-based ferrofluid and magnetic microsphere thereof,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 47, no. 5, pp. 654–660, 2010.
- [113] M. A. S. Azizi Samir, F. Alloin, and A. Dufresne, “Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field,” *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 2, pp. 612–626, 2005.

- [114] X. Wang, Q. Zhang, C. Nam, M. Hickner, M. Mahoney, and M. E. Meyerhoff, "Tonophore-based anion-selective optode printed on cellulose paper," *Angew. Chemie Int. Ed.*, vol. 56, no. 39, pp. 11826–11830, 2017.
- [115] P. Medhi *et al.*, "Lidocaine-loaded fish scale-nanocellulose biopolymer composite microneedles," *AAPS PharmSciTech*, vol. 18, no. 5, pp. 1488–1494, 2017.
- [116] R. F. Donnelly *et al.*, "Hydrogel-forming microneedles prepared from 'super swelling' polymers combined with lyophilised wafers for transdermal drug delivery," *PLoS One*, vol. 9, no. 10, 2014.
- [117] K. Khoshnevisan *et al.*, "Cellulose acetate electrospun nanofibers for drug delivery systems: Applications and recent advances," *Carbohydr. Polym.*, vol. 198, pp. 131–141, 2018.
- [118] V. J. Stella and Q. he, "Cyclodextrins," *Toxicol. Pathol.*, vol. 36, no. 1, pp. 30–42, 2008.
- [119] M. R. Patel, D. A. Lamprou, and P. R. Vavia, "Synthesis, Characterization, and Drug Delivery Application of Self-assembling Amphiphilic Cyclodextrin," *AAPS PharmSciTech*, vol. 21, no. 1, pp. 1–16, 2020.
- [120] M. Jug, F. Maestrelli, M. Bragagni, and P. Mura, "Preparation and solid-state characterization of bupivacaine hydrochloride cyclodextrin complexes aimed for buccal delivery," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 52, no. 1, pp. 9–18, 2010.
- [121] C. Thauvin, B. Schwarz, F. Delie, and E. Allémann, "Functionalized PLA polymers to control loading and/or release properties of drug-loaded nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 548, no. 2, pp. 771–777, 2018.
- [122] Y. Sheng, Y. Yuan, C. Liu, X. Tao, X. Shan, and F. Xu, "In vitro macrophage uptake and in vivo biodistribution of PLA-PEG nanoparticles loaded with hemoglobin as blood substitutes: Effect of PEG content," *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 20, no. 9, pp. 1881–1891, 2009.
- [123] C. Gómez-Gaete, E. Fattal, L. Silva, M. Besnard, and N. Tsapis, "Dexamethasone acetate encapsulation into Trojan particles," *J. Control. Release*, vol. 128, no. 1, pp. 41–49, 2008.
- [124] M. F. Zambaux, F. Bonneaux, R. Gref, E. Dellacherie, and C. Vigneron, "Preparation and characterization of protein C-loaded PLA nanoparticles," *J. Control. Release*, vol. 60, no. 2–3, pp. 179–188, 1999.
- [125] R. . Mainardes, M. . Daflon Gremiao, I. . Brunetti, L. . Da Fonseca, and N. . Khalil, "Zidovudine-Loaded PLA and PLA-PEG Blend Nanoparticles: Influence of Polymer Type on Phagocytic Uptake by Polymorphonuclear Cells," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 1, pp. 257–267, 2008.
- [126] S. H. Lee, Z. Zhang, and S. S. Feng, "Nanoparticles of poly(lactide)-tocopheryl polyethylene glycol succinate (PLA-TPGS) copolymers for protein drug delivery," *Biomaterials*, vol. 28, no. 11, pp. 2041–2050, 2007.
- [127] Q. Cheng, J. Feng, J. Chen, X. Zhu, and F. Li, "Brain Transport of Neurotoxin-I with PLA

- Nanoparticles through Intranasal Administration in Rats: A Microdialysis Study," *Biopharm. Drug Dispos.*, vol. 29, pp. 431–439, 2008.
- [128] J. Matsumoto, Y. Nakada, K. Sakurai, T. Nakamura, and Y. Takahashi, "Preparation of nanoparticles consisted of poly(L-lactide)-poly(ethylene glycol)-poly(L-lactide) and their evaluation in vitro," *Int. J. Pharm.*, vol. 185, no. 1, pp. 93–101, 1999.
- [129] M. J. R. Virlan *et al.*, "Current uses of poly(lactic-co-glycolic acid) in the dental field: A comprehensive review," *J. Chem.*, vol. 2015, no. 2, 2015.
- [130] H. Makadia and S. J. Siegel, "Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier," *Polymers (Basel)*, vol. 3, no. 3, pp. 1–19, 2011.
- [131] A. Budhian, S. J. Siegel, and K. I. Winey, "Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol," *J. Microencapsul.*, vol. 22, no. 7, pp. 773–785, 2005.
- [132] L. Mu and S. S. Feng, "A novel controlled release formulation for the anticancer drug paclitaxel (Taxol®): PLGA nanoparticles containing vitamin E TPGS," *J. Control. Release*, vol. 86, no. 1, pp. 33–48, 2003.
- [133] H. Chen, Y. S. Lui, J. Zhao, L. Xu, and L. P. Tan, "Effect of solvent composition of electrospun PLGA fibers on paclitaxel release," *Mater. Technol.*, vol. 33, no. 11, pp. 716–722, 2018.
- [134] D. . Sahana, G. Mittal, V. Bhardwaj, and M. N. . Ravi Kumar, "PLGA Nanoparticles for Oral Delivery of Hydrophobic Drugs: Influence of Organic Solvent on Nanoparticle Formation and Release Behavior In Vitro and In Vivo Using Estradiol as a Model Drug," *J. Pharm. Sci.*, vol. 97, no. 4, pp. 1530–1542, 2008.
- [135] C. Gómez-Gaete, N. Tsapis, M. Besnard, A. Bochot, and E. Fattal, "Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 331, no. 2, pp. 153–159, 2007.
- [136] J. H. Choi *et al.*, "Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) hollow fiber with segmental switchability of its chains sensitive to NIR light for synergistic cancer therapy," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 173, pp. 258–265, 2019.
- [137] L. K. Vora, R. F. Donnelly, E. Larrañeta, P. González-Vázquez, R. R. S. Thakur, and P. R. Vavia, "Novel bilayer dissolving microneedle arrays with concentrated PLGA nanomicroparticles for targeted intradermal delivery: Proof of concept," *J. Control. Release*, vol. 265, pp. 93–101, 2017.
- [138] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, "The return of a forgotten polymer - Polycaprolactone in the 21st century," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, 2010.
- [139] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, "Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review," *J. Control. Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, 2012.

- [140] S. Y. Kim and Y. M. Lee, "Taxol-loaded block copolymer nanospheres composed of methoxy poly(ethylene glycol) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) as novel anticancer drug carriers," *Biomaterials*, vol. 22, no. 13, pp. 1697–1704, 2001.
- [141] C. Damgé, P. Maincent, and N. Ubrich, "Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats," *J. Control. Release*, vol. 117, no. 2, pp. 163–170, 2007.
- [142] S. Iqbal, M. H. Rashid, A. S. Arbab, and M. Khan, "Encapsulation of anticancer drugs (5-Fluorouracil and Paclitaxel) into polycaprolactone (PCL) nanofibers and in vitro testing for sustained and targeted therapy," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 13, no. 4, pp. 355–366, 2017.
- [143] B. Wang, H. Zheng, M. W. Chang, Z. Ahmad, and J. S. Li, "Hollow polycaprolactone composite fibers for controlled magnetic responsive antifungal drug release," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 145, pp. 757–767, 2016.
- [144] I. M. Brook and R. van Noort, "Drug release from acrylic polymers via channels and cracks: In vitro studies with hydrocortisone," *Biomaterials*, vol. 6, no. 4, pp. 281–285, 1985.
- [145] S. Thakral, N. K. Thakral, and D. K. Majumdar, "Eudragit®: A technology evaluation," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 10, no. 1, pp. 131–149, 2013.
- [146] V. Nikam, "Eudragit a versatile polymer : A review Pharmacologyonline 1 : 152-164 ( 2011 ) EUDRAGIT A VERSATILE POLYMER : A REVIEW," *Pharmacol. online*, vol. 1, no. January 2011, pp. 152–164, 2011.
- [147] "Evonik Industries - Specialty Chemicals." [Online]. Available: <https://healthcare.evonik.com/product/health-care/en/products/pharmaceutical-excipients/>.
- [148] A. Sonje and A. Chandra, "Comprehensive Review on Eudragit Polymers," *Int. Res. J. Pharm.*, vol. 4, no. 5, pp. 71–74, 2013.
- [149] M. L. B. Palacio and B. Bhushan, "Research article: Bioadhesion: A review of concepts and applications," *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 370, no. 1967, pp. 2321–2347, 2012.
- [150] V. V. Khutoryanskiy, "Advances in Mucoadhesion and Mucoadhesive Polymers," *Macromol. Biosci.*, vol. 11, no. 6, pp. 748–764, 2011.
- [151] J. D. Smart, "The basics and underlying mechanisms of mucoadhesion," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 57, no. 11, pp. 1556–1568, 2005.
- [152] A. Ahuja, R. . Khar, and J. Ali, "Mucoadhesive drug delivery systems," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 23, no. 5, pp. 489–515, 1997.
- [153] C. Niranjana, R. Priya, S. Swain, G. Kumar, K. Charan, and D. Ghose, "Future Journal of Pharmaceutical Sciences Pharmaceutical significance of Eudragit : A review," vol. 3, 2017.

- [154] W. Zhang *et al.*, "Nanostructured lipid carrier surface modified with Eudragit RS 100 and its potential ophthalmic functions," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, pp. 4305–4315, 2014.
- [155] R. Tiwari, A. Gupta, M. Joshi, and G. Tiwari, "Bilayer tablet formulation of metformin HCl and acarbose: A novel approach to control diabetes," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 68, no. 2, pp. 138–152, 2014.
- [156] V. Mathur, K. Nagpal, S. Singh, and D. Mishra, "Comparative release profile of sustained release matrix tablets of verapamil HCl," *Int. J. Pharm. Investig.*, vol. 3, no. 1, p. 60, 2013.
- [157] S. A. Tayel, M. A. El-Nabarawi, M. I. Tadros, and W. H. Abd-Elsalam, "Positively charged polymeric nanoparticle reservoirs of terbinafine hydrochloride: Preclinical implications for controlled drug delivery in the aqueous humor of rabbits," *AAPS PharmSciTech*, vol. 14, no. 2, pp. 782–793, 2013.
- [158] D. T. Baviskar, V. B. Parik, and D. J. Jain, "Development of matrix-type transdermal delivery of lornoxicam: In vitro evaluation and pharmacodynamic and pharmacokinetic studies in albino rats," *PDA J. Pharm. Sci. Technol.*, vol. 67, no. 1, pp. 9–22, 2013.
- [159] N. V. Gupta, S. Natasha, A. Getyala, and R. S. Bhat, "Bioadhesive vaginal tablets containing spray dried microspheres loaded with clotrimazole for treatment of vaginal Candidiasis," *Acta Pharm.*, vol. 63, no. 3, pp. 359–372, 2013.
- [160] V. Maravajhala, S. Papishetty, and S. Bandlapalli, "Nanotechnology in development of drug delivery system," *Int. J. Pharm. Sci.*, vol. 3, no. 1, pp. 84–96, 2012.
- [161] Vanderhoff *et al.*, "United States Patent: Polymer emulsification process.," no. 19, 1979.
- [162] H. Huang, T. Belwal, S. Liu, Z. Duan, and Z. Luo, "Novel multi-phase nano-emulsion preparation for co-loading hydrophilic arbutin and hydrophobic coumaric acid using hydrocolloids," *Food Hydrocoll.*, vol. 93, no. January, pp. 92–101, 2019.
- [163] J. Allouche, *Synthesis of Organic and Bioorganic Nanoparticles: An Overview of the Preparation Methods*. 2013.
- [164] N. Rizkalla, C. Range, F. X. Lacasse, and P. Hildgen, "Effect of various formulation parameters on the properties of polymeric nanoparticles prepared by multiple emulsion method," *J. Microencapsul.*, vol. 23, no. 1, pp. 39–57, 2006.
- [165] I. D. Rosca, F. Watari, and M. Uo, "Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation," *J. Control. Release*, vol. 99, no. 2, pp. 271–280, 2004.
- [166] E. Cohen-Sela, M. Chorny, N. Koroukhov, H. D. Danenberg, and G. Golomb, "A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles," *J. Control. Release*, vol. 133, no. 2, pp. 90–95, 2009.
- [167] B. Gourdon, X. Declèves, J. M. Péan, and C. Chemin, "Double or Simple Emulsion Process to Encapsulate Hydrophilic Oxytocin Peptide in PLA-PEG Nanoparticles,"

*Pharm. Res.*, vol. 35, no. 4, 2018.

- [168] C. J. Hsiao *et al.*, "Enhancement of the stability of chlorophyll using chlorophyll-encapsulated polycaprolactone microparticles based on droplet microfluidics," *Food Chem.*, vol. 306, no. June 2019, p. 125300, 2020.
- [169] P. H. Rajasree, W. Paul, C. P. Sharma, R. A. M. Osmani, U. Hani, and A. Srivastava, "Eudragit encapsulated cationic poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles in targeted delivery of capecitabine for augmented colon carcinoma therapy," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 46, pp. 302–311, 2018.
- [170] M. Ayoub *et al.*, "Study of the effect of formulation parameters/variables to control the nanoencapsulation of hydrophilic drug via double emulsion technique," *J. Biomed. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 2, pp. 255–262, 2011.
- [171] J. Cui, Y. Wang, A. Postma, J. Hao, L. Hosta-Rigau, and F. Caruso, "Monodisperse polymer capsules: Tailoring size, shell thickness, and hydrophobic cargo loading via emulsion templating," *Adv. Funct. Mater.*, vol. 20, no. 10, pp. 1625–1631, 2010.
- [172] N. Y. Martinez, P. F. Andrade, N. Durán, and S. Cavalitto, "Development of double emulsion nanoparticles for the encapsulation of bovine serum albumin," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 158, pp. 190–196, 2017.
- [173] H. Mok and T. G. Park, "Direct plasmid DNA encapsulation within PLGA nanospheres by single oil-in-water emulsion method," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 68, no. 1, pp. 105–111, 2008.
- [174] A. Fàbregas *et al.*, "Impact of physical parameters on particle size and reaction yield when using the ionic gelation method to obtain cationic polymeric chitosan-tripolyphosphate nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 446, no. 1–2, pp. 199–204, 2013.
- [175] P. Calvo, J. L. Vila-Jato, and M. J. Alonso, "Evaluation of cationic polymer-coated nanocapsules as ocular drug carriers," *Int. J. Pharm.*, vol. 153, no. 1, pp. 41–50, 1997.
- [176] Q. Gan and T. Wang, "Chitosan nanoparticle as protein delivery carrier-Systematic examination of fabrication conditions for efficient loading and release," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 59, no. 1, pp. 24–34, 2007.
- [177] H. Katas and H. O. Alpar, "Development and characterisation of chitosan nanoparticles for siRNA delivery," *J. Control. Release*, vol. 115, no. 2, pp. 216–225, 2006.
- [178] T. H. Dung *et al.*, "Chitosan-TPP nanoparticle as a release system of antisense oligonucleotide in the oral environment," *J. Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 7, no. 11, pp. 3695–3699, 2007.
- [179] Y. Xu, Y. Du, R. Huang, and L. Gao, "Preparation and modification of N-(2-hydroxyl) propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride nanoparticle as a protein carrier," *Biomaterials*, vol. 24, no. 27, pp. 5015–5022, 2003.
- [180] K. A. Janes, M. P. Fresneau, A. Marazuela, A. Fabra, and M. J. Alonso, "Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin," *J. Control. Release*, vol. 73, no. 2–3,

pp. 255–267, 2001.

- [181] H. Fessi, F. Puisieux, J. P. Devissaguet, N. Ammoury, and S. Benita, “Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement,” *Int. J. Pharm.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–4, 1989.
- [182] C. V. Sternling and L. E. Scriven, “Interfacial turbulence: Hydrodynamic instability and the marangoni effect,” *AIChE J.*, vol. 5, no. 4, pp. 514–523, 1959.
- [183] S. Schubert, J. T. Delaney, and U. S. Schubert, “Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers: From history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid),” *Soft Matter*, vol. 7, no. 5, pp. 1581–1588, 2011.
- [184] I. Y. Perevyazko, J. T. Delaney, A. Vollrath, G. M. Pavlov, S. Schubert, and U. S. Schubert, “Examination and optimization of the self-assembly of biocompatible, polymeric nanoparticles by high-throughput nanoprecipitation,” *Soft Matter*, vol. 7, no. 10, pp. 5030–5035, 2011.
- [185] T. Betancourt, B. Brown, and L. Brannon-Peppas, “Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles by nanoprecipitation: Preparation, characterization and in vitro evaluation,” *Nanomedicine*, vol. 2, no. 2, pp. 219–232, 2007.
- [186] U. Bilati, E. Allémann, and E. Doelker, “Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles,” *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 67–75, 2005.
- [187] S. Chew, Y. Wen, Y. Dzenis, and K. Leong, “The Role of Electrospinning in the Emerging Field of Nanomedicine,” *Curr. Pharm. Des.*, vol. 12, no. 36, pp. 4751–4770, 2006.
- [188] T. J. Sill and H. A. von Recum, “Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering,” *Biomaterials*, vol. 29, no. 13, pp. 1989–2006, 2008.
- [189] A. Garjani, M. Barzegar-Jalali, K. Osouli-Bostanabad, H. Ranjbar, and K. Adibkia, “Morphological and physicochemical evaluation of the propranolol HCl–Eudragit® RS100 electrospayed nanoformulations,” *Artif. Cells, Nanomedicine Biotechnol.*, vol. 46, no. 4, pp. 749–756, 2018.
- [190] H. Valo *et al.*, “Electrospray encapsulation of hydrophilic and hydrophobic drugs in poly(L-lactic acid) nanoparticles,” *Small*, vol. 5, no. 15, pp. 1791–1798, 2009.
- [191] W. Zhao, J. Li, K. Jin, W. Liu, X. Qiu, and C. Li, “Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 59, pp. 1181–1194, 2016.
- [192] J. M. Miszuk *et al.*, “Functionalization of PCL-3D electrospun nanofibrous scaffolds for improved BMP2-induced bone formation,” *Appl. Mater. Today*, vol. 10, pp. 194–202, 2018.
- [193] X. Geng, O. H. Kwon, and J. Jang, “Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 27, pp. 5427–5432, 2005.

- [194] C. A. Bonino *et al.*, "Electrospinning alginate-based nanofibers: From blends to crosslinked low molecular weight alginate-only systems," *Carbohydr. Polym.*, vol. 85, no. 1, pp. 111–119, 2011.
- [195] R. Casasola, N. L. Thomas, A. Trybala, and S. Georgiadou, "Electrospun poly lactic acid (PLA) fibres: Effect of different solvent systems on fibre morphology and diameter," *Polymer (Guildf.)*, vol. 55, no. 18, pp. 4728–4737, 2014.
- [196] O. Koysuren and H. N. Koysuren, "Characterization of poly(methyl methacrylate) nanofiber mats by electrospinning process," *J. Macromol. Sci. Part A Pure Appl. Chem.*, vol. 53, no. 11, pp. 691–698, 2016.
- [197] H. E. Abdelhakim, A. Coupe, C. Tuleu, M. Edirisinghe, and D. Q. M. Craig, "Electrospinning Optimization of Eudragit e PO with and without Chlorpheniramine Maleate Using a Design of Experiment Approach," *Mol. Pharm.*, vol. 16, no. 6, pp. 2557–2568, 2019.
- [198] X. X. Shen, D. G. Yu, L. M. Zhu, and C. Branford-White, "Preparation and characterization of ultrafine Eudragit L100 fibers via electrospinning," *3rd Int. Conf. Bioinforma. Biomed. Eng. iCBBE 2009*, pp. 9–12, 2009.
- [199] N. Bhardwaj and S. C. Kundu, "Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique," *Biotechnol. Adv.*, vol. 28, no. 3, pp. 325–347, 2010.
- [200] D. Quintanar-Guerrero, E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker, "Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 24, no. 12, pp. 1113–1128, 1998.
- [201] M. H. Balakrishanan and M. Rajan, "Size-controlled synthesis of biodegradable nanocarriers for targeted and controlled cancer drug delivery using salting out cation," *Bull. Mater. Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 69–77, 2016.
- [202] M. L. T. Zweers, G. H. M. Engbers, D. W. Grijpma, and J. Feijen, "In vitro degradation of nanoparticles prepared from polymers based on DL-lactide, glycolide and poly(ethylene oxide)," *J. Control. Release*, vol. 100, no. 3, pp. 347–356, 2004.
- [203] J. G. Eley, V. D. Pujari, and J. McLane, "Poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles containing coumarin-6 for suppository delivery: In vitro release profile and in vivo tissue distribution," *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents*, vol. 11, no. 4, pp. 255–261, 2004.
- [204] H. Ibrahim, C. Bindschaedler, E. Doelker, P. Buri, and R. Gurny, "Aqueous nanodispersions prepared by a salting-out process," *Int. J. Pharm.*, vol. 87, no. 1–3, pp. 239–246, 1992.
- [205] A. Siddiqua Gazi and A. K. Sailaja, "Preparation and Characterization of Paracetamol Loaded Eudragit S100 Nanoparticles by Salting Out Technique," *J. Dev. Drugs*, vol. 07, no. 01, pp. 3–6, 2018.
- [206] R. Dinarvand, S. H. Moghadam, A. Sheikhi, and F. Atyabi, "Effect of surfactant HLB

- and different formulation variables on the properties of poly-D,L-lactide microspheres of naltrexone prepared by double emulsion technique," *J. Microencapsul.*, vol. 22, no. 2, pp. 139–151, 2005.
- [207] F. Shakeri, S. Shakeri, and M. Hojjatoleslami, "Preparation and Characterization of Carvacrol Loaded Polyhydroxybutyrate Nanoparticles by Nanoprecipitation and Dialysis Methods," *J. Food Sci.*, vol. 79, no. 4, 2014.
- [208] M. Liu *et al.*, "Formation of poly(l,d-lactide) spheres with controlled size by direct dialysis," *Polymer (Guildf.)*, vol. 48, no. 19, pp. 5767–5779, 2007.
- [209] E. Chiellini, C. Errico, C. Bartoli, and F. Chiellini, "Poly(hydroxyalkanoates)-based polymeric nanoparticles for drug delivery," *J. Biomed. Biotechnol.*, vol. 2009, 2009.
- [210] A. Lassenberger, O. Bixner, T. Gruenewald, H. Lichtenegger, R. Zirbs, and E. Reimhult, "Evaluation of High-Yield Purification Methods on Monodisperse PEG-Grafted Iron Oxide Nanoparticles," *Langmuir*, vol. 32, no. 17, pp. 4259–4269, 2016.
- [211] Y. Zhou *et al.*, "A New Method for Evaluating Actual Drug Release Kinetics of Nanoparticles inside Dialysis Devices via Numerical Deconvolution," *J. Control. Release*, vol. 243, pp. 11–20, 2016.
- [212] R. Vehring, "Pharmaceutical particle engineering via spray drying," *Pharm. Res.*, vol. 25, no. 5, pp. 999–1022, 2008.
- [213] D. Santos, A. C. Maurício, V. Sencadas, J. D. Santos, M. H. Fernandes, and P. S. Gomes, "Spray Drying: An Overview," *Biomater. - Phys. Chem. - New Ed.*, 2018.
- [214] Y. F. Maa, H. R. Costantino, P. A. Nguyen, and C. C. Hsu, "The effect of operating and formulation variables on the morphology of spray-dried protein particles," *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 2, no. 3, pp. 213–223, 1997.
- [215] R. Lin, L. S. Ng, and C. H. Wang, "In vitro study of anticancer drug doxorubicin in PLGA-based microparticles," *Biomaterials*, vol. 26, no. 21, pp. 4476–4485, 2005.
- [216] M. D. Blanco, M. V. Bernardo, R. L. Sastre, R. Olmo, E. Muñiz, and J. M. Teijón, "Preparation of bupivacaine-loaded poly( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres by spray drying: Drug release studies and biocompatibility," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 55, no. 2, pp. 229–236, 2003.
- [217] R. Bodmeier and H. Chen, "Preparation of Biodegradable Poly( $\pm$ )lactide Microparticles Using a Spray-Drying Technique," *J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 40, no. 11, pp. 754–757, 1988.
- [218] P. He, S. S. Davis, and L. Illum, "Chitosan microspheres prepared by spray drying method," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 4, p. S173, 1996.
- [219] P. Kortesoja, M. Ahola, M. Kangas, I. Kangasniemi, A. Yli-Urpo, and J. Kiesvaara, "In vitro evaluation of sol-gel processed spray dried silica gel microspheres as carrier in controlled drug delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 200, no. 2, pp. 223–229, 2000.

- [220] J. Simmchen, A. Baeza, D. Ruiz-Molina, and M. Vallet-Regí, "Improving catalase-based propelled motors endurance by enzyme encapsulation," *Nanoscale*, vol. 1, no. 3, 2012.
- [221] D. Blanco and M. J. Alonso, "Protein encapsulation and release from poly(lactide-co-glycolide) microspheres: Effect of the protein and polymer properties and of the co-encapsulation of surfactants," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 45, no. 3, pp. 285–294, 1998.
- [222] X. Z. Yang, S. Dou, T. M. Sun, C. Q. Mao, H. X. Wang, and J. Wang, "Systemic delivery of siRNA with cationic lipid assisted PEG-PLA nanoparticles for cancer therapy," *J. Control. Release*, vol. 156, no. 2, pp. 203–211, 2011.
- [223] A. R. Ahmed and R. Bodmeier, "Preparation of preformed porous PLGA microparticles and antisense oligonucleotides loading," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 71, no. 2, pp. 264–270, 2009.
- [224] Q. Xu, Y. Tanaka, and J. T. Czernuszka, "Encapsulation and release of a hydrophobic drug from hydroxyapatite coated liposomes," *Biomaterials*, vol. 28, no. 16, pp. 2687–2694, 2007.
- [225] G. . Nabar *et al.*, "Micelle-templated, poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles for hydrophobic drug delivery," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 13, pp. 351–366, 2018.
- [226] R. Mobasser, M. Karimi, L. Tian, H. Naderi-Manesh, and S. Ramakrishna, "Hydrophobic lapatinib encapsulated dextran-chitosan nanoparticles using a toxic solvent free method: fabrication, release property & in vitro anti-cancer activity," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 74, pp. 413–421, 2017.
- [227] K. Derakhshandeh, M. Erfan, and S. Dadashzadeh, "Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: Factorial design, characterization and release kinetics," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 66, no. 1, pp. 34–41, 2007.
- [228] H. W. Sung, K. Sonaje, Z. X. Liao, L. W. Hsu, and E. Y. Chuang, "PH-responsive nanoparticles shelled with chitosan for oral delivery of insulin: From mechanism to therapeutic applications," *Acc. Chem. Res.*, vol. 45, no. 4, pp. 619–629, 2012.
- [229] T. Yamagata *et al.*, "Characterization of insulin protection properties of complexation hydrogels in gastric and intestinal enzyme fluids," *J. Control. Release*, vol. 112, no. 3, pp. 343–349, 2006.
- [230] S. Sajeesh, K. Bouchemal, V. Marsaud, C. Vauthier, and C. P. Sharma, "Cyclodextrin complexed insulin encapsulated hydrogel microparticles: An oral delivery system for insulin," *J. Control. Release*, vol. 147, no. 3, pp. 377–384, 2010.
- [231] D. J. McClements, "Critical review of techniques and methodologies for characterization of emulsion stability," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 47, no. 7, pp. 611–649, 2007.
- [232] R. Bodmeier and J. W. McGinity, "The Preparation and Evaluation of Drug-Containing Poly(dl-lactide) Microspheres Formed by the Solvent Evaporation Method,"

*Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 4, no. 6. pp. 465–471, 1987.

- [233] S. Nakakuki, "NII-Electronic Library Service," *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 34, no. 1, pp. 430–433, 1986.
- [234] K. Suzuki and J. C. Price, "Microencapsulation and dissolution properties of a neuroleptic in a biodegradable polymer, poly(d,l-lactide)," *J. Pharm. Sci.*, vol. 74, no. 1, pp. 21–24, 1985.
- [235] H. Jeffery, S. S. Davis, and D. T. O'Hagan, "FACTORS INFLUENCING THE SIZE OF PLGA MPs," *Int. J. Pharm.*, vol. 77, no. 2–3, pp. 169–175, 1991.
- [236] M. Iwata and J. W. McGinity, "Preparation of multi-phase microspheres of poly(d,l-lactic acid) and poly(d,l-lactic-co-glycolic acid) containing a w/o emulsion by a multiple emulsion solvent evaporation technique," *J. Microencapsul.*, vol. 9, no. 2, pp. 201–214, 1991.
- [237] F. Puisieux, A. Gulik, and P. Couvreur, "international pharmaceutrctics Characterization of V3 BRU peptide-loaded small PLGA microspheres prepared by a ( W1 / O ) W 2 emulsion solvent evaporation method," vol. 111, pp. 137–145, 1994.
- [238] A. Zimmer, "Zimmer-1999-Antisense oligonucle.pdf," vol. 295, pp. 286–295, 1999.
- [239] Y. O. Samak, M. El Massik, and A. G. A. Coombes, "A Comparison of Aerosolization and Homogenization Techniques for Production of Alginate Microparticles for Delivery of Corticosteroids to the Colon," *J. Pharm. Sci.*, pp. 1–9, 2016.
- [240] Y. Y. Yang, J. P. Wan, T. S. Chung, P. K. Pallathadka, S. Ng, and J. Heller, "POE-PEG-POE triblock copolymeric microspheres containing protein: I. Preparation and characterization," *J. Control. Release*, vol. 75, no. 1–2, pp. 115–128, 2001.
- [241] K. J. Zhu, H. L. Jiang, X. Y. Du, J. Wang, W. X. Xu, and S. F. Liu, "Preparation and characterization of hCG-loaded polylactide or poly(lactide-co-glycolide) microspheres using a modified water-in-oil-in-water (w/o/w) emulsion solvent evaporation technique," *J. Microencapsul.*, vol. 18, no. 2, pp. 247–260, 2001.
- [242] J. M. Péan, M. C. Venier-Julienne, R. Filmon, M. Sergent, R. Phan-Tan-Luu, and J. P. Benoit, "Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 166, no. 1, pp. 105–115, 1998.
- [243] H. Rafati, A. G. A. Coombes, J. Adler, J. Holland, and S. S. Davis, "Protein-loaded poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles for oral administration: Formulation, structural and release characteristics," *J. Control. Release*, vol. 43, no. 1, pp. 89–102, 1997.
- [244] M. R. Aberturas, J. Molpeceres, M. Guzmán, and F. García, "Development of a new cyclosporine formulation based on poly(caprolactone) microspheres," *J. Microencapsul.*, vol. 19, no. 1, pp. 61–72, 2002.
- [245] F. Gabor, B. Ertl, M. Wirth, and R. Mallinger, "Ke toprofe n -poly(," *In Vitro*, vol. 16, no. 1, 1999.

- [246] Y. Capan, B. H. Woo, S. Gebrekidan, S. Ahmed, and P. P. DeLuca, "Influence of formulation parameters on the characteristics of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing poly(L-lysine) complexed plasmid DNA," *J. Control. Release*, vol. 60, no. 2–3, pp. 279–286, 1999.
- [247] S. W., "Studies in emulsions," *J. Phys. Chem.*, vol. 29, pp. 738–749, 1925.
- [248] A. T. Florence and D. Whitehill, "Some features of breakdown in water-in-oil-in-water multiple emulsions," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 79, no. 1, pp. 243–256, 1981.
- [249] A. T. Florence and D. Whitehill, "The formulation and stability of multiple emulsions," *Int. J. Pharm.*, vol. 11, no. 4, pp. 277–308, 1982.
- [250] S. Matsumoto, T. Inoue, M. Kohda, and K. Ikura, "Water permeability of oil layers in W/O/W emulsions under osmotic pressure gradients," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 77, no. 2, pp. 555–563, 1980.
- [251] M. Frenkel, R. Shwartz, and N. Garti, "Multiple emulsions. I. Stability: Inversion, apparent and weighted HLB," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 94, no. 1, pp. 174–178, 1983.
- [252] R. Ghaderi, C. Stureson, and J. Carlfors, "Effect of preparative parameters on the characteristics of poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres made by the double emulsion method," *Int. J. Pharm.*, vol. 141, no. 1–2, pp. 205–216, 1996.
- [253] V. Jain and R. Singh, "Development and characterization of eudragit RS 100 loaded microsponges and its colonic delivery using natural polysaccharides," *Acta Pol. Pharm. - Drug Res.*, vol. 67, no. 4, pp. 407–415, 2010.
- [254] H. M. Princen, "Highly concentrated emulsions. I. Cylindrical systems," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 71, no. 1, pp. 55–66, 1979.
- [255] K. J. Lissant and K. G. Mayhan, "A study of medium and high internal phase ratio water/polymer emulsions," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 42, no. 1, pp. 201–208, 1973.
- [256] D. C. Sherrington and A. Chemistry, "High Internal Phase Emulsions ( HIPEs ) - Structure , Properties and Use in Polymer Preparation," vol. 126, 1996.
- [257] J. M. Williams and D. A. Wroblewski, "Spatial distribution of the phases in water-in-oil emulsions. open and closed microcellular foams from cross-linked polystyrene," *Langmuir*, vol. 4, no. 3, pp. 656–662, 1988.
- [258] N. R. Cameron, "High internal phase emulsion templating as a route to well-defined porous polymers," *Polymer (Guildf.)*, vol. 46, no. 5, pp. 1439–1449, 2005.
- [259] G. M. Tedajo, S. Bouttier, J. Fourniat, J. L. Grossiord, J. P. Marty, and M. Seiller, "Release of antiseptics from the aqueous compartments of a w/o/w multiple emulsion," *Int. J. Pharm.*, vol. 288, no. 1, pp. 63–72, 2005.
- [260] M. Benitez and V. Aguirre, "Protein Purification," *Protein Purif.*, no. 1992, pp. 1–207, 2012.
- [261] M. Falahati *et al.*, "A health concern regarding the protein corona, aggregation and

- disaggregation," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1863, no. 5, pp. 971–991, 2019.
- [262] W. M. G. Anthony JF Griffiths, Jeffrey H Miller, David T Suzuki, Richard C Lewontin, *An introduction to Genetic Analysis*, 7th editio. W. H. Freeman, 2000.
- [263] S. S. Usmani *et al.*, "THPdb: Database of FDA-approved peptide and protein therapeutics," *PLoS One*, vol. 12, no. 7, 2017.
- [264] L. Ducry, "Challenges in the Development and Manufacturing of ADC," *Ther. Proteins Methods Protoc. Methods Mol. Biol.*, vol. 899, pp. 489–497, 2012.
- [265] G. Fuhrmann and J. Leroux, "Improving the Stability and Activity of Oral Therapeutic Enzymes – Recent Advances and Perspectives," 2013.
- [266] G. Fuhrmann *et al.*, "polymer – enzyme conjugates," *Nat. Chem.*, vol. 5, no. 7, pp. 582–589, 2013.
- [267] G. Rabbani, E. Ahmad, N. Zaidi, S. Fatima, and R. H. Khan, "pH-Induced Molten Globule State of *Rhizopus niveus* Lipase is More Resistant Against Thermal and Chemical Denaturation Than Its Native State," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 62, no. 3, pp. 487–499, 2012.
- [268] G. Rabbani, E. Ahmad, N. Zaidi, and R. H. Khan, "pH-Dependent Conformational Transitions in Conalbumin (Ovotransferrin), a Metalloproteinase from Hen Egg White," *Cell Biochem. Biophys.*, vol. 61, no. 3, pp. 551–560, 2011.
- [269] A. Mas, P. J. Noble, P. J. Cripps, D. J. Batchelor, P. Graham, and A. J. German, "A blinded randomised controlled trial to determine the effect of enteric coating on enzyme treatment for canine exocrine pancreatic efficiency.," *BMC Vet. Res.*, vol. 8, p. 127, 2012.
- [270] H. He, X. Zhang, and Y. Sheng, "Enteric-coated capsule containing  $\beta$ -galactosidase-loaded polylactic acid nanocapsules: enzyme stability and milk lactose hydrolysis under simulated gastrointestinal conditions," no. 2014, 2019.
- [271] M. Rawat and S. Saraf, "Formulation optimization of double emulsification method for preparation of enzyme-loaded Eudragit S100 microspheres," *J. Microencapsul.*, vol. 26, no. 4, pp. 306–314, 2009.
- [272] J. Fao, W. H. O. Working, G. Report, D. Guidelines, and F. London, "Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food," pp. 1–11, 2002.
- [273] M. Saarela, G. Mogensen, R. Fondén, J. Mättö, and T. Mattila-Sandholm, "Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties," *J. Biotechnol.*, vol. 84, no. 3, pp. 197–215, 2000.
- [274] N. P. Shah, "Functional cultures and health benefits," *Int. Dairy J.*, vol. 17, no. 11, pp. 1262–1277, 2007.
- [275] S. Hekmat and D. J. McMahon, "Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in Ice Cream for Use as a Probiotic Food," *J. Dairy Sci.*, vol. 75, no. 6, pp. 1415–1422, 1992.

- [276] Y. Karagül-Yüceer and Y. K. Avşar, "Health attributes of yogurt and functional dairy products," *Dev. Manuf. Yogurt Other Funct. Dairy Prod.*, no. November, pp. 307–315, 2016.
- [277] H. Yoon, R. Benamouzig, J. Little, M. François-Collange, and D. Tomé, "Systematic review of epidemiological studies on meat, dairy products and egg consumption and risk of colorectal adenomas," *European Journal of Cancer Prevention*, vol. 9, no. 3. pp. 151–164, 2000.
- [278] P. R. Marteau, M. De Vrese, C. J. Cellier, and J. Schrezenmeir, "Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 73, no. 2 SUPPL., pp. 430–436, 2001.
- [279] P. Marteau *et al.*, "Effects of intrajejunal perfusion and chronic ingestion of *Lactobacillus johnsonii* strain La1 on serum concentrations and jejunal secretions of immunoglobulins and serum proteins in healthy humans," *Gastroenterol. Clin. Biol.*, vol. 21, no. 4, pp. 293–298, 1997.
- [280] M. T. Liong and N. P. Shah, "Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strains," *J. Dairy Sci.*, vol. 88, no. 1, pp. 55–66, 2005.
- [281] M. E. Sanders and T. R. Klaenhammer, "Invited review. The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic," *J. Dairy Sci.*, vol. 84, no. 2, pp. 319–331, 2001.
- [282] C. Kunz, S. Kuntz, and S. Rudloff, "Intestinal flora," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 639, pp. 67–79, 2009.
- [283] F. Black, K. Einarsson, A. Lidbeck, K. Orrhage, and C. E. Nord, "Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment," *Scand. J. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 2, pp. 247–254, 1991.
- [284] Sugita T & Togawa M, "Efficacy of *Lactobacillus* preparation Biolactis powder in children with rotavirus enteritis," *Jpn. J. Pediatr.*, vol. 47, pp. 2755-2762., 1994.
- [285] N. S. & B. S. G. Aso Y, Akaza H, Kotake T, Tsukamoto T, Imai K, "Preventive effect of a *Lactobacillus casei* preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial," *Eur. J. Urol.*, vol. 27, pp. 104-109., 1995.
- [286] F. Nagao, "Nagao et al. - 2000." pp. 1–2, 2000.
- [287] K. Niedzielin, H. Kordecki, and B. Birkenfeld, "A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome," *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 13, no. 10, pp. 1143–1147, 2001.
- [288] H. Link-Amster, F. Rochat, K. Y. Saudan, O. Mignot, and J. M. Aeschlimann, "Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake," *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, vol. 10, no. 1, pp. 55–63, 1994.
- [289] C. P. Felley *et al.*, "Favourable effect of an acidified milk (LC-1) on *Helicobacter pylori*

- gastritis in man," *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, vol. 13, no. 1, pp. 25–29, 2001.
- [290] S. E. & V. T. Shornikova A-V, Casas I, Mykkilinen H, "Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis," *Pediatr. Infect. Dis. J.*, vol. 16, pp. 1103–1107, 1997.
- [291] P. Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG, Hoekstra H, Kolacek S, Massar K, Micetic-Turk D and S. H. & W. Z. A, de Sousa JS, Sandhu B, "Lactobacillus GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial," *J. Ped. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 30, pp. 54–60, 2000.
- [292] M. Kaila, E. Isolauri, E. Soppi, E. Virtanen, S. Laine, and H. Arvilommi, "Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain," *Pediatr. Res.*, vol. 32, no. 2, pp. 141–144, 1992.
- [293] H. Majamaa and E. Isolauri, "Probiotics: A novel approach in the management of food allergy," *J. Allergy Clin. Immunol.*, vol. 99, no. 2, pp. 179–185, 1997.
- [294] P. Gupta, H. Andrew, B. S. Kirschner, and S. Guandalini, "Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study," *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, vol. 31, no. 4, pp. 453–457, 2000.
- [295] T. Mattila *et al.*, "Probiotics: towards demonstrating efficacy," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 10, no. 1999, pp. 393–399, 2000.
- [296] P. Brigidi, B. Vitali, E. Swennen, G. Bazzocchi, and D. Matteuzzi, "Effects of probiotic administration upon the composition and enzymatic activity of human fecal microbiota in patients with irritable bowel syndrome or functional diarrhea," *Res. Microbiol.*, vol. 152, no. 8, pp. 735–741, 2001.
- [297] E. Isolauri, "Probiotics in human disease," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 73, no. 6, pp. 1142–1146, 2001.
- [298] J. M. Saavedra *et al.*, "Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus," *Lancet*, vol. 344, no. 8929, pp. 1046–1049, 1994.
- [299] J. M. Bae, "Prophylactic efficacy of probiotics on travelers' diarrhea: an adaptive meta-analysis of randomized controlled trials," *Epidemiol. Health*, vol. 40, p. e2018043, 2018.
- [300] Malchow HA, "Crohn's disease and *E. coli*," *J. Clin. Gastroenterol.*, vol. 25, pp. 653–658, 1997.
- [301] M. Guslandi, G. Mezzi, M. Sorghi, and P. A. Testoni, "*Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease," *Dig. Dis. Sci.*, vol. 45, no. 7, pp. 1462–1464, 2000.
- [302] T. M. Wassenaar, "INSIGHTS FROM 100 YEARS OF RESEARCH WITH PROBIOTIC *E. COLI*," vol. 6, pp. 147–161, 2016.
- [303] E. Chetwin *et al.*, "Antimicrobial and inflammatory properties of South African clinical *Lactobacillus* isolates and vaginal probiotics," *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, 2019.

- [304] V. Jain and R. Singh, "Dicyclomine-loaded eudragit®-based microsphere with potential for colonic delivery: Preparation and characterization," *Trop. J. Pharm. Res.*, vol. 9, no. 1, pp. 67–72, 2010.
- [305] K. Rezwan, L. P. Meier, M. Rezwan, J. Vörös, M. Textor, and L. J. Gauckler, "Bovine serum albumin adsorption onto colloidal Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles: A new model based on zeta potential and UV-Vis measurements," *Langmuir*, vol. 20, no. 23, pp. 10055–10061, 2004.
- [306] H. G. Rennke and M. A. Venkatachalam, "Chemical Modification of Horseradish Peroxidase," *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 27, no. 10, pp. 1352–1353, 1979.
- [307] "Protein Data Bank." .
- [308] Thermo Scientific, "User Guide: Pierce BCA Protein Assay Kit (MAN0011430 Rev. A)," *Pierce Biotechnol.*, vol. 0747, no. 23225, pp. 1–7, 2011.
- [309] B. S. Kim *et al.*, "BSA-FITC-loaded microcapsules for in vivo delivery," *Biomaterials*, vol. 30, no. 5, pp. 902–909, 2009.
- [310] Sigma, "ABTS Product information," *Methods*, pp. 1–2.
- [311] K. V. Abrosimova, O. V. Shulenina, and S. V. Paston, "FTIR study of secondary structure of bovine serum albumin and ovalbumin," *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 769, no. 1, 2016.
- [312] S. M. Kelly, T. J. Jess, and N. C. Price, "How to study proteins by circular dichroism," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1751, no. 2, pp. 119–139, 2005.
- [313] J. T. Vivian and P. R. Callis, "Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins," *Biophys. J.*, vol. 80, no. 5, pp. 2093–2109, 2001.
- [314] T. Peters, "Serum Albumin," *Adv. Protein Chem.*, vol. 37, no. C, pp. 161–245, 1985.
- [315] K. G. Welinder, "Amino Acid Sequence Studies of Horseradish Peroxidase: Amino and Carboxyl Termini, Cyanogen Bromide and Tryptic Fragments, the Complete Sequence, and Some Structural Characteristics of Horseradish Peroxidase C," *Eur. J. Biochem.*, vol. 96, no. 3, pp. 483–502, 1979.
- [316] M. Iosin, V. Canpean, and S. Astilean, "Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles," *J. Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 217, no. 2–3, pp. 395–401, 2011.
- [317] I. No, "7-AAD Cell Viability Assay Kit," *Cell*, no. 10009856.
- [318] V. S. Jasion and B. P. Burnett, "Survival and digestibility of orally-administered immunoglobulin preparations containing IgG through the gastrointestinal tract in humans," *Nutr. J.*, vol. 14, no. 1, 2015.
- [319] C. Hilger, F. Grigioni, C. De Beaufort, G. Michel, J. Freilinger, and F. Hentges, "Differential binding of IgG and IgA antibodies to antigenic determinants of bovine serum albumin," *Clin. Exp. Immunol.*, no. 123, pp. 387–394, 2001.
- [320] R. Wang *et al.*, "Analyzing pepsin degradation assay conditions used for allergenicity

assessments to ensure that pepsin susceptible and pepsin resistant dietary proteins are distinguishable," *PLoS One*, vol. 12, no. 2, 2017.

- [321] C. Kusonwiriawong, V. Lipipun, N. Vardhanabhuti, Q. Zhang, and G. C. Ritthidej, "Spray-dried chitosan microparticles for cellular delivery of an antigenic protein: Physico-chemical properties and cellular uptake by dendritic cells and macrophages," *Pharm. Res.*, vol. 30, no. 6, pp. 1677–1697, 2013.
- [322] D. S. Kohane, D. G. Andersen, C. Yu, and R. Langer, "pH-Triggered Release of Macromolecules from Spray-Dried Polymethacrylate Microparticles," *Pharm. Res.*, vol. 20, no. 10, pp. 1533–1538, 2003.
- [323] G. D. Arrigo, C. Di, L. Pescosolido, and T. Coviello, "Calcium alginate / dextran methacrylate IPN beads as protecting carriers for protein delivery," pp. 1715–1722, 2012.
- [324] N. Kanthamneni *et al.*, "Enhanced stability of horseradish peroxidase encapsulated in acetalated dextran microparticles stored outside cold chain conditions," *Int. J. Pharm.*, vol. 431, no. 1–2, pp. 101–110, 2012.
- [325] G. Kibria, M. A. Roni, M. S. Absar, and R.-U. Jalil, "Effect of plasticizer on release kinetics of diclofenac sodium pellets coated with Eudragit RS 30 D.," *AAPS PharmSciTech*, vol. 9, no. 4, pp. 1240–6, 2008.
- [326] S. B. Bhardwaj, A. J. Shuklass, and C. C. Collins, "Effect of varying drug loading on particle size distribution and drug release kinetics of verapamil hydrochloride microspheres prepared with cellulose esters," vol. 12, no. 1, pp. 71–81, 1995.
- [327] W. D. Lindner and B. C. Lippold, "Drug Release from Hydrocolloid Embeddings with High or Low Susceptibility to Hydrodynamic Stress," *Pharm. Res.*, vol. 12, no. 11, 1995.
- [328] A. Ebadi, A. A. Rafati, S. Bavafa, and M. Mohammadi, "Kinetic and theoretical studies of novel biodegradable thermo-sensitive xerogels based on PEG/PVP/silica for sustained release of enrofloxacin," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 425, pp. 282–290, Dec. 2017.
- [329] P. L. Ritger and N. A. Peppas, "A simple equation for description of solute release I.," vol. 5, pp. 23–36, 1987.
- [330] G. Crotts, H. Sah, and T. G. Park, "Adsorption determines in-vitro protein release rate from biodegradable microspheres: Quantitative analysis of surface area during degradation," *J. Control. Release*, vol. 47, no. 1, pp. 101–111, 1997.
- [331] G. Rabbani, M. J. Khan, A. Ahmad, M. Y. Maskat, and R. H. Khan, "Effect of copper oxide nanoparticles on the conformation and activity of  $\beta$ -galactosidase," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 2014.
- [332] M. Iosin, V. Canpean, and S. Astilean, "Journal of Photochemistry and Photobiology A : Chemistry Spectroscopic studies on pH- and thermally induced conformational changes of Bovine Serum Albumin adsorbed onto gold nanoparticles," *Journal Photochem. Photobiol. A Chem.*, vol. 217, no. 2–3, pp. 395–401, 2011.

- [333] G. Rabbani, E. Ahmad, M. V. Khan, M. T. Ashraf, R. Bhat, and R. H. Khan, "RSC Advances Candida antarctica lipase B (CaLB): in relation to," *RSC Adv.*, vol. 5, pp. 20115–20131, 2015.
- [334] I. J. Hidalgo, T. J. Raub, and R. T. Borchardt, "Characterization of the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2) as a Model System for Intestinal Epithelial Permeability," *Gastroenterology*, vol. 96, no. 2, pp. 736–749, 1989.
- [335] A. Lopodota *et al.*, "European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics The use of Eudragit Ò RS 100 / cyclodextrin nanoparticles for the transmucosal administration of glutathione," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 72, no. 3, pp. 509–520, 2009.
- [336] W. Zhang *et al.*, "Nanostructured lipid carrier surface modified with Eudragit RS 100 and its potential ophthalmic functions," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, pp. 4305–4315, 2014.
- [337] E. Esposito, S. Sebben, R. Cortesi, E. Menegatti, and C. Nastruzzi, "Preparation and characterization of cationic microspheres for gene delivery," *Int. J. Pharm.*, vol. 189, no. 1, p. 29–41, 1999.
- [338] A. Inoue and K. Horikoshi, "Estimation of solvent-tolerance of bacteria by the solvent parameter log P," *J. Ferment. Bioeng.*, vol. 71, no. 3, pp. 194–196, 1991.
- [339] S. Isken and J. A. M. De Bont, "Bacteria tolerant to organic solvents," *Extremophiles*, vol. 2, no. 3, pp. 229–238, 1998.
- [340] S. Jan, J. A. de Bont, and B. Poolman, "Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons," *Microbiol. Rev.*, vol. 59, no. 2, pp. 201–222, 1995.
- [341] J. C. Koenig, K. D. Groissmeier, and M. J. Manefield, "Tolerance of anaerobic bacteria to chlorinated solvents," *Microbes Environ.*, vol. 29, no. 1, pp. 23–30, 2014.
- [342] S. K. Jain, A. M. Awasthi, N. K. Jain, and G. P. Agrawal, "Calcium silicate based microspheres of repaglinide for gastroretentive floating drug delivery: Preparation and in vitro characterization," *J. Control. Release*, vol. 107, no. 2, pp. 300–309, 2005.
- [343] R. Portela, P. L. Almeida, P. Patr, T. Cidade, R. G. Sobral, and C. R. Leal, "Real-time rheology of actively growing bacteria," vol. 030701, pp. 2–6, 2013.
- [344] S. Haznedar and B. Dortunç, "Preparation and in vitro evaluation of Eudragit microspheres containing acetazolamide &," vol. 269, pp. 131–140, 2004.
- [345] A. T. Florence, A. M. Hillery, N. Hussain, and P. U. Jani, "controlled release Nanoparticles as carriers for oral peptide absorption : studies on particle uptake and fate," vol. 36, pp. 39–46, 1995.
- [346] T. D. Boylston, C. G. Vinderola, H. B. Ghoddusi, and J. A. Reinheimer, "Incorporation of bifidobacteria into cheeses : challenges and rewards," vol. 14, pp. 375–387, 2004.
- [347] D. Knorr, "Technology aspects related to microorganisms in functional foods," vol. 9, 1998.
- [348] J. T. Lisle, M. A. Hamilton, A. R. Willse, and G. A. McFeters, "Comparison of

- fluorescence microscopy and solid-phase cytometry methods for counting bacteria in water," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 70, no. 9, pp. 5343–5348, 2004.
- [349] T. Higuchi, "Mechanism of sustained-action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices," *J. Pharm. Sci.*, vol. 52, no. 12, pp. 1145–1149, 1963.
- [350] G. Bujacz and A. Bujacz, "research papers Cryoprotection properties of salts of organic acids : a case study for a tetragonal crystal of HEW lysozyme research papers," pp. 789–796, 2010.
- [351] P. C. Naha and H. J. Byrne, "Generation of intracellular reactive oxygen species and genotoxicity effect to exposure of nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimers in PLHC-1 cells in vitro," *Aquat. Toxicol.*, vol. 132–133, pp. 61–72, 2013.
- [352] X. Yan and R. A. Gemeinhart, "Cisplatin delivery from poly ( acrylic acid- co -methyl methacrylate ) microparticles," vol. 106, pp. 198–208, 2005.
- [353] J. P. Rao and K. E. Geckeler, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 36, pp. 887–913, 2011.
- [354] V. Lassalle and M. L. Ferreira, "PLA nano- and microparticles for drug delivery: An overview of the methods of preparation," *Macromol. Biosci.*, vol. 7, no. 6, pp. 767–783, 2007.
- [355] C. G. Barreras-Urbina *et al.*, "Nano- and Micro-Particles by Nanoprecipitation: Possible Application in the Food and Agricultural Industries," *Int. J. Food Prop.*, vol. 19, no. 9, pp. 1912–1923, 2016.
- [356] T. Govender, S. Stolnik, M. C. Garnett, L. Illum, and S. S. Davis, "PLGA nanoparticles prepared by nanoprecipitation: Drug loading and release studies of a water soluble drug," *J. Control. Release*, vol. 57, no. 2, pp. 171–185, 1999.
- [357] W. Badri, K. Miladi, R. Eddabra, H. Fessi, and A. Elaissari, "Elaboration of nanoparticles containing indomethacin: Argan oil for transdermal local and cosmetic application," *J. Nanomater.*, vol. 2015, 2015.
- [358] D. Massella *et al.*, "Preparation of bio-functional textiles by surface functionalization of cellulose fabrics with caffeine loaded nanoparticles," *IOP Conf. Ser. Mater. Sci. Eng.*, vol. 460, no. 1, 2018.
- [359] S. Singh and B. Gupta, "Size-controlled preparation of nanosoy for potential biomedical applications," *Polym. Int.*, vol. 65, no. 12, pp. 1373–1381, 2016.
- [360] V. J. Pansare, M. J. Bruzek, D. H. Adamson, J. Anthony, and R. K. Prud'homme, "Composite fluorescent nanoparticles for biomedical imaging," *Mol. Imaging Biol.*, vol. 16, no. 2, pp. 180–188, 2014.
- [361] A. Albisa, E. Piacentini, M. Arruebo, V. Sebastian, and L. Giorno, "Sustainable Production of Drug-Loaded Particles by Membrane Emulsification," *ACS Sustain. Chem. Eng.*, vol. 6, no. 5, pp. 6663–6674, 2018.

- [362] B. Mishra, B. B. Patel, and S. Tiwari, "Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery," *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.*, vol. 6, no. 1, pp. 9–24, 2010.
- [363] E. Lepeltier, C. Bourgaux, and P. Couvreur, "Nanoprecipitation and the 'Ouzo effect': Application to drug delivery devices," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 71, pp. 86–97, 2014.
- [364] S. M. D'Addio and R. K. Prud'homme, "Controlling drug nanoparticle formation by rapid precipitation," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 63, no. 6, pp. 417–426, 2011.
- [365] M. C. Brick, H. J. Palmer, and T. H. Whitesides, "Formation of colloidal dispersions of organic materials in aqueous media by solvent shifting," *Langmuir*, vol. 19, no. 16, pp. 6367–6380, 2003.
- [366] I. J. Joye and D. J. McClements, "Production of nanoparticles by anti-solvent precipitation for use in food systems," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 34, no. 2, pp. 109–123, 2013.
- [367] M. E. Matteucci, M. A. Hotze, K. P. Johnston, and R. O. Williams, "Drug nanoparticles by antisolvent precipitation: Mixing energy versus surfactant stabilization," *Langmuir*, vol. 22, no. 21, pp. 8951–8959, 2006.
- [368] J. Tao, S. F. Chow, and Y. Zheng, "Application of flash nanoprecipitation to fabricate poorly water-soluble drug nanoparticles," *Acta Pharm. Sin. B*, vol. 9, no. 1, pp. 4–18, 2019.
- [369] V. K. Lamer and R. H. Dinegar, "Theory, Production and Mechanism of Formation of Monodispersed Hydrosols," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 72, no. 11, pp. 4847–4854, 1950.
- [370] R. Stepanyan, J. G. J. L. Lebouille, J. J. M. Slot, R. Tuinier, and M. A. C. Stuart, "Controlled nanoparticle formation by diffusion limited coalescence," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 109, no. 13, pp. 1–5, 2012.
- [371] F. Ganachaud and J. L. Katz, "Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: Spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices," *ChemPhysChem*, vol. 6, no. 2, pp. 209–216, 2005.
- [372] S. A. Vitale and J. L. Katz, "Liquid droplet dispersions formed by homogeneous liquid-liquid nucleation: 'The ouzo effect,'" *Langmuir*, vol. 19, no. 10, pp. 4105–4110, 2003.
- [373] N. L. Sitnikova, R. Sprik, G. Wegdam, and E. Eiser, "Emulsions: Mechanism of Formation and Stability," *Langmuir*, no. 8, pp. 7083–7089, 2005.
- [374] S. Galindo-Rodriguez, E. Allémann, H. Fessi, and E. Doelker, "Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods," *Pharm. Res.*, vol. 21, no. 8, pp. 1428–1439, 2004.
- [375] S. Stainmesse, A. M. Orecchioni, E. Nakache, F. Puisieux, and H. Fessi, "Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles," *Colloid Polym. Sci.*, vol. 273, no. 5, pp. 505–511, 1995.

- [376] I. Limayem Blouza, C. Charcosset, S. Sfar, and H. Fessi, "Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use," *Int. J. Pharm.*, vol. 325, no. 1–2, pp. 124–131, 2006.
- [377] F. Lince, D. L. Marchisio, and A. A. Barresi, "Strategies to control the particle size distribution of poly- $\epsilon$ -caprolactone nanoparticles for pharmaceutical applications," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 322, no. 2, pp. 505–515, 2008.
- [378] P. Legrand *et al.*, "Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation," *Int. J. Pharm.*, vol. 344, no. 1–2, pp. 33–43, 2007.
- [379] I. Y. Perevyazko, A. Vollrath, C. Pietsch, S. Schubert, G. M. Pavlov, and U. S. Schubert, "Nanoprecipitation of poly(methyl methacrylate)-based nanoparticles: Effect of the molar mass and polymer behavior," *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.*, vol. 50, no. 14, pp. 2906–2913, 2012.
- [380] Wei Huang and Chenming Zhang, "Tuning the size of poly (lactic-co-glycolic acid)(PLGA) nanoparticles fabricated by nanoprecipitation," *Biotechnol. J.*, vol. 13, no. 1, pp. 1–19, 2018.
- [381] D. R. Lide, *Handbook of Chemistry and Physics*. 1998.
- [382] L. I. Vossen, S. Wedepohl, and M. Calderón, "A facile, one-pot, surfactant-free nanoprecipitation method for the preparation of nanogels from polyglycerol-drug conjugates that can be freely assembled for combination therapy applications," *Polymers (Basel)*, vol. 10, no. 4, 2018.
- [383] H. Y. Kwon, J. Y. Lee, S. W. Choi, Y. Jang, and J. H. Kim, "Preparation of PLGA nanoparticles containing estrogen by emulsification-diffusion method," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 182, no. 1–3, pp. 123–130, 2001.
- [384] M. L. T. Zweers, D. W. Grijpma, G. H. M. Engbers, and J. Feijen, "The Preparation of Monodisperse Biodegradable Polyester Nanoparticles with a Controlled Size," *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 66, no. 2, pp. 559–566, 2003.
- [385] B. Arica and A. Lamprecht, "In Vitro Evaluation of Betamethasone-Loaded Nanoparticles," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 31, no. 1, pp. 19–24, 2005.
- [386] Y. Dong and S. S. Feng, "Methoxy poly(ethylene glycol)-poly(lactide) (MPEG-PLA) nanoparticles for controlled delivery of anticancer drugs," *Biomaterials*, vol. 25, no. 14, pp. 2843–2849, 2004.
- [387] A. Budhian, S. J. Siegel, and K. I. Winey, "Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content," *Int. J. Pharm.*, vol. 336, no. 2, pp. 367–375, 2007.
- [388] M. Chorny, I. Fishbein, H. D. Danenberg, and G. Golomb, "Lipophilic drug loaded nanospheres prepared by nanoprecipitation: Effect of formulation variables on size, drug recovery and release kinetics," *J. Control. Release*, vol. 83, no. 3, pp. 389–400, 2002.

- [389] H. Asadi, K. Rostamizadeh, D. Salari, and M. Hamidi, "Preparation of biodegradable nanoparticles of tri-block PLA-PEG-PLA copolymer and determination of factors controlling the particle size using artificial neural network," *J. Microencapsul.*, vol. 28, no. 5, pp. 406–416, 2011.
- [390] H. Van De Ven *et al.*, "PLGA nanoparticles and nanosuspensions with amphotericin B: Potent in vitro and in vivo alternatives to Fungizone and AmBisome," *J. Control. Release*, vol. 161, no. 3, pp. 795–803, 2012.
- [391] C. Sanson *et al.*, "Doxorubicin Loaded Magnetic Polymersomes: Theranostic Nanocarriers for MR Imaging and Magneto-Chemotherapy," *LB Highlights*, pp. 5–6, 2011.
- [392] J. M. Barichello, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai, J. M. Barichello, and M. Morishita, "Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method Encapsulation of Hydrophilic and Lipophilic Drugs in PLGA Nanoparticles by the Nanoprecipitation Method," vol. 9045, no. October, pp. 471–476, 2017.
- [393] M. Morales-Cruz *et al.*, "Two-step nanoprecipitation for the production of protein-loaded PLGA nanospheres," *Results Pharma Sci.*, vol. 2, no. 1, pp. 79–85, 2012.
- [394] W. S. Saad and R. K. Prud'Homme, "Principles of nanoparticle formation by flash nanoprecipitation," *Nano Today*, vol. 11, no. 2, pp. 212–227, 2016.
- [395] A. J. Mahajan and D. J. Kirwan, "Micromixing Effects in a Two-Impinging-Jets Precipitator," *AIChE J.*, vol. 42, no. 7, pp. 1801–1814, 1996.
- [396] B. K. Johnson and R. K. Prud'homme, "Chemical processing and micromixing in confined impinging jets," *AIChE J.*, vol. 49, no. 9, pp. 2264–2282, 2003.
- [397] I. Valente, E. Celasco, D. L. Marchisio, and A. A. Barresi, "Nanoprecipitation in confined impinging jets mixers: Production, characterization and scale-up of pegylated nanospheres and nanocapsules for pharmaceutical use," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 77, pp. 217–227, 2012.
- [398] J. Han *et al.*, "A Simple Confined Impingement Jets Mixer for Flash Nanoprecipitation," *J. Pharm. Sci.*, vol. 101, no. 7, pp. 2271–2280, 2012.
- [399] C. E. Markwalter and R. K. Prud'homme, "Design of a Small-Scale Multi-Inlet Vortex Mixer for Scalable Nanoparticle Production and Application to the Encapsulation of Biologics by Inverse Flash NanoPrecipitation," *J. Pharm. Sci.*, vol. 107, no. 9, pp. 2465–2471, 2018.
- [400] D. B. K. Chu, J. S. Owen, and B. Peters, "Nucleation and Growth Kinetics from LaMer Burst Data," *J. Phys. Chem. A*, vol. 121, no. 40, pp. 7511–7517, 2017.
- [401] S. Ding, N. Anton, T. F. Vandamme, and C. A. Serra, "Microfluidic nanoprecipitation systems for preparing pure drug or polymeric drug loaded nanoparticles: an overview," *Expert Opin. Drug Deliv.*, vol. 13, no. 10, pp. 1447–1460, 2016.

- [402] I. Ortiz De Solorzano, L. Uson, A. Larrea, M. Miana, V. Sebastian, and M. Arruebo, "Continuous synthesis of drug-loaded nanoparticles using microchannel emulsification and numerical modeling: Effect of passive mixing," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 11, pp. 3397–3416, 2016.
- [403] N. . Nguyen, *Micromixers. Fundamentals, Design and Fabrication. in Micro and Nano Technologies*, William An. 2008.
- [404] P. M. Valencia, O. C. Farokhzad, R. Karnik, and R. Langer, "Microfluidic technologies for accelerating the clinical translation of nanoparticles," *Nat. Nanotechnol.*, vol. 185, no. 2, pp. 974–981, 2013.
- [405] D. Gobby, P. Angeli, and A. Gavriilidis, "Mixing characteristics of T-type microfluidic mixers," vol. 126, 2001.
- [406] V. Hessel, H. Löwe, and F. Schönfeld, "Micromixers - A review on passive and active mixing principles," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 60, no. 8-9 SPEC. ISS., pp. 2479–2501, 2005.
- [407] H. Zhao, J. X. Wang, Q. A. Wang, J. F. Chen, and J. Yun, "Controlled liquid antisolvent precipitation of hydrophobic pharmaceutical nanoparticles in a MicroChannel reactor," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 46, no. 24, pp. 8229–8235, 2007.
- [408] R. Karnik *et al.*, "Microfluidic Platform for Controlled Synthesis of Polymeric Nanoparticles Rohit," *Nano Lett.*, vol. 8, no. 9, pp. 2906–2912, 2008.
- [409] L. Chronopoulou, C. Sparago, and C. Palocci, "A modular microfluidic platform for the synthesis of biopolymeric nanoparticles entrapping organic actives," *J. Nanoparticle Res.*, vol. 16, no. 11, 2014.
- [410] F. Bally *et al.*, "Improved size-tunable preparation of polymeric nanoparticles by microfluidic nanoprecipitation," *Polym. (United Kingdom)*, vol. 53, no. 22, pp. 5045–5051, 2012.
- [411] H. Chen, C. Khemtong, X. Yang, X. Chang, and J. Gao, "Nanonization strategies for poorly water-soluble drugs," *Drug Discov. Today*, vol. 16, no. 7–8, pp. 354–360, 2011.
- [412] P. G. Shao and L. C. Bailey, "Stabilization of pH-induced degradation of porcine insulin in biodegradable polyester microspheres," *Pharm. Dev. Technol.*, vol. 4, no. 4, pp. 633–642, 1999.
- [413] C. Becker *et al.*, "Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Rifampicin," *J. Pharm. Sci.*, vol. 98, no. 7, pp. 2252–2267, 2009.
- [414] G. R. Hartmann, P. Heinrich, M. C. Kollenda, B. Skrobranek, M. Tropschug, and W. Weiß, "Molecular Mechanism of Action of the Antibiotic Rifampicin," *Angew. Chemie Int. Ed. English*, vol. 24, no. 12, pp. 1009–1014, 1985.
- [415] J. M. Murdoch, C. F. Speirs, N. Wright, and E. T. Wallace, "Rifampicin.," *Lancet*, vol. 1, no. 7605, p. 1094, 1969.
- [416] M. Grobbelaar, G. E. Louw, S. L. Sampson, P. D. van Helden, P. R. Donald, and R. M.

- Warren, "Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 74, no. April, p. 103937, 2019.
- [417] V. Yunivita *et al.*, "Pharmacokinetics and safety/tolerability of higher oral and intravenous doses of rifampicin in adult tuberculous meningitis patients," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 48, no. 4, pp. 415–421, 2016.
- [418] S. J. Yawalkar and A. McDougall, "Once-monthly rifampicin plus dapsone in initial treatment of Lepromatous leprosy," *Lancet*, no. May, pp. 1199–1202, 1982.
- [419] A. K. Lindgren, A. C. Nilsson, P. Åkesson, E. Gustafsson, and E. Melander, "Eradication of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) throat carriage: a randomised trial comparing topical treatment with rifampicin-based systemic therapy," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 51, no. 4, pp. 642–645, 2018.
- [420] H. J. Park, J. H. Cho, H. J. Kim, S. H. Han, S. H. Jeong, and M. K. Byun, "Colistin monotherapy versus colistin/rifampicin combination therapy in pneumonia caused by colistin-resistant *Acinetobacter baumannii*: A randomised controlled trial," *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, vol. 17, pp. 66–71, 2019.
- [421] H. Namikawa *et al.*, "Discovery of anti-mucoviscous activity of rifampicin and its potential as a candidate antivirulence agent against hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 54, no. 2, pp. 167–175, 2019.
- [422] H. Singh, R. Bhandari, and I. P. Kaur, "Encapsulation of Rifampicin in a solid lipid nanoparticulate system to limit its degradation and interaction with Isoniazid at acidic pH," *Int. J. Pharm.*, vol. 446, no. 1–2, pp. 106–111, 2013.
- [423] C. J. Shishoo, "Impaired bioavailability of rifampicin from fixed dose combination (FDC) formulations with isoniazid," *Indian J. Pharm. Sci.*, vol. 63, no. 6, pp. 443–449, 2001.
- [424] World Health Organization, "Global Tuberculosis Report," 2019.
- [425] S. Bhattacharjee, "DLS and zeta potential - What they are and what they are not?," *J. Control. Release*, vol. 235, pp. 337–351, 2016.
- [426] S. Agrawal, Y. Ashokraj, P. V. Bharatam, O. Pillai, and R. Panchagnula, "Solid-state characterization of rifampicin samples and its biopharmaceutic relevance," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 22, no. 2–3, pp. 127–144, 2004.
- [427] J. Ribeiro, F. D. Vieira, T. King, J. B. D'Arezzo, and J. M. Boyce, "Misclassification of susceptible strains of *Staphylococcus aureus* as methicillin-resistant *S. aureus* by a Rapid automated susceptibility testing system," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, no. 5, pp. 1619–1620, 1999.
- [428] D. R. Lide, "Handbook of Chemistry and Physics," in *Handbook of Chemistry and Physics*, 1998.
- [429] M. Beck-Broichsitter, E. Rytting, T. Lehardt, X. Wang, and T. Kissel, "Preparation of nanoparticles by solvent displacement for drug delivery: A shift in the 'ouzo region' upon drug loading," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 41, no. 2, pp. 244–253, 2010.

- [430] A. Dobhal, A. Kulkarni, P. Dandekar, and R. Jain, "A microreactor-based continuous process for controlled synthesis of poly-methyl-methacrylate-methacrylic acid (PMMA) nanoparticles," *J. Mater. Chem. B*, vol. 5, no. 18, pp. 3404–3417, 2017.
- [431] E. V. Batrakova, H. Y. Han, V. Y. Alakhov, D. W. Miller, and A. V. Kabanov, "Effects of pluronic block copolymers on drug absorption in Caco-2 cell monolayers," *Pharmaceutical Research*, vol. 15, no. 6, pp. 850–855, 1998.
- [432] B. K. Johnson and R. K. Prud'homme, "Mechanism for rapid self-assembly of block copolymer nanoparticles," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 91, no. 11, pp. 1–4, 2003.
- [433] A. Larrea, A. Clemente, E. Luque-Michel, and V. Sebastian, "Efficient production of hybrid bio-nanomaterials by continuous microchannel emulsification: Dye-doped SiO<sub>2</sub> and Au-PLGA nanoparticles," *Chem. Eng. J.*, vol. 316, pp. 663–672, 2017.
- [434] T. L. Doane, C. H. Chuang, R. J. Hill, and C. Burda, "Nanoparticle  $\zeta$ -potentials," *Acc. Chem. Res.*, vol. 45, no. 3, pp. 317–326, 2012.
- [435] S. Skoglund, J. Hedberg, E. Yunda, A. Godymchuk, E. Blomberg, and I. Odnevall Wallinder, "Difficulties and flaws in performing accurate determinations of zeta potentials of metal nanoparticles in complex solutions - Four case studies," *PLoS One*, vol. 12, no. 7, pp. 1–19, 2017.
- [436] J. P. Holmberg, E. Ahlberg, J. Bergenholtz, M. Hassellöv, and Z. Abbas, "Surface charge and interfacial potential of titanium dioxide nanoparticles: Experimental and theoretical investigations," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 407, pp. 168–176, 2013.
- [437] A. Reisch, A. Runser, Y. Arntz, Y. Mély, and A. S. Klymchenko, "Charge-controlled nanoprecipitation as a modular approach to ultrasmall polymer nanocarriers: Making bright and stable nanoparticles," *ACS Nano*, vol. 9, no. 5, pp. 5104–5116, 2015.
- [438] B. Pinho and L. Torrente-Murciano, "Continuous manufacturing of silver nanoparticles between 5 and 80 nm with rapid online optical size and shape evaluation," *React. Chem. Eng.*, vol. 5, no. 2, pp. 342–355, 2020.
- [439] J. Cheng *et al.*, "Formulation of Functionalized PLGA-PEG Nanoparticles for In Vivo Targeted Drug Delivery," *Biomaterials*, vol. 28, no. 5, pp. 869–8767, 2007.
- [440] J. Aubry, F. Ganachaud, J. P. C. Addad, and B. Cabane, "Nanoprecipitation of polymethylmethacrylate by solvent shifting: 1. Boundaries," *Langmuir*, vol. 25, no. 4, pp. 1970–1979, 2009.
- [441] G. Kaur, S. K. Mehta, S. Kumar, G. Bhanjana, and N. Dilbaghi, "Coencapsulation of Hydrophobic and Hydrophilic Antituberculosis Drugs in Synergistic Brij 96 Microemulsions: A Biophysical Characterization," *J. Pharm. Sci.*, vol. 104, no. 7, pp. 2203–2212, 2015.
- [442] M. Singh, P. Sasi, G. Rai, V. H. Gupta, D. Amarapurkar, and P. P. Wangikar, "Studies on toxicity of antitubercular drugs namely isoniazid, rifampicin, and pyrazinamide in an in vitro model of HepG2 cell line," *Med. Chem. Res.*, vol. 20, no. 9, pp. 1611–1615, 2011.

- [443] D. Reddy, "Formulation and in vitro evaluation of antineoplastic drug loaded nanoparticles as drug delivery system," *African J. Pharm. Pharmacol.*, vol. 7, no. 23, pp. 1592–1604, 2013.
- [444] W. D. Lindner and B. C. Lippold, "Drug Release From Hydrocolloid Embeddings with High or Low Susceptibility to Hydrodynamic Stress," *Pharmaceutical Research: An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists*, vol. 12, no. 11, pp. 1781–1785, 1995.
- [445] M. Foldes, R. Munro, T. C. Sorrell, S. Shanker, and M. Toohey, "In-vitro effects of vancomycin, rifampicin, and fusidic acid, alone and in combination, against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 11, no. 1, pp. 21–26, Jan. 1983.
- [446] C. W. Norden and M. Shaffer, "Treatment of Experimental Chronic Osteomyelitis Due to *Staphylococcus aureus* with Vancomycin and Rifampin," *J. Infect. Dis.*, vol. 147, no. 2, pp. 352–357, Feb. 1983.
- [447] T. J. Silhavy, D. Kahne, and S. Walker, "The Bacterial Cell Envelope," T. J. Silhavy, D. Kahne and S. Walker, .," *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 2, pp. 1–16, 2010.
- [448] J. Costa and A. Ahluwalia, "Advances and Current Challenges in Intestinal in vitro Model Engineering: A Digest," *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 7, no. JUN, pp. 1–14, 2019.
- [449] S. Zhan, D. Chen, X. Jiao, and Y. Song, "Mesoporous TiO<sub>2</sub>/SiO<sub>2</sub> composite nanofibers with selective photocatalytic properties," *Chem. Commun.*, vol. 1, no. 20, pp. 2043–2045, 2007.
- [450] Y. K. Luu, K. Kim, B. S. Hsiao, B. Chu, and M. Hadjiargyrou, "Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers," *J. Control. Release*, vol. 89, no. 2, pp. 341–353, 2003.
- [451] W. Cui, Y. Zhou, and J. Chang, "Electrospun nanofibrous materials for tissue engineering and drug delivery," *Sci. Technol. Adv. Mater.*, vol. 11, no. 1, p. 014108, 2010.
- [452] T. E. Herricks *et al.*, "Direct fabrication of enzyme-carrying polymer nanofibers by electrospinning," *J. Mater. Chem.*, vol. 15, no. 31, pp. 3241–3245, 2005.
- [453] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W. E. Teo, T. Yong, Z. Ma, and R. Ramaseshan, "Electrospun nanofibers: Solving global issues," *Mater. Today*, vol. 9, no. 3, pp. 40–50, 2006.
- [454] H. Liang, A. Yao, X. Jiao, C. Li, and D. Chen, "Fast and Sustained Degradation of Chemical Warfare Agent Simulants Using Flexible Self-Supported Metal-Organic Framework Filters," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 24, pp. 20396–20403, 2018.
- [455] D. Lv *et al.*, "Green Electrospun Nanofibers and Their Application in Air Filtration," *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 303, no. 12, pp. 1–18, 2018.
- [456] Rayleigh L., "On the Equilibrium of Liquid Conducting Masses charged with Electricity," *Philos. Mag*, vol. 14, p. 184–186, 1882.

- [457] J. Zeleny, "The electrical discharge from liquid points, and a hydrostatic method of measuring the electric intensity at their surfaces," *Phys. Rev.*, vol. 3, no. 2, pp. 69–91, 1914.
- [458] A. Formhals, "Process and Apparatus for Preparing Artificial Threads," *U.S. Pat. 1,975,504*, 1934.
- [459] D. H. Reneker, A. L. Yarin, H. Fong, and S. Koombhongse, "Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning," *J. Appl. Phys.*, vol. 87, no. 9 I, pp. 4531–4547, 2000.
- [460] H. Fong, I. Chun, and D. H. Reneker, "Beaded nanofibers formed during electrospinning," *Polymer (Guildf.)*, vol. 40, no. 16, pp. 4585–4592, 1999.
- [461] Y. M. Shin, M. M. Hohman, M. P. Brenner, and G. C. Rutledge, "Experimental characterization of electrospinning: The electrically forced jet and instabilities," *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, no. 25, pp. 09955–09967, 2001.
- [462] L. Persano, A. Camposeo, C. Tekmen, and D. Pisignano, "Industrial upscaling of electrospinning and applications of polymer nanofibers: A review," *Macromol. Mater. Eng.*, vol. 298, no. 5, pp. 504–520, 2013.
- [463] G. Taylor and M. D. Van Dyke, "Electrically driven jets With an appendix by," *Proc. Roy. Soc. Lond. A*, vol. 313, pp. 453–475, 1969.
- [464] D. Li and Y. Xia, "Electrospinning of nanofibers: Reinventing the wheel?," *Adv. Mater.*, vol. 16, no. 14, pp. 1151–1170, 2004.
- [465] K. Garg and G. L. Bowlin, "Electrospinning jets and nanofibrous structures," *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 1, pp. 1–19, 2011.
- [466] R. T. Collins, J. J. Jones, M. T. Harris, and O. A. Basaran, "Electrohydrodynamic tip streaming and emission of charged drops from liquidcones," *Nat. Phys.*, vol. 4, no. 2, pp. 149–154, 2008.
- [467] M. M. Munir, A. B. Suryamas, F. Iskandar, and K. Okuyama, "Scaling law on particle-to-fiber formation during electrospinning," *Polymer (Guildf.)*, vol. 50, no. 20, pp. 4935–4943, 2009.
- [468] G. Collins, J. Federici, Y. Imura, and L. H. Catalani, "Charge generation, charge transport, and residual charge in the electrospinning of polymers: A review of issues and complications," *J. Appl. Phys.*, vol. 111, no. 4, 2012.
- [469] X. Wang, Y. Yuan, X. Huang, and T. Yue, "Controlled release of protein from core-shell nanofibers prepared by emulsion electrospinning based on green chemical," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 132, no. 16, pp. 1–9, 2015.
- [470] S. K. Tiwari and S. S. Venkatraman, "Importance of viscosity parameters in electrospinning: Of monolithic and core-shell fibers," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 32, no. 5, pp. 1037–1042, 2012.

- [471] A. K. Haghi and M. Akbari, "Trends in electrospinning of natural nanofibers," *Phys. Status Solidi Appl. Mater. Sci.*, vol. 204, no. 6, pp. 1830–1834, 2007.
- [472] I. Hayati, A.I Bailey, "Investigations into the mechanisms of electrohydrodynamic spraying of liquids: I. Effect of electric field and the environment on pendant drops and factors affecting the formation of stable jets and atomization," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 117, no. 1, pp. 205–221.
- [473] M. M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, and B. Erman, "Electrospinning of polyurethane fibers M.M.," *Polymer (Guildf.)*, vol. 43, pp. 3303–3309, 2002.
- [474] Deitzel J.M et al., "The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles," *Polymer (Guildf.)*, vol. 42, pp. 261–272, 2001.
- [475] H. Shao, J. Fang, H. Wang, and T. Lin, "Effect of electrospinning parameters and polymer concentrations on mechanical-to-electrical energy conversion of randomly-oriented electrospun poly(vinylidene fluoride) nanofiber mats," *RSC Adv.*, vol. 5, no. 19, pp. 14345–14350, 2015.
- [476] S. Megelski, J. S. Stephens, D. Bruce Chase, and J. F. Rabolt, "Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers," *Macromolecules*, vol. 35, no. 22, pp. 8456–8466, 2002.
- [477] D. Li, Y. Wang, and Y. Xia, "Electrospinning Nanofibers as Uniaxially Aligned Arrays and Layer-by-Layer Stacked Films," *Adv. Mater.*, vol. 16, no. 4, pp. 361–366, 2004.
- [478] C. J. Buchko, L. C. Chen, Y. Shen, and D. C. Martin, "Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films," *Polymer (Guildf.)*, vol. 40, no. 26, pp. 7397–7407, 1999.
- [479] P. Katta, M. Alessandro, R. D. Ramsier, and G. G. Chase, "Continuous electrospinning of aligned polymer nanofibers onto a wire drum collector," *Nano Lett.*, vol. 4, no. 11, pp. 2215–2218, 2004.
- [480] Y. He *et al.*, "Freestanding three-dimensional graphene/MnO<sub>2</sub> composite networks as ultralight and flexible supercapacitor electrodes," *ACS Nano*, vol. 7, no. 1, pp. 174–182, 2013.
- [481] S. De Vrieze, T. Van Camp, A. Nelvig, B. Hagström, P. Westbroek, and K. De Clerck, "The effect of temperature and humidity on electrospinning," *J. Mater. Sci.*, vol. 44, no. 5, pp. 1357–1362, 2009.
- [482] J. Zeng *et al.*, "Influence of the drug compatibility with polymer solution on the release kinetics of electrospun fiber formulation," *J. Control. Release*, vol. 105, no. 1–2, pp. 43–51, 2005.
- [483] Y. Wang, B. Wang, W. Qiao, and Y. Tieying, "A Novel Controlled Release Drug Delivery System for Multiple Drugs Based on Electrospun Nanofibers Containing Nanoparticles," *J. Pharm. Sci.*, vol. 99, no. 12, pp. 4805–4811, 2010.
- [484] C. Li, Q. Li, X. Ni, G. Liu, W. Cheng, and G. Han, "Coaxial electrospinning and

- characterization of core-shell structured cellulose nanocrystal reinforced PMMA/PAN composite fibers," *Materials (Basel)*, vol. 10, no. 6, 2017.
- [485] P. Zhao, H. Jiang, H. Pan, K. Zhu, and W. Chen, "Biodegradable fibrous scaffolds composed of gelatin coated poly( $\epsilon$ -caprolactone) prepared by coaxial electrospinning Pengcheng," *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, vol. 83, no. A, pp. 372–382, 2007.
- [486] Y. Z. Zhang, X. Wang, Y. Feng, J. Li, C. T. Lim, and S. Ramakrishna, "Coaxial electrospinning of (fluorescein isothiocyanate-conjugated bovine serum albumin)-encapsulated poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers for sustained release," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 4, pp. 1049–1057, 2006.
- [487] X. Xu *et al.*, "Ultrafine medicated fibers electrospun from W/O emulsions," *J. Control. Release*, vol. 108, no. 1, pp. 33–42, 2005.
- [488] M. . Olivera *et al.*, "Biowaiver Monographs for Immediate Release Solid Oral Dosage Forms: Ciprofloxacin Hydrochloride," *J. Pharm. Sci.*, vol. 100, no. 1, pp. 22–33, 2011.
- [489] C. Y. Wu and L. Z. Benet, "Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system," *Pharm. Res.*, vol. 22, no. 1, pp. 11–23, 2005.
- [490] D. H. Hanna and G. R. Saad, "Encapsulation of ciprofloxacin within modified xanthan gum- chitosan based hydrogel for drug delivery," *Bioorg. Chem.*, vol. 84, no. October 2018, pp. 115–124, 2019.
- [491] D. C. Henry *et al.*, "Comparison of once-daily extended-release ciprofloxacin and conventional twice-daily ciprofloxacin for the treatment of uncomplicated urinary tract infection in women," *Clin. Ther.*, vol. 24, no. 12, pp. 2088–2104, 2002.
- [492] M. LeBel, "Ciprofloxacin: Chemistry, Mechanism of Action, Resistance, Antimicrobial Spectrum, Pharmacokinetics, Clinical Trials, and Adverse Reactions," *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.*, vol. 8, no. 1, pp. 3–30, 1988.
- [493] H. J. Zeiler and K. Grohe, "The in vitro and in vivo activity of ciprofloxacin," *Eur. J. Clin. Microbiol.*, vol. 3, no. 4, pp. 339–343, 1984.
- [494] R. Davis, A. Markham, and J. A. Balfour, "Ciprofloxacin: An Updated Review of its Pharmacology, Therapeutic Efficacy and Tolerability," *Drugs*, vol. 51, no. 6, pp. 1019–1074, 1996.
- [495] G. A. Islan, I. P. De Verti, S. G. Marchetti, and G. R. Castro, "Studies of ciprofloxacin encapsulation on alginate/pectin matrixes and its relationship with biodisponibility," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 167, no. 5, pp. 1408–1420, 2012.
- [496] R. Cioffi, D. Turco, B. Alfano, F. Di Salvatore, P. Gnasso, and S. Mastroianni, "Treatment of respiratory tract infections with augmentin," *J. Chemother.*, vol. 1, no. 4 Suppl, pp. 766–767, 1989.
- [497] S. Žakelj, K. Šturm, and A. Kristl, "Ciprofloxacin permeability and its active secretion through rat small intestine in vitro," *Int. J. Pharm.*, vol. 313, no. 1–2, pp. 175–180, 2006.

- [498] DrugBank, "Ciprofloxacin." .
- [499] Z. Mao, L. Ma, C. Gao, and J. Shen, "Preformed microcapsules for loading and sustained release of ciprofloxacin hydrochloride," *J. Control. Release*, vol. 104, no. 1, pp. 193–202, 2005.
- [500] B. Joob and I. Wiwanitkit, "Acute kidney injury due to ciprofloxacin for treatment of acute pyelonephritis," *J. nephro pharmacology*, vol. 5, no. 2, pp. 73–74, 2015.
- [501] Y. Il Jeong *et al.*, "Ciprofloxacin-encapsulated poly(dl-lactide-co-glycolide) nanoparticles and its antibacterial activity," *Int. J. Pharm.*, vol. 352, no. 1–2, pp. 317–323, 2008.
- [502] A. V-fitc, A. V-fitc, and A. V-fitc, "Kit Detección de apoptosis," 2017.
- [503] P. Description, "PI / RNASE Solution," pp. 2–3, 2017.
- [504] A. F. Mejia, P. He, D. Luo, M. Marquez, and Z. Cheng, "Uniform discotic wax particles via electrospray emulsification," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 334, no. 1, pp. 22–28, 2009.
- [505] M. Nasir *et al.*, "Control of diameter, morphology, and structure of PVDF nanofiber fabricated by electrospray deposition," *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.*, vol. 44, no. 5, pp. 779–786, 2006.
- [506] Á. G. Marín, I. G. Loscertales, and A. Barrero, "Surface tension effects on submerged electrosprays," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 4, 2012.
- [507] S. Zhang, C. Campagne, and F. Salaün, "Preparation of electrosprayed poly(caprolactone) microparticles based on green solvents and related investigations on the effects of solution properties as well as operating parameters," *Coatings*, vol. 9, no. 2, 2019.
- [508] A. T. Florence, "Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential?," *Drug Discov. Today Technol.*, vol. 2, no. 1, pp. 75–81, 2005.
- [509] C. H. Park and J. Lee, "Electrosprayed Polymer Particles: Effect of the Solvent Properties," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 114, pp. 430–437, 2009.
- [510] M. C. Bonferoni *et al.*, "Comparison of different in vitro and ex vivo methods to evaluate mucoadhesion of glycol-palmitoyl chitosan micelles," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 20, no. 6, pp. 419–424, 2010.
- [511] Q. Mei *et al.*, "Formulation and in vitro characterization of rifampicin-loaded porous poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microspheres for sustained skeletal delivery," *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. 12, pp. 1533–1544, 2018.
- [512] S. Pandit, C. Martin, and H. O. Alpar, "Positively charged rifampicin-loaded microspheres for lung delivery," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 15, no. 4, pp. 281–287, 2005.
- [513] E. Soto, Y. S. Kim, J. Lee, H. Kornfeld, and G. Ostroff, "Glucan particle encapsulated rifampicin for targeted delivery to macrophages," *Polymers (Basel)*, vol. 2, no. 4, pp. 681–

689, 2010.

- [514] M. G. Arafa, H. A. Mousa, and N. N. Afifi, "Preparation of PLGA-chitosan based nanocarriers for enhancing antibacterial effect of ciprofloxacin in root canal infection," *Drug Deliv.*, vol. 27, no. 1, pp. 26–39, 2020.
- [515] D. K. Ho, A. Costa, C. De Rossi, C. De Souza Carvalho-Wodarz, B. Loretz, and C. M. Lehr, "Polysaccharide Submicrocarrier for Improved Pulmonary Delivery of Poorly Soluble Anti-infective Ciprofloxacin: Preparation, Characterization, and Influence of Size on Cellular Uptake," *Mol. Pharm.*, vol. 15, no. 3, pp. 1081–1096, 2018.
- [516] S. Demirci, A. Celebioglu, Z. Aytac, and T. Uyar, "PH-responsive nanofibers with controlled drug release properties," *Polym. Chem.*, vol. 5, no. 6, pp. 2050–2056, 2014.
- [517] S. Yang, X. Zhang, and D. Zhang, "Electrospun chitosan/poly (vinyl alcohol)/graphene oxide nanofibrous membrane with ciprofloxacin antibiotic drug for potential wound dressing application," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 18, 2019.
- [518] N. A. Peppas and J. J. Sahlin, "A simple equation for the description of solute release. III. Coupling of diffusion and relaxation," *Int. J. Pharm.*, vol. 57, no. 2, pp. 169–172, 1989.
- [519] P. L. Ritger and N. A. Peppas, "A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices," *J. Control. Release*, vol. 5, no. 1, pp. 37–42, 1987.
- [520] "Mathematical models of drug release," in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, 2015, pp. 63–86.
- [521] R. W. Korsmeyer and N. A. Peppas, "Solute and penetrant diffusion in swellable polymers. VIII. Influence of the swelling interface number on solute concentration profiles and release," *J. Control. Release*, vol. 7, no. 1, pp. 61–68, 1988.
- [522] H. Van De Belt *et al.*, "Surface roughness, porosity and wettability of gentamicin-loaded bone cements and their antibiotic release," vol. 21, pp. 1981–1987, 2000.
- [523] K. Anagnostakos and J. Kelm, "Review Enhancement of Antibiotic Elution From Acrylic Bone Cement," no. Table I, pp. 467–475, 2009.
- [524] J. M. Hyatt, D. E. Nix, and J. J. Schentag, "Pharmacokinetic and pharmacodynamic activities of ciprofloxacin against strains of *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* for which MICs are similar," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 38, no. 12, pp. 2730–2737, 1994.
- [525] S. M. Smith and R. H. K. Eng, "Activity of ciprofloxacin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 27, no. 5, pp. 688–691, 1985.
- [526] K. Dillen *et al.*, "Adhesion of PLGA or Eudragit®/PLGA nanoparticles to *Staphylococcus* and *Pseudomonas*," *Int. J. Pharm.*, vol. 349, no. 1–2, pp. 234–240, 2008.
- [527] Y. Higuchi, M. Kojima, G. Ishii, K. Aoyagi, H. Sasaki, and A. Ochiai, "Gastrointestinal fibroblasts have specialized, diverse transcriptional phenotypes: A comprehensive gene

- expression analysis of human fibroblasts," *PLoS One*, vol. 10, no. 6, pp. 1–19, 2015.
- [528] P. C. Naha, H. J. Byrne, and A. K. Panda, "Role of Polymeric Excipients on Controlled Release Profile of Glipizide from PLGA and Eudragit RS 100 Nanoparticles," *J. Nanopharmaceutics Drug Deliv.*, vol. 1, no. 1, pp. 74–81, 2013.
- [529] C. B. Vibe *et al.*, "Thioridazine in PLGA nanoparticles reduces toxicity and improves rifampicin therapy against mycobacterial infection in zebrafish," *Nanotoxicology*, vol. 10, no. 6, pp. 680–688, 2016.
- [530] S. Isefuku, C. J. Joyner, and A. H. R. W. Simpson, "Toxic effect of rifampicin on human osteoblast-like cells," *J. Orthop. Res.*, vol. 19, no. 5, pp. 950–954, 2001.
- [531] J. Du, I. M. El-Sherbiny, and H. D. Smyth, "Swellable Ciprofloxacin-Loaded Nano-in-Micro Hydrogel Particles for Local Lung Drug Delivery," *Ageing Int.*, vol. 15, no. 6, pp. 1535–1544, 2014.
- [532] T. Miclau, M. L. Edin, G. E. Lester, R. W. Lindsey, and L. E. Dahners, "Effect of ciprofloxacin on the proliferation of osteoblast-like MG-63 human osteosarcoma cells in vitro," *J. Orthop. Res.*, vol. 16, no. 4, pp. 509–512, 1998.
- [533] G. Qin, Z. Zhu, S. Li, A. M. McDermott, and C. Cai, "Development of Ciprofloxacin-loaded contact lenses using fluororous chemistry," *Biomaterials*, vol. 124, pp. 55–64, 2017.
- [534] M. E. Santocildes-Romero *et al.*, "Fabrication of Electrospun Mucoadhesive Membranes for Therapeutic Applications in Oral Medicine," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 13, pp. 11557–11567, 2017.
- [535] S. A. Abouelmagd, B. Sun, A. C. Chang, Y. Jin Ku, and Y. Yeo, "Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right?," *Mol. Pharm.*, vol. 12, no. 3, pp. 997–1103, 2015.
- [536] N. M. Franson and N. A. Peppas, "Influence of copolymer composition on non-fickian water transport through glassy copolymers," *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 28, no. 4, pp. 1299–1310, 1983.
- [537] S. Zupancic, S. Sinha-Ray, S. Sinha-Ray, J. Kristl, and A. L. Yarin, "Long-Term Sustained Ciprofloxacin Release from PMMA and Hydrophilic Polymer Blended Nanofibers," *Mol. Pharm.*, vol. 13, no. 1, pp. 295–305, 2016.
- [538] K. Kanellakopoulou and E. J. Giamarellos-Bourboulis, "Carrier systems for the local delivery of antibiotics in bone infections," *Drugs*, vol. 59, no. 6, pp. 1223–1232, 2000.
- [539] A. Terada, A. Yuasa, T. Kushimoto, S. Tsuneda, A. Katakai, and M. Tamada, "Bacterial adhesion to and viability on positively charged polymer surfaces," *Microbiology*, vol. 152, no. 12, pp. 3575–3583, 2006.
- [540] H. E. Colley *et al.*, "Pre-clinical evaluation of novel mucoadhesive bilayer patches for local delivery of clobetasol-17-propionate to the oral mucosa," *Biomaterials*, vol. 178, pp. 134–146, 2018.

- [541] R. Balen *et al.*, "Structural, thermal, optical properties and cytotoxicity of PMMA/ZnO fibers and films: Potential application in tissue engineering," *Appl. Surf. Sci.*, vol. 385, pp. 257–267, 2016.
- [542] Y. Liu, Y. Ji, K. Ghosh, R. A. F. Clark, L. Huang, and M. H. Rafailovich, "Effects of fiber orientation and diameter on the behavior of human dermal fibroblasts on electrospun PMMA scaffolds," *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*, vol. 90, no. 4, pp. 1092–1106, 2009.
- [543] M. Iqbal, N. Zafar, H. Fessi, and A. Elaissari, "Double emulsion solvent evaporation techniques used for drug encapsulation," *Int. J. Pharm.*, vol. 496, no. 2, pp. 173–190, 2015.
- [544] R. Donno *et al.*, "Nanomanufacturing through microfluidic-assisted nanoprecipitation: Advanced analytics and structure-activity relationships," *Int. J. Pharm.*, vol. 534, no. 1–2, pp. 97–107, 2017.
- [545] R. P. A. Hartman, D. J. Brunner, D. M. A. Camelot, J. C. M. Marijnissen, and B. Scarlett, "Electrohydrodynamic atomization in the cone-jet mode physical modeling of the liquid cone and jet," *J. Aerosol Sci.*, vol. 30, no. 7, pp. 823–849, 1999.
- [546] R. Bocanegra, D. Galán, M. Márquez, I. G. Loscertales, and A. Barrero, "Multiple electrosprays emitted from an array of holes," *J. Aerosol Sci.*, vol. 36, no. 12, pp. 1387–1399, 2005.
- [547] B. Almería, T. M. Fahmy, and A. Gomez, "A multiplexed electrospray process for single-step synthesis of stabilized polymer particles for drug delivery," *J. Control. Release*, vol. 154, no. 2, pp. 203–210, 2011.
- [548] P. M. Kashif *et al.*, "Development of Eudragit RS 100 Microparticles Loaded with Ropinirole: Optimization and In Vitro Evaluation Studies," *AAPS PharmSciTech*, vol. 18, no. 5, pp. 1810–1822, 2017.
- [549] A. Trapani *et al.*, "Eudragit RS 100 microparticles containing 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and glutathione: Physicochemical characterization, drug release and transport studies," *Eur. J. Pharm. Sci.*, vol. 30, no. 1, pp. 64–74, 2007.
- [550] R. Pignatello, D. Amico, S. Chiechio, C. Spadaro, G. Puglisi, and P. Giunchedi, "Preparation and analgesic activity of eudragit RS100® microparticles containing diflunisal," *Drug Deliv. J. Deliv. Target. Ther. Agents*, vol. 8, no. 1, pp. 35–45, 2001.
- [551] P. Verma, R. N. Gupta, A. K. Jha, and R. Pandey, "Development, in vitro and in vivo characterization of Eudragit RL 100 nanoparticles for improved ocular bioavailability of acetazolamide," *Drug Deliv.*, vol. 20, no. 7, pp. 269–276, 2013.
- [552] A. F. A. Aisha, A. M. S. Abdulmajid, Z. Ismail, S. A. Alrokayan, and K. M. Abu-Salah, "Development of Polymeric Nanoparticles of Garcinia mangostana Xanthenes in Eudragit RL100/RS100 for Anti-Colon Cancer Drug Delivery," *J. Nanomater.*, vol. 2015, no. Figure 1, pp. 4–7, 2015.
- [553] S. S. Gautam, M. K. Mishra, and R. K. Prasad, "Formulation and Characterization of Ketorolac Tromethamine Nanoparticle with Eudragit RS-100 and RL-100 by Nano

- precipitation Method," *Int. J. Res. Pharm. Biosci.*, vol. 4, no. 1, pp. 17–23, 2017.
- [554] S. Payab *et al.*, "Preparation and physicochemical characterization of the azithromycin-Eudragit RS 100 nanobeads and nanofibers using electrospinning method," *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, vol. 24, no. 6, pp. 585–590, 2014.
- [555] K. Adibkia, S. Selselehjonban, S. Emami, K. Osouli-Bostanabad, and M. Barzegar-Jalali, "Electrosprayed polymeric nanobeads and nanofibers of modafinil: Preparation, characterization, and drug release studies," *BioImpacts*, vol. 9, no. 3, pp. 179–188, 2019.
- [556] M. Akram *et al.*, "Sustained release of hydrophilic drug from polyphosphazenes/poly(methyl methacrylate) based microspheres and their degradation study," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 58, pp. 169–179, 2016.
- [557] A. F. Stockwell, S. S. Davis, and S. E. Walker, "In vitro evaluation of alginate gel systems as sustained release drug delivery systems," *J. Control. Release*, vol. 3, no. 1–4, pp. 167–175, 1986.
- [558] U. M. Dhana lekshmi, G. Poovi, N. Kishore, and P. N. Reddy, "In vitro characterization and in vivo toxicity study of repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 396, no. 1–2, pp. 194–203, 2010.
- [559] S. Yuan, F. Lei, Z. Liu, Q. Tong, T. Si, and R. X. Xu, "Coaxial electro spray of curcumin-loaded microparticles for sustained drug release," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, pp. 1–15, 2015.
- [560] L. D. de Carvalho *et al.*, "Doxycycline release and antibacterial activity from PMMA/PEO electrospun fiber mats," *J. Appl. Oral Sci.*, vol. 27, pp. 1–10, 2019.
- [561] A. F. Widmer, "New developments in diagnosis and treatment of infection in orthopedic implants," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 33 Suppl 2, pp. S94–S106, Sep. 2001.
- [562] A. Trampuz and A. F. Widmer, "Infections associated with orthopedic implants," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 4, 2006.
- [563] W. Zimmerli, "Clinical presentation and treatment of orthopaedic implant-associated infection," *J. Intern. Med.*, vol. 276, no. 2, pp. 111–119, 2014.
- [564] E. Y. Klein *et al.*, "Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 115, no. 15, p. E3463 LP-E3470, Apr. 2018.
- [565] F. Brusafferri and L. Candelise, "Steroids for multiple sclerosis and optic neuritis: A meta-analysis of randomized controlled clinical trials," *J. Neurol.*, vol. 247, no. 6, pp. 435–442, 2000.
- [566] M. . Summers, L. . Majovski, G. . Marsh, K. Tachiki, and A. Kling, "Oral tetrahydroaminoacridine in long-term treatment of senile dementia, Alzheimer type," *N. Engl. J. Med.*, vol. 315, no. 20, pp. 1241–1245, 1986.
- [567] A. L. Fuhlbrigge, R. F. Lemanske, L. Rasouliyan, C. A. Sorkness, and J. E. Fish, "Practice

patterns for oral corticosteroid burst therapy in the outpatient management of acute asthma exacerbations," *Allergy Asthma Proc.*, vol. 33, no. 1, pp. 82–89, 2012.

