



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
Fax: 954 55 60 85
E-mail: galenica@us.es
<http://tecnofar.us.es>

***MICRO- Y NANOTECNOLOGÍA DE
PRODUCCIÓN DE SISTEMAS
PORTADORES DE ACTIVOS:
FLOW FOCUSING
VS.
EVAPORACIÓN - EXTRACCIÓN DEL
DISOLVENTE***

Memoria presentada por M^a José Cózar Bernal
para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2010



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
Fax: 954 55 60 85
E-mail: galenica@us.es
<http://tecnofar.us.es>

**Memoria presentada por M^a José Cózar Bernal para optar al Grado
de Doctor por la Universidad de Sevilla**

Fdo: M^a José Cózar Bernal

V^o B^o

Los Directores de la Tesis Doctoral

Fdo.: Dra. Mercedes Fernández Arévalo
Profesora Titular de Universidad
Departamento de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica

Fdo.: Dr.a. M^a Angeles Holgado Villafuerte
Profesora Titular de Universidad
Departamento de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica

Fdo.: Dra. Josefa Alvarez Fuentes
Profesora Contratada Doctora de Universidad
Departamento de Farmacia y
Tecnología Farmacéutica



**C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
Fax: 954 55 60 85
E-mail: galenica@us.es
<http://tecnofar.us.es>**

**FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA**

MERCEDES FERNANDEZ AREVALO, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, M^a ANGELES HOLGADO VILLAFUERTE, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla y JOSEFA ALVAREZ FUENTES, Profesora Contratada Doctora de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla

CERTIFICAN: Que la memoria que se presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla, realizada por la Licenciada en Farmacia D^a M^a José Cózar Bernal, cuyo título es "Micro- y Nanotecnología de sistemas portadores de activos: Flow Focusing versus Extracción-Evaporación del disolvente", ha sido realizada bajo la dirección de las que suscriben y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Para que conste, y a petición de la interesada, firmamos el presente en Sevilla, a cuatro de marzo de dos mil diez.

A MIS PADRES

Agradecimientos

Tras un largo camino de esfuerzo y dedicación, presento esta Tesis Doctoral, fruto de mi ilusión, dedicación y trabajo junto al esfuerzo y apoyo de numerosas personas que me han acompañado durante este camino.

A mis tres Directoras, les dedico el cariño más especial. Dra. Mercedes Fernández Arévalo y Dra. Josefa Álvarez Fuentes, gracias por ofrecerme esta gran oportunidad y por despertar en mí el espíritu de la investigación. Cada una de vosotras habéis contribuido de manera significativa en mi persona haciéndome sentir afortunada por pertenecer a vuestro grupo de investigación. Agradecerlos vuestros consejos, vuestra paciencia y dedicación en todos los momentos que he necesitado. A la Dra. M^a Ángeles Holgado Villafuerte, agradecerle su cercanía y cariño y más especialmente su dedicación absoluta en esta última etapa, a pesar de sus muchas otras ocupaciones.

A todos los miembros del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, tanto a los miembros activos como a los que estuvieron en su día, quisiera agradecerles la oportunidad que me han brindado de conocer y participar en el mundo de la investigación y docencia, poniendo a mi disposición todos sus conocimientos y experiencia. Especialmente a Marisa y a Mónica, gracias por todo.

A mis compañeras del laboratorio, por tantas horas compartidas, por tantas charlas en los “momentos” de descanso, por tantas risas juntas con las que compartimos penas y alegrías, y sin las cuales este trabajo sería mucho más duro. Os agradezco todos los momentos compartidos tanto en el laboratorio como fuera de él. Una mención especial a una gran compañera y amiga, que

me ha apoyado y me ha dado fuerzas cuando más baja de ánimo estaba, muchas gracias por todo Inma. Espero que continuemos juntas el camino comenzado.

Sirce, contigo comencé este camino y son miles las horas que hemos pasado juntas en el Departamento apoyándonos mutuamente. Llegando a compartir buenos y malos momentos y que sólo espero que los kilómetros que ahora nos separan solo sirvan para reforzar nuestra amistad.

Como se verá en la presente memoria, ha habido una colaboración especial con el Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de Granada, de donde me tengo grandes recuerdos y donde conocí a increíbles personas. Por lo que quisiera especialmente agradecer a la Dra. Adolfina Ruiz y al Dr. José Luis Arias su dedicación durante mi estancia en Granada y su acogida en su grupo Farmacia Práctica, donde me hicieron sentir como una más, dándome la oportunidad de conocer y aplicar distintas maneras de trabajar e investigar. Muchas gracias a tod@s.

Ya fuera del ámbito profesional y académico, me gustaría dar las gracias a todos los que han estado a mi lado aunque fuera en la distancia, a todos mis amig@s, gracias por vuestro cariño y apoyo en todos los momentos que lo he necesitado.

Mención especial requiere mi familia. Gracias a mis padres, Juan y Nana, por el apoyo y educación que me han dado siempre. Sin olvidar las infinitas horas al teléfono con mi padre que han permitido desahogarme y contar paso a paso los logros obtenidos en el laboratorio, esta tesis es también tuya. Muchas gracias Papá.

Muchas gracias a mis hermanos, Miguel, Fernando y Pili, por ser como son y por hacerme disfrutar estando con vosotros, por cada ratito de confianzas y risas que pasamos juntos.

A Carlos, tú conoces mis fortalezas, pero también mis debilidades, y sin embargo siempre estás a mi lado. Gracias por tu paciencia, por tus cuidados y por tu apoyo, parte de ti también queda reflejada en esta tesis.

En último lugar hacer una mención especial a la Junta de Andalucía por facilitarme el apoyo económico para la realización de este Tesis, gracias al proyecto P06-CTS-01688.

ÍNDICE

1.- INTRODUCCIÓN.....	3
Bibliografía	63
2.- OBJETIVOS	79
3.- CAPÍTULO I	
Synthesis of lidocaine loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties.....	83
Abstract	84
1. Introduction	85
2. Materials and methods.....	87
3. Results and discussion	93
4. Conclusions.....	106
5. Acknowledgements	107
6. References.....	107
4.- CAPÍTULO II	
Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: Physicochemical characterization and protein detection by reversed-phase HPLC	113
Abstract	114
1. Introduction	115
2. Materials and methods.....	117
3. Results and discussion	122
4. Conclusions.....	134
5. Acknowledgements	134
6. References.....	134

5.- CAPÍTULO III

Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the assay of insulin in PLGA microspheres 141

Abstract.....	142
1. Introduction	143
2. Experimental.....	144
3. Results and discussion.....	149
4. Conclusions	157
5. Acknowledgements.....	157
6. References	157

6.- CAPÍTULO IV

Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing vs. solvent extraction/evaporation technologies .. 163

Abstract.....	164
1. Introduction	165
2. Materials and methods	167
3. Results and discussion.....	173
4. Conclusions	187
5. Acknowledgements.....	188
6. References	188

7.- CONCLUSIONES.....199



INTRODUCCIÓN

1. MICROENCAPSULACIÓN DE FÁRMACOS

1.1. Antecedentes

Las primeras investigaciones para el desarrollo de los procedimientos de microencapsulación fueron publicadas en 1931 por Bungerburg de Jong y Kaas. En ellas se describía la formación de microcápsulas de gelatina según un procedimiento que recibía el nombre de *coacervación*.

Los procesos de encapsulación siguieron evolucionando y en los años 40, Green y cols. procedentes de *The National Cash Register Co.* (Dayton, Ohio) perfeccionaron el proceso de coacervación con gelatina para encapsular colorantes y dar lugar así a la elaboración del papel de calco (Schleicher, 1956). Dicho producto consistía en una fina película de microcápsulas adherida a una hoja de papel, de tal modo que la presión ejercida por el bolígrafo sobre él provocaba la fractura de dichas microcápsulas y la consiguiente liberación del marcador, dejando patente la impresión en la hoja de copia (Yañez y cols., 2002).

Años después, la microencapsulación encontró aplicaciones interesantes en el campo de la alimentación, por ejemplo para la encapsulación de aromas, vitaminas, etc., y de la agricultura, especialmente para la encapsulación de pesticidas y fertilizantes.

La idea de microencapsular fármacos no surgió hasta mediados de la década de los 50, cuando una compañía farmacéutica, *Smith Kline and French* introdujo esta tecnología con la finalidad de conseguir una liberación sostenida o prolongada de diversos fármacos. Con esa intención y la de prevenir la irritación gástrica fue microencapsulado el AAS, denominado *Measurin*®, por los laboratorios *Breon*; así el AAS aparece citado en la bibliografía como uno de los primeros fármacos microencapsulados (Nokhodchi y Farid, 1992; Yang y cols., 2001). A pesar de la aplicación algo tardía de la microencapsulación al campo farmacéutico, lo cierto es que su difusión fue muy rápida, llegando a ser, en un corto período de tiempo, una tecnología ampliamente extendida en la industria farmacéutica.

En la actualidad, la técnica de microencapsulación presenta múltiples aplicaciones, empleándose en el campo farmacéutico, agrícola, cosmético

y alimentario (Poplewell y cols., 1995; Dahms y cols., 2002; Yáñez y cols., 2002; Kanga, 2004).

1.2. Concepto y clasificación

La microencapsulación de fármacos se define desde un punto de vista tecnológico como el proceso de recubrimiento de éstos bajo (1) forma molecular, (2) partículas sólidas o (3) glóbulos líquidos, utilizando materiales de distinta naturaleza, para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico (1 - 1000 μm).

El producto tecnológico obtenido de este proceso se denomina micropartículas, que según su morfología y estructura interna se clasifican en microcápsulas o microesferas.

Sin embargo, no siempre es posible diferenciar del todo entre microcápsulas y microesferas, aunque la mayoría de autores admiten las siguientes definiciones:

- **Microcápsulas:** partículas sólidas consistentes en un núcleo sólido, líquido o pastoso, rodeado por una membrana de naturaleza polimérica que constituye el elemento controlador de la liberación. El principio activo se encuentra incluido en una especie de reservorio, que se haya envuelto por una fina película del material de recubrimiento.
- **Microesferas:** El principio activo se encuentra altamente disperso, bajo la forma de diminutas partículas o moléculas, en un entramado polimérico tipo matricial.

En ambos casos, la membrana o el soporte polimérico, puede estar constituido por uno o más polímeros (Fernández- Hervás y Holgado, 1997; Remuñán y Alonso, 2001).

La obtención de un tipo de estructura u otro depende de las propiedades fisicoquímicas del principio activo y del material de recubrimiento, así como del proceso tecnológico elegido (Remuñán y Alonso, 2001).

Cuando las partículas poseen un tamaño inferior a 1 μm , el producto resultante del proceso de microencapsulación recibe la denominación de “nanoesferas” o “nanocápsulas”.

En la figura 1 se muestran los diferentes tipos de partículas que se pueden obtener en función del método seleccionado.

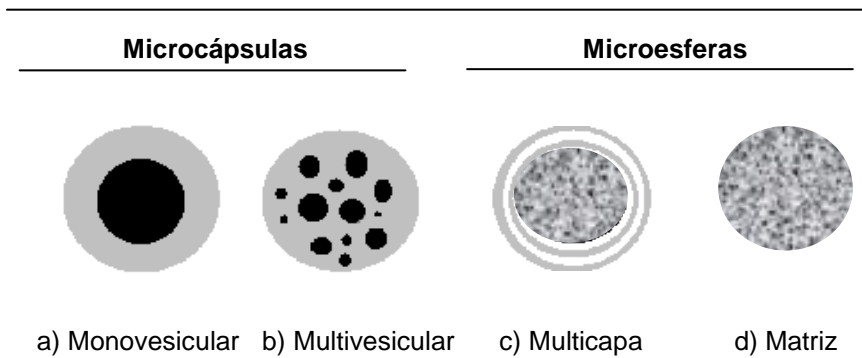


Figura 1. Clasificación de las micropartículas en función de su morfología: a) Microcápsula tipo mono-vesicular, b) Microcápsula tipo multi-vesicular, c) Microesfera tipo multi-capa, d) microsfera tipo matriz

1.3. Aplicaciones de la microencapsulación

En el campo farmacéutico, una vez obtenidas las micropartículas, éstas deberán ser acondicionadas en una forma farmacéutica secundaria. Así, las micropartículas pueden administrarse bajo la forma de suspensión o incluidas en una cápsula o en un comprimido. Obviamente, la forma farmacéutica final estará condicionada por la vía de administración del producto microencapsulado. En este sentido, es importante resaltar que la mayoría de las micropartículas presentes actualmente en el mercado están destinadas a su administración por vía oral. No obstante, existe un número limitado pero previsiblemente creciente, administrables por vía parenteral, intramuscular o subcutánea (Ramos y cols., 2000). Como ya se ha comentado, el AAS fue microencapsulado y procesado hacia la forma de comprimido con el fin de enmascarar su sabor, reducir la irritación gástrica y controlar su liberación. Además del AAS, se han microencapsulado diversos fármacos bajo distintas formas farmacéuticas como bromocriptina, leuprorelina, nitroglicerina y progesterona, con el fin de controlar la liberación.

Las ventajas de la microencapsulación en la formulación de medicamentos se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Reducción del efecto directo irritante causado por algunos fármacos en la mucosa gástrica. Ejemplos de esto son los principios activos de carácter ácido, entre cuales cabe citar el ya mencionado AAS.
2. Enmascarar características organolépticas desagradables. El recubrimiento de una sustancia de características organolépticas indeseables con un material que hace imperceptibles dichos matices aporta, sin lugar a dudas, importantes ventajas desde el punto de vista de la aceptabilidad por parte del paciente (Chiappetta y cols., 2004).
3. Conseguir una liberación sostenida o controlada del principio activo a partir de la forma farmacéutica. Esta es, en la actualidad, la aplicación más frecuente de la microencapsulación. Gracias al recubrimiento eficaz del fármaco con un material adecuado es posible conseguir, no únicamente una cesión gradual y sostenida del mismo, sino también que la liberación se produzca a modo de pulsos o a un determinado pH en virtud de las características del material polimérico (Remuñán y Alonso, 2001; Freiberg y Zhu, 2004; Martín-Banderas, 2008; Holgado y cols., 2009).
4. Asegurar la protección del principio activo frente a los agentes atmosféricos que comportarían su degradación, como es el caso de las vitaminas A y K, sensibles a la luz.
5. Inmovilización de células o enzimas (Chang y Prakahs, 2001; Taqieddin y Amiji, 2004; Orive y cols., 2006).
6. Modificar la solubilidad de un fármaco.
7. Proteger principios activos incompatibles entre sí.
8. Prevenir la evaporación de productos volátiles, como esencias y aromas.

En la industria alimentaria, la microencapsulación está transformando los productos, llegando incluso a intervenir en las tendencias de salud del consumidor mediante la encapsulación de probióticos (Shah y Ravula, 2000) o con la incorporación de otros ingredientes que mejoren la salud. Además, se han creado nuevas texturas, se han diferenciado y revalorizado algunos productos, etc. Uno de los sectores con mayor potencial es la alimentación infantil con la incorporación de vitaminas, minerales, etc.

En la industria textil, la microencapsulación también ha supuesto una revolución dando lugar a los llamados “tejidos inteligentes”. Éstos incorporan en sus fibras partículas con determinadas características que pueden hacer que las prendas cambien de color en función de la luz o de la humedad, pueden llevar incorporadas sustancias desodorantes, fragancias, repelentes de insectos o sustancias cosméticas como aloe vera (Nelson, 2002; Rodrigues y cols., 2009).

Las micropartículas también han sido empleadas como sistemas modelos en medicina, bioquímica, química coloidal, tecnología de aerosoles, etc. Se utilizan como soporte para la síntesis de péptidos, para separación celular o incluso de metales pesados contaminantes (Kaminiski y Núñez, 1999; Phanapavudhikul y cols., 2002; Ngomsik y cols., 2005;).

También tiene gran interés su empleo como patrones de calibración en equipos como citómetros de flujo, analizadores de partículas, microscopía confocal, etc. Otras aplicaciones son la medición de flujo en gases y líquidos (*Laser Doppler Anemometry* (LDA); *Particle Dynamics Analysis* (PDA); *Particle Image Velocimetry* (PIV)).

En el campo de la información y la imagen el primer éxito comercial fue el papel calco sin carbón desarrollado en los años 50 por *National Cash Register Company*, para evitar los problemas de evaporación y difusión de la tinta en el papel. Hoy día se sigue comercializando y el interés por desarrollar nuevos tipos de papel o *displays* va en aumento por sus propiedades ópticas y electrónicas. Actualmente existen productos desarrollados por *Sony Corporation* en los que se ha incorporado la tecnología de la tinta electroforética de E-ink Corp (Ozin y Arsenault, 2008).

Las micropartículas han supuesto un gran avance en el uso sistemas de diagnóstico médico, sistemas *multiplex*, mejorando enormemente la eficacia y la resolución de los tradicionales (Vignali, 2000).

1.4. Métodos de microencapsulación

En la actualidad existen gran variedad de métodos para microencapsular fármacos y, a medida que aparecen nuevos materiales y nuevos fármacos, el número de técnicas aumenta. Los métodos más usados industrialmente se recogen en la tabla 1.

MÉTODO	FÁRMACO	TAMAÑO DE PARTÍCULA
Extracción – Evaporación del disolvente	Sólido - Líquido	0.1 – 1.000 μm
Polimerización interfacial	Sólido - Líquido	1 – 1.000 μm
Coacervación (Separación de fases)	Sólido - Líquido	1 – 1.000 μm
Atomización y atomización-congelación	Sólido - Líquido	1 – 1.000 μm
Suspensión en aire	Sólido	>1.000 μm
Gelificación iónica	Sólido	50 – 5.000 μm

Tabla 1. *Métodos de microencapsulación de fármacos*

La elección del método se hace, principalmente, en base a las características físico-químicas del polímero y del principio activo a encapsular, además de tener en cuenta los siguientes requerimientos (Ramos y cols., 2001):

- El rendimiento de obtención de microesferas con el intervalo de tamaños deseado debe ser alto.
- La eficacia de encapsulación del principio activo debe ser elevada.
- La actividad biológica del principio activo debe mantenerse durante el proceso de encapsulación.
- La producción de los distintos lotes debe ser reproducible lote a lote en términos de un perfil cualitativo y de liberación del principio activo.
- El perfil de liberación debe poder ajustarse mediante el control de la composición y las variables del proceso.
- Las microesferas no deben agregarse y deben presentarse como un polvo fino que fluya libremente.

Además, deben optimizarse otras propiedades como:

- Tamaño y distribución de tamaños.
- Propiedades de superficie.

- Carga de principio activo.
- Velocidad de liberación del principio activo.
- Velocidad de degradación de la matriz.

Lógicamente, aspectos como esterilidad, apirogenicidad o contenido de disolvente orgánico residual tienen que ser también satisfactorios.

1.4.1. Clasificación

Existe gran divergencia de opiniones entre los distintos autores en cuanto a la clasificación de los métodos de microencapsulación, sin embargo, las clasificaciones más aceptadas son las propuestas por Kondo (1979) y Merkle (1984) los cuales dividen los métodos en tres grandes grupos: fisicoquímicos, químicos y mecánicos. En la figura 2 quedan resumidos los métodos y/o técnicas de microencapsulación en función de cómo vaya vehiculizado el material a encapsular, así como, los pasos necesarios para obtener finalmente micropartículas.



Figura 2. Clasificación de los métodos y técnicas de microencapsulación en función del estado del material a encapsular

A continuación en las tablas 2, 3 y 4 se recoge una clasificación de los métodos de preparación de micropartículas en función del procedimiento tecnológico seguido (Palomo y cols., 1997a; 1997b; 1997c):

Métodos químicos/físicos					
Método	Estado fármaco	Tamaño partícula	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Polimerización interfacial	Sólido / Líquido	1 – 1000 μm	Fármaco lipo ó hidrosoluble	Material reactivo en contacto con el fármaco	Li y cols., 2008
Polimerización <i>in situ</i>	Sólido / Líquido	1 – 500 μm	Material reactivo no está en contacto con el fármaco	Formación pre – polímero, control pH, T ^a , fármaco liposoluble, ajuste proporciones reactivos, múltiples pasos	Kim y cols., 2002; Sun y Deng, 2005
Emulsión polimerización	Sólido / Líquido	50 – 300 μm			McDonald y Devon, 2002; Ding y cols., 2004; Tan y cols., 2009; Zhao y cols., 2009
Insolubilización rápida del polímero	Sólido / Líquido		Condiciones suaves y sencillas		Guo y cols., 2006
Coacervación o separación de fases	Sólido / Líquido	1 – 500 μm	Protección a oxidación y Volatilidad	Control pH, T ^a , ajuste proporciones de reactivo	Salaün y cols., 2009
Emulsión-extracción /evaporación del solvente	Sólido / Líquido	0.1 – 1000 μm	Coste	Baja eficacia de encapsulación, múltiples pasos	

Tabla 2. *Métodos químicos o F/Q de microencapsulación*

Métodos físicos o mecánicos					
Método	Estado fármaco	Tamaño partícula	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Atomización	Sólido / Líquido	1 – 1000 μm	Escalable, sencillo	Alto consumo de energía	Cui y cols., 2001; Chiriaca y cols., 2005
Lecho fluido	Sólido	50 – 10000 μm	Escalable		Lubarsky y cols., 2004
Pan coating		> 50 μm	Alta producción	Poco control de tamaño dependiente del Operario	

Tabla 3. Métodos mecánicos de microencapsulación.

Otros Métodos			
Método	Ventajas	Inconvenientes	Referencia
Hinchamiento	Evita formación de agregados	Múltiples etapas Baja encapsulación	Bradley y cols., 2005
Fluidos Supercríticos	Control de morfología Reducción disolventes orgánicos	Posible desnaturalización de biomoléculas Número de disolvente limitado	Martín y cols., 2002
Membranas porosas	Control del tamaño Tamaño dependiente del diámetro de poro.	No producción en continuo. Baja Productividad	Ma y cols., 2004
Capa a capa	Sencillo, control tamaño	Múltiples pasos. Coste, procesos muy precisos y exactos, sin margen de error	Zhang y cols., 2003

Tabla 4. Otros métodos de microencapsulación

A continuación, se describen muy brevemente los métodos indicados, centrándonos fundamentalmente en los dos seleccionados para llevar a cabo el presente trabajo de investigación.

A. Procedimientos Químicos:

- **Polimerización Interfacial**

Este proceso se basa en la reacción de Schotten-Baumann, por la cual, dos monómeros, uno lipófilo (ácido dihaluro), contenido en una solución orgánica, y el otro hidrófilo (diamina), contenido en una solución acuosa inmiscible con la anterior, forman una película polimérica en la interfaz de los dos líquidos inmiscibles que constituyen la emulsión donde se desarrolla un proceso de polimerización que da lugar a la formación de las microcápsulas.

En la industria farmacéutica, la utilización de este método ha sido escasa. Merece la pena destacar únicamente el método propuesto por Chang para la formación de microcápsulas de poliamida (nylon) basado en la reacción interfacial de los monómeros hexametilendiamina y cloruro de sebacoilo (Palomo y cols., 1997a; Scher y cols., 1998; Remuñán y Alonso, 2001; Cho y cols., 2002).

- **Polimerización in situ**

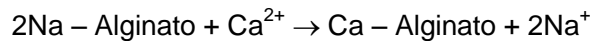
Este proceso se basa en que polímeros de bajo peso molecular o precondensados, se polimerizan sobre la superficie de los núcleos formando la película polimérica. En este caso, el material reactivo no está en contacto con el material a encapsular. La polimerización ocurre exclusivamente en la fase continua y en el lado de la interfase de ésta, originándose un pre-polímero de bajo peso molecular de forma que el tamaño de partícula aumenta por adición de un agente reticulante (Lee y cols., 2002; Brown y cols., 2003; Kim y cols., 2005).

- **Insolubilización rápida del polímero o gelificación iónica**

El polímero se solubiliza y cuando se añade a un medio donde existen iones inorgánicos, aldehídos, ácido nítrico, isocianato, etc., se produce la insolubilización del mismo, formándose una película. Esta insolubilización

puede estar causada por neutralización del punto isoeléctrico (Palomo y cols., 1997a).

Generalmente se recurre a la gelificación de alginato sódico (polianión) con cloruro cálcico (catión). El método consiste en solubilizar o suspender el compuesto que se va a encapsular en una solución acuosa de alginato sódico, adicionando la mezcla, mediante goteo, sobre una solución acuosa de Cl_2Ca que se encuentra sometida a una velocidad de agitación adecuada. Al entrar la gota de alginato sódico en contacto con Ca^{2+} , se produce la gelificación de la misma, obteniéndose una membrana o cubierta de alginato cálcico que es insoluble en agua pero permeable. La reacción que tiene lugar es (Remuñán y Alonso, 2001):



La gran ventaja es que se lleva a cabo en condiciones muy suaves al no requerir el uso de disolventes orgánicos, calor, agitación energética ni agentes reticulantes perjudiciales. Por todo esto es el método de elección para la inmovilización de células (Orive y cols., 2002; Pereira y cols., 2005; Maguire, y cols. 2006; Wang y cols., 2006).

Se trata de un método rápido y sencillo que permite combinar otros tipos de insolubilización como puede ser la térmica. En este caso el polímero de elección suele ser la agarosa la cual funde a 90 °C, manteniéndose fundida a temperatura ambiente (Orive y cols. 2003; Cellesi y cols., 2004).

- **Emulsión-polimerización**

Consiste en una polimerización aniónica iniciada por bases covalentes, por ejemplo, grupos OH^- provenientes de la disociación de H_2O . Ocurre en medio acuoso y finaliza con la adición de cationes que neutralizan las cadenas. Se lleva a cabo mediante el goteo del monómero en una solución acuosa acidificada con HCl (pH 1.0 – 3.5) conteniendo un surfactante y un estabilizador. La acidificación del medio produce polímeros de mayor peso molecular y por tanto micropartículas más estables lo que retarda la degradación de éstas (Soppimath y cols. 2001).

Permite la producción de partículas huecas para diferentes aplicaciones (McDonald y Devon, 2002), por ejemplo, para mejorar la calidad y resolución de pinturas ya que tienen menor densidad que los pigmentos

inorgánicos y son capaces de dispersar la luz. También se emplean para recubrimientos de papel.

B. Procedimientos Físico-Químicos:

- **Coacervación o separación de fases**

Bajo la denominación de “coacervación” o “separación de fases” se agrupan una serie de técnicas de microencapsulación que se basan en la inducción, por algún procedimiento, de la desolvatación del polímero que, a continuación, se deposita en forma de gotículas de coacervado alrededor de la sustancia que se va a encapsular.

El término “coacervación” fue introducido en la química coloidal por Kruyt y Burgenberger de Jong en 1929 para describir la floculación o separación espontánea de dos fases líquidas que ocurre cuando dos polielectrolitos de carga opuesta se mezclan en medio acuoso. Este fenómeno se limita a las mezclas de polielectrolitos que tienen una densidad de carga y una longitud de cadena adecuadas. Así, la coacervación es un fenómeno asociado a soluciones coloidales.

El proceso de coacervación comprende tres etapas realizadas bajo agitación continua:

1. Formación de tres fases químicas inmiscibles: solvente polimérico, núcleo y polímero. En esta fase el sistema físico-químico final es una dispersión del núcleo en la solución polimérica.
2. Sedimentación del polímero sobre el núcleo. Aquí, la tensión interfacial juega un papel importante en el tamaño de las gotas de coacervado, de forma que mediante el control de esta propiedad se puede regular el tamaño de las microcápsulas.
3. Endurecimiento de la cubierta polimérica mediante la total desolvatación del polímero (eliminación del solvente).

Según el carácter del medio donde se lleva a cabo el procedimiento de microencapsulación se distinguen distintos métodos:

- Separación de fases en medio acuoso.
 - Coacervación simple donde existe un soluto coloidal.
 - Coacervación compleja con un sistema de dos o más solutos.

- Separación de fases en medio orgánico. En este caso el material a encapsular se dispersa en una fase orgánica que constituye la solución polimérica (Palomo y cols., 1997b).

En la tabla 5, se resumen los distintos métodos de separación de fases en medio acuoso:

Diferencias entre coacervación simple y coacervación compleja		
CARACTERÍSTICAS	COACERVACIÓN SIMPLE	COACERVACIÓN COMPLEJA
COMPONENTES	Al menos uno debe ser una macromolécula	Necesita dos macromoléculas capaces de transportar cargas opuestas
PRESENCIA DE CARGAS EN LAS MACROMOLÉCULAS	Sin consecuencia en la inducción de la coacervación	Determina si hay o no coacervación
CONDICIÓN PRINCIPAL	Carencia total de agua en una parte del sistema	Adecuada oposición de cargas
EFFECTO DE LA DILUCIÓN	Impide la coacervación	No afecta a la coacervación
PRESENCIA DE SALES	Promueven la coacervación: la efectividad sigue la serie liotrópica	Suprimen la coacervación: la posición de iones en series liotrópicas es de menor significación
INFLUENCIA DEL PH	Independiente del pH	Dependiente de pH

Tabla 5. Principales diferencias entre la coacervación simple y la compleja

La coacervación presenta algunos inconvenientes, como son:

- Frecuente aglomeración, porque no hay un estabilizador.
- La variación lote a lote ha causado problemas tanto en el proceso de coacervación como en el perfil de liberación de fármaco.
- Alto coste dada la gran cantidad de disolventes que se necesitan, aumentando la contaminación ambiental en el caso de los orgánicos (Ramos y cols., 2001).

Ruiz y cols. (1989) estudiaron el proceso de separación de fases usando ácido poliláctico-glucónico (PLGA) para formar microesferas que contenían triptorelina concluyendo que la naturaleza físico-química del polímero, la concentración del polímero, la viscosidad del aceite de silicona y la relación polímero-aceite de silicona afectaban la estabilidad del sistema emulsión en

el proceso de separación de fases y, por tanto, la formación y calidad de la microesfera.

- **Recubrimiento con ceras**

Este método sólo puede usarse con principios activos insolubles o casi insolubles en agua. Existen dos procesos que se diferencian en la temperatura que se aplica al sistema:

I) *Dispersión fundible*. Consiste en suspender la sustancia activa en agua y calentar el sistema hasta la temperatura de fusión de una segunda fase compuesta de una dispersión acuosa de la sustancia cérea. Posteriormente, se mezclan ambas fases con agitación constante durante un tiempo determinado, tras lo cual se enfría rápidamente hasta temperatura ambiente o inferior. Las microcápsulas así formadas se separan del agua mediante filtración.

II) *Congelación de la fase dispersa hidrofóbica*. En este caso la sustancia activa se disuelve en la sustancia cérea a una temperatura de 10 °C por encima de la temperatura de fusión de dicha cera. Sobre este sistema se incorpora una fase acuosa, previamente calentada a 5 °C por encima de la temperatura de fusión de la cera, formándose así una emulsión de fase interna oleosa. A continuación se baja la temperatura de forma brusca hasta 4 °C, formándose así las micropartículas (Palomo y cols., 1997b).

C. Procedimientos mecánicos:

- **Atomización o nebulización**

Consiste en la atomización de la sustancia activa, previamente dispersada o disuelta en una solución constituida por el material de recubrimiento, en el seno de una corriente de aire. Se distinguen dos procesos: *spray drying* (atomización y secado) y *spray congealing* (atomización y congelación). La diferencia entre ambos estriba en la temperatura del aire de entrada.

- **Lecho Fluido**

En este caso se atomiza la solución polimérica sobre la sustancia activa que se encuentra suspendida en una corriente de aire caliente y a medida que el disolvente del polímero se evapora, éste se deposita alrededor de

las partículas que han de ser porosas o sólidas (Palomo y cols., 1997c; Remuñán y Alonso, 2001).

D. Otros métodos:

- **Capa a capa (*Iyer-by-Iyer, LBL*)**

Mediante este método, las microcápsulas se forman en varios etapas, cada una de las cuales consiste en el ensamblaje de un polielectrolito cargado positiva o negativamente en el que va disuelto la sustancia que se va a encapsular formando una fina película alrededor de una partícula que actúa como núcleo, generalmente nanoesferas de sílice o poliestireno (Yang y cols., 2001); en otras ocasiones es la propia sustancia a encapsular la que actúa como núcleo (Ye y cols., 2005). En la siguiente etapa otro polielectrolito, de carga opuesta al anterior, interacciona electrostáticamente formando un complejo.

Por otro lado, el núcleo de la micropartícula puede ser modificado, puede disolverse obteniendo partículas huecas y/o rellenarse con moléculas funcionalizadas (Zhang y cols., 2005).

Con este método se consigue controlar el espesor de la pared y el tamaño de partícula. Sin embargo, se requieren materiales de muy alta calidad y varias etapas en la formación de las partículas, obteniendo una baja eficacia de encapsulación, lo que nos lleva a un encarecimiento del proceso.

- **Hinchamiento**

El material a encapsular se incorpora a micropartículas previamente producidas, generalmente de poliestireno. Para ello las micropartículas han de ser tratadas con disolventes orgánicos, de esta forma se provoca un hinchamiento de la matriz polimérica permitiendo la entrada del material deseado. A continuación, se procede al secado de las partículas, retirando los disolventes con líquidos extractores (Mulvaney y cols., 2004) o simplemente calentando (Bradley y cols., 2005).

Los principales inconvenientes son las múltiples etapas necesarias; la encapsulación poco eficiente y el proceso es dependiente de los materiales de partida; sin embargo, puede ser ventajosa frente a otras técnicas en

determinados casos, por ejemplo, en la encapsulación de “*quantum dots*” frente al método de polimerización in situ ya que se evita la formación de agregados (Bradley y cols., 2005).

- **Emulsificación mediante membranas porosas**

Se trata de una técnica relativamente reciente para la producción controlada de partículas. El origen de esta técnica radica en 1986 cuando Nakashima y Shimizu fabricaron unas particulares membranas de vidrio llamadas “*Shirasu Porous Glass*” (SPG) (Vladisavljevic y Williams, 2005).

Esta técnica, permite la producción de emulsiones simples de los dos signos A/O y O/A y de emulsiones dobles tipo A/O/A (Ma y cols., 2004).

El funcionamiento de estos sistemas consiste en hacer pasar la fase dispersa a través de la membrana la cual se encuentra rodeada de fase continua circulando de forma constante. Es importante que la membrana no sea mojada por la fase dispersa por lo que antes de su uso debe ser mojada por la fase continua así, por ejemplo, para la producción de emulsiones O/A utilizaríamos una membrana hidrofílica que mojaríamos con agua (Charcosset y cols., 2004). Hoy día, el material de la membrana puede ser: vidrio, cerámica, acero inoxidable y celulosas.

Seleccionando adecuadamente la membrana, es posible controlar el tamaño de gota. Además, requiere poca energía en comparación con los métodos mecánicos convencionales y es fácil de escalar utilizando varias membranas por módulo. Los principales inconvenientes son que no permite la producción de forma continua, ha de ser lote a lote, el tamaño de gota depende del tamaño de poro y los caudales de la fase dispersa son muy bajos por lo que la capacidad de producción es pequeña.

- **Fluidos supercríticos (*Supercritical fluids, SCFs*)**

Se trata de una técnica de micronización usada ampliamente en la industria basada en la utilización de dos disolventes líquidos completamente miscibles, de forma que el soluto a micronizar sólo es soluble en uno de ellos. Así, la adición del antisolvente induce la formación de una solución de dos líquidos y la supersaturación y precipitación del soluto (Martín y cols., 2002). La propiedad que caracteriza a los SFCs es que son una fase intermedia entre líquido y gas.

Esta única fase se consigue al someter al fluido a presiones y temperaturas cercanas a su punto crítico. Cerca de este punto crítico, pequeños cambios de presión o temperatura provocan cambios significativos en sus propiedades fisicoquímicas (por ejemplo: densidad, solubilidad, difusividad, etc.). Esta característica los hace especialmente útiles en procesos de síntesis, cromatografía, catálisis, etc. de forma que han desplazado a algunos disolventes orgánicos como los hidrocarburos halogenados por su alta toxicidad, siendo el dióxido de carbono supercrítico (sc-CO₂) una buena alternativa ya que no presenta toxicidad para el medioambiente ni para la salud (<http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/11/i02/html/02regs.html>, junio 2007).

Su principal ventaja es que permite controlar la morfología de las partículas y reducir el uso de disolventes orgánicos. Permite trabajar en continuo o lote a lote, en función del montaje del dispositivo.

Los principales factores que afectan tanto al tamaño como a la morfología de las partículas son: la velocidad de inyección del líquido, el tipo de inyector empleado, el proceso de lavado una vez finalizado el proceso, temperatura, volumen de expansión del solvente, etc. Uno de los principales inconvenientes de esta técnica es que el soluto entra en contacto con disolventes orgánicos lo que puede provocar la desnaturalización de biomoléculas. Otro inconveniente es que el número de disolventes está limitado y una gran mayoría de moléculas terapéuticas no son solubles en ellos.

Una vez descritos brevemente los distintos métodos más comúnmente empleados en la obtención de micropartículas, nos centraremos en describir de manera más minuciosa los dos métodos de producción escogidos para la elaboración del presente trabajo: extracción-evaporación del disolvente y Flow Focusing.

1.5. Extracción-evaporación del disolvente

Éste ha sido el método tradicional elegido para la microencapsulación de los activos objeto del presente estudio. El método fue descrito inicialmente por Vranken y Claeys en 1970, aunque cuenta con algunas variantes. El

objetivo principal es la eliminación del disolvente en el que está disuelto el polímero, ya sea por evaporación o por extracción de éste.

En todos los casos debe elaborarse una emulsión. Dependiendo de la naturaleza de la fase continua de la emulsión que se forme se clasificarán en técnicas de extracción- evaporación del disolvente en fase acuosa o en fase oleosa.

La preparación de las micropartículas por este método consiste, básicamente, en cuatro pasos (Freitas y cols., 2005):

1. Disolución o dispersión de la sustancia activa, en un disolvente orgánico que contiene el material que forma la matriz.
2. Emulsificación de la fase orgánica en una segunda fase acuosa continua inmiscible con primera.
3. Extracción del disolvente a partir de la fase dispersada por la fase continua, que es acompañada opcionalmente por la evaporación del disolvente, transformándose las gotitas en micropartículas sólidas.
4. Recolección y secado de las micropartículas.

Aunque el método de extracción- evaporación del disolvente es conceptualmente simple, existen muchas variables que pueden influir en las características de los sistemas obtenidos. Algunas de estas variables son (Ramos y cols., 2001):

- Tipo de disolvente orgánico.
- Naturaleza y cantidad de emulsificante.
- Naturaleza y solubilidad del principio activo.
- Temperatura de evaporación del disolvente.
- Relación de volumen de las fases orgánica y acuosa.
- Relación de principio activo y polímero.
- Estructura y peso molecular del polímero.
- Tipo y velocidad de agitación.

A su vez, dentro de este método existen distintas modalidades:

a) En fase acuosa:

- **Método de la emulsión O/A.** En este método, la fase orgánica que contiene el polímero y el principio activo se emulsiona en una fase acuosa que contiene un tensioactivo. Posteriormente las gotas

orgánicas emulsificadas que contienen el polímero y el principio activo son endurecidas como microesferas por eliminación del disolvente orgánico (figura 3).

Algunas de las ventajas de este método son: eficiente incorporación de principios activos lipofílicos, obtención de un intervalo de tamaños esencialmente controlados por la velocidad y las condiciones de agitación y obtención de micropartículas con propiedades superficiales hidrofílicas, lo que permite su resuspensión sin agregación.

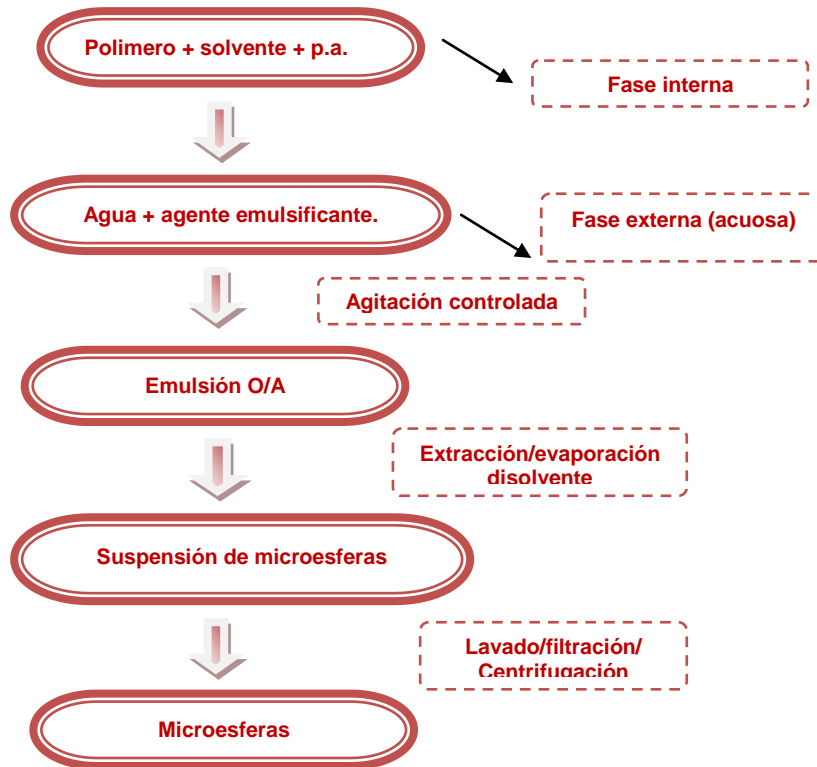


Figura 3. Preparación del método de evaporación-extracción del disolvente en fase acuosa O/A

Uno de los principales inconvenientes de este método es la baja incorporación de principios activos solubles en agua, debido al reparto del principio activo en la fase acuosa externa de la emulsión. Este problema se

resuelve modificando el método tradicional que da lugar al método de la doble emulsión (A/O/A). En este caso el principio activo se disuelve en agua (fase acuosa) y el polímero se disuelve en un disolvente orgánico (fase orgánica). Ambas fases se mezclan obteniéndose la primera emulsión A/O, que se adiciona lentamente sobre un medio acuoso que contiene un emulsificante, por ejemplo alcohol polivinílico, para dar lugar a la segunda emulsión A/O/A. A continuación, el disolvente orgánico es eliminado y se obtienen las micropartículas. En la figura 4 se muestra el esquema de preparación de este método.

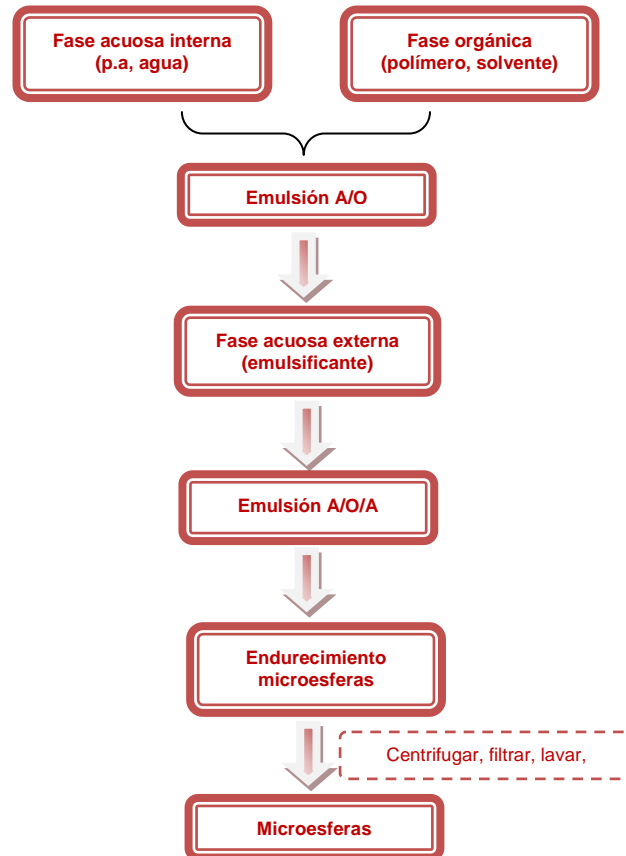


Figura 4. Obtención de las microesferas por el método de emulsión múltiple A/O/A

b) En fase oleosa:

- **Emulsión O/O.** Este método es otra modificación de la emulsión O/A donde la fase continua está formada por un líquido orgánico, por ejemplo aceite mineral, formándose la emulsión O/O. Se usa para encapsular eficazmente principios activos solubles en agua (figura 5).

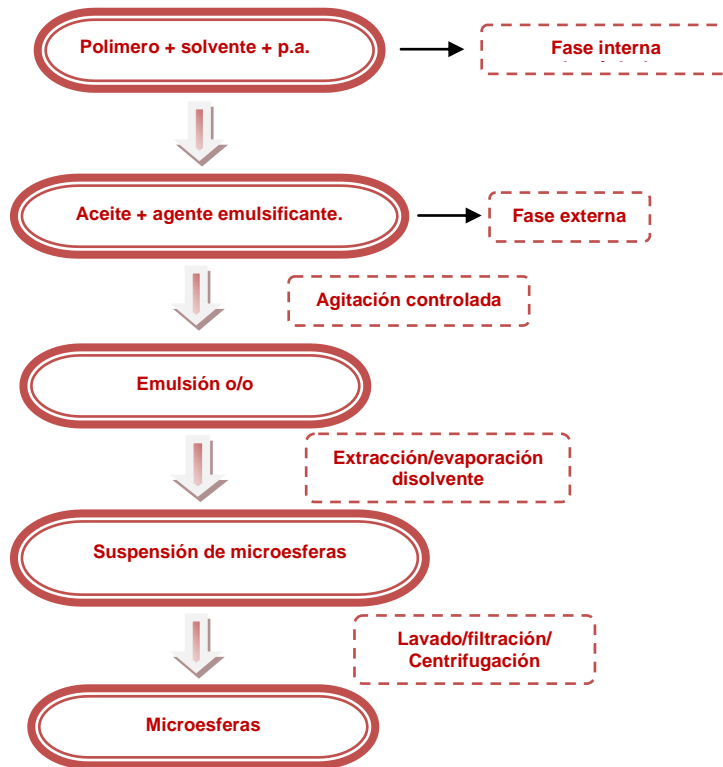


Figura 5. Preparación del método de evaporación-extracción del disolvente en fase oleosa O/O.

Los inconvenientes que presenta este método son la dificultad de obtener micropartículas pequeñas (menores de 50 μm) y la tendencia de las micropartículas a agregarse cuando se resuspenden en vehículos acuosos debido a la naturaleza hidrófoba de su superficie y a la ausencia de un estabilizador hidrofílico.

c) Otros métodos. En la bibliografía se encuentran recogidos los siguientes:

- Emulsión A/O/A/O
- Emulsión A/O/O
- Emulsión A/O/O/O

1.6 Tecnología Flow Focusing (FF)

La tecnología Flow Focusing (FF) fue creada y desarrollada en los años 90, por el Dr. Alfonso Gañán Calvo, catedrático de Mecánica de Fluidos de la Universidad de Sevilla. Se trata de una técnica capaz de producir, de manera masiva, gotas monodispersas a escala micrométrica, generando un aerosol con unas características diferenciadoras del resto de sistemas obtenidos por otros métodos. En la actualidad, esta novedosa técnica se encuentra protegida por numerosas patentes. La tecnología FF presenta un alto potencial de aplicación en el campo farmacéutico ya que permite un control exhaustivo del tamaño de la micropartícula, así como de su estructura.

Fundamentalmente se basa en la formación de un microchorro de un fluido “enfocado” en el núcleo de una corriente laminar de otro fluido “enfocante” altamente acelerado. En esta tecnología el fluido enfocado es conducido suavemente por el enfocante, evitándose esfuerzos violentos. Se trata, pues, de un procedimiento puramente mecánico, en donde las moléculas con las que se trabaja son sometidas a condiciones experimentales muy suaves evitando situaciones estresantes que podrían implicar alteraciones de las estructuras (Martín-Banderas y cols., 2005).

En los procesos de atomización la aportación de energía puede llevarse a cabo por diferentes mecanismos: presión de líquido, presión de aire, rotación, vibración, campo eléctrico, etc. En el caso de FF, la producción de gotas es el resultado de una combinación entre fuerzas hidrodinámicas y una geometría específica, no requiriendo la aplicación de fuerzas externas como vibración o campo eléctrico para la producción de gotas (Gañán-Calvo y Barrero, 1998).

La configuración básica de un nebulizador (figura 6) consiste en un tubo capilar enfrentado a un orificio practicado en una pared delgada. Del tubo sale un caudal de fluido que es enfocado por el fluido circundante formando un microchorro que atraviesa el orificio sin tocarlo. Bajo ciertas condiciones de presiones y flujos, y teniendo en cuenta ciertos parámetros

fisicoquímicos de los fluidos empleados (viscosidades, tensiones superficiales e interfaciales), se consigue un chorro fino, estable, reproducible y controlable que rompe produciendo una atomización monodispersa por inestabilidad capilar.

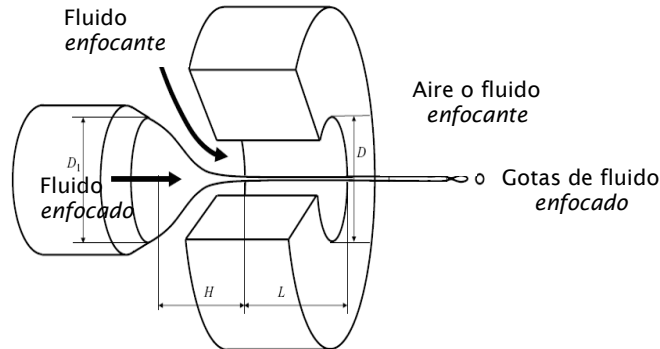


Figura 6. Esquema de la configuración básica de un nebulizador FF

Según la naturaleza de los fluidos “enfocado-enfocante” empleados podemos considerar las siguientes configuraciones y resultados:

- **Gas-Líquido:** Un gas a presión rodea a un flujo de líquido dando lugar a la producción de microgotas del líquido “enfocado”. Esta es la configuración requerida para generar aerosoles y es, por tanto, la que ocupa el interés en este estudio (figura 7a).
- **Líquido-Gas:** La configuración es la contraria a la anterior, tenemos un núcleo esférico de gas rodeado por un líquido y por tanto genera microburbujas en las que una capa de líquido rodea un núcleo esférico de gas.
- **Líquido-Líquido:** Es este caso el fluido “enfocante” es un líquido inmisible con el “enfocado” generando gotas de líquido rodeadas por otro líquido, es decir, una emulsión formada por gotículas del mismo tamaño (figura 7b).
- **Compuesta:** En esta configuración se tienen dos corrientes de líquidos inmiscibles entre sí que salen en disposición concéntrica y que son, a su vez, enfocados por una corriente de gas a presión. De esta forma se generan microcápsulas de pared de espesor

controlable mediante una adecuada selección de la relación de fluidos caudales (figura 7c)



a) Gas-Líquido

b) Líquido-Líquido

c) Compuesta

Figura 7. Algunas configuraciones posibles de la tecnología Flow Focusing

La configuración empleada para la microencapsulación de los activos en la presente memoria se muestra en la figura 8. En ella un líquido, “fluido enfocado”, sale de un tubo capilar de radio interior D_0 que se encuentra a una distancia H de una pared de espesor L . En dicha pared hay un orificio de diámetro D (centrado con el tubo capilar) a través del cual fluye una corriente de gas. Todas estas medidas, D_0 , H , L y D son del orden de cientos de micras.

La gota de líquido proveniente del tubo capilar se alarga en dirección al orificio desarrollando una forma de copa a una distancia crítica del orificio, cuando el incremento de presión ΔP_g que sufre el gas al atravesar el orificio supera las fuerzas que genera la tensión superficial en la interfaz líquido-gas. Si, una vez alcanzadas estas condiciones, se suministra desde el tubo capilar un caudal constante Q , se establece un estado estacionario (Figura 8).

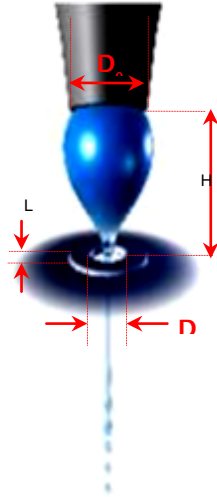


Figura 8. Parámetros geométricos de la configuración Flow Focusing

En el presente trabajo, se han desarrollado distintas formulaciones de activos (lidocaína, green fluorescent protein (GFP) e insulina) bajo las configuraciones: gas-líquido y líquido-líquido, dependiendo de las características de las sustancias a encapsular y de los objetivos marcados.

En el primero de los casos, microencapsulación de lidocaína, se trabajó con la configuración gas-líquido (figura 9). En él, el fluido enfocado que se inyecta con una bomba de jeringa es una solución de lidocaína y PLGA en acetato de etilo y es enfocado mediante el uso de un gas (aire comprimido) a presión, que actúa de enfocante. Cuando la velocidad del gas circundante se elige de manera determinada, las fluctuaciones de presión son menores que las fuerzas de tensión superficial líquido-gas. Así, el patrón de rotura del chorro forma un aerosol prácticamente monodisperso. El nebulizador FF se encuentra en una cámara termostatzada. De esta manera el aerosol producido por el nebulizador se hace pasar por dicha cámara (55 ± 10 °C) con el fin de conseguir el secado de las micropartículas por evaporación del disolvente. Las microesferas así producidas se recogen sobre un vidrio de reloj y se dejan secar a temperatura ambiente durante 24 horas, completando así el proceso de secado y asegurando la evaporación total del disolvente

A continuación, se inició la microencapsulación de sustancias de naturaleza peptídica usando GFP como proteína modelo y el mismo dispositivo que para el caso de la lidocaína (figura 9).

Para la producción de estas microesferas, se utilizó como fluido enfocante aire comprimido y como enfocado una emulsión A/O conteniendo PLGA y la proteína. La solidificación de las gotas y obtención de partículas sólidas se produjo por evaporación del disolvente (acetato de etilo) al producirse la atomización en el seno de la cámara termostatzada.

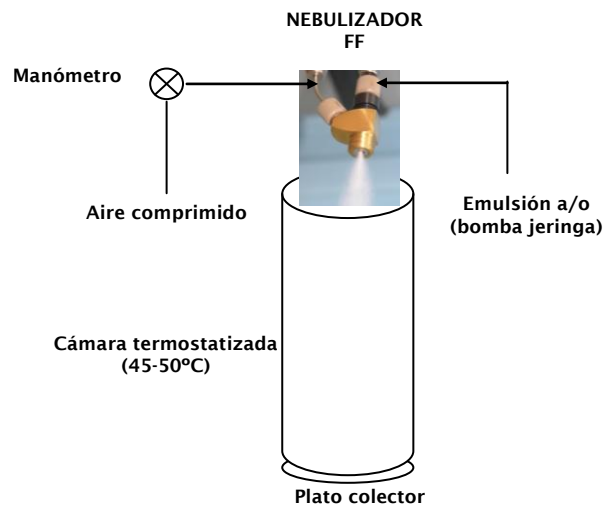


Figura 9. Esquema del dispositivo empleado para la producción de micropartículas de PLGA conteniendo lidocaína y GFP.

Una vez desarrollados los sistemas conteniendo lidocaína y GFP, se procedió a microencapsular insulina como proteína terapéutica. En esta ocasión, se usó la configuración líquido-líquido que se muestra en la figura 10 (Martín-Banderas y cols., 2006).

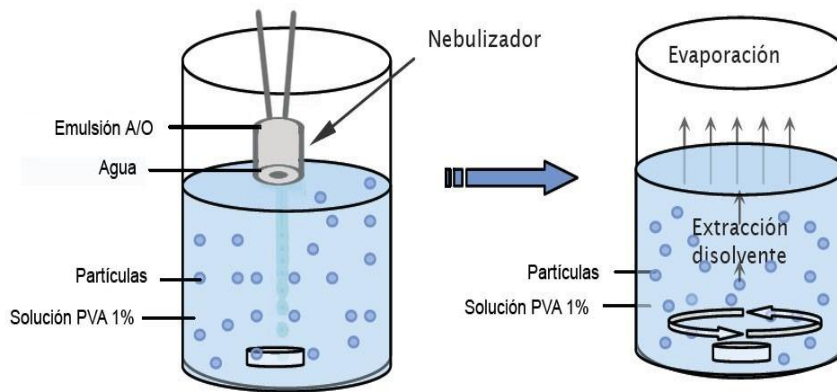


Figura 10. Esquema del dispositivo empleado para la producción de microesferas de PLGA conteniendo insulina.

La elaboración de microesferas con este método implica la formación de una doble emulsión A/O/A. Este modelo de configuración simple líquido-líquido consiste en que, tanto el fluido enfocante como el enfocado son líquidos.

Inicialmente, se preparó una primera emulsión A/O con una solución de insulina y con la solución de PLGA en acetato de etilo. Esta emulsión fue enfocada utilizando como fluido enfocante agua destilada. Para formar la doble emulsión final A/O/A, las gotículas generadas se recogieron en una solución acuosa de PVA (1% p/v). Esta solución acuosa de PVA, en agitación continua evitó, además, la posible coalescencia de las gotas y su deformación, impidiendo la formación de agregados.

2. NANOTECNOLOGÍA

Uno de los grandes retos de la Tecnología Farmacéutica actual es el desarrollo de sistemas nanométricos que contengan un principio activo vehiculizado junto a un transportador, y que sean capaces de mejorar la seguridad y eficacia de dicho fármaco.

La “Nanotecnología Farmacéutica”, como indica el profesor Vila Jato, es una ciencia emergente con un alto contenido fisicoquímico y biológico, ya que en ella aparecen nuevos aspectos biofarmacéuticos y farmacocinéticos no conocidos con los sistemas de transporte de fármacos convencionales (<http://ranf.com/pdf/discursos/numero/vila.pdf>).

El desafío se presenta cuando la Tecnología Farmacéutica debe dotar de nuevas formas de dosificación a una gran cantidad de moléculas procedentes de la Biotecnología, además de optimizar la terapia de fármacos ya conocidos y utilizados en formas de administración convencionales.

Centrándonos en los sistemas de liberación de fármacos, que constituyen el campo fundamental de la Nanotecnología Farmacéutica, los objetivos que se persiguen con su utilización son los siguientes:

- Proteger al fármaco de su degradación física y química, sobre todo si son compuestos procedentes de la Biotecnología.
- Aumentar la absorción de fármacos, facilitando su paso a través de membranas, aspecto fundamental si se pretenden encontrar alternativas a la administración intravenosa de fármacos.
- Modificar las características farmacocinéticas de los principios activos para modular su distribución por tejidos y órganos, incrementando así su eficacia o disminuyendo efectos secundarios indeseables.
- Favorecer la penetración intracelular de los compuestos y fármacos, si estos tienen sus dianas de actuación en el interior de las células.
- Optimizar otros aspectos como son las técnicas de imagen y el diagnóstico *in vivo*.

La Nanotecnología Farmacéutica, como ciencia y tecnología de los sistemas nanoparticulares, ofrece, cada vez más, grandes posibilidades para mejorar la seguridad y eficacia de numerosos fármacos y moléculas

de origen biotecnológico. Este planteamiento es fundamental si lo que se pretende es optimizar los tratamientos actuales y dotar al arsenal terapéutico de nuevos medicamentos.

El término “Nanotecnología” es usado extensivamente para definir las ciencias y las técnicas que se aplican a nivel de nanoescala, esto es, que permiten trabajar y manipular las estructuras moleculares y sus átomos. Se contemplaría por tanto, la posibilidad de fabricar distintos materiales a partir del reordenamiento de átomos y moléculas. Cuando se manipula la materia a escala tan minúscula de átomos y moléculas, aparecen fenómenos y propiedades que antes no se ponían de manifiesto. Para tener una idea aproximada del tamaño de los sistemas que nos ocupa basta decir que un eritrocito tiene un tamaño aproximado de 5000 nm; un virus mide unos 50 nm y el ADN unos 2 nm. En la figura 11 puede verse una comparación de tamaños de distintos elementos.

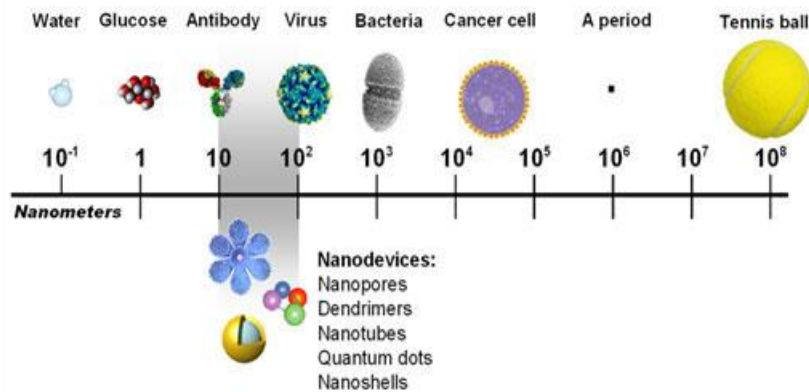


Figura 11. Comparación de tamaños de distintas moléculas y elementos

La Nanotecnología tiene eminentemente un carácter multidisciplinar e implica a científicos de diferentes campos de investigación, incluyendo físicos, químicos, ingenieros, tecnólogos, especialistas en ciencias de los materiales así como biólogos y farmacéuticos. Además, está siendo aplicada prácticamente a la totalidad de los campos de la ciencia: electrónica, óptica, desarrollo de nuevos materiales y biomedicina (Kateb y cols., 2010).

En el campo farmacéutico, la Nanotecnología permite la vectorización de principios activos a nivel de órganos, tejidos o células sobre los que ejercen su acción mediante la utilización de transportadores.

Estos transportadores deben cumplir una serie de características tales como baja toxicidad, propiedades adecuadas para el transporte y liberación del fármaco y larga vida media.

En este caso, permite que la liberación del fármaco sea mínimamente invasiva ya que posibilita la fabricación de dispositivos a escala nanométrica, tamaño que permite a estos sistemas atravesar poros y membranas celulares. Desde 1990, las autoridades regulatorias han ido aprobando una serie de productos para uso clínico basados en esta metodología, estando la mayoría de ellos indicados en el tratamiento del cáncer: Daunoxome® (liposomas de daunorubicina para leucemias y sarcoma de Kaposi), Doxil® (liposomas pegilados de doxorubicina para el cáncer de ovario), Abraxane® (nanopartículas de albúmina con paclitaxel para el cáncer de mama).

Con esta técnica se ve incrementada la efectividad del fármaco mediante el control preciso de la dosis requerida, del tamaño, la morfología y las propiedades superficiales del compuesto. Los fármacos, al ser liberados de forma específica sólo en los órganos, tejidos o células dañadas, disminuyen su posible toxicidad asociada. Por otra parte, al ser posible la liberación paulatina del principio activo, de acuerdo con las necesidades del paciente, se consiguen disminuir los posibles efectos adversos que puedan producirse como consecuencia de la ingesta masiva del fármaco.

Existen distintos tipos de sistemas de vectorización de fármacos (figura 12). Éstos se diferencian en su composición y estructura, pero todos persiguen los mismos objetivos



Figura 12. Diferentes sistemas de vectorización de fármacos (Fuente: González y cols., 2005a)

En definitiva, la aparición de los nanosistemas farmacéuticos ha constituido una auténtica revolución en el campo terapéutico y ha intentado paliar, en mayor o menor grado, algunas lagunas que muestran los sistemas convencionales de liberación de fármacos. En la tabla 6 se muestra, a modo de resumen las alternativas ofrecidas por dichos sistemas.

Problema	Efecto del nanosistema de liberación
Baja solubilidad	Sistemas de liberación de fármacos como micelas o liposomas proporcionan un ambiente tanto hidrofóbico como hidrofílico, aumentando la solubilidad del fármaco
Daño en el tejido al producirse la extravasación	La dispensación regulada de los sistemas de liberación puede disminuir o eliminar el daño a los tejidos producido por la extravasación accidental
Farmacocinética desfavorable	Los sistemas de liberación protegen al fármaco frente a la degradación prematura, por lo que se requieren dosis menores
Baja distribución	La especificidad asociada a los sistemas de liberación minimiza el volumen de distribución y ayuda a reducir los efectos secundarios que se puedan producir en órganos sensibles
Falta de selectividad de tejidos	Los sistemas de liberación pueden incrementar la concentración del fármaco en el tejido diana

Tabla 6. Problemas asociados a sistemas convencionales que pueden ser resueltos mediante la utilización de nanosistemas (Fuente: Allen y Cullis, 2004)

A continuación, se realizará una breve descripción de las nanopartículas como uno de los sistemas de transporte de activos desarrollado en la presente tesis doctoral.

2.1. Nanopartículas

Son sistemas coloidales de tamaño inferior a 1 μm y, generalmente, de naturaleza polimérica. Dependiendo del método de preparación, y al igual que ocurría con los sistemas microparticulares, se pueden distinguir dos tipos de estructuras:

- **Nanoesferas:** sistemas matriciales constituidos por el entrecruzamiento de oligómeros o unidades de polímero, en los que el principio activo se puede encontrar atrapado en la red polimérica, disuelto en ella o adsorbido en su superficie. A estas estructuras se les suele denominar indistintamente “nanopartículas” o “nanoesferas”.
- **Nanocápsulas:** sistemas reservorio constituidos por un núcleo rodeado de una membrana polimérica. En este caso el principio activo suele encontrarse en el núcleo, aunque también puede estar adsorbido en la superficie.

Hasta el momento se han utilizado, para la preparación de nanopartículas, macromoléculas hidrofílicas de origen natural (proteínas o polisacáridos) o polímeros hidrofóbicos sintéticos (poliésteres o policianoacrilatos). A pesar de que los polímeros naturales son muy interesantes, presentan problemas de antigenicidad al usarlos como vectores. De hecho, aún no se dispone de estudios que demuestren de manera rotunda la ausencia de toxicidad de estos sistemas. Por el contrario, la seguridad de los poliésteres está demostrada al haber sido aceptada para su empleo en humanos (existen formulaciones en forma de microesferas). En el caso de los policianoacrilatos de alquilo, las expectativas son buenas si se tiene en cuenta que existe una formulación de nanopartículas conteniendo doxorrubicina en fase II de estudios clínicos (Kumari y cols., 2010).

Los métodos de elaboración de los sistemas nanoparticulares pueden ser muy variados. Puede distinguirse entre aquéllos que utilizan el polímero preformado y los que parten de los monómeros para constituir el polímero durante la preparación de las nanopartículas. Dentro de los polímeros preformados, hay que diferenciar los que utilizan macromoléculas naturales y los sintéticos. Otros métodos empleados en la elaboración de estos sistemas son los denominados “nanoprecipitación” y “polimerización”.

A continuación se indican, de forma resumida, las principales características de los polímeros utilizados:

- **Polímeros naturales.** Se distinguen de manera especial aquéllos que utilizan proteínas (albúmina y gelatina) y polisacáridos (alginato). Los métodos preparativos utilizan una emulsión A/O, en la que la proteína se somete a una desnaturalización por el calor o

una reticulación con agentes químicos. También se puede partir de una solución acuosa de la macromolécula que se somete a un proceso de separación de fases (desolvatación o gelificación iónica).

- Polímeros sintéticos. Destacan en este grupo las nanopartículas elaboradas con poliésteres de carácter hidrofóbico como el ácido láctico y los copolímeros de éste con el ácido glicólico. El método de elaboración más conocido es el de extracción- evaporación del disolvente, en el que el polímero se encuentra en la fase interna de una emulsión O/A disuelto en un disolvente clorado (diclorometano). Las nanopartículas se obtienen tras la evaporación de este último bajo presión reducida.

2.1.1. Estudios de distribución y posibles aplicaciones terapéuticas

Las posibilidades que ofrecen las nanopartículas de modificar pautas de distribución de un principio activo se ven limitadas por la captación preferente por parte del sistema reticuloendotelial. Así, en estudios de distribución en animales realizados con nanopartículas biodegradables de distinta naturaleza, se ha observado una acumulación mayoritaria de las mismas en el hígado (40-80% de la dosis administrada), los pulmones (0,7-3%) y el bazo (0,6-2%). Por otra parte, aunque en ciertos casos se ha observado un incremento de la actividad terapéutica de citostáticos asociados a nanopartículas frente a determinados tumores experimentales, se ha demostrado que, en general, la concentración de portadores en el tumor es siempre muy baja (menor al 1%). Esto quiere decir que, por el momento, las posibles aplicaciones de estos sistemas han de orientarse al tratamiento de enfermedades asociadas a células del sistema retículo-endotelial (por ejemplo, leishmaniosis) o a órganos en los que predominan dichas células (por ejemplo, infecciones intracelulares hepáticas y tumores hepáticos).

Actualmente, existen en la bibliografía numerosos estudios que abordan la posibilidad de modificar la distribución de estos sistemas coloidales, para así ser dirigidos a una diana específica y que no sean captados por el sistema reticuloendotelial. Entre las distintas estrategias utilizadas están la aplicación de un campo magnético externo para guiar nanopartículas

magnéticas, el anclaje de diversos ligandos a la superficie de las nanopartículas (PEG, anticuerpos monoclonales, ácido fólico, aptameros, etc.). A continuación se exponen resumidamente algunos ejemplos.

- Nanopartículas magnéticas. Se han elaborado nanopartículas que contienen magnetita con la finalidad de que puedan ser guiadas por un campo magnético exterior hacia el órgano o tejido diana. Estos sistemas, concretamente los elaborados con albúmina, han permitido obtener muy buenos resultados en animales, sobre todo cuando el tejido diana se encuentra en un lugar fácilmente accesible al campo magnético externo.
- Nanopartículas recubiertas con agentes tensioactivos. El recubrimiento con agentes tensioactivos no iónicos es otra de las posibilidades que se está investigando para reducir la permanencia de las mismas en la sangre circulante y disminuir la captación por parte del sistema retículoendotelial. Se ha estudiado el efecto provocado por la adsorción de diferentes variedades de copolímeros de óxido de etileno y propileno, capaces de modificar características superficiales de los sistemas nanoparticulares. Dicha modificación ha permitido conseguir que tanto el hígado como el bazo capten menos nanopartículas y también se ha observado una reducción de su opsonización por las proteínas de la sangre. No obstante, es preciso apuntar que los estudios realizados no han resultado igual de concluyentes cuando se trató de nanopartículas biodegradables. En este caso, parece necesaria la presencia de restos hidrofílicos en la superficie de la partícula durante el proceso de erosión, para lo cual tendrían que estar distribuidos en toda la matriz polimérica, unidos, por ejemplo, mediante enlace covalente.
- Nanopartículas recubiertas con anticuerpos monoclonales. La idea de asociar anticuerpos específicos a nanopartículas tiene su origen en los estudios que llevaron a cabo la elaboración de conjugados entre principios activos y anticuerpos, tratando de conseguir (aunque sin éxito) la orientación del principio activo hacia determinados tejidos. Con el mismo planteamiento se pensó en la utilización de anticuerpos monoclonales como conductores de nanopartículas hacia ciertas células que poseen antígenos específicos, como son las células tumorales. Sin embargo, aunque

in vitro sí se ha podido demostrar la capacidad de las nanopartículas de unirse de manera inmuno-específica a las células tumorales, se ha demostrado que esta técnica tampoco queda libre de la captura por parte del sistema reticuloendotelial.

- Nanopartículas multifuncionales. Consistiría en añadir ligandos y componentes que anclados en la superficie o en el interior de la nanopartícula la llevarán a cumplir distintas funciones como, prolongar su circulación en la sangre, capacidad para acumularse expresamente o no en la zona patológica requerida, sensibilidad a estímulos locales como cambios de pH o temperatura y liberación del principio activo en el interior de la célula de forma eficaz.

2.2. Situación actual y perspectivas

No hay dudas de que el mercado de la Nanotecnología es un mercado emergente. La Nanomedicina es sólo una de las diversas áreas de investigación y desarrollo en el campo de la Nanotecnología.

Los procesos de aprobación para la comercialización de aplicaciones nanotecnológicas en medicina son largos, con un promedio de alrededor de 10 años; esta restricción no está presente en el resto de mercados nanotecnológicos, donde está apareciendo un gran número de productos en muy diversos sectores. Al tratarse de una disciplina emergente, la comercialización de productos procedentes de Nanomedicina se encuentra en un estado inicial. Existen distintas limitaciones que frenan la explotación comercial de resultados de investigación en Nanomedicina, como son, los altos costes de producción y las dificultades para llevar a cabo una producción a gran escala, el miedo de la sociedad a utilizar tecnologías innovadoras sobre todo en temas relacionados con la salud, la inexistencia de regulación específica y el largo proceso de aprobación de nuevos materiales para su uso en salud humana por parte de las agencias reguladoras.

A pesar de estos inconvenientes, existen dos factores clave que guiarán la comercialización de productos desarrollados mediante Nanotecnología: la inversión de fondos públicos y la expiración de patentes de medicamentos pertenecientes a industrias farmacéuticas. Otros factores importantes serán el aumento de la esperanza de vida de la población que supone la

necesidad de desarrollar tratamientos novedosos y más eficaces que los actuales y el impacto de la aplicación de técnicas bioinformáticas en la secuenciación del Genoma Humano.

Existe un gran número de tecnologías pertenecientes al ámbito de la Nanomedicina que pueden ser protegidas mediante patentes. En la figura 13 se muestra una relación de todas estas técnicas susceptibles de ser patentadas.

De las patentes con participación española en el campo de la Nanotecnología, un 25% y un 12% corresponden a patentes con aplicaciones en industria médico-farmacéutica y a biotecnología, respectivamente. Estas aplicaciones constituyen un tercio del total, lo que nos da una idea del grado de importancia de este sector.

Las diferentes aplicaciones de la Nanomedicina comenzarán a tener resultados visibles en los próximos 10-15 años. Esto se debe a que los productos que se desarrollen mediante estas técnicas para su aplicación en salud humana deben seguir unos protocolos de ensayo más largos y están sometidos a una regulación más estricta. Tres son los principales pilares sobre los que se asentará el desarrollo futuro de esta emergente ciencia (figura 14).

En cuanto a las enfermedades que más se beneficiarán de los avances en Nanotecnología, el cáncer se presenta como una de las principales dianas para los avances científicos que supondrá la aplicación de estas técnicas a la salud humana. La Nanomedicina jugará también un papel muy importante en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema cardiovascular.

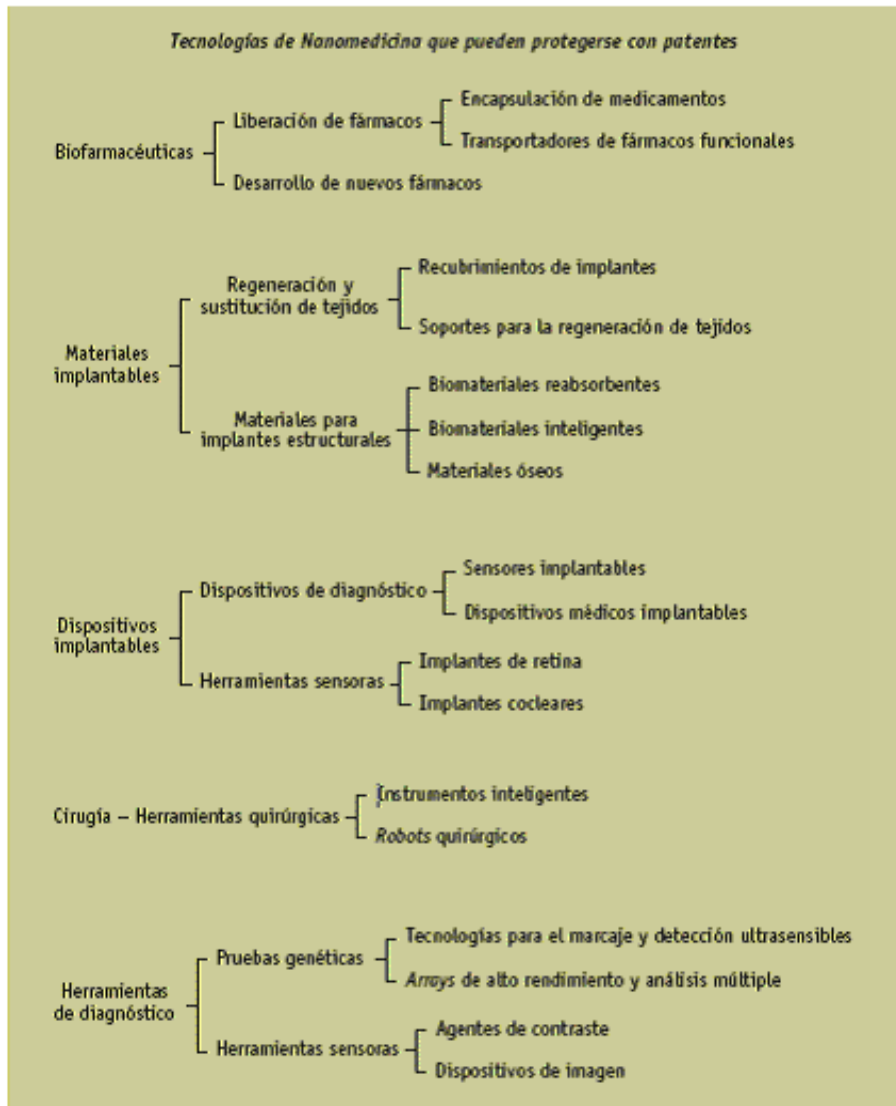


Figura 13. Tecnología y técnicas de Nanomedicina que pueden ser protegidas con patentes (Fuente: González y cols., 2005b)



Figura 14. Perspectivas de desarrollo de las diferentes aplicaciones y tecnologías de la Nanomedicina. (Fuente: González y cols., 2005b)

El desarrollo de nanodispositivos capaces de monitorizar trombos o hemorragias tendrá un gran impacto en el diagnóstico y el tratamiento de embolias o accidentes cerebrovasculares. Estos dispositivos podrán realizar un diagnóstico temprano de este tipo de lesiones, emitir una señal al organismo y liberar sustancias como anticoagulantes u otros fármacos en respuesta al estímulo detectado.

El resto de enfermedades sobre las que tendrá un mayor impacto serán las enfermedades neurodegenerativas, diabetes, enfermedades infecciosas, enfermedades relacionadas con la sangre y los pulmones y problemas ortopédicos.

En lo que se refiere a la perspectiva de desarrollo económico, la Nanomedicina se presenta como el área de la nanotecnología con grandes posibilidades de comercialización.

Las aplicaciones de la Nanotecnología con perspectivas de comercialización más elevadas serían la construcción de tejidos u órganos humanos in vitro, la liberación controlada de fármacos, los dispositivos lab-on-a-chip, el desarrollo de sondas inteligentes para el diagnóstico in vivo, y el desarrollo de nanomáquinas moleculares.

Se espera que la producción de nanofármacos aumente un 12% en los próximos siete años y que la facturación en medicamentos “nano” pase de 40 millones de dólares en 2004 a 92.1 millones de dólares en 2012. En la figura 15 se observa el incremento en la facturación de medicamentos “nano” y en su cuota de mercado.

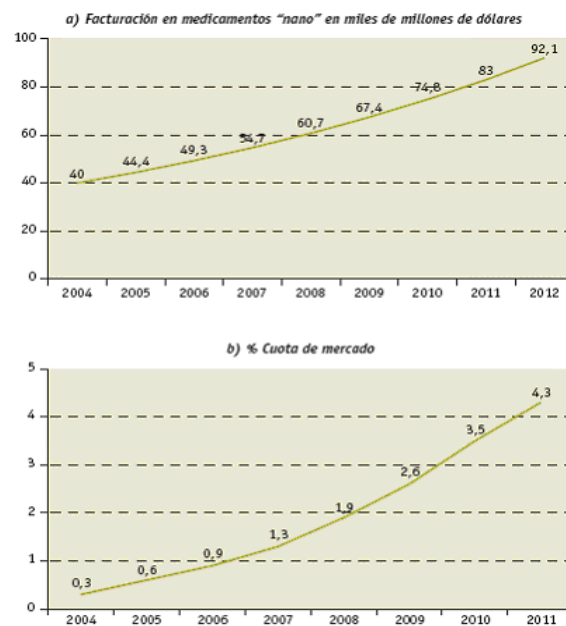


Figura 15. a) Crecimiento de la facturación en medicamentos de origen nanotecnológico. b) Aumento de la cuota de mercado (Fuente: González y cols., 2005b)

3. GRUPOS TERAPÉUTICOS DE INTERÉS

Actualmente, se están llevando a cabo grandes esfuerzos, desde los puntos de vista tecnológico e industrial, en el desarrollo de sistemas de administración de activos capaces de ejercer un control sobre su comportamiento fisicoquímico, en general, y biofarmacéutico, en particular. La posibilidad de desarrollar productos novedosos con relación a activos conocidos se ha convertido en una realidad de gran interés para industrias de diferente índole, farmacéutica, cosmética, agroalimentaria, etc. El hecho es que con esta opción se aporta un elemento diferencial con ventajas innegables que redundan en la puesta en el mercado de productos novedosos, de mayor calidad y mejor aceptación. En este contexto, la aportación de la micro y nanotecnología, en lo relativo al desarrollo de sistemas particulares para activos tales como fármacos, ingredientes cosméticos o productos de interés alimentario (por citar sólo algunos ejemplos), está resultando ser una herramienta tecnológica especialmente útil.

En concreto, en el campo farmacéutico la micro y nanotecnología es utilizada como herramienta en el diseño de sistemas de liberación controlada capaces de circular libremente en sangre, anclarse o atravesar la piel y las mucosas para poder así acceder a órganos diana de manera selectiva (Kateb y cols. 2010).

El desarrollo de sistemas transportadores de fármacos es una ciencia que está en constante evolución. Su objetivo fundamental es depositar de forma efectiva y selectiva, las sustancias terapéuticas en las concentraciones adecuadas para maximizar su efectividad. Esto debe lograrse restringiendo el acceso de estas sustancias a las áreas no seleccionadas para su efecto, considerando por tanto al transportador como uno de los factores más importantes para obtener tal éxito. Se necesitan nuevas formas de dosificación adaptadas a la administración de moléculas activas, de diferente naturaleza y con requerimientos muy específicos para su administración, que con frecuencia precisan de una vectorización u orientación selectiva para conseguir una adecuada acción terapéutica.

La administración oral es una de las rutas de administración de fármacos más utilizada y preferida por los pacientes. Sin embargo, no es demasiado factible en el caso en el que los principios activos presenten unas propiedades fisicoquímicas desfavorables para su absorción intestinal, bien

por cuestiones de estabilidad, por problemas de solubilidad o por una clara disminución de biodisponibilidad por efectos hepáticos de primer paso, entre otras causas. Todos estos problemas pueden ser resueltos con el abordaje innovador en la formulación y desarrollo de sistemas tecnológicamente avanzados.

Una de las estrategias utilizadas para mejorar la biodisponibilidad de dichas sustancias es la utilización de sistemas coloidales, por ejemplo micro y nanopartículas poliméricas, que son estables en el tracto gastrointestinal, protegen la sustancia vehiculizada y son capaces de modular tanto las características fisicoquímicas del sistema como la liberación de las sustancias activas.

Respecto a la liberación de fármacos, en general, estos sistemas son capaces de mejorar la farmacocinética, aumentar la biodistribución del fármaco en el órgano diana, mejorar la eficacia terapéutica y reducir su toxicidad. Presentan la gran ventaja de aumentar la solubilidad de compuestos hidrofóbicos y han demostrado su capacidad para aumentar la estabilidad de compuestos como DNA, oligonucleótidos, péptidos, etc.

La elección de la técnica de elaboración de estos sistemas se hace principalmente en base a las características físico-químicas del polímero y del principio activo a encapsular, del tamaño medio de partícula requerida, del mecanismo de liberación deseado y del coste.

En los últimos años, se han desarrollado sistemas multiparticulares de liberación controlada de diversas moléculas farmacológicamente activas de diferente naturaleza. Muchos de estos sistemas se encuentran ya en el mercado farmacéutico. Entre los grupos farmacológicos encapsulados encontramos antieméticos, antibióticos (amoxicilina, sulfato de gentamicina), anestésicos locales (lidocaína), antiinflamatorios (paracetamol, AAS, diclofenaco, 5-ASA), antiparkinsonianos (bromocriptina), moléculas proteicas (somatostatina), antidiabéticos (insulina), virus (vacunas), genes, anticancerosos (leuprorelina, doxorubicina), y antianginosos (nitroglicerina).

Actualmente, el mercado farmacéutico cuenta con numerosas formulaciones de principios activos encapsulados en sistemas multiparticulares de diferente naturaleza, un número que día a día va en aumento gracias a las incesantes investigaciones en este campo. Se citan a continuación algunos ejemplos:

- **Lupron Depot[®]** (Takeda-Abbott), leuprolida, empleado en el tratamiento de cáncer de próstata.
- **Abraxane[®]** (Abraxis Bioscience), paclitaxel, empleado en el tratamiento del cáncer metastásico de mama.
- **Sandostatin LAR[®]** (Novartis), ocreotida, empleado en acromegalia y en tumores endocrinos gastroenteropancreáticos.
- **Enantone Depot[®]** (Takeda-Abbott), utilizados en el tratamiento de cáncer.
- **Nutropin Depot[®]** (Genentech), somatropina, empleado en trastornos del crecimiento en pacientes pediátricos.
- **Treslar Depot[®]** (Debio Recherche Pharmaceutique S.A.), empleado en el tratamiento paliativo del cáncer de próstata avanzado.
- **Plenaxis[®]** (Praecis Pharmaceuticals), abarelix, empleado en el tratamiento del cáncer prostático.
- **Parlodel LA[®]** (Novartis), bromocriptina, empleado para tratar la acromegalia.
- **Decapeptyl[®]** (Debiopharm), triptorelina, utilizado en el tratamiento paliativo del cáncer de próstata avanzado.

Tras la extensa revisión bibliográfica realizada, se expone, a continuación, un breve resumen sobre algunos grupos terapéuticos de interés en micro y nanotecnología, centrándonos en los más importantes:

Inmunosupresores: fármacos capaces de suprimir la respuesta inmunológica a un estímulo antigénico ya sea producido por un antígeno externo o interno. Estos fármacos se utilizan en la prevención del rechazo a los trasplantes y en una amplia serie de enfermedades autoinmunes como la psoriasis, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y otras muchas enfermedades dermatológicas y sistémicas. Dentro de este grupo pueden citarse azatioprina, ciclosporina, micofenolato y sirolimus.

Anticancerosos: El cáncer es una de las enfermedades más estudiadas en la actualidad por la implicación social que conlleva. En los últimos años, la FDA ha aprobado la comercialización de numerosos sistemas

(liposomas, dendrímeros, nanopartículas) para el tratamiento del cáncer. En la tabla 7, se recogen los principios activos que se han formulado en liposomas para el tratamiento de esta enfermedad.

Principio activo	Indicación
Daunorubicina	Sarcoma de Kaposi
Doxorubicina	Cáncer de mama
Doxorubicina en liposomas pegilados	Sarcoma de Kaposi, cáncer de ovario, cáncer de mama
Citarabina	Meningitis linfomatosa
Vincristina	Linfoma no Hodgkin
Acido trans-retinoico	Leucemia, Linfoma no Hodgkin, Sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón
Derivados del platino	Diversos tumores
Plásmido ADN	Melanoma metastásico

Tabla 7. Principios activos incluidos en liposomas aprobados para utilización clínica en fase de investigación

Anestésicos locales: fármacos empleados para producir una pérdida reversible de sensación en una región circunscrita del cuerpo. Tienen la facultad de impedir temporalmente la transmisión de los impulsos nerviosos, produciendo una interrupción de la sensibilidad, especialmente la dolorosa, en una región dada del organismo.

Proteínas terapéuticas: se definen como aquellas proteínas que el organismo debería producir y que por alguna patología dada es incapaz de hacerlo. Las proteínas están compuestas por cadenas de aminoácidos y la reorganización de estas secuencias en una estructura tridimensional es la que confiere la actividad farmacológica a dichas sustancias.

La mayoría de los fármacos de naturaleza peptídica son moléculas obtenidas mediante biotecnología, pero antes del desarrollo de la tecnología del ADN recombinante de los hibridomas, los procedimientos

clásicos de obtención eran poco rentables, limitados a una gama restringida de proteínas ya que se obtenía en cantidades limitadas y a un alto coste.

Fue en 1976 cuando se obtuvo la primera producción de proteínas terapéuticas por ingeniería genética, concretamente somatostatina aislada de bacterias. Robert Swanson y Herbert Boyer crean *Genentech*, la primera compañía de biotecnología. A comienzos de los años 80, Eli-Lilly, produce la primera hormona obtenida por biotecnología, la insulina para el tratamiento de la diabetes. En la tabla 8, se recogen algunos ejemplos de proteínas obtenidas por biotecnología y su uso en terapéutica.

En un estudio reciente (Murua y cols., 2009), se han recubierto células con biomateriales de distinta naturaleza para dar lugar a partículas de tamaño micrométrico. Las células encapsuladas producen proteínas terapéuticas (productoras de eritropoyetina, EPO) que, una vez implantadas en el organismo, en este caso de rata, se liberan de forma controlada y sostenida. Resulta, por tanto, muy beneficiosa en el caso de enfermedades que requieren la administración regular de medicamentos. Esto junto con la administración de un tratamiento inmunosupresor, consiguieron mantener los niveles de hematocrito elevados durante un periodo de tiempo significativamente superior al del grupo que no recibió el tratamiento inmunosupresor, en concreto 14 semanas más.

PROTEÍNA	USO TERAPÉUTICO
γ -interferón	Carcinoma
β -interferón	Esclerosis múltiple
Activador del plasminógeno tisular	Fibrinólisis
Calcitonina	Enfermedad de Paget's, hipercalcemia
Eritropoyetina	Estimulación de la eritropoyesis
Factor de necrosis tisular	Carcinoma
Factor VIII	Hemofilia
Glucagón	Hipoglucemia crónica intratable
Hormona del crecimiento	Enanismo
Insulina	Diabetes tipo I
Oligonucleótidos	Cáncer y SIDA
Proleukina	Carcinoma
Somatostatina	Diabetes
Somatotropina	Síndrome de Turner
Superóxido dismutasa	Desordenes respiratorios

Tabla 8. Ejemplos de proteínas utilizadas en terapéutica

En los siguientes apartados se muestra una descripción detallada de los activos utilizados en el desarrollo experimental de la presente memoria: lidocaína, GFP e insulina.

3.1. Lidocaína

En 1943 Löfgren y Lundqvist sintetizan un anestésico local derivado del ácido dietilaminoacético: la 2-(dietilamino)-N-(2,6-dimetilfentil)acetamida o lidocaína. Es un anestésico local del grupo de las amidas, con estructura $C_{14}H_{22}N_2O$ (figura 16) y peso molecular 234,3. Con este compuesto se inaugura la familia de las amidas, con menor capacidad sensibilizante.

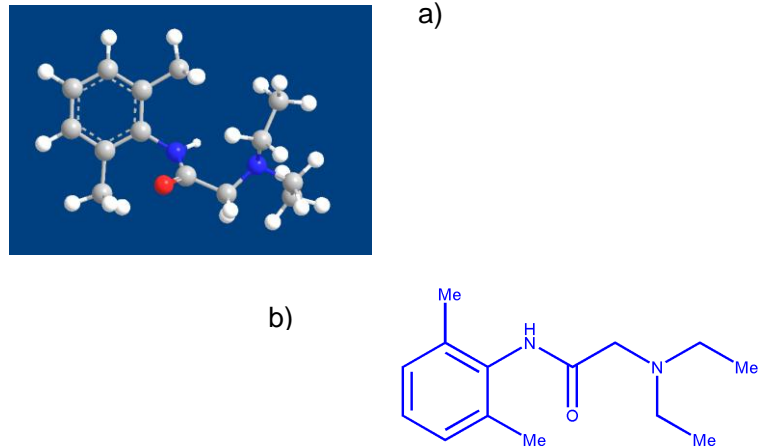


Figura 16. Estructura de lidocaína en a) 3D y b) 2D

A finales de los 40, la lidocaína se utilizó inicialmente como fármaco antiarrítmico para tratar arritmias que se presentaban durante el cateterismo cardíaco. Su indicación como anestésico local no fue introducida hasta 1948 y a partir de ese momento se convirtió en uno de los anestésicos más usados. Hoy día es el agente de elección en infiltración y el anestésico de referencia por su potencia, buena penetración y escasa toxicidad. Su mecanismo básico de acción es inhibición de la despolarización de la membrana y bloqueo de la conducción nerviosa (Arribas y cols., 2001; Cinesi y cols., 2002).

La lidocaína produce una anestesia rápida e intensa, pero breve. Es el agente de elección, en los individuos sensibles a los anestésicos locales tipo éster. Su corta semivida biológica (1.5-2 h) y su bajo peso molecular la convierten en una molécula candidata a ser microencapsulada. Además, y dada su elevada hidrofobicidad y baja solubilidad acuosa, se puede utilizar

como fármaco hidrófobo modelo (Görner y cols., 1999; Holgado y cols., 2008).

Los primeros trabajos que citan la encapsulación de la lidocaína datan de 1979. Estos trabajos refieren una acción más intensa y duradera tanto como analgésico como prolongando los efectos bloqueantes motores. A partir de entonces, varias han sido las propuestas encontradas en la bibliografía en relación a la microencapsulación de este fármaco y al control de su liberación (Görner y cols., 1999; Polakovic y cols., 1999; Chen y cols., 2004; Dong y Bodmeier, 2006; McCarron y cols., 2008; Salas y cols., 2008)

3.2. Green Fluorescent Protein (GFP)

A comienzos de los años 60, Osamu Shimomura y su equipo aislaron por primera vez la proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein* o GFP) a partir de la medusa *Aequorea victoria*. El descubrimiento de esta proteína fue algo fortuito ya que este investigador estudiaba el fenómeno de la bioluminiscencia en los organismos vivos, en concreto en la medusa *A. Victoria*. Esta medusa presentaba puntos verdes relucientes alrededor de su cuerpo (figura 17) de donde aislaron, en primer lugar, la aequorina, proteína bioluminiscente que emitía fluorescencia en la zona azul del espectro. Sin embargo, la medusa emitía luz verde. Profundizando en los estudios, se descubrió que la emisión producida por la aequorina era absorbida por otra proteína, la GFP que a su vez re-emitía luz verde.

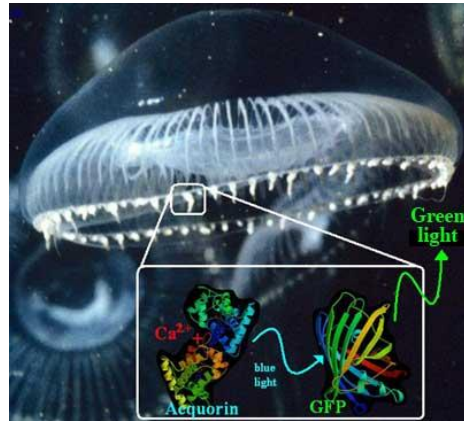


Figura 17. Medusa *Aequoera victoria*.

(<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/images/aequorin-2.jpg>)

En el año 1971, se publicó el espectro de emisión de GFP con un pico de emisión característico a 508 nm, notando que la bioluminiscencia verde del tejido vivo de la medusa también tenía un pico a esa longitud de onda. La GFP posee dos picos de excitación: uno menor, a 475 nm, y uno mayor, a 395 nm. La aequorina, proteína a la que está asociada GFP, emite luz azul a 470 nm, a una longitud de onda cercana a la de excitación de GFP, (475 nm). De este fenómeno se concluye acertadamente que GFP convertía la emisión azul de aequorina al brillo verde que presentan las células animales. En 1974, se demostró que la aequorina podía transferir eficientemente su energía luminosa a su compañera GFP, cuando ambas proteínas estaban en contacto adsorbidas en un soporte catiónico (Morise y cols., 1974).

La estructura de la proteína verde fluorescente (figura 18) se determinó en 1996. Está constituida por 238 aminoácidos, formando una larga cadena beta. Esta cadena se pliega en forma de barril que tiene en su interior los aminoácidos 65, 66 y 67 los cuales forman el grupo que absorbe luz UV y produce fluorescencia verde. El barril, está atravesado por una hélice alfa a la cual está unido el fluoróforo (Tsien, 1998).

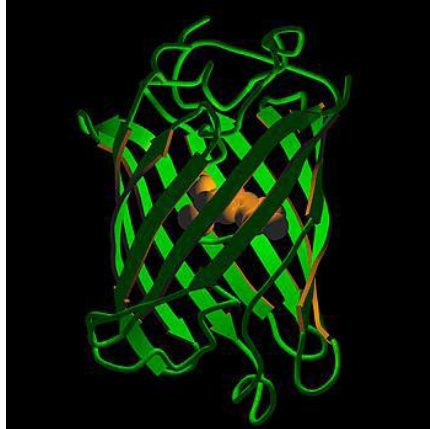


Figura 18. Estructura secundaria de la GFP

En el 2008 los profesores Martin Chalfie, Osamu Shimomura y Roger Y. Tsien fueron galardonados por la Real Academia Sueca de Ciencias de Estocolmo con el Premio Nobel de Química 2008 "por su descubrimiento y desarrollo de la proteína fluorescente verde (GFP)", herramienta indispensable para la biología y la medicina modernas (http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/press.html).

Las proteínas fluorescentes, entre las cuales se encuentra la GFP, son muy versátiles y se utilizan en diversos campos como la microbiología, ingeniería genética y fisiología. Permiten ver procesos previamente invisibles, como el desarrollo de neuronas, la diseminación de células cancerosas, el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, el crecimiento de bacterias patogénicas, la proliferación del virus del SIDA, entre otros. Por otro lado, el modelo permite seguir la evolución comparativa de las metástasis en presencia o ausencia de distintos fármacos. Esto sería sólo uno de los múltiples usos que se le están asignando a estas proteínas.

La GFP también tiene una importancia especial en la biología del desarrollo: si se introduce en una fase temprana de un embrión, se puede seguir la evolución de las primeras células, estructuras y órganos.

Ya se han generado monos, gusanos, algas, *Escherichia coli* y cerdos con GFP en su genoma y hasta se han fabricado juguetes con esta sustancia que brillan en la oscuridad (Pérez-Millán y Becu-Villalobos, 2009; <http://ceslava.com/blog/%C2%BFsuenan-los-gatos-robots-con-peces-electricos>).

Hay numerosos trabajos publicados que citan la encapsulación en micro y nanosistemas de GFP (Jagadeeswaran y cols., 2004; Dassa y cols., 2007; Muttill y cols., 2007; Yang, 2007;), incluidos los sistemas basados en microfluidos (Dendukury y Doyle, 2009; Holgado y cols., 2009). Su utilidad radica en que es un compuesto de naturaleza peptídica fácilmente detectable por diversas técnicas siendo, además, menos dañina en las células vivas que otros marcadores como el FITC (isotiocianato de fluoresceína) (Iwasaki y cols., 2007; Pawelczyk y cols., 2008; Thomas y cols., 2009).

3.3. Insulina

Es una hormona que se administra como tratamiento de la diabetes tipo 1 y en la diabetes tipo 2 cuando existe deterioro de las células beta del páncreas y progresión de la enfermedad. Es una hormona producida por las células beta de los islotes de Langerhans situados en el páncreas y que se segrega en respuesta al estímulo de una concentración creciente de glucosa en sangre.

Fue descubierta por Banting y Best en 1921, pero no es hasta 1954 cuando se establece su naturaleza proteica. En 1968, Crane y Luntz pusieron de manifiesto que con una total ausencia de enzimas proteolíticos de origen pancreático, la insulina administrada vía oral no llegaba a destruirse rápidamente, pero tenía dificultad para absorberse (<http://www.discoveryofinsulin.com>, diciembre 2009).

Como se muestra en la figura 19, la molécula de insulina contiene dos cadenas polipeptídicas que poseen 21 (cadena A) y 30 aminoácidos (cadena B), respectivamente. Ambas cadenas están unidas por puentes disulfuro de cistina. Es sintetizada a partir de un precursor de cadena única conocido como proinsulina que contiene 81 aminoácidos. Posteriormente, se produce la sustracción del péptido C (30 aminoácidos) dando lugar a la insulina. Este péptido C se utiliza, desde un punto de vista clínico, como marcador cuantitativo del funcionamiento de las células beta.

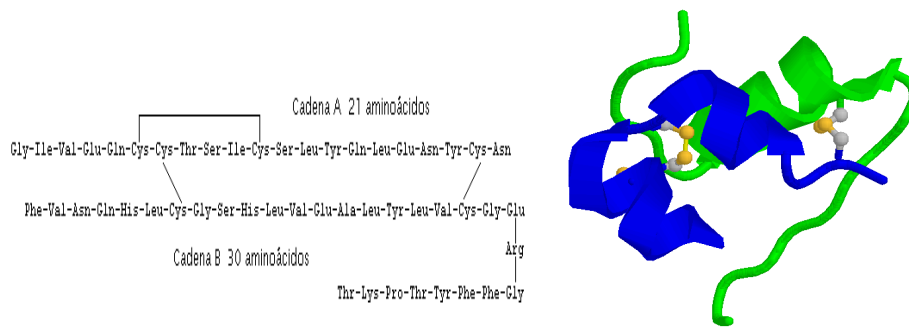


Figura 19. Estructura química y tridimensional de la insulina (Fuentes: (<http://www.scientificpsychic.com> y <http://www.accefyn.org>))

Su participación en el metabolismo del organismo es variada: favorece la captación de glucosa en hígado, músculo y tejido adiposo; estimula la glucogenogénesis e inhibe la neoglucogénesis y glucogenólisis; aumenta la captación de aminoácidos en tejido muscular y la síntesis proteica; es necesaria para la síntesis de somatomedina, mediador de la hormona del crecimiento.

La insulina fisiológica de origen pancreático es secretada en el sistema porta para su conducción hacia el hígado, por ello, la mayoría de las acciones fisiológicas de esta molécula son realizadas en este órgano. Consecuentemente, la concentración de insulina en la vena porta es mucho más elevada que en el plasma periférico. Por lo tanto, la insulina absorbida vía oral se comportaría de manera similar a la insulina pancreática. Por el contrario, la insulina de administración convencional por vía subcutánea alcanzaría la circulación periférica y actuaría, en primer lugar, sobre el consumo de glucosa del músculo y, en segundo lugar, en la producción de glucosa por el hígado.

Como consecuencia, los diabéticos insulino dependientes tienen frecuentemente una concentración periférica de insulina más elevada que los individuos normales, por lo que se cree que esta hiperinsulinemia crónica puede contribuir a la aparición de complicaciones cardiovasculares tan frecuentes en la diabetes.

Inicialmente, la insulina administrada a los pacientes era de origen porcino y bovino. Posteriormente ha sido posible sintetizar insulina humana, dando lugar a la insulina semisintética (obtenida a partir de insulina porcina por sustitución en la cadena B del aminoácido alanina por treonina) y a la insulina biosintética (obtenida por biotecnología con ADN recombinante de origen bacteriano o de levadura) (Gómez Ayala, 2008).

Actualmente disponemos en el mercado de una gran variedad de especialidades con insulina, siendo todas ellas de origen ADN recombinante. Los últimos estudios han conducido a la obtención de los análogos de la insulina cuyo objetivo es mejorar el perfil farmacocinético de las insulinas convencionales y superar así las limitaciones que éstas presentaban en algunos pacientes para mantener un control glucémico adecuado (Almodóvar y cols., 2007).

Se pueden establecer tres criterios de clasificación distintos para las mismas:

1. Según su estructura: insulina humana y análogos de insulina humana
2. Según su farmacocinética: insulinas de acción rápida, intermedia, prolongada y mezclas de insulina rápida e intermedia
3. Según sus dispositivos de administración: viales, plumas precargadas, cartuchos y bombas de insulina

En la tabla 9 se recoge la clasificación de las insulinas según su farmacocinética (Aragón Alonso y cols., 2004; Ceruelo Bermejo, 2005):

TIPO		INICIO DE ACCIÓN (h)	EFECTO MÁXIMO (h)	DURACIÓN DE ACCIÓN (h)
RÁPIDA	REGULAR, NORMAL O SOLUBLE	0,5	1---3	8
	ASPART	0,5	1---3	5---7
	LISPRO	0,25	0,5---1,2	2---5
INTERMEDIA	NPH o ISOFÁNICA	1	2---8	18---20
	LISPRO PROTAMINA	1---2	4---8	18---24
	INSULINA ZINC (CRISTALIZADA 70%)	2,5	7---15	20---24
PROLONGADA	GLARGINA	4---6	2---20	18---24
	DETEMIR	17	6---8	24
	INSULINA ZINC (CRISTALIZADA 90%)	4	8---20	28
MEZCLAS RÁPIDAINTERMEDIA	REGULAR (10%)/ NPH (90%)	0,5	1,5---7	16---18
	REGULAR (20%)/ NPH (80%)	0,5	1---7	14---16
	REGULAR (30%)/ NPH (70%)	0,5	1---8	14
	REGULAR (40%)/ NPH (60%)	0,5	2---8	24
	REGULAR (50%)/ NPH (50%)	0,5	1---8	14
	ASPART (30%)/ ASPART- PROTAMINA(70%)	0,15---0,3	1---4	24
	LISPRO (25%)/ LISPRO- PROTAMINA(75%)	0,25	0,5---1,2	2---5
	LISPRO (50%)/ LISPRO- PROTAMINA(50%)	0,25	0,5---1,2	2---5

Tabla 9. Clasificación farmacocinética de las distintas insulinas

Desde hace años, existe un intento continuado de controlar la glucemia del enfermo diabético durante todo el día y poder así reducir algunas de las

complicaciones de la diabetes, complicaciones que se ha demostrado que disminuyen cuando se consigue un control metabólico del paciente.

Hasta la fecha, los sistemas de administración de insulina comercializados en España son administrados por vía subcutánea (tabla 10) (Holgado y Fernández-Hervás, 1997; Faustman, 2004). El sistema clásico viene acondicionado en viales junto con aguja y jeringas desechables graduadas en unidades internacionales. La mayor ventaja que presenta este sistema es su bajo coste y la posibilidad de mezclar manualmente distintos tipos de insulina obteniendo el efecto deseado, aunque presenta el inconveniente de la dificultad de su manejo. Hoy día han sido casi totalmente desplazadas por las plumas de insulina que inyectan la cantidad exacta de insulina seleccionada mediante un breve impulso.

Las plumas vienen cargadas en un cartucho que o bien se recambia tras su uso o bien se deshecha. Presentan un sistema graduado de dosificación que permite ajustar la dosis de una forma más sencilla y fiable que el vial. Las ventajas que presenta son mayor facilidad de administración y mayor discreción en el transporte y administración. Por el contrario, su coste es más elevado que las anteriores.

Los “jet-inyectores” son pequeños dispositivos tipo bolígrafo que, mediante un sistema de alta presión, permiten la penetración de la insulina en la piel sin necesidad de aguja. Es especialmente útil en aquellos sujetos con poca tolerancia a las agujas. Su inconveniente fundamental es su elevado coste y la poca experiencia de uso.

SISTEMA	CARACTERISTICAS	VENTAJAS	INCONVENIENTES
VIALES	Aguja y jeringa desechable	Menor coste se pueden mezclar	Dificultad manejo
PLUMAS	Cartucho recambiable	Mejor administración Mayor discreción	Mejor ajuste dosis que viales
JET- INYECTORES	Bolígrafos con sistema a alta presión	No uso agujas	Alto coste
BOMBAS	Infusión sc. continua de insulina de acción rápida desde un reservorio	Mejor control metabólico Menor riesgo hipoglucémico	Alto coste Obstrucción cánula
Paradigm® Real Time	Sistema de monitorización y administración	Mejor control metabólico	
EXUBERA (Retirado)	Polvo para administración en forma de aerosol con cámara de inhalación		Dosis mayores a las utilizadas por vía sc para lograr el mismo efecto. No suprime adm parenteral

Tabla 10. Sistemas de administración de insulina

Las bombas de infusión continua son sistemas de pequeño tamaño. Una programación permite mantener tanto los niveles basales de insulina como la introducción de bolos rápidos que aumentan los niveles postprandiales, con el objetivo de conseguir un mejor control metabólico, minimizando así el riesgo de hipoglucemias (Almodóvar y cols., 2007) (figura 20). Desde el 20 de septiembre de 2004 son cubiertas por los diferentes sistemas públicos de salud de España.

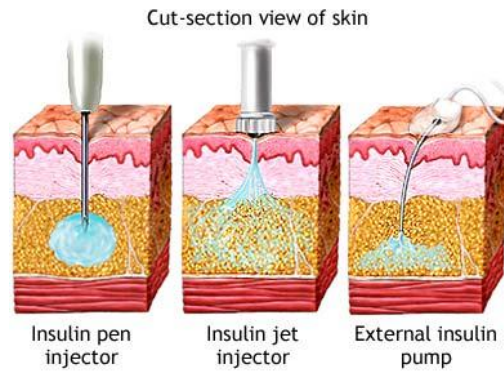


Figura 20. Diferencias en la administración de insulina con sistemas “pluma”, “jet” y “bomba de infusión”
(http://www.myhealthzone.com/en_US/CardiacCareGuides/graphics/images/en/19210.jpg)

El sistema integrado de monitorización y administración (Paradigm® Real Time) es un dispositivo que reúne las virtudes de una bomba de infusión continua de insulina y las de un medidor continuo de los niveles de glucosa, proporcionando dicha información en tiempo real. El sistema también incorpora una alarma sonora que permite a los pacientes detectar cuando los niveles de glucosa suben o bajan demasiado rápido (figura 21). Está disponible en España desde finales de Enero de 2006.

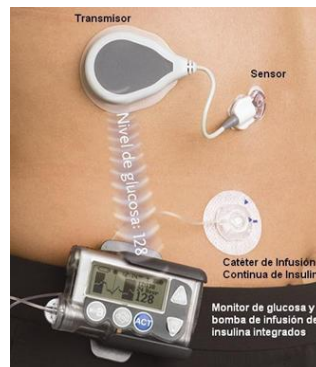


Figura 21. Sistema Paradigm® Real Time (Fuente: (<http://www.candiddiabetes.com>))

Otro sistema de administración de insulina, aunque ya retirado del mercado, es la insulina inhalada (Exubera®) indicada para el tratamiento de la diabetes tipo 1 y 2 en adultos sin problemas pulmonares conocidos. Se

trata de un análogo de la insulina humana de acción rápida, que se presenta como polvo para su administración en forma de aerosol con cámara de inhalación. Además no supone la supresión del tratamiento parenteral, dada la necesidad de administración de insulinas basales. Actualmente, Exubera® se encuentra retirada del mercado, debido a las bajas ganancias que se obtuvieron de su venta, para la cual se invirtió una buena suma para garantizar su seguridad. También se rumoreó su retirada debido a su implicación en varios casos de cáncer de pulmón, aunque esta teoría no ha sido del todo confirmada (Gómez Ayala, 2008).

3.3.1. Estudios recientes para la obtención de insulina oral

Las investigaciones en el campo de la administración oral de insulina se han visto aumentadas a lo largo de los últimos años. Dichos estudios se centran principalmente en los sistemas micro- y nanoparticulares como transportadores de esta proteína hasta la circulación sistémica, atravesando las placas de Peyer, pero para ello el diámetro del sistema transportador debe ser inferior a 1 µm.

A continuación se muestran algunas referencias comentadas sobre las investigaciones más novedosas y relevantes sobre sistemas orales de insulina:

- M. Trotta, R. Cavalli, M.E. Carlotti, L. Battaglia, F. Debernardi, “Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent in water emulsion-diffusion technique”, *International Journal of Pharmaceutics*, 288 (2005) 281-288: el trabajo recoge la producción de micropartículas sólidas lipídicas cargadas con insulina, utilizando la técnica de formación de la emulsión con evaporación del disolvente. Utilizan ácido isobutírico como disolvente, glicerol monoestearato o cetilpalmitato como lípido, lecitina de soja y taurodeoxicolato como emulsificadores. El ácido isobutírico, un disolvente parcialmente miscible en agua de baja toxicidad, es usado dada su alta capacidad para solubilizar la insulina. La eficiencia de encapsulación fue alrededor del 80%, pudiendo demostrar que la insulina permanece totalmente estable dentro de las micropartículas.

- Y.F. Fan, Y.N. Wang, Y.G. Fan, J.B. Ma, "Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption", *International Journal of Pharmaceutics* 324 (2006) 158-167: se desarrolla un nuevo sistema de liberación sostenida polipeptídico, consistente en nanoagregados de insulina con tamaños de 100-230 nm preparados con NaCl y encapsulados por adsorción, capa por capa, con dos polielectrolitos, ácido poli α - β -L-málico y quitosan soluble en agua. La liberación de la insulina fue pH-dependiente.
- J. Liu, S.M Zhang, P.P. Chen, L. Cheng, W., Zhou, W.X. Tang, Z.W. Chen, C.M. Ke, "Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18 (2007) 2205-2210: se elaboraron sistemas conteniendo insulina, basados en PLGA y PVA. Se observó un diámetro medio de 615 nm y una eficiencia en la encapsulación de un 72.6%
- C. Pinto Reis, A.J. Ribeiro, S. Houg, F. Veiga, R.J. Neufeld, "Nanoparticle delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30 (2007) 392-397: se trata de la producción nanoesferas de alginato-dextrano cargadas con insulina, elaboradas por medio de una dispersión de una nanoemulsión seguida de una congelación in situ. Las nanoesferas que se obtuvieron tenían un tamaño entre 267 nm y 2.76 μ m, con una eficiencia de encapsulación del 82.5%.
- B. Singh, N. Chauhan, "Modification of psyllium polysaccharides for use in oral insulin delivery", *Food Hydrocolloids*, 23 (2009) 928-935: se prepararon hidrogeles de insulina a base de Psyllum, conocido con el nombre de ispágula (o isphagula). Este producto deriva de las cáscaras de la semilla de *Plantago ovata*. En este trabajo se discute el efecto del pH sobre la cinética de hinchamiento y la cinética de liberación de estos hidrogeles.
- A. Schoubben, P. Blasi, S. Giovagnoli, L. Perioli, C. Rossi, M. Ricci, "Novel composite microparticles for protein stabilization and delivery", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36 (2009) 226-234: se desarrolló un nuevo compuesto entre alginato y PLGA

para elaborar sistemas microparticulares que contenían insulina con objeto de estabilizar la proteína y optimizar su liberación.

- K. Sonaje, Y.H. Lin, J.H. Juang, S.P. Wey, C.T. Chen, H.W. Sung, “*In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery*”, *Biomaterials*, 30 (2009) 2329-2339: en este estudio se elaboraron nanopartículas pH-sensibles con una mezcla de una solución aniónica de ácido poli- γ - glutámico y una solución catiónica de quitosano en presencia de sulfato magnésico y tripolifosfato de sodio. Los resultados in vitro mostraron que el transporte de insulina a través de la monocapa de células Caco-2 fue pH-dependiente, decreciendo cuando aumentamos el pH.
- M.J. Santander-Ortega, D. Bastos-González, J.L. Ortega-Vinuesa, M.J. Alonso, “*Insulin-loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an in vitro physico-chemical characterization*”, *Journal of Biological Nanotechnology* 5 (2009) 45-53: se elaboraron nanopartículas de PLGA de administración oral conteniendo insulina. Estas nanoestructuras consistieron en una mezcla formada por PLGA y derivados polioxietilenos en dos tipos de formulaciones, PLGA-poloxamer (Pluronic® F68) y PLGA-poloxamine (Tetronic® T904). En primer lugar, se estudió la estabilidad de las nanopartículas en fluidos gástricos e intestinales. Posteriormente se evaluó la cantidad de insulina encapsulada. Los resultados obtenidos mostraron que estos transportadores formados por insulina encapsulada en PLGA-Pluronic® F68 son capaces, al menos in vitro, de atravesar la barrera gastrointestinal.
- K. Sonaje, Y.J. Chen, H.L. Chen, S.P. Wey, J.H. Juang, H.N. Nguyen, C.W. Hsu, K.J. Lin, H.W. Sung. “*Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(g-glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery*”. *Biomaterials* (2010), doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.042: se elaboraron sistemas microparticulares de quitosano y ácido poliglutámico para la administración oral de insulina. Los estudios in vivo demuestran que la estructura de la cubierta entérica puede evitar la degradación de la insulina en el estómago, mejorando su absorción intestinal y proporcionando un efecto hipoglucemiante prolongado.

- *R. Shelma, Willi Paul, Chandra P. Sharma. "Development and characterization of self-aggregated nanoparticles from anacardoylated chitosan as a carrier for insulin". Carbohydrate Polymers 80 (2010) 285–290: nanopartículas poliméricas de quitosano y derivados más hidrófobos de éste han sido utilizados para elaborar sistemas orales de administración de insulina. La naturaleza hidrófoba de las nanopartículas elaboradas ayudó a la liberación sostenida de insulina en el tracto intestinal.*

BIBLIOGRAFÍA

- Allen T.M. y Cullis P.R. Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream, *Science*, 303 (2004): 1818-1822.
- Almodóvar M.J.; Alonso M.A.; Álvarez J.; Arroyo J.; Aylón R.; Gangoso A.; Martínez H.; Mateo C.; Morera T.; Pérez A.; Ruiz J.; Saiz L.C.; Sevillano M.L.; Siguín R. Actualización del tratamiento insulínico de la diabetes, *Salud Madrid*, 14 (2007): 3-8.
- Aragón Alonso A.; Oliván Palacios B.; Manzano Arroyo P.; Lucas Morante T. Las nuevas insulinas: Revisión. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 28 (2004): 41-49.
- Arribas Blanco, J.M.; Rodríguez Pata N.; Esteve Arrola, B.; Beltrán Martín, M. Anestesia local y locorregional en cirugía menor. *Semergen*, 27 (2001):471-481.
- Bilati U.; Alléman E.; Doelker E. "Nanoprecipitation versus emulsion-based techniques for the encapsulation of protein into biodegradable nanoparticles and process-related stability issues", *AAPS Pharmaceutical Science Technology* 6 (2005) article 74
- Bradley, M.; Bruno, N.; Vincent B. Distribution of CdSe Quantum Dots within swollen polystyrene microgel particles using confocal microscopy. *Langmuir*, 21 (2005): 2750-2753.
- Brown, E.N.; Kessler, M.R.; Sottos, N.R.; White, S.R. In situ poly(urea-formaldehyde) microencapsulation of dicyclopentadiene. *Journal of Microencapsulation*, 20 (2003): 719-730
- Carino P.; Jacob G.S.; Mathiowitz E. Nanosphere based oral insulin delivery. *Journal of Controlled Release*, 65 (2000) 261-269.
- Cellesi, F.; Weber, W.; Fussenegger, M.; Hubbell, J.A.; Tirelli, N. Towards a fully synthetic substitute of alginate: optimization of a thermal gelation/chemical cross-linking scheme ("tandem" gelation) for the production of beads and liquid-core capsules. *Biotechnology & Bioengineering*, 88 (2004): 740-749.
- Ceruelo Bermejo J.; Miranda Hidalgo R.; García Ortiz A. Insulinas: clasificación y usos. *Boletín de Información terapéutica (Sacylite)* nº 1, 2005

- Chang T. y Prakash S. Procedures for microencapsulation of enzymes, cells and genetically engineered microorganisms. *Molecular Biotechnology*, 17 (2001): 249-260.
- Charcosset, C.; Limayem, I.; Fessi, H. The membrane emulsification process – a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 79 (2004): 209-218
- Chen P.C.; Park Y.J.; Chang L.C.; Kohane D.S.; Bartlett R.H.; Langer R.; Yang V.C. Injectable microparticle-gel system for prolonged and localized lidocaine release. I. In vitro characterization. *Journal of Biomedical Materials Research., A* 70 (2004): 412-419.
- Chiappetta D.; Rodríguez-Llimós A.; Witte N.; Széliga M.; Niselman V.; Bregni C. Enmascaramiento de sabor de paracetamol utilizando microencapsulación. *Acta Farmacéutica Bonarense*, 23 (2004): 292-296.
- Chiriaca H.; Mogaa A.E.; Ostin G.I.; Mungiub C. Amorphous magnetic microspheres for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 293 (2005): 28-32.
- Cho J.S.; Kwon A.; Cho C.G. Microencapsulation of octadecane as phase-change material by interfacial polymerisation in an emulsion system. *Colloid and Polymer Science*, 280 (2002): 260-266
- Cinesi Gomez C.; Alonso Pacheco M.L.; Zambrano Centeno L.B.; De Eusebio Murillo E. y Caballero Sanchez, M.M. Anestesia local en Atención Primaria. *Formación Continuada*, 28 (2002): 132-135.
- Cui J.H.; Goh J.S.; Park S.Y.; Kim P.H.; Lee B.J. Preparation and physical characterization of alginate microparticles using air atomization method. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27 (2001): 309-319.
- Dahms G.; Seidel H.; Jung A. SCC Annual Scientific Seminar, 2002.
- Dassa C.R.; Contrerasa K.G.; Dunstanb D.E.; Choonga P.F.M. Chitosan microparticles encapsulating PEDF plasmid demonstrate efficacy in an orthotopic metastatic model of osteosarcoma. *Biomaterials* 28 (2007): 3026-3033.
- De Campos A.M.; Sanchez A.; Alonso M.J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *International Journal of Pharmaceutics*, 224 (2001): 159-168.

- Delgado G. C. Economical potential and safety of nanomaterials. Razón y palabra 68 (2009)
(<http://www.razonypalabra.org.mx/N/n68/16GianCarlo.pdf>).
- Dendukury D.; Doyle P.S. The synthesis and Assembly of Polymeric microparticles using microfluidics. *Advanced Materials*, 21 (2009): 1-16.
- Ding X.; Zhao J.; Liu Y.; Zhang H.; Wang Z. Silica nanoparticles encapsulated by polystyrene via surface grafting and in situ emulsion polymerization. *Materials Letters* 58 (2004): 3126-3130.
- Dong W. y Bodmeier R. Encapsulation of lipophilic drugs within enteric microparticles by a novel coacervation method. *International Journal of Pharmaceutics*, 326 (2006): 128-138
- El-Shabouri M.H. Positively charged nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporin-A. *International Journal of Pharmaceutics*, 249 (2002): 101-108.
- Fan Y.F.; Wang Y.N.; Fan Y.G.; Ma J.B. Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption. *International Journal of Pharmaceutics*, 324 (2006): 158-167.
- Faustman L. D. "Nuevos tratamientos para la diabetes: generar nuevas células productoras de insulina". *Diabetes Voice*, 49 (2004): 34-37.
- Fernández-Hervás M.J.; Holgado M.A. Sistemas de dosificación multiparticulares. *Industria Farmacéutica*, 5 (1997): 59-64.
- Freiberg S.; Zhu X.X. Polymer microspheres for controlled drug release. *International Journal of Pharmaceutics*, 282 (2004): 1-18.
- Freitas S.; Merkle H.P.; Gander, B. Microencapsulation by solvent extraction/ evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *Journal of Controlled Release*, 102 (2005): 313-332.
- Gañán Calvo A. M.; Barrero Ripoll A. Producing homogeneous size droplets and sprays in the micron/submicron range by micro suction. *Bulletin of the American Physical Society Division of Fluid* 43 (1998): 2082-2082.
- Glänzel W.; Meyer M.; Du Plessis M.; Thijs B.; Magerman T.; Schlemmer B. Nanotechnology. Analysis of an Emerging Domain of Scientific and

Technological Endeavour. Steunpunt O&O Statistieken., www.steunpuntoos.be , febrero 2010.

Gómez Ayala A.E. Terapia insulínica, Revisión y actualización, Offarm, 27 (2008): 72-80.

González J.M.; López M.; Ruiz G., Nanomedicina, Vigilancia Tecnológica, 5 (2005a): 22-26.

González J.M.; López M.; Ruiz, G., La Nanomedicina va despacio pero obtendrá los mayores beneficios, Periódico Expansión, 17 de diciembre de 2005b.

Görner T.; Gref R.; Michenot D.; Sommer F.; Tran M.N.; Dellacherie, E. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix. *Journal of Controlled Release*, 57 (1999): 259-268.

Gref R.; Quellec P.; Sanchez A.; Calvo P.; Dellacherie E.; Alonso M.J. Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid) poly(ethylene glycol)PEG micro- and nanoparticles. Comparison with conventional PLA particulate carriers. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 51 (2001): 111-118.

Guo M.J.; Zhao Z.; Fan Y.G.; Wang C.H.; Shi L.Q.; Xia J.J.; Long Y.; Mi H.F. Protein-imprinted polymer with immobilized assistant recognition polymer chains. *Biomaterials* 27(2006): 4381-4387.

Holgado M.A.; Fernández-Hervás, M.J. Recientes avances en la administración oral de insulina. *Industria Farmacéutica*, 12 (1997) 73-78.

Holgado M.A.; Arias J.L.; Cózar M.J.; Álvarez-Fuentes J.; Gañán-Calvo A.M.; Fernández-Arévalo, M. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties. *International Journal of Pharmaceutics*, 358 (2008): 27-35.

Holgado M.A.; Cózar-Bernal M.J.; Salas S; Arias J.L.; Álvarez-Fuentes J; Fernández-Arévalo M. Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: Physicochemical characterization and protein detection by reversed-phase HPLC. *International Journal of Pharmaceutics*, 380 (2009): 147-154.

<http://ceslava.com/blog/%C2%BFsuenan-los-gatos-robots-con-peces-electricos>, febrero 2010

http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/press.html, febrero 2010.

<http://pubs.acs.org/subscribe/journals/tcaw/11/i02/html/02regs.html>, octubre 2007

<http://ranf.com/pdf/discursos/numero/vila.pdf>, noviembre 2009

<http://www.conncoll.edu/ccacad/zimmer/GFP-ww/images/aequorin-2.jpg>, febrero 2010

<http://www.discoveryofinsulin.com>, diciembre 2009

http://www.myhealthzone.com/en_US/CardiacCareGuides/graphics/images/en/19210.jpg, octubre 2009

Hu F.Q.; Wu M.Z.; Yuan H.; Zhang H.H. A novel preparation of solid lipid nanoparticles with cyclosporin A for prolonged drug release. *Pharmazie* 59 (2004): 683-685.

Iwasaki Y.; Ueda M.; Yamada T.; Kondo A.; Seno M.; Tanizawa K.; Kuroda S.; Sakamoto M.; Kitajima M. Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticles. *Cancer Gene Therapy* 14 (2007): 74-81.

Jagadeeswaran P.; Cykowski M.; Thattaliyath B. Kinetics of Thrombocyte and Thrombocyte-Microparticle Recruitment in Laser Induced Arterial Thrombus Formation in Zebrafish. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*, 104 (2004): Abstract 2622. American Society of Hematology

Jaiswal J.; Kumar Gupta S.; Kreuter J. Preparation of biodegradable cyclosporine nanoparticles by high-pressure emulsification-solvent evaporation process. *Journal of Controlled Release*, 96 (2004): 169-178.

Kaminski M.D.; y Núñez L. Extractant-coated magnetic particles for cobalt and nickel recovery from acidic solution. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 194(1999): 31-36.

Kanga V. *Cosmet-Pharm Consultants, LLC* Cresskill, NJ, USA 2004.

Kateb B; Chiu K.; Yamamoto V.; Khalsa B.; Black K.L.; Ljubimova J.Y.; Ding H.; Patil R.; Portilla-Arias J.A.; Modo M.; Moore D.; Farahani K.; Okun M.; Prakash N.; Neman J.; Ahdoot D.; Grundfest W.; Nikzad S.; Heiss J. Nanoplatforms for constructing new approaches to cancer treatment, imaging, and drug delivery: What should be the policy?. *NeuroImage* (2010), doi:10.1016/j.neuroimage.2010.01.105.

Kim J.W.; Shim J.W.; Bae J.H.; Han S.H.; Kim H.K.; Chang L.C. Titanium dioxide/poly(methyl methacrylate) composite microspheres prepared by in situ suspension polymerization and their ability to protect against UV rays. *Colloid and Polymer Science*, 280 (2002): 584-588.

Kim C.A.; Joung M.J.; Ahn S.D.; Kim G.H.; Kang S.Y.; You I.K.; Oh J.; Myoung H.J.; Baek K.H.; Suh K.S. Microcapsules as an electronic ink to fabricate color electrophoretic displays. *Synthetic Metals*, 151 (2005): 181-185

Kondo, A. "Microcapsule Processing and Technology", Ed. Marcel Dekker, Inc., New York (1979).

Koombhongse S.; Eby R.; Jones S.; Walker M.; Naik R.; Wahl K. Influence of Green Fluorescent Protein (GFP) Nanoparticles on the Optical and Mechanical Properties of Silk in Bio-Nanocomposites with Photonic Properties. American Physical Society, March Meeting, March 13-17, 2006, abstract #Q1.086

Kumari A.; Yadav S.K.; Yadav S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 75 (2010): 1-18

Lee H.Y.; Lee S.J.; Cheong I.W.; Kim J.H. Microencapsulation of fragrant oil via in situ polymerisation: effects of pH and melamine-formaldehyde molar ratio. *Journal of Microencapsulation*, 19 (2002): 559-569.

Li J.; Jia Q.; Zhu J.; Zheng M. Interfacial polymerization of morphologically modified polyaniline: from hollow microspheres to nanowires. *Polymer International*, 57 (2008): 337-341.

Liu J.; Zhang S.M.; Chen P.P.; Cheng L.; Zhou W.; , Tang W.X.; Chen Z.W.; Ke C.M. Controlled release of insulin from PLGA nanoparticles embedded within PVA hydrogels. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 18 (2007): 2205-2210.

Lubarsky G.V., Davidson M.R.; Bradley R.H. Characterisation of polystyrene microspheres surface-modified using a novel UV/ozone/fluidised-bed reactor. *Applied Surface Science*, 227 (2004): 268-274.

Ma G.; Sone H.; Omi S. Preparation of uniform-size polystyrene-polyacrylamide composite microspheres from w/o/w emulsion membrane emulsification technique and subsequent suspension polymerization. *Macromolecules*, 37 (2004): 2954-2964.

Maguire T.; Novik E.; Schloss R.; Yarmush M. Alginate-PLL microencapsulation: effect on the differentiation of embryonic stem cells into hepatocytes. *Biotechnology & Bioengineering*, 93 (2006): 581-591.

Martín T.M.; Bandi N.; Shulz R.; Roberts C.B.; Kompella, U.B. Preparation of budesonide and budesonide-PLA microparticles using supercritical fluid precipitation technology. *AAPS Pharmaceutical Science Technology*, 3 (2002): 1-11.

Martín-Banderas L.; Flores-Mosquera M.; Riesco-Chueca P.; Rodríguez-Gil A.; Cebolla A.; Chávez S.; Gañán-Calvo A.M. Flow Focusing: a versatile technology to produce size-controlled and specific morphology microparticles. *Small*, 1 (2005): 2–6.

Martín-Banderas L.; Rodríguez-Gil A.; Cebolla A.; Chávez S.; Berdún-Álvarez T.; Fernández J.M.; Flores-Mosquera, M.; Gañán-Calvo, A.M. Towards a high throughput production of uniform encoded microparticles. *Advanced Materials*, 18 (2006): 559–564.

Martín-Banderas L. Microencapsulación mediante la tecnología flow focusing para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 2008.

Mazzola L. Commercializing nanotechnology. *Nature Biotechnology*, 21 (2003): 1137-1143.

McCarron P.A.; Donnelly R.F.; Al-Kassas, R. Comparison of a novel spray congealing procedure with emulsion-based methods for the microencapsulation of water-soluble drugs in low melting point triglycerides. *Journal of Microencapsulation*, 25 (2008): 365-378.

McDonald C.J. y Devon M.J. Hollow latex particles: synthesis and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 99 (2002): 181-213.

Merisko-Liversidge E.M; Liversidge G.G.; Cooper E.R. Nanosizing: a formulation approach for poorly-water-soluble compounds. [My paper] *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18 (2003):113-20.

Molpeceres J.; Chacón M.; Guzmán M.; Berges L.; Aberturas M. R. A polycaprolactone nanoparticle formulation of cyclosporin-a improves the prediction of area under the curve using limited sampling strategy. *International Journal of Pharmaceutics*, 187 (1999): 101-113.

- Morise H.; Shimomura O.; Johnson F.; Winant J. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*. *Biochemistry*, 13 (1974): 2656–62.
- Muller R.H.; Runge S.; Ravelli V.; Mehnert W.; Thunemann A.F.; Souto E.B. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. *International Journal of Pharmaceutics*, 317 (2006): 82-89.
- Mulvaney S.P.; Mattsoussi H.; Whitman L.J. Incorporating fluorescent dyes and quantum dots into magnetic microbeads for immunoassays. *Bio Technique*, 36 (2004): 602-609.
- Murua A.; Orive G.; Hernández R.M., Pedraz J.L. Xenogeneic transplantation of erythropoietin-secreting cells immobilized in microcapsules using transient immunosuppression *Journal of Controlled Release*, 137 (2009): 174-178.
- Muttill P.; Volmer J.; Boucher R.; Hickey A. Spray drying of GFP tagged *Pseudomonas aeruginosa* in Alginate Microparticles. http://www.aapsj.org/abstracts/AM_2007/AAPS2007-003495.PDF, 2007
- Nanovip staff. Role of nanotechnology in drug delivery. Septiembre 2009.
- Mendoza Simón E. Diseño, desarrollo e implantación de un sistema de producción masiva de nebulizados por Flow Focusing para instrumentación analítica. Tesis Doctoral, Universidad de Sevilla, 2004.
- Nelson G. Application of microencapsulation in textiles. *International Journal of Pharmaceutics*, 242 (2002): 52-55.
- Ngomsik A.F.; Bee A.; Draye M.; Cote G.; Cabuil V. Magnetic nano-and microparticles for metal removal and environmental applications: a review. *Comptes Rendus Chimie*, 8 (2005): 963-970.
- Nokhodchi A. y Farid D. Effect of various factors on microencapsulation of acetyl salicylic acid by a non-solvent addition method. *STP Pharma Science*, 2 (1992): 279-283.
- Orive G.; Ponce S.; Hernández R.M.; Gascón A.R.; Igartua M.; Pedraz J.L. Biocompatibility of microcapsules for cell immobilization elaborated with different type of alginates. *Biomaterials*, 23 (2002): 3825-3831
- Orive G.; Hernández M.R.; Gascón A.; Cell encapsulation: promises and progress. *Nature Medicine*, 9 (2003): 104-107.

Ozin G. y Arsenault A. P-Ink and Elast-Ink from lab to market. *Materials Today* 11 (2008): 44-51.

Orive G.; Tam S.K.; Pedraz J.L.; Halle J.P. Biocompatibility of alginate–poly-L-lysine microcapsules for cell therapy. *Biomaterials*, 27 (2006): 3691–3700.

Palomo M.E.; Ballesteros M.P.; Frutos P. Procesos de microencapsulación. (I) Microencapsulación por procesos químicos. *Industria Farmacéutica*, 12 (1997a): 95-98.

Palomo M.E.; Ballesteros M.P.; Frutos P. Procesos de microencapsulación. (II) Microencapsulación por procesos fisico-químicos. *Industria Farmacéutica*, 12 (1997b): 59-65.

Palomo M.E.; Ballesteros M.P.; Frutos P. Procesos de microencapsulación. (III) Microencapsulación por procesos mecánicos. *Industria Farmacéutica*, 12 (1997c): 35-37.

Pawelczyk E.; Kay Jordan E.; Johnson-Barello J.; Smith M.; Chaudhry A.; Frank J.A. In vivo Uptake of BrdU, GFP and Iron Oxide Nanoparticles by Local Tissue Macrophages from Labeled Stem Cells. Implications for Cell Transplantation. *The FASEB Journal*. 22 (2008): 578

Pereira T.; Millar T.J.; Chuck J.A. Viability analysis of alginate encapsulated micro-organisms using fluorescent stains. *Journal of Microencapsulation*, 22 (2005): 787-792.

Pérez Millán M.I.; Becu-Villalobos D. La proteína verde fluorescente ilumina la biociencia. *Medicina*, 69 (2009): 370-374.

Phanapavudhikul P.; Waters J.A.; Ortiz E.S. Para-magnetic composite microparticles as heavy metal ion-exchanger. *European Cells and Material* 3 (2002): 118-121.

Pinto Reis C.; Ribeiro A.J.; Houg S.; Veiga F.; Neufeld R.J.; Nanoparticle delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30 (2007): 392-397.

Polakovic M.; Görner T.; Gref R., Dellacherie E. Lidocaine loaded biodegradable nanospheres: II. Modelling of drug release. *Journal of Controlled Release*, 60 (1999): 169-177.

Popplewell L.M.; Black J.M.; Norris L.M.; Porzio M. Encapsulation system for flavours and colors. *Food Technology*, 49 (1995): 76-82.

Qi R.; Ping Q.N. Gastrointestinal absorption enhancement of insulin by administration of enteric microspheres and SNAC to rats. *Journal of Microencapsulation*, 21 (2004): 37-45.

Ramos Picos D; Gómez Carril M.; Fernández Mena D. Métodos de obtención de microesferas biodegradables. *Revista Cubana de Farmacia*, 35 (2001): 126-135.

Ramos Picos D; Gómez Carril M.; Fernández Mena D.; Núñez De La Fuente L. Microesferas biodegradables de liberación controlada para la administración parenteral. *Revista Cubana de Farmacia* 34 (2000): 70-77.

Remuñán López C.; Alonso Fernández M.J. "Microencapsulación de medicamentos", En Vila Jato J.L.: "Tecnología Farmacéutica. Aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos operaciones básicas". (vol I), Ed. Síntesis, Madrid; (2001): 577-609.

Rodrigues S.N.; Martins I.M.; Fernandes I.P.; Gomes P.B.; Mata V.G.; Barreiro M.F.; Rodrigues A.E. Scentfashion®: Microencapsulated perfumes for textile application. *Chemical Engineering Journal*, 149 (2009): 463–472.

Ruiz J.M.; Tissier B.; Benoit J.P. Microencapsulation of peptide: a study of the phase separation of poly (DL-lactic-co-glycolic acid) copolymer 50/50 by silicone oil. *International Journal of Pharmaceutics*, 49 (1989):69-77.

Salas S.; Talero B.; Rabasco A.M.; González-Rodríguez M.L. Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the assay of lidocaine hydrochloride in alginate-Gantrez®microspheres. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 47 (2008): 501-507.

Salaün F.; Vroman I.; Aubry C. Preparation of double layered shell microparticles containing an acid dye by a melt dispersion–coacervation technique. *Powder Technology* 192 (2009): 375–383.

Santander-Ortega M.J.; Bastos-González D.; Ortega-Vinuesa J.L.; Alonso M.J. Insulin-loaded PLGA nanoparticles for oral administration: an in vitro physico-chemical characterization. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 5 (2009): 45-53.

Scher H.B.; Rodson M.; Lee K.S. Microencapsulation of pesticides by interfacial polymerisation utilizing isocyanate or aminoplast chemistry. *Journal of Pest Science*, 54 (1998): 394-400.

Schleicher L.; Green BK, US Patent 2730456, 1956.

Schoubben A.; Blasi P.; Giovagnoli S.; Perioli L.; Rossi C.; Ricci M.; Novel composite microparticles for protein stabilization and delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 36 (2009): 226-234.

Shah N.P. y Ravula R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55 (2000): 139-144.

Shelma R.; Paul W.; Sharma C. P. Development and characterization of self-aggregated nanoparticles from anacardoylated chitosan as a carrier for insulin. *Carbohydrate Polymers* 80 (2010) 285–290

Sonaje K.; Chen Y.J.; Chen H.L.; Wey S.P.; Juang J.H.; Nguyen H.N.; Hsu C.W.; Lin K.J.; Sung H.W. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials* (2010), doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.042

Sonaje K.; Lin Y.H.; Juang J.H.; Wey S.P.; Chen C.T.; Sung H.W. In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*, 30 (2009): 2329-39.

Soppimath K.S.; Aminabhavi T.M.; Kulkarni A.R.; Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *Journal of Controlled Release*, 70 (2001): 1-20.

Sun Q. y Deng Y. In situ synthesis of temperature-sensitive hollow microspheres via interfacial polymerization. *Journal of the American Chemistry Society*, 127 (2005): 8274-8275.

Tan T.; Wang S.; Li X.; Wang C.; An Y. Facile preparation and characterization of hollow poly(St-co-MMA-co-BA-co-MAA) core– double shell latex nanoparticles for electrophoretic displays. *Current Applied Physics*, 9 (2009): 989–992.

Taqieddin E. y Amiji M. Enzyme immobilization in novel alginate–chitosan core-shell microcapsules. *Biomaterials*, 25 (2004): 1937-1945.

Thomas G.M.; Panicot-Dubois L.; Lacroix R.; Dignat-George F.; Lombardo D.; Dubois C. Cancer cell–derived microparticles bearing P-selectin

glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *The Journal of Experimental Medicine*, 206 (2009): 1913-1927.

Tozuka Y.; Sugiyama E.; Takeuchi H. Release profile of insulin entrapped on mesoporous materials by freeze-thaw method. *International Journal of Pharmaceutics* 386 (2010) 172-177

Trotta M.; Cavalli R.; Carlotti M.E.; Battaglia L.; Debernardi F. Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent in water emulsion-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 288 (2005): 281-288.

Tsien R.Y. The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry*, 67 (1998): 509-544.

Ugazio E.; Cavalli R.; Gasco M.R. Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 24 (2002): 341-344.

Vignali D.A.A. Multiplexed particle-based flow cytometric assays. *Journal of Immunological Methods*, 243 (2000): 243-255.

Villafuerte-Robles L. Nanotecnología farmacéutica. Razón y palabra, 68 (2009): www.razonypalabra.org.mx/N/n68/9Villafuerte.pdf

Vladislavjevic G.T. y Williams R.A. Recent developments in manufacturing emulsions and particulate products using membranes. *Advances in Colloids and Interface Science*, 113 (2005): 1-20.

Wang W.; Liu X.; Xie Y.; Zhang H.; Yu W.; Xiong Y.; Xie W.; Ma X. Microencapsulation using natural polysaccharides for drug delivery and cell implantation. *Journal of Materials Chemistry*, 16 (2006): 3252-3267.

Weltwe K. La proteína verde fluorescente-una herramienta valiosa en la biomedicina. *Avances en Química*, 3 (2009): 99-103.

Yang X. Nano- and Microparticle-based Imaging of Cardiovascular Interventions: Overview. *Radiology*, 243 (2007): 340-347.

Yang C.; Tsay S.; Tsiang R.C. Encapsulating aspirin into a surfactant-free ethyl cellulose microsphere using non-toxic solvents by emulsion solvent-evaporation technique. *Journal of Microencapsulation*, 18 (2001): 223-236.

Yáñez Fernández J.; Salazar Montoya J.A.; Chaires Martínez L.; Jiménez Hernández J.; Márquez Robles M.; Ramos Ramírez E.G. Aplicaciones

biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21 (2002): 313-319.

Ye S.; Wang C.; Liu X.; Tong Z. Deposition temperature effect on release rate of indomethacin microcrystals from microcapsules of layer-by-layer assembled chitosan and alginate multiplayer films. *Journal of Controlled Release*, 106 (2005): 319-328

Yuan X.B.; Li H.; Yuan Y.B. Preparation of cholesterol-modified chitosan selfaggregated nanoparticles for delivery of drugs to ocular surface. *Carbohydrate Polymers*, 65 (2006): 337-345.

Zhang Q.; Yie G.; Li Y.; Yang Q.; Nagai T. Studies on the cyclosporin A loaded stearic acid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 200 (2000): 153-159.

Zhang S.Q.; Zhu Y.H.; Yang X.L. Fabrication of core-shell latex spheres with CdS/polyelectrolyte composite multilayers. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 264 (2005): 215-218.

Zhao C.S.; Liu X.L.; Yang M.; Fang J.Y.; Zhang J.J.; Liu F.Q. The preparation of copolymerized fluorescent microspheres of styrene using detergent-free emulsion polymerization. *Dyes and Pigments*, 82 (2009): 134-141.



OBJETIVOS

OBJETIVOS

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo central el diseño, la producción, la evaluación y la optimización de sistemas micro- y nano-particulares de naturaleza polimérica (PLGA) conteniendo moléculas activas de distinta naturaleza para su posible administración a través de diferentes vías, preferentemente oral.

Este estudio implica el uso de dos tipos de moléculas:

- (1) **Lidocaína**, a modo de ejemplo de fármaco bien conocido en su comportamiento en procesos de microencapsulación. Sobre esta molécula se producirán microesferas tanto por una técnica tradicional (SEVM) como por la tecnología FF.
- (2) Péptidos. Se empleará (2.1) **GFP** como péptido modelo por su fácil trazabilidad y su manejo en procesos de microencapsulación y (2.2) **Insulina**, como biomolécula activa de gran interés terapéutico.

Para abordar este estudio con las moléculas indicadas, el objetivo central se estructura en los siguientes capítulos:

- I. ***Synthesis of lidocaine loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties.*** Se hace un estudio comparativo entre dos técnicas de microencapsulación de lidocaína (fármaco tomado a modo de ejemplo), con objeto de optimizar las condiciones de producción en función de la caracterización de los sistemas obtenidos.
- II. ***Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: Physicochemical characterization and protein detection by reversed-phase HPLC.*** Este capítulo está centrado en el estudio de la aplicación de la tecnología FF en la producción de micropartículas peptídicas, empleando para ello

GFP, con la intención de controlar y optimizar las condiciones implicadas en la microdinámica de fluidos y su aplicabilidad en biomoléculas peptídicas de uso terapéutico.

- III. ***Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the assay of insulin in PLGA microspheres.*** Los métodos analíticos por HPLC recogidos en bibliografía para cuantificar insulina requieren del uso de concentraciones muy elevadas de sales, implicando esto un problema de estabilidad de los equipos de HPLC usados. Por otro lado, se alarga el proceso analítico debido a un tiempo de retención elevado. En este capítulo se ha puesto a punto una técnica alternativa por HPLC en la que se reducen ambos aspectos, optimizando así el proceso de cuantificación.
- IV. ***Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing vs. solvent extraction/evaporation methodologies.*** Los datos de microdinámica de fluidos estudiados en el Capítulo II han permitido producir sistemas multiparticulares de insulina por medio de FF. En este capítulo se lleva a cabo una comparativa entre esta tecnología y la SEV, con objeto de seleccionar las mejores condiciones de producción de estos sistemas referidos a control de tamaños, rendimientos y caracterización tecnológica y biofarmacéutica. Además, se estudia la integridad del péptido tras su encapsulación en las condiciones de formulación ensayadas.



CAPÍTULO I

Synthesis of lidocaine loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties

M.A. Holgado¹, J.L. Arias², M.J. Cózar¹, J. Alvarez-Fuentes¹, A.M. Gañán-Calvo³, M. Fernández-Arévalo¹

¹Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, España

²Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada, Spain.

³Departamento de Ingeniería Aeroespacial y Mecánica de Fluidos, Escuela Técnica Superior de Ingenieros, Universidad de Sevilla, España

Revista:

International Journal of Pharmaceutics 358 (2008) 27–35

Abstract

In the present work, two methods for the preparation of lidocaine loaded PLGA microparticles are compared. The differences between the polymeric particles obtained by Solvent Evaporation (SEVM) or Flow Focusing (FF) were studied by means of scanning electron microscopy and surface thermodynamics determinations. A detailed investigation of the capabilities of the polymer particles to load this drug is described. The physical state of the drug in the polymeric particles and the existence of interactions between both entities were studied by differential scanning calorimetry. The main factors determining the lidocaine incorporation and the release kinetics were the synthesis procedure followed, the amount of drug dissolved in the organic phase during the synthesis routine, the type of polymer (molecular weight and end chemical groups) and the size and the hydrophobic/hydrophilic properties of the particles. The FF technology allowed higher drug incorporations and slower release kinetics. The release studies showed a biphasic profile probably due to diffusion-cum-degradation mediated processes.

Key Words: Drug Delivery Systems; Flow Focusing; Lidocaine; Poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA); Solvent Evaporation; Surface Thermodynamics.

1. Introduction

Local anaesthetics are widely used in the treatment of both acute and chronic pain, but their usefulness is limited by the short duration of the local anaesthetic effect that generally lasts for only few hours (Nurkeeva et al., 2002). Lidocaine is a local anaesthetic type amide, that can be considered as a model molecule for hydrophobic drug encapsulation because of its small molecular weight and low water solubility (Görner et al., 1999). Lidocaine has a faster onset of action and a higher length of action than amino ester anaesthetics. However, its therapeutic potential is restricted by its short plasma half-life (1.5 - 2 hours). In order to increase the therapeutic index of this molecule in the treatment of pain, with respect to its effectiveness and safety, biodegradable microspheres have been used as drug delivery systems to achieve a localized and sustained drug release. This will reduce the dose needed to obtain a pharmacological effect and, therefore, the incidence of systemic effects (Chen et al., 2004). Moreover, a long-term drug delivery system will be an ideal candidate to improve drug adherence and to ensure continued optimum drug dosage levels that maximize the benefits of therapy.

Microencapsulation is a very common method for elaborating delivery systems for drugs and vaccines (Freitas et al., 2005). Microspheres can be prepared using different strategies, although most of them are modifications of three basic techniques: solvent extraction/evaporation, phase separation (coacervation) and spray-drying (Aftabrouhad and Doelker, 1992). However, traditional drug microencapsulation methods do not provide particles with the desired drug loading, and, moreover, a complementary treatment (filtration or sieve systems) is also needed to obtain particles with a monodisperse size distribution. Therefore, an easy methodology is needed for the preparation of particles with a suitable drug loading, a homogeneous shape and a narrow size distribution in the nanometer or micrometer range (Martín-Banderas et al., 2005).

Poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymers (PLGA) are polyesters commonly used for the microencapsulation of therapeutics and antigens. Their use as drug delivery systems is due to their excellent biocompatibility and biodegradability properties. Moreover, PLGA-based microparticles offers many advantages in comparison to other materials used as drug

carriers (Kumar et al., 2001). Several methods can be followed in the preparation of PLGA microparticles; however, the success of the technique is determined by many factors related to the drug (solubility, partition coefficient, etc.) and the polymer (composition, molecular weight, end chemical groups, etc.) (Fu et al., 2005).

The Flow Focusing (FF) technique (Gañán-Calvo, 1998) can efficiently control the production of monodisperse simple or encapsulated particles, in the micron or sub-micron range, in just one step and without additional purification procedures. The FF technology is based on a useful microfluidic concept resulting from the combination of hydrodynamic forces with a specific geometry. Briefly, a FF device (Figure 1) consists of a pressurized chamber with a continuous focusing fluid (gas or liquid) provision. Inside, a hydrodynamic “funnel shaped lens” is created when the flowing focusing fluid undergoes a pressure drop across an orifice. By feeding an immiscible liquid flow into this hydrodynamic funnel made by the focusing fluid, a steady thin jet of immiscible liquid is created in the core of the co-flowing focusing stream, giving rise to a micro- or nano-jet that leaves the chamber through the orifice together with the focusing fluid. The jet diameter is much smaller than the diameter of the exit orifice, thus precluding any contact. Capillary instability breaks up the stationary jet into droplets of homogeneous size.

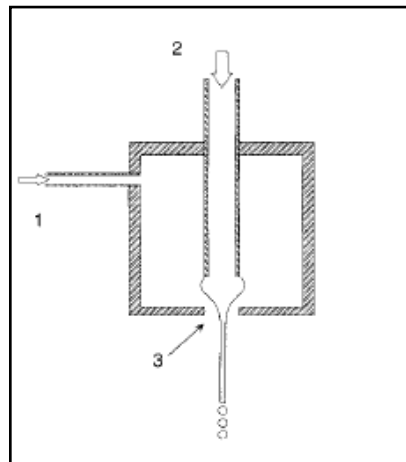


Figure 1. Flow Focusing atomizer: focusing fluid (1), focused fluid (2), and meniscus (3)

This versatile technique allows the control of the size, the surface characteristics and the internal structure of the elaborated systems (Martín-Banderas et al., 2005), and presents several advantages in comparison to other traditional encapsulation technologies: *i)* Compatibility with different fluid mixtures (liquid-liquid, liquid-gas) using simple liquids, polymeric solutions, emulsions, suspensions or melted solids. *ii)* Production, without external excitation sources and additional purification steps, of smaller particles with narrow size distribution, in just one step. *iii)* Suitability for the encapsulation of labile compounds (proteins, cells, etc.), as because of the special flow geometry, the particle generating fluid is subjected to low stresses, this making the FF technique most adequate for the encapsulation of labile compounds (proteins, cells, and similar entities). *iv)* Control of the particle design, involving freely-chosen morphology, surface treatment, and composition (e.g., homogeneous particles, two-phase capsules, or hollow capsules). *v)* High performance and applicability to industry large-scale production (Martín-Banderas et al., 2005).

In this work we describe the preparation of lidocaine-loaded PLGA microparticles with long-lasting effects, using two techniques, the FF technology and a traditional method based on solvent evaporation (SEVM). A comparative study is carried out to check the influence of both techniques on the: *i)* size and morphology, and surface thermodynamics of the polymers; *ii)* physical state of the drug in the PLGA particles; and *iii)* drug loading and release kinetics of the particles. The release studies are performed with the aim of evaluating the dissolution behavior of these systems in the administration site. In the present paper, a parenteral route is intended for the local administration of these systems, and hence a physiological pH condition has been reproduced.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Lidocaine, a model drug for hydrophobic encapsulation, was purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymers (PLGA 50:50) Resomer[®] RG 502 (Mw: 12000; inherent viscosity: 0.24 dl/g), Resomer[®] RG 502H (Mw: 12000; inherent viscosity: 0.19 dl/g), Resomer[®]

RG 504 (Mw: 48000; inherent viscosity: 0.5 dl/g) and Resomer[®] RG 504H (Mw: 48000; inherent viscosity: 0.53 dl/g) were obtained from Boehringer Ingelheim (Germany). All other chemicals used were of analytical quality from Panreac (Spain), except from formamide (Aldrich, USA) and polyvinyl alcohol [PVA, Mw: 16000; Fluka (Germany)]. Water used in the experiments was deionized and filtered (Milli-Q Academic, Millipore, France).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of the lidocaine-loaded PLGA microparticles

The preparation of the microparticles by means of the solvent evaporation method (SEVM) involves the following procedure: 250 mg of PLGA was dissolved at room temperature in 10 ml of ethyl acetate. In the resulting solution, different amounts of lidocaine (6.25-50 mg) were dissolved. This organic phase was added to a 0.3 % (w/v) PVA solution and homogenized at 8000 rpm during 8 min (Heidolph DIAX 900, Germany). The obtained emulsion was stirred at 300 rpm for at least twelve hours with a magnetic stirrer hotplate SM6 (Jepson Bolton, UK), under room conditions, in order to evaporate the organic solvent. The obtained PLGA particles were collected by centrifugation at 3000 rpm during 25 min (Orto Alresa, mod. Digicen, Spain) and washed twice with 5 ml of water in order to remove the weakly adsorbed (or simply mechanically adhered) lidocaine. Finally, microparticles were frozen in liquid nitrogen and lyophilized (Telstar Cryodos, Spain).

The synthesis of the PLGA particles by means of the flow focusing technology (FF) involves the dissolution of lidocaine (6.25-50 mg) in a solution containing 250 mg of PLGA in 10 ml of ethyl acetate. The resulting solution was sprayed, using a standard FF nozzle fixed at 5 ml/h and 100 mbar, inside a chamber with an inlet temperature of 60 ± 10 °C. The formed particles were collected at the bottom of the chamber as a dry powder on a plate, freeze-dried and stored at 4 °C.

The formulations used in the synthesis of the PLGA particles by both methods are collected in Table 1. Lidocaine-loaded PLGA copolymers (Resomer[®] RG 504 and Resomer[®] RG 504H) obtained by the FF method

were discarded because of their high viscosity, useless for our drug delivery purposes. All the formulations were prepared in triplicate.

Formulation	Lidocaine (mg)	PLGA (250 mg)
1	50	502
2	25	502
3	12.5	502
4	6.25	502
5	50	502 H
6	25	502 H
7	12.5	502 H
8	6.25	502 H
9	50	504
10	12.5	504
11	50	504 H
12	12.5	504 H

Table 1. Formulations of lidocaine-loaded PLGA microparticles obtained by means of the solvent evaporation method (SEVM) and the flow focusing technology (FF).

2.2.2. Characterization methods

The size distribution of the microparticles was determined by means of an optical microscope (Olympus BH-2, USA) and an image-processing program (ImageJ 1.30v software, NIH, USA; Jilavenkatesa et al., 2001). The diameter determination and the statistical analysis were carried out from various microphotographs (sample size: 200 particles). The morphology and surface characteristics of the microparticles were studied by scanning electron microscopy (Philips XL-30, Philips Electron Optics, The Netherlands). Prior to observation, a dilute suspension of the particles (≈ 0.1 % w/v) was sonicated during 5 minutes, and drops of the suspension were placed on copper grids and coated with a palladium:gold alloy film, using a fine-coat sputter JFC1100 (Jeol Ltd, Japan). The grids were then dried at 35.0 ± 0.5 °C in a convection oven.

In order to determine the physical state of the drug in the polymeric particles and the possible existence of interactions between both entities, thermograms of PLGA, lidocaine, PLGA-lidocaine physical mixture, and lidocaine-loaded PLGA microparticles were obtained in an automatic differential scanning calorimetry (DSC) analyzer system (Mettler FP80 HT Central Processor and Mettler FP85 TA Cell, Spain). The data processing system (Mettler FP89 HT, Spain) was connected to the thermal analyzer. Temperature calibrations were performed with indium as a standard. An empty flask was used as a reference. All samples (5 mg) were run at a scanning rate of 10 °C/min, from 30 to 300 °C.

Finally, the differences between the surface properties of the PLGA microparticles obtained by both methods (SEVM and FF) were also investigated by performing a surface thermodynamic analysis. Our starting point is the model developed by van Oss and his group (van Oss et al., 1988; van Oss, 1994; see also Arias et al., 2006), according to which the total surface free energy of any material i is the sum of two contributions:

$$\gamma_i^{\text{TOT}} = \gamma_i^{\text{LW}} + \gamma_i^{\text{AB}} = \gamma_i^{\text{LW}} + 2\sqrt{\gamma_i^+ \gamma_i^-} \quad [1]$$

one of which, γ_i^{LW} , is the non-polar Lifshitz-van der Waals component, and the second one, γ_i^{AB} , is the acid-base component. This is related to the electron-donor (γ_i^-) and electron-acceptor (γ_i^+) characteristics of the material. Similarly, the interfacial solid/liquid free energy, $\gamma_{\text{SL}}^{\text{TOT}}$, and its *LW* and *AB* components ($\gamma_{\text{SL}}^{\text{LW}}$, $\gamma_{\text{SL}}^{\text{AB}}$, respectively) are related to the surface free energies of both the solid (subscripts S) and the liquid (subscripts L):

$$\gamma_{\text{SL}}^{\text{TOT}} = \gamma_{\text{SL}}^{\text{LW}} + \gamma_{\text{SL}}^{\text{AB}} = \gamma_{\text{SL}}^{\text{LW}} + 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^+ \gamma_{\text{S}}^-} + 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^- \gamma_{\text{S}}^+} - 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^+ \gamma_{\text{L}}^-} - 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^- \gamma_{\text{L}}^+} \quad [2]$$

Using the Young's equation (Adamson, 1990), these quantities can be related to the contact angle θ between the liquid and the solid:

$$(1 + \cos \theta) \gamma_{\text{L}}^{\text{TOT}} = 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{LW}} \gamma_{\text{L}}^{\text{LW}}} + 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^+ \gamma_{\text{L}}^-} + 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^- \gamma_{\text{L}}^+} \quad [3]$$

The three unknowns (γ_s^{LW} , γ_s^+ and γ_s^-) can be obtained by solving the resulting system of three equations if one measures the contact angles of three liquids of known γ_L^{LW} , γ_L^+ and γ_L^- . In our case, we used water ($\gamma_L^{LW} = 21.8$, $\gamma_L^+ = \gamma_L^- = 25.5$ mJ/m²), formamide ($\gamma_L^{LW} = 39.0$, $\gamma_L^+ = 2.28$, $\gamma_L^- = 39.6$ mJ/m²) and α -bromonaphtalene ($\gamma_L^{LW} = 43.6$, $\gamma_L^+ = \gamma_L^- = 0$ mJ/m²; all data taken from van Oss, 1994). The contact angles of the three liquids were determined at 25.0 ± 0.5 °C, using a Ramé-Hart 100-00 goniometer (USA), on pellets (radius: 1.3 cm) obtained by compressing the dry powders in a Spepac hydraulic press set to 10 Ton during 5 minutes.

2.2.3. Determination of the lidocaine loading to PLGA microparticles

In order to determine the drug loading, 7 mg of lidocaine-loaded PLGA microparticles were dissolved in acetonitrile. The obtained solutions were filtered with 0.45 μ m Millipore filters. The amount of lidocaine loaded was determined at 254 nm using a HPLC system manager (Hitachi, Japan), composed by four units: isocratic pump L-7100, automatic injector L-7200, DAD UV-vis L-7455 and D-7000 interface, using a column LiChrospher 100 5 RP-18 μ m (125 mm x 4 mm) from Merck (Germany). Acetonitrile:ammonium acetate (70:30, 0.0257 M, pH = 4.85) was used as mobile phase with a flow rate of 0.6 ml/min.

The lidocaine content (%) of microparticles was calculated as:

$$\text{Lidocaine content} = \frac{\text{mg incorporated lidocaine}}{\text{mg microparticles}} \cdot 100 \quad [4]$$

The normal distribution of each continuous variable was assessed by using the Shapiro-Wilk test. Levene's test is used to verify that variances are equal across groups or samples; it's called homogeneity of variance. Some statistical tests, for example the analysis of variance, assume that variances are equal across groups or samples.

A factorial analysis of variance was performed to determine the effect on drug loading of the polymer type used and the amount of drug dissolved in

the organic phase during the synthesis routine. Snedecor's F distribution is most commonly used to test for statistical significance in tests of variance. The size of the F factor relates directly to the confidence at which the null hypothesis (no difference among treatments or interactions) can be rejected - the larger the factor the greater the confidence of the statistical inference and the smaller the significance level. The F-statistic is the mean square for the factor divided by the mean square for the error. This statistic follows an F distribution with (k-1) and (N-k) degrees of freedom where k is the number of levels for the given factor and N is the number of cases.

When comparing more than two means, an ANOVA *F*-test tells you whether the means are significantly different from each other, but it does not tell you which mean differs from which other means. Multiple comparison procedures (MCPs) give you more detailed information about the differences among the means; so the Tamhane test (for unequal variances) was used for post hoc comparisons between groups. All statistical tests were two-sided, and *p* values < 0.05 were considered to be statistically significant.

2.2.4. In vitro lidocaine release from the PLGA microparticles

A dialysis method was used for the drug release determinations. Briefly, 30 mg of lidocaine-loaded PLGA microparticles were placed in a dialysis bag and immersed in 40 mL of a phosphate buffer medium (pH = 7.4 ± 0.1). The dialysis process was carried out using a cellulose acetate membrane (diameter: 20.4 mm) in a Spectra/por membrane MWCO: 12-14.000 (Spectrum Laboratories, USA), at 37 ± 0.5 °C and under magnetic stirring (50 rpm). This membrane was pretreated during 1 h with the same buffer solution (pH = 7.4 ± 0.1), to ensure its wetting and sealing. At specified times aliquots of 1 mL were withdrawn and the amount of drug released was determined by means of a HPLC system manager, as previously described. An equal volume of buffer, maintained at the same temperature, was added after sampling to ensure sink conditions. All the experiments were carried out in triplicate.

3. Results and Discussion

3.1. Particle geometry

As an example, Figure 2 shows SEM picture of lidocaine-loaded PLGA microparticles obtained by SEVM (figure 2a) and by FF (figure 2b). As it can be observed, the microparticles obtained by SEVM are spherical with a broad size distribution and a smooth surface. The microparticles obtained by FF show also a spherical shape and a smooth surface. As it can be seen, the selected technique of microencapsulation does not seem to influence the final morphology and surface characteristics of the particles. (Similar pictures are not shown for the rest of PLGA formulations).

In relation to the microparticles mean size, the SEVM method allows to obtain little smaller particles than the FF technology in the experimental conditions assayed in this paper. On the other hand, important differences with respect to the size distribution of the microparticles have been detected (Table 2). The FF technique allows to obtain microparticles with a more narrow size distribution in comparison to the particles obtained by SEVM. This is especially interesting considering the biopharmaceutical influences that can be derived.

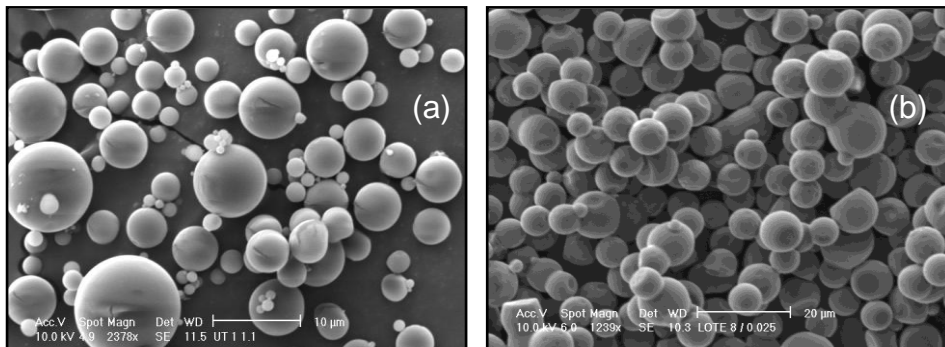


Figure 2. Scanning electron microscopy photographs of lidocaine-loaded PLGA microparticles obtained by SEVM (a) and FF (b).

Finally, the morphology, surface and size of the microparticles did not vary significantly when loaded with different drug amounts, and they were also

independent to the type of PLGA used. Pictures for different drug concentrations are not shown for brevity.

Formulation	SEVM		FF	
	Size (μm)	CV (%)	Size (μm)	CV (%)
1	3.2 \pm 1.6	48.8	8.4 \pm 1.1	13.2
2	4.7 \pm 1.7	36.4	7.9 \pm 1.2	14.7
3	3.8 \pm 1.7	44.6	8.5 \pm 1.2	13.9
4	3.9 \pm 2.0	51.0	7.6 \pm 1.2	16.2
5	4.5 \pm 1.9	42.2	7.9 \pm 1.1	14.4
6	3.3 \pm 1.5	45.8	8.3 \pm 1.1	12.9
7	4.8 \pm 1.8	37.7	8.0 \pm 1.2	15.0
8	4.5 \pm 2.0	44.2	8.1 \pm 1.1	13.2
9	3.7 \pm 1.4	38.5	—	—
10	3.9 \pm 1.2	30.0	—	—
11	4.4 \pm 1.5	34.5	—	—
12	4.3 \pm 1.1	25.4	—	—

Table 2. Mean diameter of the lidocaine-loaded PLGA microparticles obtained by the SEVM and the FF techniques.

3.2. Thermal analysis

Figure 3 shows DSC thermograms of lidocaine, PLGA 502 and a PLGA 502/lidocaine physical mixture. The presence of both the lidocaine endothermic peak (80.8 °C) and the PLGA glass transition temperature peak (57.2 °C), in the thermogram of their physical mixture, reveals the absence of interactions between both entities.

With respect to the physical state of the drug loaded to the PLGA particles, the lidocaine endothermic peak is not observed in the thermograms of the lidocaine-loaded polymeric particles obtained by either SEVM (Figure 4a) and FF (Figure 4b) methods. Thus, the drug must be loaded in its

amorphous form, rather than in crystalline state; it can be possibly thought of as a molecular dispersion or a solid solution (Zidan et al., 2006). This is confirmed by SEM pictures (Figure 2): no drug crystals are observed on the PLGA surface. Let us finally mention that neither the amount of drug loaded nor the type of PLGA used had any significant influence on the drug physical state or the drug-polymer interaction. This observation is based on the thermograms obtained in the different conditions described (data not shown).

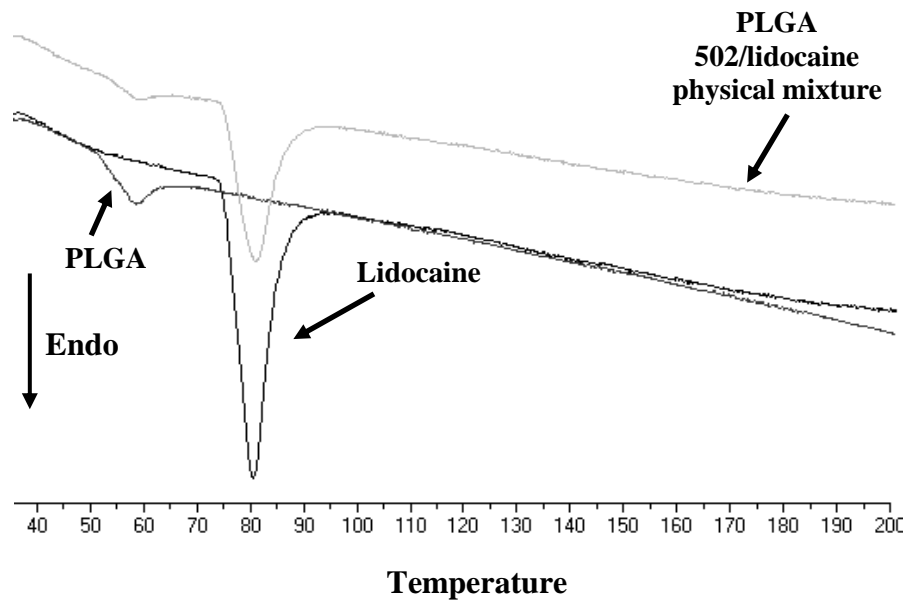


Figure 3. Thermograms of lidocaine, PLGA 502 and PLGA 502/lidocaine physical mixture.

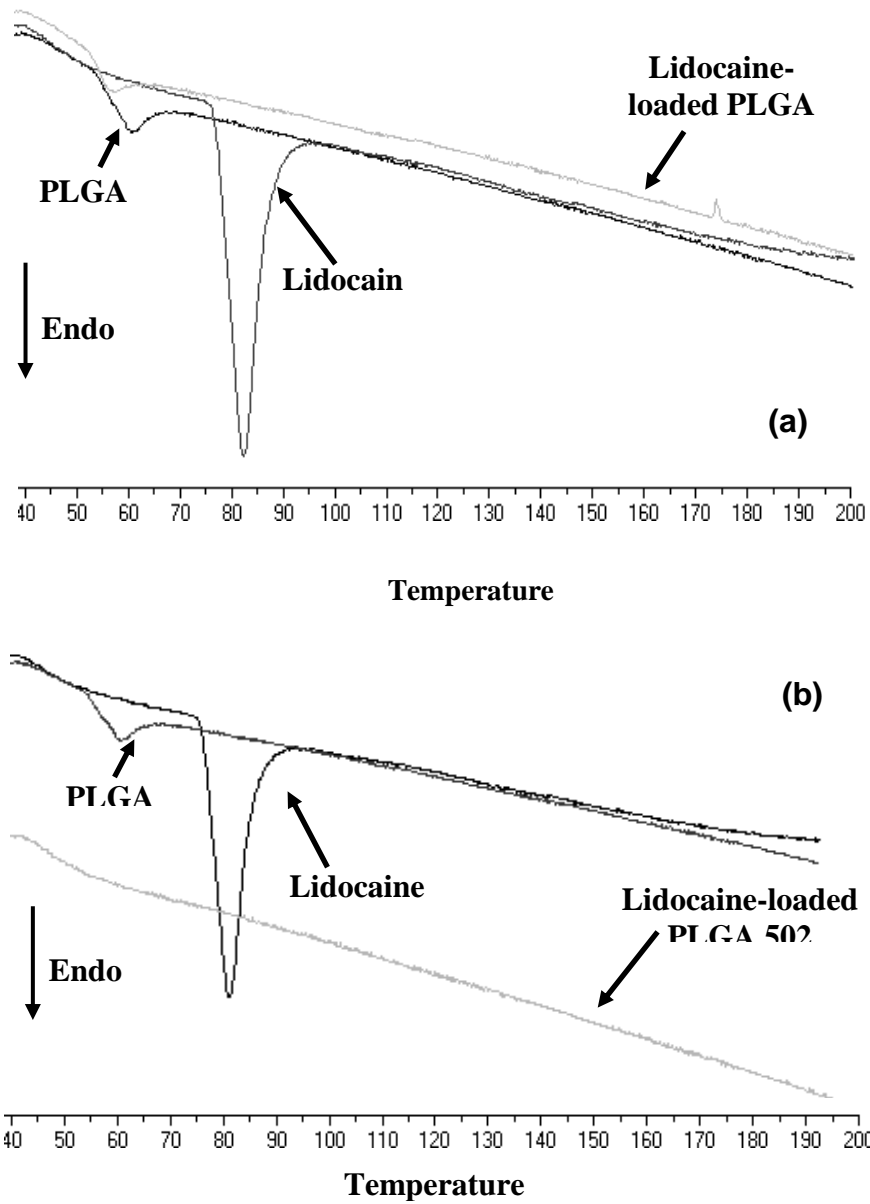


Figure 4. Thermograms of lidocaine, PLGA 502 and lidocaine-loaded PLGA 502 microparticles (Formulation 1) obtained by SEVM (a) and by FF (b).

3.3. Surface thermodynamics

The surface free energy components (γ_S^{LW} , γ_S^+ , γ_S^-) of the three types of particles constitute a set of physical quantities that can also be analyzed to ascertain the differences between both synthesis techniques. In order to obtain such quantities using Eq. [2], we measured the contact angles of water, formamide and α -bromonaphtalene on pellets obtained by compressing dry powders of the drug-loaded microparticles. The results are detailed in Table 3. Even these raw contact angle data already denote that there exist significant differences among the lidocaine-loaded PLGA microparticles obtained by SEVM and FF techniques. But it is the evaluation of the γ_S components, given in Table 4, that provides the true physical information about the thermodynamics of the lidocaine-loaded PLGA microparticles prepared by both techniques. Whatever the component considered, its values for particles obtained by both procedures are different. Thus the Lifshitz-van der Waals component is the least affected (as it is usually the case, see *e.g.* Arias et al., 2001), although its value for the PLGA obtained by FF is slightly higher than the one for the particles obtained by SEVM. Concerning the electron-acceptor component, γ_S^+ , although small in both cases, is close to zero for the particles obtained by SEVM. The electron-donor component γ_S^- shows large values in particles obtained by SEVM, in comparison to particles obtained by FF.

Obviously, these changes in the surface free energy manifest themselves in the hydrophobicity/hydrophilicity characteristics of the different materials. According to van Oss (1994), the following criterion may be used to check whether a solid can be considered hydrophobic or hydrophilic. The free energy of interaction (not considering the electrostatic component) between the solid phases immersed in the liquid can be written as follows in terms of the total interfacial tension between phases S and L (Eq. [2]):

$$\Delta G_{SLS} = -2\gamma_{SL}^{TOT} . \quad [5]$$

Solid	SEVM			FF		
	Water	Formamide	α -bromo-naphtalene	Water	Formamide	α -bromo-naphtalene
1	55.4 ± 2.7	21.4 ± 1.6	14 ± 5	73.4 ± 2.1	22.6 ± 1.4	7.9 ± 1.2
2	54.8 ± 1.0	24.0 ± 4.6	16 ± 4	75.5 ± 2.2	16.8 ± 1.9	9.2 ± 1.1
3	53.7 ± 4.2	23.3 ± 3.2	15.4 ± 1.0	82.0 ± 2.3	16.5 ± 1.5	7.2 ± 1.1
4	56.9 ± 1.0	28.2 ± 1.0	24.1 ± 1.0	72.2 ± 2.8	18.5 ± 2.1	8.7 ± 1.0
5	60.9 ± 2.9	28.9 ± 1.0	19.7 ± 1.0	76.9 ± 2.6	21.3 ± 0.6	8.3 ± 1.1
6	59.1 ± 1.8	31.3 ± 1.9	17.2 ± 2.3	79.3 ± 3.4	18.1 ± 1.5	7.5 ± 1.3
7	57.9 ± 2.7	28 ± 3	18 ± 5	78.8 ± 1.7	19.1 ± 1.7	9.2 ± 1.4
8	59 ± 3	26 ± 3	17.5 ± 2.4	82.6 ± 3.1	23.6 ± 1.3	7.6 ± 2.8
9	59.1 ± 1.8	31.3 ± 1.9	17.2 ± 2.3	-	-	-
10	57.7 ± 1.0	28.6 ± 2.8	20.2 ± 1.0	-	-	-
11	61 ± 4	20.1 ± 1.0	18.2 ± 1.0	-	-	-
12	62.0 ± 2.9	26 ± 6	19.8 ± 1.5	-	-	-

Table 3. Contact angle θ (degrees) of the probe liquids indicated on the different formulations of lidocaine-loaded PLGA microparticles obtained by SEVM and FF techniques

Solid	SEVM			FF		
	γ_S^{LW}	γ_S^+	γ_S^-	γ_S^{LW}	γ_S^+	γ_S^-
1	42.3 ± 0.9	2.4 ± 0.3	13.9 ± 2.3	43.2 ± 0.1	4.3 ± 0.1	1.2 ± 0.6
2	41.9 ± 0.9	2.1 ± 0.3	15.4 ± 0.4	43.1 ± 0.1	5.6 ± 0.2	0.3 ± 0.3
3	42.1 ± 0.2	2.1 ± 0.1	16.4 ± 3.5	43.3 ± 0.1	6.8 ± 0.3	0.2 ± 0.3
4	39.3 ± 0.3	2.2 ± 0.1	14.6 ± 0.7	43.1 ± 0.1	4.8 ± 0.2	1.3 ± 0.9
5	41.1 ± 0.2	2.2 ± 0.2	10.9 ± 2.4	43.1 ± 0.1	5.1 ± 0.4	0.3 ± 0.4
6	41.7 ± 0.5	1.6 ± 0.1	13.6 ± 1.1	43.2 ± 0.1	6.1 ± 0.5	0.1 ± 0.1
7	41.6 ± 1.1	2.1 ± 0.1	13.1 ± 1.7	43.1 ± 0.2	5.9 ± 0.1	0.1 ± 0.1
8	41.6 ± 0.5	2.3 ± 0.1	11.9 ± 1.9	43.2 ± 0.3	5.7 ± 0.4	0.1 ± 0.3
9	41.7 ± 0.5	1.6 ± 0.1	13.6 ± 1.1	-	-	-
10	40.9 ± 0.2	1.9 ± 0.2	13.9 ± 0.1	-	-	-
11	41.5 ± 0.2	3.4 ± 0.5	8.3 ± 3.5	-	-	-
12	41.1 ± 0.4	2.8 ± 0.4	8.9 ± 0.9	-	-	-

Table 4. Surface free energy components of the different formulations of lidocaine-loaded PLGA microparticles obtained by SEVM and FF techniques.

γ_S^{LW} is the Lifshitz-van der Waals component; γ_S^+ (γ_S^-) is the electron-acceptor (electron-donor) component. All values in mJ/m².

This quantity gives a quantitative indication of the hydrophobic/hydrophilic nature of the solid: if it happens to be negative, interfacial interactions favour attraction of the particles to each other, and they are considered hydrophobic. Hydrophilicity will correspondingly be associated to positive values of ΔG_{SLS}^{TOT} . Table 5 shows the results for both kinds of lidocaine-loaded PLGA microparticles. As observed, lidocaine-loaded PLGA microparticles are hydrophobic materials, independently of the type of polymer used, the synthesis method followed and the amount of drug loaded. However, the hydrophobic nature of the PLGA particles is incremented when they are obtained by the FF technique (more negative values of ΔG_{SLS}^{TOT}). This is probably due to the contribution of the adsorbed PVA to the surface thermodynamics of the PLGA microparticles obtained by SEVM. As PLGA microparticles prepared using PVA tends to strongly adsorb this emulsifier on their surface (Sahoo et al., 2002), this should induce a reduction in the hydrophobic nature, ΔG_{SLS}^{TOT} values, of the PLGA microparticles (Perrin and English, 1997; Gómez-Lopera et al., 2001; Gómez-Lopera, 2003).

Finally, the molecular weight of the polymer should also be taken into account as it is an indication of the polymer chain length and, therefore, of the degree of hydrophilicity/hydrophobicity of the polymer. It is clear that the higher the molecular weight the longer the chain and, hence, the higher the hydrophobicity of PLGA (Mittal et al., 2007). In summary, whatever the synthesis procedure followed, higher ΔG_{SLS}^{TOT} values (more hydrophobic solids) are obtained in PLGA particles of higher molecular weights (Resomer[®] RG 504 and 504 H).

	SEVM	FF
Solid	ΔG_{SLS}^{TOT}	ΔG_{SLS}^{TOT}
1	-25.1 ± 5.5	-54.3 ± 3.7
2	-22.7 ± 1.7	-55.5 ± 3.8
3	-21.1 ± 6.4	-51.6 ± 4.2
4	-22.9 ± 1.5	-51.8 ± 5.1
5	-31.1 ± 5.9	-57.5 ± 5.7
6	-27.2 ± 2.5	-56.1 ± 3.6
7	-27.2 ± 4.1	-56.8 ± 2.2
8	-28.8 ± 4.4	-57.5 ± 6.6
9	-27.1 ± 2.6	-
10	-25.2 ± 0.6	-
11	-33.9 ± 9.1	-
12	-33.8 ± 3.5	-

Table 5. ΔG_{SLS}^{TOT} (interfacial energy of interaction between solid particles, S, in a liquid medium, L, per unit area of solid/liquid interface) values and hydrophobicity/hydrophilicity of the different formulations of lidocaine-loaded PLGA microparticles obtained by SEVM and FF techniques. All values in mJ/m^2 .

3.4. Lidocaine loading to PLGA microparticles

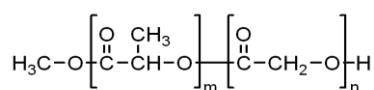
Table 6 shows that drug loading is clearly affected by the amount of drug dissolved in the organic phase during the synthesis routine, the type of polymer used and the synthesis technique followed. As determined with drugs of different nature, a positive effect of the increment in drug concentration is observed on the loading efficiency (McCarron et al., 2000; Prior et al., 2000; Dillen et al., 2004; Rivera et al., 2004; Vega et al., 2006).

Formulation	SEVM		FF	
	Drug content	CV (%)	Drug content	CV (%)
1	1.21 ± 0.02	1.9	16.91 ± 0.86	5.1
2	0.80 ± 0.06	7.1	8.98 ± 0.20	2.2
3	0.75 ± 0.11	14.5	4.18 ± 0.58	13.9
4	0.61 ± 0.03	4.8	2.58 ± 0.49	19.0
5	2.86 ± 0.49	17.4	17.74 ± 1.03	5.8
6	2.55 ± 0.49	19.1	9.69 ± 0.28	2.9
7	1.51 ± 0.05	3.2	5.93 ± 0.16	2.8
8	0.93 ± 0.04	4.2	2.78 ± 0.07	2.4
9	1.24 ± 0.05	4.0	—	—
10	0.69 ± 0.01	1.4	—	—
11	1.77 ± 0.09	5.1	—	—
12	0.87 ± 0.05	5.8	—	—

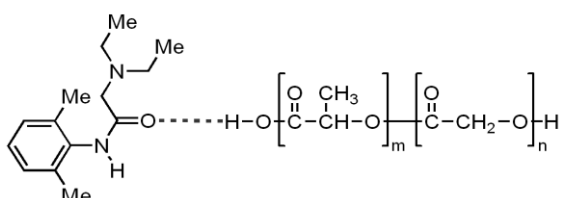
Table 6. Lidocaine loading (% w/w) to PLGA microparticles obtained by SEVM and FF techniques

With respect to the effect of the type of PLGA used on drug loading, the influence of the polymeric end groups has been previously evaluated (Budhian et al., 2005). The use of PLGA particles carrying predominantly free carboxylic end groups (in our case, Resomer[®] RG 502H and Resomer[®] RG 504H) increases the lidocaine incorporation to the polymeric matrix, because of the formation of hydrogen bonds between these end groups and the drug molecule (Figure 5). This chemical bonding determines a higher drug loading than that achieved with Resomer[®] RG 502 and Resomer[®] RG 504 copolymers, which carry predominantly alkyl ester end groups (Budhian et al., 2005). In addition, the hydrophobicity of the matrix must also be considered: the incorporation of the drug to the polymeric matrix is favoured in more hydrophobic polymers; in other words, it is

thermodynamically preferred for the drug to get into the polymer matrix rather than stay in the aqueous solution.



(a)



(b)

Figure 5. Chemical structure of PLGA copolymers with an alkyl ester end group (a), and hydrogen bonding between PLGA with carboxylic end group and the lidocaine molecule (b).

A factorial analysis of variance was carried out in order to check the described effect on drug loading of both factors, the amount of drug dissolved in the organic phase during the synthesis routine and the type of polymer used. When the SEVM method was followed, results showed a significant effect of the type of PLGA used (different hydrophobicity and viscosity), $F_{(3, 60)} = 114,94$, $p < 0.001$; and of the amount of drug dissolved in the organic phase, $F_{(3, 60)} = 90,51$, $p < 0.001$. A significant interaction between both factors was detected ($F_{(5, 60)} = 17,37$, $p < 0.001$), indicating that the effect of the amount of lidocaine dissolved was different depending on the type of PLGA used. The mean lidocaine loading was more than 3 times higher when the most hydrophilic polymers were used (Resomer[®] 502H and Resomer[®] 504H; see Table 6) and only 2 times by using Resomer[®] 502 and Resomer[®] 504. The differences in variance values in the formulations studied were detected by Levene's test of homogeneity of variances, and the post hoc Tamhane test was performed to identify significantly different group means when the factorial ANOVA test was

significant. This pairwise comparison procedures, which compare more than one pair of means at the same time, clearly showed significant differences ($p < 0.05$) between the lidocaine loading if the following polymers were used: Resomer[®] 502H and Resomer[®] 504 (mean difference = 1.12, $p < 0.001$), Resomer[®] 502 and Resomer[®] 504 (mean difference = 1.00, $p < 0.001$), Resomer[®] 504H and Resomer[®] 502 (mean difference = 4.73, $p = 0.036$), Resomer[®] 502H and Resomer[®] 504H (mean difference = 0.65, $p = 0.04$).

When a factorial analysis of variance was applied to the PLGA particles obtained by the FF method, results showed a significant effect of the amount of drug dissolved in the organic phase during the synthesis routine on the drug loading efficiency ($F_{(3, 32)} = 1302,16$, $p < 0.001$). Slightly higher lidocaine loading values were achieved when PLGA particles with free carboxylic end groups were used ($F_{(1, 32)} = 7,92$, $p = 0.008$).

Finally, the influence of the synthesis procedure followed can also be clearly observed. Whatever the amount of drug dissolved or the type of PLGA used, higher drug loadings are obtained if use is made of the FF technology. This is probably due to a stronger interaction between the hydrophobic drug and the PLGA matrix obtained by FF, as these polymeric particles are more hydrophobic than the ones obtained by SEVM (McCarron et al., 2000). Moreover, as PLGA particles are obtained in just one step by FF, the possibility of drug loss during the synthesis is minimal.

3.5. In vitro dissolution studies

Drug release profiles from PLGA particles reported in the literature are quite controversial and a general trend cannot be stated. Different PLGA properties, such as size, molecular weight, hydrophobicity/hydrophilicity and the nature of the polymer used, have been reported to influence the drug release (Luan and Bodmeier, 2006).

As can be seen in Figures 6 and 7, lidocaine release follows a biphasic profile probably due to diffusion-cum-degradation mediated processes. During the rapid early phase, drug release occurs mainly by the loss of the

surface-associated drug and by drug diffusion in the polymeric matrix. With respect to the release during the slower phase, it may result from polymer degradation, from drug diffusion through the polymeric matrix, or both (Panyam et al., 2003; Mittal et al., 2007). However, some differences are observed between the PLGA particles obtained by SEVM and FF (Figure 6). Whatever the lidocaine concentration dissolved in the organic phase and the type of PLGA used, faster release rates are achieved by formulations obtained by SEVM: first, an early rapid release of around 75 % takes place within \approx 15 days, while the remaining 25 % is slowly liberated during the next 35 days. With respect to the polymeric particles obtained by FF, the release rate is slower: around 75 % is released within around 30 days, while the remaining 25 % is liberated during the next 20 days.

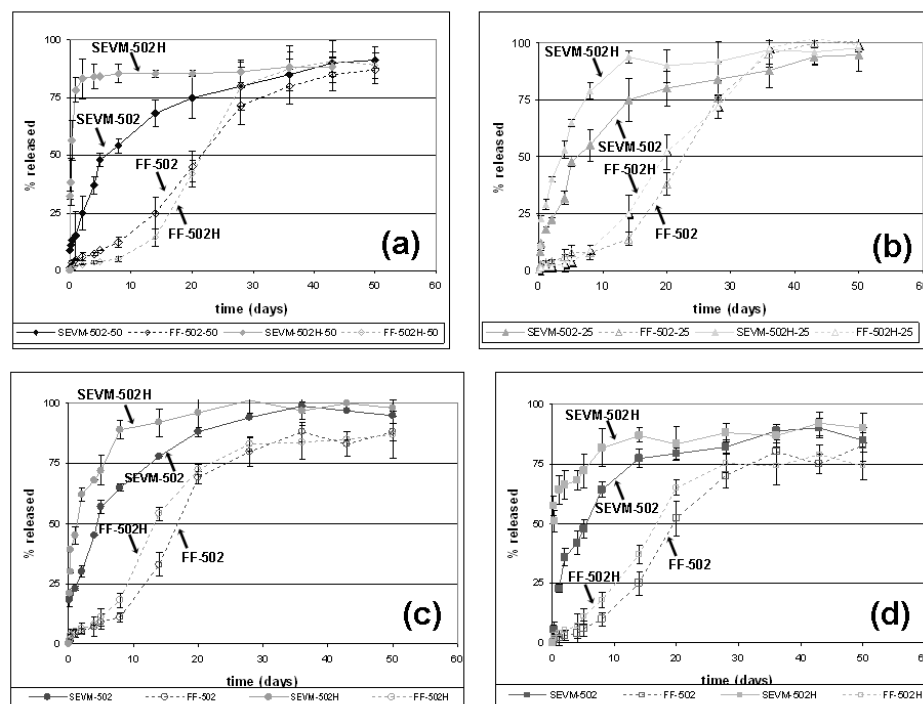


Figure 6. Lidocaine release (%) from PLGA 502 and 502H particles obtained by SEVM and FF. The drug loaded PLGA particles were obtained by varying the amount of lidocaine dissolved in the organic phase during the synthesis procedure: 50 mg (a), 25 mg (b), 12.5 mg (c) and 6.25 mg (d).

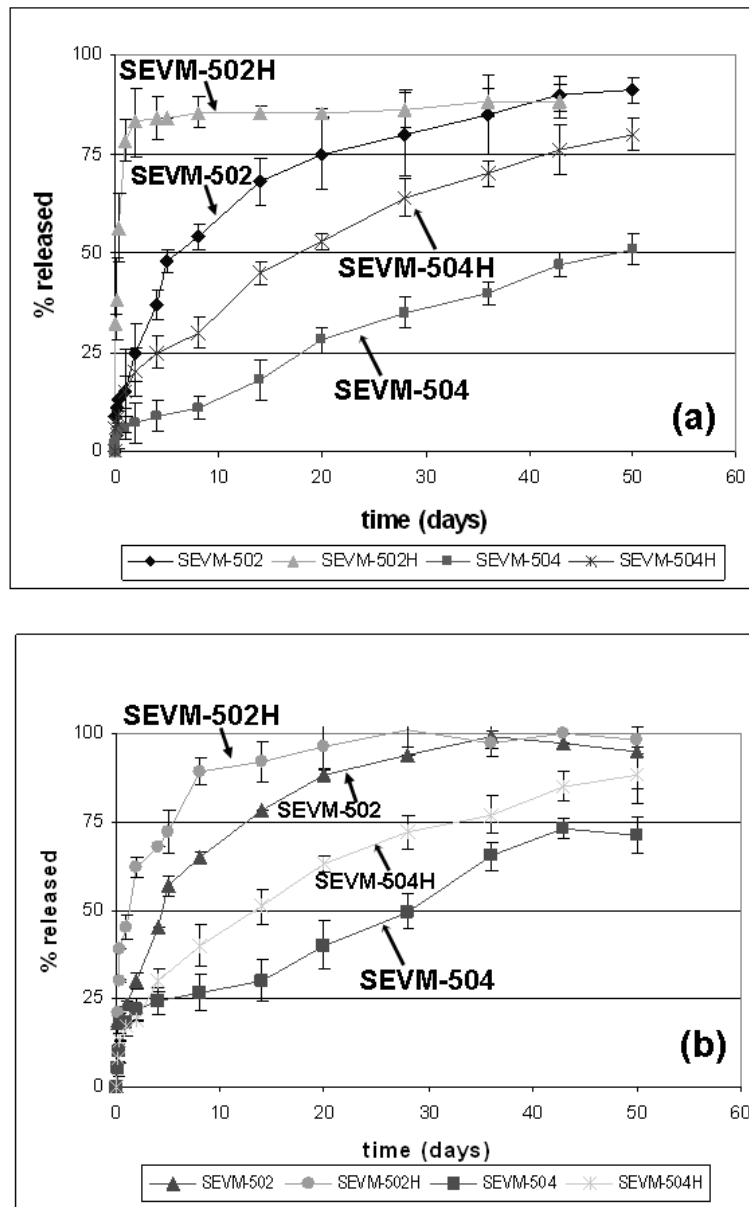


Figure 7. Lidocaine release (%) from PLGA 502, 502H, 504 and 504H particles obtained by SEVM. The drug loaded PLGA particles were obtained by varying the amount of lidocaine dissolved in the organic phase during the synthesis procedure: 50 mg (a) and 12.5 mg (b).

These differences are due to a stronger interaction between the lipophilic drug and the more hydrophobic PLGA particles obtained by FF; this induces a slower drug release process (Gibaud et al., 1998; McCarron et al., 2000; Arias et al., 2007). Moreover, the hydrophobicity/hydrophilicity characteristics of the polymeric particles also determine their degradation rate and, therefore, the drug release. Increases in hydrophobicity (recall that FF particles are more hydrophobic, as shown in Table 5) contribute to a decrease in the degradation rate and, hence, in drug release (Mittal et al., 2007). We should also take into account that particle size is an important parameter that could affect the degradation of the polymer matrix. An increase in particle size reduces the surface area/volume ratio of the polymer, leading to decreased buffer penetration in the particles and slower release of the drug. This may be another reason for the slower drug release from PLGA microparticles obtained by FF (Mittal et al., 2007).

The lidocaine loading and, therefore, the type of PLGA used, also determines the drug release rate. Figures 6 and 7 show a slightly faster release from PLGA particles with free carboxylic acid end groups (Resomer[®] RG 502H and 504H) in comparison to copolymers with alkyl ester end groups (Resomer[®] RG 502 and 504), independently of the synthesis routine followed. As an increase in drug loading also enhances the cumulative drug release (Brasseur et al., 1991; Arias et al., 2007, 2008), a faster process will be observed in PLGA 502H and 504H particles, because of their higher loadings values (Table 6). Finally, Figure 7 also allows studying the influence of the PLGA molecular weight on the lidocaine release. As can be seen, an increase in molecular weight decreases the drug release rate. This is due to the higher hydrophobicity of Resomer[®] RG 504 and 504H (see Table 5) determined by their higher molecular weight; more hydrophobic polymers will more easily retain the drug and, therefore, will lead to a slower drug release (Soppimath and Aminabhavi, 2002; Díez and Tros de Ilarduya, 2006; Mittal et al., 2007).

4. Conclusions

In this study, two synthesis procedures for the preparation of spherical PLGA microparticles loaded with the anaesthetic drug lidocaine, have been analyzed. The differences between the classical solvent evaporation method (SEVM) and the novel flow focusing technique

(FF), have been demonstrated by morphology and surface thermodynamic characterizations. It is found that the FF technology allows obtaining microparticles with a more narrow size distribution in comparison to those obtained by SEVM. Moreover, the microparticles obtained by the FF method show a higher loading and a slower drug release profile. These processes are determined by the synthesis procedure followed, the type of polymer (molecular weight and end chemical groups), the size and the hydrophobic/hydrophilic properties of the particles, and the amount of drug dissolved in the organic phase.

5. Acknowledgements

The present paper is part of a PETRI research project (PTR1995-0858-OP) supported by the Spanish Ministry of Education and Science (MEC). Financial support from Projects MAT2005-07746-C02-02 (MEC) and FQM-410 (Junta de Andalucía) is also acknowledged.

6. References

- Adamson, A.W., 1990. *Physical Chemistry of Surfaces*, 5th Ed., John Wiley & Sons, New York.
- Aftabouchad, C., Doelker, E., 1992. Méthodes de préparation des microparticules biodégradables chargées en principes actifs hydrosolubles. *S.T.P. Pharma Sci.* 2, 365- 380.
- Arias, J.L., Gallardo, V., Gómez-Lopera, S.A., Plaza, R.C., Delgado, A.V., 2001. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Rel.* 77, 309-321.
- Arias, J.L., Gallardo, V., Linares-Molinero, F., Delgado, A.V., 2006. Preparation and characterization of carbonyl iron/poly(butylcyanoacrylate) core/shell nanoparticles. *J. Colloid Interface Sci.*, 299, 599-607.
- Arias, J.L., Gallardo, V., Ruiz, M.A., Delgado, A.V., 2007. Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(butylcyanoacrylate) nanospheres. *Int. J. Pharm.* 337(1-2), 282-290.
- Arias, J.L., Ruiz, M.A., López-Viota, M., Delgado, A.V., 2008. Poly(alkylcyanoacrylate) Colloidal Particles as Vehicles for Antitumour Drug Delivery: A Comparative Study. *Colloids Surf. B: Biointerfaces* 62, 64-70.

Brasseur, N., Brault, D., Couvreur, P., 1991. Adsorption of hematoporphyrin onto polyalkylcyanoacrylate nanoparticles: carrier capacity and drug release. *Int. J. Pharm.* 70, 126-135.

Budhian, A., Siegel, S.J., Winey, K.I., 2005. Production of haloperidol-loaded PLGA nanoparticles for extended controlled drug release of haloperidol. *J. Microencapsulation*, 22 (7), 773-785.

Chen, P.-C., Park, Y.J., Chang, L.-C., Kohane, D.S., Bartlett, R.H., Langer, R., Yang, V.C., 2004. Injectable microparticle-gel system for prolonged and localized lidocaine release. I. In vitro characterization. *J. Biomed. Mat. Res. A*, 70A(3), 412-419.

Díez, S., Tros de Ilarduya, C., 2006. Versatility of biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for plasmid DNA delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 63, 188-197.

Dillen, K., Vandervoort, J., Van Den Mooter, G., Verheyden, L., Ludwig, A., 2004. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 275(1-2), 171-187.

Freitas, S., Merkle, H.P., Gander, B., 2005. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. *J. Control. Rel.* 102, 313-332.

Fu, X., Ping, Q., Gao, Y., 2005. Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres. *J. Microencapsulation*, 22(1), 57-66.

Gañán-Calvo, A.M., 1998. Generation of steady liquid microthreads and micron-sized monodisperse sprays in gas streams. *Phys. Rev. Lett.* 80, 285-288.

Gibaud, S., Rousseau, C., Weingarten, C., Favier, R., Douay, L., Andreux, J.P., Couvreur, P., 1998. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *J. Control. Release* 52, 131-139.

Gómez-Lopera, S.A., Plaza, R.C., Delgado, A.V., 2001. Synthesis and characterization of spherical magnetite/biodegradable polymer composite particles. *J. Colloid Interface Sci.* 240, 40-47.

Gómez-Lopera, S.A., 2003. Síntesis y caracterización de portadores magnéticos coloidales: aplicaciones al diseño de sistemas de liberación de fármacos (In Spanish). Ph.D Thesis, University of Granada, Spain.

Görner, T., Gref, R., Michenot, D., Sommer, F., Tran, M.N., Dellacherie, E., 1999. Lidocaine-loaded biodegradable nanospheres. I. Optimization of the drug incorporation into the polymer matrix. *J. Control. Rel.* 57, 259-268.

Jillavenkatesa, A, Dapkunas, S.J., Lum, L.-S.H., 2001. NIST Recommended Practice Guide - Particle Size Characterization, Natl. Inst. Stand. Technol., Washington.

Kumar, N., Ravikumar, M.N.V., Domb, A.J., 2001. Biodegradable block copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53, 23-44.

Luan, X. , Bodmeier, R., 2006. Influence of the poly(lactide-co-glycolide) type on the leuprolide release from in situ forming microparticle systems. *J. Control. Rel.* 110, 266-272.

Martín-Banderas, L., Flores-Mosquera, M., Riesco-Chueca, P., Rodríguez-Gil, A., Cebolla, A., Chávez, S., Gañán-Calvo, A.M., 2005. Flow Focusing: a versatile technology to produce size-controlled and specific-morphology microparticles. *Small* 1(7), 688-692.

McCarron, P.A., Woolfson, A.D., Keating, S.M., 2000. Sustained release of 5-fluorouracil from polymeric nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.* 52(12), 1451-1459.

Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V., Ravi Kumar, M.N.V., 2007. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J. Control. Rel.* 119, 77-85.

Nurkeeva, Z.S., Mun, G.A., Khutoryanskiy, V.V., Bitekenova, A.B., Dzhusupbekova, A.B., 2002. Polymeric complexes of lidocaine hydrochloride with poly(acrylic acid) and poly(2-hydroxyethyl vinyl ether). *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 13(7), 759-768.

Panyam, J., Dali, M.M., Sahoo, S.K., Ma, W., Chakravarthi, S.S., Amidon, G.L., Levy, R.J., Labhasetwar, V., 2003. Polymer degradation and in vitro

release of a model protein from poly (D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J. Control. Release* 92, 173-187.

Perrin, D.E., English, J.P., 1997. Polyglycolide and polylactide. In: Domb, A.J., Kost, J., Wiseman, D.M. (Eds.), *Handbook of Biodegradable Polymers*, Harwood Academic, Amsterdam, pp. 3-28.

Prior, S., Gamazo, C., Irache, J.M., Merkle, H.P., Gander, B., 2000. Gentamicin encapsulation in PLA/PLGA microspheres in view of treating *Brucella* infections. *Int. J. Pharm.* 196(1), 115-125.

Rivera, P.A., Martínez-Oharriz, M.C., Rubios, M., Irache, J.M., Espuelas, S., 2004. Fluconazole encapsulation in PLGA microspheres by spray-drying. *J. Microencapsulation* 21(2), 203-211.

Sahoo, S.K., Panyam, J., Prabha, S., Labhasetwar, V. 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release* 82, 105-114.

Soppimath, K.S., Aminabhavi, T.M., 2002. Ethylacetate as a dispersing solvent in the production of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres: effect of process parameters and polymer type. *J. Microencapsulation* 19 (3), 281-292.

van Oss, C.J., Chaudhury, M.K., Good, R.J., 1988. Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem. Rev.* 88, 927-941.

van Oss, C.J., 1994. *Interfacial Forces in Aqueous Media*, Marcel Dekker Inc., New York.

Vega, E., Egea, M.A., Valls, O., Espina, M., García, M.L., 2006. Flurbiprofen loaded biodegradable nanoparticles for ophtalmic administration. *J. Pharm. Sci.* 95(11), 2393-2405.

Zidan, A.S., Sammour, O.A., Hammad, M.A., Megrab, N.A., Hussain, M.D., Khan, M.A., Habib, M.J., 2006. Formulation of anastrozole microparticles as biodegradable anticancer drug carriers. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 7, article 61, E1-E9.



CAPÍTULO II

Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: Physicochemical characterization and protein detection by reversed-phase HPLC

M.A. Holgado¹, M.J. Cózar-Bernal¹, S. Salas¹, J.L. Arias², J. Álvarez-Fuentes¹, M. Fernández-Arévalo¹

¹Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain.

²Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain.

Revista:

International Journal of Pharmaceutics 380 (2009) 147–154

Abstract

In the present study, a novel synthesis technique based on the Flow Focusing (FF) technology is investigated for the preparation of green fluorescent protein (GFP)-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) microparticles. To our knowledge, this novel technique has never been applied to the formulation of proteins in polymeric systems. A simple, specific and rapid reversed-phase HPLC (RP-HPLC) method was validated for the determination of GFP in PLGA microparticles with the best chromatographic peak resolution, reduced run time and low cost of analysis. In order to achieve the finest GFP-loaded polymeric particles, experimental parameters mainly associated to the FF device were studied (liquid flow rate and pressure of the focusing air). Very high GFP encapsulation values (> 90 %) were obtained by this technique, and the electrokinetic characterization of these systems suggested that this protein was incorporated into the polymeric matrix. This study is intended to offer information on which to base the development of high molecular weight protein-loaded polymeric delivery systems prepared by FF.

Key Words: Flow Focusing (FF); Green Fluorescent Protein (GFP); Microparticles; Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA); Peptide- and Protein-loaded Polymeric Delivery Systems; Reversed-Phase HPLC (RP-HPLC); Method Validation.

1. Introduction

Protein and peptide delivery methods have evolved significantly over the past years, focusing the major research efforts on the delivery of high molecular weight proteins. These biomolecules are characterized by a poor absorption into the blood stream when administered orally and by a short half-life, which determines the need of a frequent administration in high doses to achieve a therapeutic effect. Even more, these macromolecules are very sensitive to environmental conditions (e.g., acidic pH of the stomach) and usually lead to toxic side effects after systemic administration in high doses. In view of the fact, drug delivery systems involving the use of polymers have become the major focus of this research in order to enhance the therapeutic index of this biomolecules (effectiveness and safety) by means of a localized and sustained release at the target site, without resulting in undesirable side effects. However, a great deal of research is still required to make most of these delivery methods feasible for commercialization (Arias, 2008; Dai et al., 2005).

Recently, we have developed a Flow Focusing (FF) method for the microencapsulation of drugs. This technique allows the easy formulation of well-formed polymeric systems with very suitable drug carrying properties: great entrapment efficiencies and drug loading values, and very slow (biphasic) drug release profiles (Holgado et al., 2008). FF has been suggested to enable the control of the size, the surface characteristics and the internal structure of the synthesized systems. Additionally, FF has many general advantages including: *i*) it is a simple and scalable one-step approach, making additional purification and separation procedures unnecessary; *ii*) it allows for the encapsulation of labile compounds, unlike many of the high-energy physical approaches of generating monodisperse droplets through the breaking up of larger droplets; *iii*) it is compatible with different fluid mixtures (liquid-liquid, liquid-gas) and does not require surfactants, although their use might support droplet formation; *iv*) particle size can be adjusted by changing the fluid flow velocity of the two phases; *v*) droplet size is not limited by the injector and orifice size, i.e., droplets can be much smaller than the orifice size; and *vi*) offers the generation of droplets and microspheres at low costs. Compared to other preparation procedures, such as spray drying or emulsion/solvent evaporation, FF lacks an overall high throughput. However, this inconvenience can be overcome

by scaling up of the FF process into arrays of hundreds or even thousands of fluid streams (He, 2008; Holgado et al., 2008; Martín-Banderas et al., 2005; 2006; Schneider et al., 2008; Xu et al., 2009).

In this work, we study the utility and versatility of FF in the preparation of polymer-based delivery systems loaded with either peptides or proteins, and intended for non-parenteral routes of administration, mainly the oral route, to obtain a local and/or systemic effect. With that aim, we engineered PLGA particles loaded with green fluorescent protein (GFP) by FF. To our knowledge, this novel technique has never been applied to the formulation of proteins in polymeric systems. The vehiculization of this fluorescent protein will facilitate this purpose, because its incorporation and distribution inside the polymer particles will be easily checked by confocal laser scanning microscopy (CLSM). GFP is a 26.9 kDa protein characterized by a tightly packed “ β can” tertiary structure made up of 238 amino acids (Niwa et al., 1996; Yang et al., 1996; Bilati et al., 2005; McRae et al., 2005). Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) is a biocompatible and biodegradable polyester that was approved by the FDA for drug delivery and that is commonly used for the microencapsulation of therapeutics and antigens (Anderson and Shive, 1997; Jain, 2000; Kumar et al., 2001; Fu et al., 2005; Arias, 2008).

In order to obtain GFP-loaded PLGA particles with a narrow size distribution and the best loading properties, we investigated two important parameters related to the FF device: the liquid flow rate and the pressure of the focusing air. Furthermore, a specific and rapid reversed-phase HPLC (RP-HPLC) method coupled with fluorescence detection was validated for the quantification of GFP loading into PLGA microparticles. RP-HPLC is a powerful and sensitive technique for the separation and determination of peptides and proteins in both artificial and biological environments (Sarmiento et al., 2006), that to our knowledge has never been applied to GFP determination in polymeric systems.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Green Fluorescent Protein (GFP) was purchased from Biomedal S.L. (Spain). Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA 50:50) Resomer[®] RG 502 (Mw: 12000; inherent viscosity: 0.24 dL/g) was obtained from Boehringer Ingelheim (Germany). All other chemicals used were of analytical quality from Panreac (Spain), except for trifluoroacetic acid (TFA, obtained from Sigma-Aldrich, Germany) and Span[®] 60 (Acofarma[®], Spain). Water used in the experiments was deionized and filtered (Milli-Q Academic, Millipore, France).

The RP-HPLC analysis was carried out on a Hitachi LaChrom[®] (D-7000) Series HPLC system equipped with a L-7200 automatic injector, an interphase D-7000 and a quaternary pump (model L-7100), and coupled with a L-2485 fluorescence detector (Merck-Hitachi, Germany). A Waters Symmetry Shield[®] RP18 column (USA, 3.5 μ m, 4.6 \times 150 mm) kept at 15.0 \pm 0.1 $^{\circ}$ C (L-2350 column oven, Elite LaChrom[®]) was used in this analysis. Data collection and calculation was done by using HSM software (Merck-Hitachi, Germany).

2.2. Preparation of the GFP-loaded PLGA microparticles

A water-in-oil emulsion was prepared by mixing for 6 min 357.7 μ L of a GFP aqueous solution (0.27 %, w/v) and 9.66 μ L of a 4 % (w/v) PLGA solution in ethyl acetate containing Span[®] 60 (0.5 %, w/v) (Branson 5200E4 ultrasonic 188 bath, USA, operating at 40 kHz with a sonic power of 100 W). This emulsion was sprayed inside a chamber with an inlet temperature of 50 \pm 5 $^{\circ}$ C by using a standard FF nozzle [model Advant 2 (D = 100 μ m), Ingeniatics Tecnologías S.L., Spain] fixed at different flow rates and pressures (table 1). The polymeric particles were collected at the bottom of the chamber as a dry powder on a plate, and freeze-dried [frozen in liquid nitrogen and lyophilized (-80.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C, and 0.057 mbar; Telstar Cryodos, Spain)] and stored at 4.0 \pm 0.5 $^{\circ}$ C, in order to increase their physicochemical stability but without significantly modifying the

characteristics of the PLGA-based delivery system. All the formulations were prepared in nonaplicate (n = 9).

Formulation	Flow rate (mL/h)	Pressure (mbar)
1	4	50
2	6	50
3	8	50
4	4	100
5	6	100
6	8	100
7	4	200
8	6	200
9	8	200

Table 1. Formulations of GFP-loaded PLGA microparticles obtained by Flow Focusing (FF) under different preparation conditions.

2.3. Characterization methods

The mean particle size and particle size distributions of GFP-loaded PLGA microparticles were measured at 25.0 ± 0.5 °C by a laser scattering technique (Malvern Mastersizer 2000 laser light scattering instrument, Malvern Instruments Ltd., UK), after 60 min of mechanical stirring (50 rpm). The selected angle was 90° and the measurement was made after dilution of the protein-loaded polymer aqueous suspensions. In order to confirm these results, the mean particle diameters were also measured from scanning electron microscopy (SEM) pictures of 100 particles by using a Zeiss DSM 950 (Germany) scanning electron microscope set at 80 kV accelerating voltage. Prior to observation, a dilute microparticle suspension (≈ 0.1 %, w/v) was sonicated for 5 min, and drops of the suspension were placed on copper grids with formvar film. The grids were then dried at 35.0 ± 0.5 °C in a convection oven.

The analysis of the presence and distribution of GFP in PLGA microparticles was carried out by confocal laser scanning microscopy (CLSM) (DM-IRE2 microscope, Leica Microsystems, Germany). In order to

extensively characterize the type of GFP loading (surface adsorption or absorption inside the polymeric matrix) to PLGA particles, the zeta potential (ζ)-pH trend and ζ -ionic strength dependence were investigated in all the GFP-loaded PLGA formulations and in non-loaded PLGA particles (Holgado et al., 2008). Briefly, the surface electrical properties of these microparticle suspensions (≈ 0.1 %, w/v) were analyzed by electrophoresis as a function of both pH (adjusted with either HNO₃ or KOH) and KNO₃ concentration using a Malvern Zetasizer 2000 electrophoresis device (Malvern Instruments Ltd., U.K.). Measurements were performed at 25.0 ± 0.5 °C, after 24 h of contact at this temperature under mechanical stirring (50 rpm). The experimental uncertainty of the measurements was < 5 %. The theory of O'Brien and White (1978) was used to convert the electrophoretic mobility (u_e) into ζ values. Finally, this data was also used in the investigation of the influence of changes in the parameters of PLGA production by FF (flow rate and pressure) on the surface electrical properties (electrokinetics) of the PLGA microparticles.

2.4. Chromatographic conditions

The introduction of new HPLC methods for routine quality control of pharmaceutical preparations starts with the establishment of the optimal measurement conditions, and provides the maximum relevant information by analyzing the experimental data (García et al., 2003; Pérez-Lozano et al., 2004; Zaxariou and Panderi, 2004; Salas et al., 2008).

The mobile phase consisted of ACN 0.04 % TFA/H₂O 0.04 % TFA. The mobile phase was filtered through a 0.22 μ m nitrocellulose-membrane filter (Millipore, Barcelona) and degassed under vacuum prior to use. The flow rate was 0.5 mL/min.

A linear gradient of:

- 5 - 24 % of ACN in 6 minutes
- 24 - 50 % of ACN in 4 minutes
- 50 - 5 % of ACN in 17 minutes.

Eluent was pumped at a flow rate of 0.5 mL/min and the injection volume was 50 μ L. GFP was detected at an excitation wavelength of 503 nm and at an emission wavelength of 573 nm. All the measurements were carried out at room temperature (25.0 ± 0.5 °C) and the total peak area was used to quantify the protein.

2.5. Preparation of the GFP solutions

A primary stock solution of GFP (2.7 mg/mL) was accurately prepared and filtered through a 0.45 μ m nylon membrane filter (Millipore, Spain), following by rigorous dilution to obtain secondary standard solutions ranging from 0.5 to 1.5 mg/mL. These solutions were protected against ambient light, wrapping all glassware with aluminium foil, and stored at 4.0 ± 0.5 °C. No GFP precipitation or aggregation was observed after 8 months, as was confirmed by RP-HPLC. Freshly prepared solutions were used in all the determinations.

The preparation of GFP-loaded PLGA microparticle samples for RP-HPLC involved the addition of an adequate amount of GFP-loaded polymer (equivalent to 5 mg of GFP) to 2 mL of an ACN solution in a volumetric flask of 5 mL. This solution was sonicated for 15 min, diluted with 2 mL of methanol, and filtered through a 0.45 μ m nylon membrane filter (Millipore, Spain).

2.6. Validation of the RP-HPLC method

The method was validated in agreement with the International Conference on Harmonization guidelines (ICH, 1996) by using linearity, precision, accuracy, specificity, and detection and quantification limits as analytical parameters. System and method linearity were evaluated by assessing a regression line using the least squares method. Calibration curves were obtained by preparing three separate batches of five GFP concentrations (0.5, 0.75, 1, 1.25 and 1.5 mg/mL). The samples used in the determination of method linearity were ACN solutions of GFP-loaded PLGA microparticles with the same content in GFP as the GFP solutions used in the analysis of the system linearity (0.5, 0.75, 1, 1.25 and 1.5 mg/mL).

Instrumental precision was determined by testing 6 consecutive times in the same day the repeatability of a standard GFP solution (1.6 mg/mL). Acceptance criterion was set at a relative standard deviation (RSD) $\leq 1.5\%$.

Method repeatability was determined by using the results obtained in the accuracy test (acceptance criterion: RSD $\leq 2.0\%$). Intermediate precision was evaluated by analyzing the same sample by different analysts in two different days (Peroza Meza et al., 2006).

The accuracy characterizes the proximity between the obtained experimental results and the real results and can be assessed by the determination of the percentage recovery of a known amount of GFP. The accuracy of the method was first tested by calculating the percentage recoveries of the mean of three determinations of GFP in samples where a known amount of protein was added to a blank PLGA solution (GFP concentrations: 0.5, 0.75, 1, 1.25 and 1.5 mg/mL, corresponding respectively to the concentration levels: 50, 75, 100, 125 and 150 %). The accuracy was also assessed by determining the RSD.

In order to determine the capacity of this analytical technique to identify interferences coming from impurities, degradation products or any formulation component, the specificity of the method was investigated. Specificity was checked by running GFP standard solutions (2.7 mg/mL), ACN solutions of GFP-loaded PLGA microparticles (2 mg/mL) and ACN solutions of blank PLGA microparticles (2 mg/mL). All the preparations contained the same GFP concentration or the same PLGA content, and the determinations were performed under the same conditions. The specificity of the RP-HPLC method was also checked under different protein degradation conditions (pH, light and temperature) in triplicate. The effect of pH was studied after contact during 24 h of GFP standard solutions with appropriate $[H^+]$ (0.5 N HNO_3) or $[OH^-]$ (0.5 N KOH). The effect of exposure to light was studied by placing one set of glassware under ambient light during 24 h. To check the effect of temperature, samples were kept at $60.0 \pm 0.5\text{ }^\circ\text{C}$ during 24 h.

The detection limit (DL) can be defined as the lowest concentration of analyzed substance in a certain sample that can be detected under certain conditions by a given method. The quantitation limit (QL) is the lowest concentration that can be determined at an acceptable precision and

accuracy. These parameters were determined by using the following expressions:

$$DL = \frac{3.3\sigma}{S} \qquad QL = \frac{10\sigma}{S}$$

where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve (GFP concentrations ranged from 0.01 to 0.4 mg/mL).

2.7. GFP loading of PLGA microparticles

Samples from the protein-loaded PLGA microparticles obtained under different synthesis conditions (table 1) were added to 2 mL of ACN. This solution was sonicated for 15 min, diluted with 2 mL of methanol, and filtered through a 0.45 μ m nylon membrane filter (Millipore, Spain) before RP-HPLC analysis. GFP incorporation to PLGA microparticles was expressed in terms of GFP entrapment efficiency (EE, %) [encapsulated GFP (mg) / total GFP in the colloidal suspension (mg) \times 100] (Brigger et al., 2004). In order to determine the variations in particle size when PLGA was loaded with GFP, statistical analysis was performed by the use of the Student's *t*-test. Values with $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were considered as significantly different.

3. Results and Discussion

3.1. Chromatographic study

We have developed a simple RP-HPLC method for the determination of GFP in PLGA microparticles with the best chromatographic peak resolution, reduced run time and low cost of analysis. This method permits the analysis of a large series of samples, avoiding possible degradation associated to a long analysis time. Figure 1 shows representative chromatograms of a GFP standard solution and of ACN solutions of GFP-loaded PLGA microparticles. As can be observed in this figure, the relatively symmetrical GFP peak has a retention time of \approx 12.2 min. No peaks from possible

degradation products were observed in the chromatograms, probing the purity of the GFP used in the study and its stability in stock solutions.

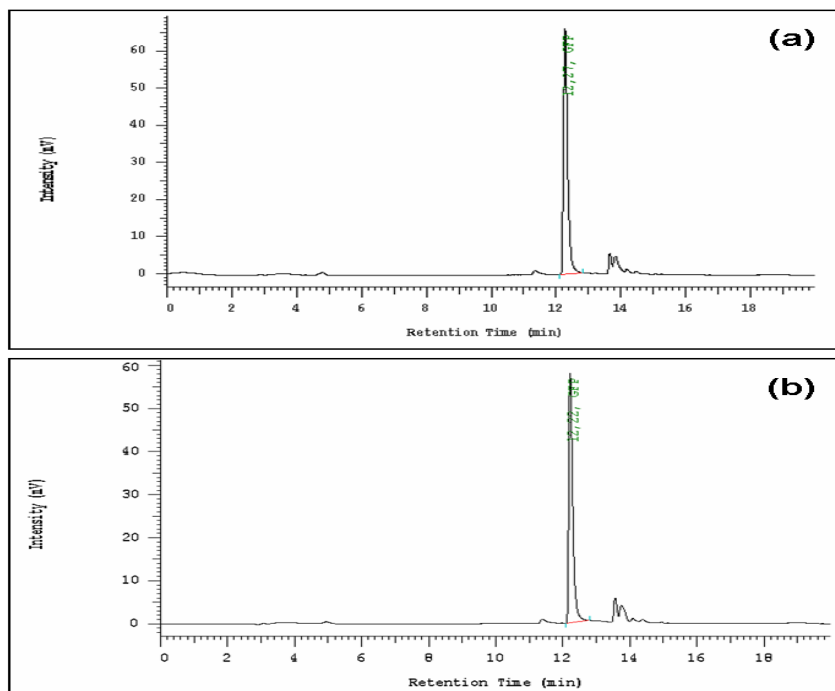


Figure 1. Representative chromatograms of GFP detection in (a) standard solutions, and in (b) ACN solutions of GFP-loaded PLGA microparticles.

3.2. Method validation

Good system linearity was obtained in the range of the study (figure 2a). The calibration curve was $y = 892754 \cdot x + 4251$, where y represents the peak area and x represents the GFP concentration (mg/mL). The standard error was 13654 and the correlation coefficient (R^2) was 0.9992 ($n = 15$). With respect to the linearity of the method (figure 2b), the calibration curve was $y = 881712 \cdot x + 12686$ and the R^2 was 0.9993 ($n = 15$). In both cases, the R^2 was ≥ 0.999 , indicating a good linearity in the GFP concentration range (0.5-1.5 mg/mL) (table 2).

STATISTIC REPORT FOR THE SYSTEM LINEARITY						
ANOVA						
	d.f.	SS	MS	F	Significance F	
Regression	1	1.49439·10 ¹²	1.49439·10 ¹²	8015.637427	1.5754·10 ⁻¹⁹	
Residual	13	2423650760	186434673.9			
Total	14	1.49682·10 ¹²				
	Coefficient	Standard error	t-Stat	p-value	Lower 95 %	Upper 95 %
Intercept	4251.4	10576.42682	0.401969405	0.694237146	-18597.58096	27100.381
Area	892753.8667	9971.550836	89.5300923	1.5754·10 ⁻¹⁹	871211.6408	914296.093
STATISTIC REPORT FOR THE METHOD LINEARITY						
ANOVA						
	d.f.	SS	MS	F	Significance F	
Regression	1	1.49439·10 ¹²	1.49439·10 ¹²	8015.637427	1.5754·10 ⁻¹⁹	
Residual	13	2423650760	186434673.9			
Total	14	1.49682·10 ¹²				
	Coefficient	Standard error	t-Stat	p-value	Lower 95 %	Upper 95 %
Intercept	12685.86667	9623.553732	1.318210198	0.210188338	-8104.55714	33476.2905
Area	881712.6667	9073.173471	97.17797962	5.43563·10 ⁻²⁰	862111.2671	901314.066

Table 2. Statistic report for the system and method linearities.

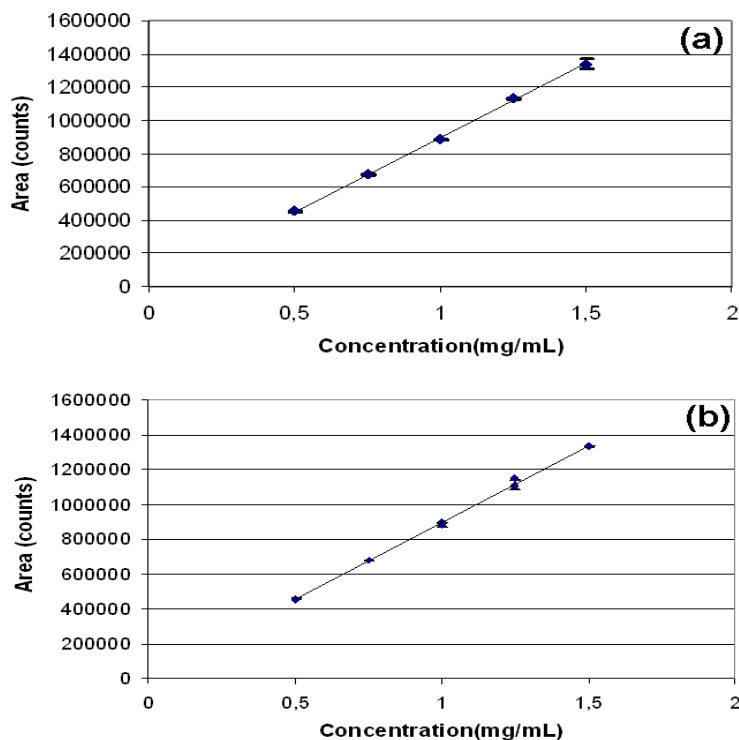


Figure 2. Calibration curves of GFP solutions (a), and ACN solutions of GFP-loaded PLGA microparticles (b). GFP concentration range: 0.5-1.5 mg/mL.

Instrumental precision was determined after testing 6 consecutive times a standard GFP solution (1.6 mg/mL). The mean peak area was 868318 ± 1336 (RSD = 0.154 %) and the mean retention time was 12.8 min (RSD = 0.24 %). According to these results, the instrumental precision is satisfactory (RSD < 1.5 %). Method repeatability was considered valid as the RSD values were ≤ 2.0 % (table 3). Intermediate precision was evaluated by analyzing the same sample by different analysts in two different days. The results obtained in this analysis are collected in table 4 and, as can be observed, the RSD values were under the limit of

acceptance (RSD < 2.0 %). This proved that the variations settled in the test did not influence the experimental method and showed the good precision of the analytical method. Moreover, the MANOVA statistical test confirmed that no statistical differences occurred between days and analysts ($p = 0.778$).

Level	Theoretical GFP content (mg)	Peak area	Experimental GFP content (mg)	Recovery (%)
I	0.5	457110	0.5073	101.45
	0.5	450321	0.4997	99.93
	0.5	456155	0.5062	101.24
	Mean value	454529 ± 3675	0.5044 ± 0.0041	100.87 ± 0.82
	RSD	0.8086	0.8162	0.8162
II	0.75	675213	0.7516	100.21
	0.75	675581	0.7519	100.26
	0.75	674845	0.7512	100.15
	Mean value	675213 ± 368	0.7516 ± 0.0004	100.21 ± 0.06
	RSD	0.0545	0.0548	0.0548
III	1	880267	0.9812	98.12
	1	880205	0.9812	98.12
	1	900329	1.0037	100.37
	Mean value	886934 ± 11601	0.9887 ± 0.0129	98.87 ± 1.29
	RSD	1.3079	1.3143	1.3143
IV	1.25	1110592	1.2392	99.14
	1.25	1103792	1.2316	98.53
	1.25	1151864	1.2855	101.84
	Mean value	1122083 ± 26014	1.2521 ± 0.0291	100.17
	RSD	2.3184	2.3272	2.3272
V	1.5	1334509	1.4901	99.34
	1.5	1330440	1.4855	99.03
	1.5	1334755	1.4903	99.36
	Mean value	1333235 ± 2423	1.4886 ± 0.0027	99.24 ± 0.18
	RSD	0.1818	0.1824	0.1824

Table 3. Recovery values of ACN solutions of GFP-loaded PLGA microparticles. Concentration range: 0.5-1.5 mg/mL (level I: 0.5mg/mL; level II: 0.75 mg/mL; level III: 1 mg/mL; level IV: 1.25 mg/mL; level V: 1.5mg/mL).

Analyst / Day (Sample)	Theoretical GFP content (mg)	Peak Area	Experimental GFP content (mg)	Mean value	RSD	Recovery (%)
1 / 1 (1)	0.47	413751	0.46			97.59
1 / 1 (2)	0.46	415506	0.46	0.46 ± 0.01	0.30	100.14
2 / 1 (1)	0.48	424962	0.47			98.18
2 / 1 (2)	0.47	423318	0.47	0.47 ± 0.01	0.28	99.87
1 / 2 (1)	0.48	421112	0.47			97.28
1 / 2 (2)	0.48	422444	0.47	0.47 ± 0.01	0.23	97.59
2 / 2 (1)	0.48	419864	0.47			96.99
2 / 2 (2)	0.49	423841	0.47	0.47 ± 0.01	0.67	95.92
Mean value	0.48 ± 0.01	420599 ± 4035	0.47 ± 0.01	0.47 ± 0.01	0.37	97.95 ± 1.43
RSD	1.92	0.96	0.97			1.46

Table 4. Method repeatability evaluated by analyzing the same sample by different analysts in two different days.

The investigation of the accuracy of the method revealed that recovery values (%) were between 98.12 % and 101.84 % (table 3) and that the mean RSD was 0.934 %. It was not needed to carry out any other statistical test since the ICH limit value for pharmaceutical formulations establishes a recovery between 98 % and 102 % (equivalent to ± 2.0 % of the relative error). These results demonstrated the coincidence between experimental and theoretical values and, therefore, it can be concluded that the RP-HPLC method is accurate.

The specificity of the method was verified by analyzing potential interfering peaks of the formulation components at GFP retention time. The RP-HPLC method was found to be specific as no interfering peaks were observed in the chromatogram with a similar retention time to that of the protein. The three chromatograms measured at different times were within the established threshold for the GFP peak. Furthermore, the specificity of the RP-HPLC method was also confirmed by studying the possible interference of the protein degradation products (coming from the exposure of GFP to different pH, light and temperature conditions) with the GFP peak. Under these degradation conditions, it can be said that the protein is almost completely degraded, giving rise to high amounts of degradation products that did not interfere with the GFP peak (table 5).

The detection limit (DL) and the quantitation limit (QL) were found to be 0.1 and 0.2 mg/mL, respectively. These values are slightly lower in comparison to the ones obtained for other important biomedical proteins such as insulin by using other RP-HPLC methods (Sarmiento et al., 2006), which could be pointed as an advantage compared with them.

Sample	Peak Area	Degradation (%)
Fresh GFP standard solution	621353 ± 14013	—
After light exposure	8696 ± 88	98.6
After heating (60.0 ± 0.5 °C)	40834 ± 724	93.4
After contact with 0.5 N HNO ₃	91836 ± 1622	85.2
After contact with 0.5 N KOH	19860 ± 21	96.8

Table 5. Peak areas and degradation degree (%) corresponding to GFP standard solutions (1.6 mg/ml) under different degradation conditions.

3.3. Characterization of the GFP-loaded PLGA microparticles

3.3.1. Particle geometry

GFP-loaded PLGA microparticles were of spherical shape and with a smooth surface. This particle morphology was not significantly influenced by the FF conditions. All the formulations were in the colloidal size range and moderately monodisperse. Figure 3a shows, as an example, a scanning electron microscopy (SEM) picture of microparticles from formulation 9. As it was observed by CLSM (figure 3b), GFP was uniformly distributed inside the microparticles in all the formulations.

The size (mean diameter ± SD) of the GFP-loaded PLGA formulations can be compared in table 6 with the corresponding theoretical values that were calculated by using a mathematical model that considers the main geometrical parameters and the flow parameters (liquid flow rate and pressure of the focusing air) of the FF device, and the properties of the fluid (density, viscosity and surface tension) (Gañán-Calvo, 1998; Martín-Banderas et al., 2006). Briefly, this mathematical model defined a simple

and universal expression for the jet diameter at the hole exit of the flow focusing device:

$$d_j \cong \left(\frac{8\rho_l}{\pi^2 \Delta P_g} \right)^{1/4} Q^{1/2} \quad (3)$$

where, d_j is the mean particle diameter, ρ_l is the liquid density, ΔP_g is the pressure gradient and Q is the flow rate.

Formulation	Theoretical size (µm)	Experimental size (µm)	Entrapment efficiency (%)
1	10.9	11.5 ± 0.7	91.9 ± 1.2
2	12.7	12.3 ± 1.2	92.1 ± 1.8
3	14.1	13.9 ± 0.8	91.8 ± 2.0
4	8.1	7.8 ± 0.9	90.5 ± 1.6
5	9.2	8.4 ± 0.5	92.7 ± 2.2
6	10.2	10.5 ± 0.8	90.8 ± 1.9
7	5.8	4.2 ± 0.3	90.2 ± 1.9
8	6.6	4.9 ± 0.2	92.5 ± 1.2
9	7.3	7.1 ± 0.5	92.1 ± 2.1

Table 6. Theoretical and experimental sizes, and protein entrapment efficiency of the formulations of GFP-loaded PLGA microparticles obtained by flow focusing.

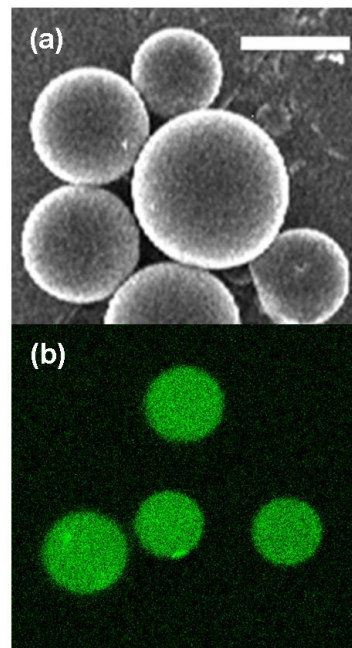


Figure 3. Scanning electron microscope (SEM) (a) and confocal laser scanning microscopy (CLSM) (b) pictures of GFP-loaded PLGA microparticles (formulation 9).
Bar length: 2 μm .

Taking into account the statistical analysis that was done, a good linear relationship between theoretical and experimental values was found ($n = 9$; $F = 160.01$; $p < 0.0001$) (figure 4a) and, thus, it could be theoretically calculated the experimental conditions (flow rate and pressure) needed to obtain a given size (figure 4b). This is particularly important since these experimental conditions are determined by the properties of the fluid (Gañán-Calvo et al., 2006; Sakai et al., 2006; Ong et al., 2007; He, 2008). Therefore, FF technique allows to control and, even more, to predict the size of the GFP-loaded PLGA microparticles. As it can be checked in table 6, the liquid flow rate and the pressure of the focusing air seems to determine the size of the GFP-loaded PLGA microparticles. An increase in the flow rate (at a constant pressure) induced the formation of microparticles with a bigger size. On the opposite, an increase in the pressure (keeping the flow rate constant) determined a significant reduction in the particle size and a narrow size distribution.

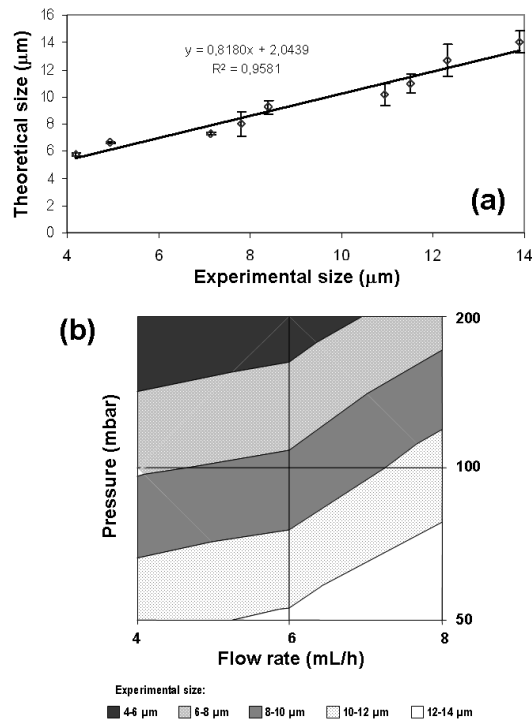


Figure 4. Relation between the theoretical size and the experimental size of the GFP-loaded PLGA microparticles (a), and (b) between the flow parameters (liquid flow rate and pressure of the focusing air) and the experimental size of the GFP-loaded PLGA microparticles.

3.3.2. Electrokinetic properties

We first focussed our study on the effect of pH on the zeta potential, ζ , of the non-loaded PLGA and GFP-loaded PLGA microparticles. Thus, figure 5a shows this quantity as a function of pH in the presence of 10^{-3} M KNO_3 . Note that ζ is negative for almost the whole pH interval investigated, and that it rises in absolute value as the pH increased. As it is observed, both non-loaded PLGA and GFP-loaded PLGA microparticles show a well defined isoelectric point (pH_{iep} or pH of zero potential) close to $\text{pH} \approx 2.5 - 2.8$. This behaviour can be explained on the basis of the charge generation mechanism at the polymer/solution interface: we can expect that

the chemical species responsible for the generation of the negative surface charge on PLGA are ionized weak acid groups, presumably carboxylic-end groups (Mu and Feng, 2001; Teixeira et al., 2005; Musumeci et al., 2006; Okassa et al., 2007). In addition, this negative charge could also be due to strong groups corresponding to dissociated end molecules of the polysorbate surfactant Span[®] 60 used in the synthesis, that remain adsorbed on the particle surface even after the cleaning procedure. The increasingly negative values and charge density may be explainable by the effect of increasing OH⁻ ion concentration in the solution, which tends to favour a gain in protons. In contrast, a decrease in absolute ζ as pH becomes more acidic may be explainable by neutralization of the negative regions as a result of chemical adsorption of increasing numbers of H⁺ ions (Ruiz et al., 2004; Arias et al., 2007).

In order to confirm these results, we also measured ζ as a function of KNO₃ concentration at a constant pH = 5. ζ is negative for the whole ionic strength interval investigated, and falls in absolute value as the KNO₃ concentration increased, due to the double-layer compression (figure 5b). The counterions accumulate closer to the particle surface, such that the double layer shrinks as concentration increases. This leads to a lower electrical potential in the shear plane (or slip surface) that limits the value of the zeta potential (Dillen et al., 2004).

Finally, the results of this analysis, plotted in figure 5, clearly showed how similar are the electrokinetics of non-loaded PLGA particles and the electrokinetics of all the formulations of GFP-loaded PLGA microparticles. This points out that the protein was not adsorbed onto the polymeric surface and, consequently, a very efficient GFP entrapment have led to GFP-loaded PLGA particles which, from an electrokinetic point of view, are indistinguishable from non-loaded PLGA (Nicoli et al., 2001; Dillen et al., 2004; Teixeira et al., 2005; Díez and Tros de Ilarduya, 2006; Gómez-Gaete et al., 2007). Furthermore, this data clearly demonstrated that a modification in the parameters of particle production by FF (flow rate and pressure) did not influence the surface electrical properties of the particles.

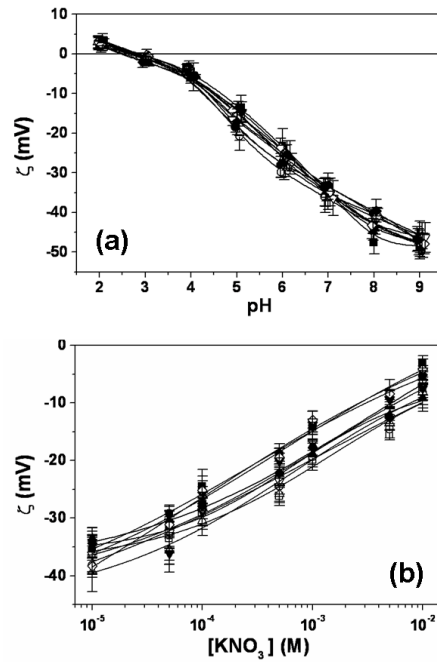


Figure 5. Zeta potential of blank PLGA (■), formulation 1 (□), formulation 2 (●), formulation 3 (○), formulation 4 (▲), formulation 5 (△), formulation 6 (▼), formulation 7 (▽), formulation 8 (◆) and formulation 9 (◇), as a function of (a) pH in the presence of 10^{-3} M KNO_3 , and (b) KNO_3 concentration at pH = 5. The lines are guides to the eye

3.3.3. GFP loading to PLGA microparticles

The proposed RP-HPLC method was successfully applied to the determination of the amount of GFP incorporated to the PLGA microparticles. It was demonstrated that none of other microparticle components interfered with the GFP analysis, but a filtration step (through a $0.45 \mu\text{m}$ nylon membrane filter) is needed to protect the column from contamination and delay pre-column obstruction.

FF allows obtaining high GFP entrapment efficiencies in PLGA microparticles (> 90 %), whatever the synthesis conditions (liquid flow rate and pressure of the focusing air) (table 6). Furthermore, in comparison to non-loaded PLGA (data not shown for brevity), particle geometry (morphology, surface and size) did not vary significantly when GFP was

loaded to this polymer, as was previously observed with other biomolecules (Teixeira et al., 2005; Holgado et al., 2008).

4. Conclusions

A novel synthesis procedure (flow focusing) has been developed for the preparation of protein-loaded PLGA microparticles by using GFP as a model protein. This technique allowed obtaining polymeric microparticles with a controllable size and an optimum GFP loading. A mathematical model was satisfactorily applied for the determination of the formulation conditions to achieve the desired particle size. GFP determination was carried out by a fast RP-HPLC method that was validated according to ICH guidelines. These very interesting results encourage further investigations to formulate peptide- and protein-loaded PLGA microparticles by FF, and to study the possibilities of controlling particle size without reducing the protein loading. Work is undergoing for the preparation of insulin-loaded PLGA microparticles by this novel technique.

5. Acknowledgements

Technical support from Ingeniatics Tecnologías S.L. (Spain) is gratefully acknowledged. Financial support from Junta de Andalucía, Spain, under projects P06-CTS-01688 is gratefully acknowledged.

6. References

- Anderson, J.M., Shive, M.S. 1997. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 28, 5-24.
- Arias, J.L., López-Viota, M., Ruiz, M.A., López-Viota, J., Delgado, A.V. 2007. Development of carbonyl iron/ethylcellulose core/shell nanoparticles for biomedical applications. *Int. J. Pharm.*, 339, 237-245.
- Arias, J.L., 2008. Novel strategies to improve the anticancer action of 5-fluorouracil by using drug delivery systems. *Molecules*, 13, 2340-2369.

Bilati, U., Allémann, E., Doelker, E., 2005. Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59, 375-388

Brigger, I., Morizet, J., Laudani, L., Aubert, G., Appel, M., Velasco, V., Terrier-Lacombe, M.J., Desmaële, D., d'Angelo, J., Couvreur, P., Vassal, G., 2004. Negative preclinical results with stealth[®] nanospheres-encapsulated doxorubicin in an orthotopic murine brain tumor model. *J. Control. Release*, 100, 29-40.

Dai, C., Wang, B., Zhao, H., 2005. Microencapsulation peptide and protein drugs delivery system. *Colloids Surf B: Biointerfaces*, 41, 64-70.

Díez, S., Tros de Ilarduya, C., 2006. Versatility of biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for plasmid DNA delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 63, 188-197.

Dillen, K., Vandervoort, J., Van den Mooter, G., Verheyden, L., Ludwig, A., 2004. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 275, 171-187.

Fu, X., Ping, Q., Gao, Y., 2005. Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres. *J. Microencapsulation*, 22, 57-66.

Gañán-Calvo, A.M., 1998. Generation of Steady Liquid Microthreads and Micron-Sized Monodisperse Sprays in Gas Streams. *Phys. Rev. Lett.*, 80, 285-288.

Gañán-Calvo, A.M., Martín-Banderas, L., González-Prieto, R., Rodríguez-Gil, A., Berdún-Álvarez, T., Cebolla, A., Chávez, S., Flores-Mosquera, M., 2006. Straightforward production of encoded microbeads by Flow Focusing: potential applications for biomolecule detection. *Int. J. Pharm.*, 324, 19-26.

García, C.V., Breier, A.R., Steppe, M., Schapoval, E.E.S., Oppe, T.P., 2003. Determination of dexamethasone acetate in cream by HPLC. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 31, 597-600.

He, Y., 2008. Application of flow-focusing to the break-up of an emulsion jet for the production of matrix-structured microparticles. *Chem. Engin. Sci.*, 63, 2500-2507.

Gómez-Gaete, C., Tsapis, N., Besnard, M., Bochet, A., Fattal, E., 2007. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 331, 153-159.

Holgado, M.A., Arias, J.L., Cózar, M.J., Álvarez-Fuentes, J., Gañán-Calvo, A.M., Fernández-Arévalo, M., 2008. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties. *Int. J. Pharm.*, 358, 27-35.

ICH, 1996. International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Methodology (ICH-Q2B).

Jain, R.A., 2000. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials*, 21, 2475-2490.

Kumar, N., Ravikumar, M.N.V., Domb, A.J., 2001. Biodegradable block copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 53, 23-44.

Martín-Banderas, L., Flores-Mosquera, M., Riesco-Chueca, P., Rodríguez-Gil, A., Cebolla, A., Chávez, S., Gañán-Calvo, A.M., 2005. Flow Focusing: a versatile technology to produce size-controlled and specific-morphology microparticles. *Small*, 1, 688-692.

Martín-Banderas, L., Rodríguez-Gil, A., Cebolla, A., Chávez, S., Berdún-Álvarez, T., Fernández, J.M., Flores-Mosquera, M., Gañán-Calvo, A.M., 2006. Towards a high throughput production of uniform encoded microparticles. *Adv. Materials*, 18, 559-564.

McRae, S.R., Brown, C.L., Bushell, G.R., 2005. Rapid purification of EGFP, EYFP and ECFP with high yield and purity. *Protein Expr. Purif.*, 41, 121-127.

Mu, L., Feng, S.S., 2001. Fabrication, characterization and in vitro release of paclitaxel (Taxol[®]) loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by spray drying technique with lipid/cholesterol emulsifiers. *J. Control. Release*, 76, 239-254.

Musumeci, T., Ventura, C.A., Giannone, I., Ruozi, B., Montenegro, L., Pignatello, R., Puglisi, G., 2006. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Int. J. Pharm.*, 325, 172-179.

Nicoli, S., Santi, P., Couvreur, P., Couarraze, G., Colombo, P., Fattal, E., 2001. Design of triptorelin loaded nanospheres for transdermal iontophoretic administration. *Int. J. Pharm.*, 214, 31-35.

Niwa, H., Inouye, S., Hirano, T., Matsuno, T., Kojima, S., Kubota, M., Ohashi, M., Tsuji, F.I., 1996. Chemical nature of the light emitter of the Aequorea green fluorescent protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 13617-13622.

O'Brien, R.W., White, L.R., 1978. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 2, 1607-1626.

Okassa, L.N., Marchais, H., Douziech-Eyrolles, L., Hervé, K., Cohen-Jonathan, S., Munnier, E., Soucé, M., Linassier, C., Dubois, P., Chourpa, I., 2007. Optimization of iron oxide nanoparticles encapsulation within poly(D,L-lactide-co-glycolide) sub-micron particles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67, 31-38.

Ong, W.L., Hua, J., Zhang, B., Teo, T.Y., Zhuo, J., Nguyen, N.T., Ranganathan, N., Yobas, L., 2007. Experimental and computational analysis of droplet formation in a high-performance flow-focusing geometry. *Sens. Actuators A*, 138, 203-212.

Pérez-Lozano, P., García-Montoya, E., Orriols, A., Miñarro, M., Tico, J.R., Suñé-Negre, J.M., 2004. Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of alprazolam in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 34: 979-987.

Peroza Meza, C., Santos, M.A., Romanach, R.J., 2006. Quantitation of drug content in a low dosage formulation by transmission near infrared spectroscopy. *AAPS PharmSciTech.*, 7, article 29.

Ruiz, M.A., Gallardo, V., Ouazzani, N., López-Viota, J., López-Durán, J.D.G., 2004. Electrophoretic properties of acrylic latex suspensions (Kollicoat[®] MAE 30 D) and ibuprofen. *Il Farmaco*, 59, 657-662.

Sakai, S., Hashimoto, I., Kawakami, K., 2006. Usefulness of flow focusing technology for producing subsieve-size cell enclosing capsules: application for agarose capsules production. *Biochem. Eng. J.*, 30, 218-221.

Salas, S., Talero, B., Rabasco, A.M., González-Rodríguez, M.L., 2008. Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the assay of lidocaine hydrochloride in alginate-Gantrez[®] microspheres. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 47, 501-507.

Sarmiento, B., Ribeiro, A., Veiga, F., Ferreira, D., 2006. Development and validation of a rapid reversed-phase HPLC method for the determination of insulin from nanoparticulate systems. *Biomed. Chromatogr.*, 20, 898-903.

Schneider, T., Zhao, H., Jackson, J.K., Chapman, G.H., Dykes, J., Häfeli, U.O., 2008. Use of Hydrodynamic Flow Focusing for the Generation of Biodegradable Camptothecin-Loaded Polymer Microspheres. *J. Pharm. Sci.*, DOI: 10.1002/jps.21344.

Teixeira, M., Alonso, M.J., Pinto, M.M.M., Barbosa, C.M., 2005. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59, 491-500.

Xu, Q., Hashimoto, M., Dang, T.T., Hoare, T., Kohane, D.S., Whitesides, G.M., Langer, R., Anderson, D.G., 2009. Preparation of monodisperse biodegradable polymer microparticles using a microfluidic flow-focusing device for controlled drug delivery. *Small*, 5, 1575-1581.

Yang, F., Moss, L.G., Phillips, G.N., 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.*, 14, 1246-1251.

Zaxariou, M., Panderi, I., 2004. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of buspirone in pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 35, 41-50.



CAPÍTULO III

Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the assay of insulin in plga microspheres

M.J. Cózar-Bernal, S. Salas, M.A. Holgado, J. Álvarez-Fuentes, M. Fernández-Arévalo

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain.

Revista:

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (under review)

Abstract

A simple, fast and reversed-phase high-performance liquid chromatographic (HPLC) method has been developed and validated for determining of insulin (INS) in PLGA microspheres. Separation was achieved in a Zorbax SB-C18 column, using a mobile phase consisting of acetonitrile: 0.1% aqueous trifluoroacetic acid (TFA) solution at a flow rate of 1 mL/min. The detection was made with a diode array detector measuring at the maximum for the compound. The validation study demonstrated that the method was precise, accurate and linear over the concentration range of analysis with a limit of detection of 0.025 µg/mL. The limit of quantification was 0.05 µg/mL. Linear regression analysis in the range of 50–150 µg/mL gave correlation coefficients higher than 0.9987. The method developed was applied to the analysis of insulin in microsphere samples in order to evaluate in next papers, the encapsulation efficiency of different formulations.

Key Words: Flow Focusing; Insulin; Microspheres; HPLC; Validation.

1. Introduction

During the last three decades, there has been continuous interest in the use of biodegradable polymers for the development of peptide and protein delivery systems able to prolong their therapeutic effect. Their encapsulation within drug delivery systems allows to have a better pharmacokinetics pathway and to reduce drastically the frequency of injection. In order to successfully develop these formulations, poly(lactic-co-glycolic) acid (PLGA), one of the few polymers approved by the Food and Drug Administration for human clinical use, was chosen as biodegradable polymer [1- 3]. PLGA polymers have shown to be biocompatible and they degrade to toxicologically acceptable lactic and glycolic acids [4].

The peptide insulin is used in our study, it is a well known 51 amino acids protein, produced nowadays by DNA recombination techniques and used subcutaneously in the treatment of diabetes mellitus. It is a disorder caused by decreased production of insulin or by decreased ability to use insulin, leading to increase glucose levels in the blood.

Usually, insulin is injected subcutaneously two to four times a day. Therefore, there has been significant interest in the development of oral delivery systems for insulin [5- 8]. The oral route is considered to be the most acceptable and convenient route of drug administration for chronic therapy. Oral administration of insulin may be beneficial to such patients as it can mimic the physiological fate of insulin and might provide a better glucose homeostasis. However, during insulin transit through the gastrointestinal tract it is chemically and enzymatically inactivated due to high acidity and proteolytic enzyme activity.

Therefore, an optimal delivery system is needed to protect the peptide from the harsh environment in the gastrointestinal tract. An ideal delivery system for oral administration of insulin should prolong its intestinal residence time, reversibly increase the permeability of the mucosal epithelium to enhance the absorption of drug and provide the intact drug to the systemic circulation. Additionally, this delivery system must be safe after oral administration [9- 10].

The utility and versatility of Flow Focusing technology (FF) in the preparation of PLGA-based delivery systems loaded with insulin and other

drugs for non-parenteral routes of administration have been studied by our research group. The Flow Focusing (FF) technique can efficiently control the production of monodisperse simple or encapsulated particles, in the micron or sub-micron range, in just one step and without additional purification procedures [11-13]. The FF technology is based on a useful microfluidic concept resulting from the combination of hydrodynamic forces with a specific geometry [14].

With that aim, PLGA particles loaded with insulin (INS) were engineered by FF. It is important to develop a specific technique for the INS quantification for these types of formulations. Then, the development and validation of an HPLC analytical technique for this protein is crucial to have adequate results. For this reason, this work describes the development of a rapid reversed-phase HPLC method with a diode detector for the determination of INS.

Most of the analytical methods found in the literature, carried out by high-performance liquid chromatographic (HPLC) to determine INS, are aimed at quantifying INS in plasma and in biological fluids, to determine the raw material and its related substances. Few of the methods described by HPLC are dedicated to the study of insulin in final products.

For this reason, this work describes the validation parameters stated either by USP 29 [15] and by the ICH guidelines [16] to achieve an analytical method with acceptable characteristics of suitability, reliability and feasibility, ensuring that the findings achieved, when this method is applied, are correct.

2. Experimental

2.1. Chemicals

Insulin was obtained from Sigma–Aldrich (Germany); HPLC-grade acetonitrile, water and acetic acid were used to prepare the mobile phase and were purchased from Panreac (Barcelona). Poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer (PLGA 50:50) Resomer[®] RG 502 (Mw: 12000; inherent viscosity: 0.24 dL/g) was obtained from Boehringer Ingelheim (Germany).

Deionized and purified water using a Milli-Q system (Millipore) was used for the standard solutions preparation. All other reagents were of analytical grade.

2.2. Chromatographic system

The chromatographic apparatus consisted of a Hitachi system manager D-7000, equipped with a quaternary pump L-7100, a diode array detector L-7455, an automatic injector L-7200 and interfase D-7000. For data collection and calculation, HSM System Manager Software was used.

The chromatographic conditions were optimized using a column C18 (Agilent, Zorbax SB-C18; 250mm × 4.6mm, 5µm). The mobile phase consisted of solution A: acetonitrile and solution B: 0.1% v/v TFA in water. The mobile phase was filtered through a 0.22µm nitrocellulose-membrane filter (Millipore, Barcelona) and degassed under vacuum prior to use.

A linear gradient of:

- 30:70 % over 5 minutes
- 40:60 % from 6 to 10 minutes
- 70:30 % from 11 to 15 minutes

And a flow rate was 1.000 mL/min. The monitoring wavelength was 214 nm and the injection volume was 20 µL. Peak areas were measured and HPLC analysis was conducted at room temperature.

2.3. Preparation of insulin-loaded microspheres

The preparation of PLGA microspheres involves the formation of an oil-in-water emulsion using a standard Flow Focusing nozzle in a liquid-liquid configuration [17]. A water-in-oil emulsion was prepared by mixing in a ultrasonic bath (Selecta S.A., Spain), operating at 50 kHz and with a sonic power of 50 W, an aqueous insulin solution (1% w/v) and a 1 % (w/v) PLGA solution in ethyl acetate. This emulsion was sprayed using a standard FF nozzle [model Advant 2 (D = 50 µm), Ingeniatics Tecnologías S.L., Spain] that was immersed into the final continuous phase. The disperse phase is injected through a capillary tube using a syringe pump, and focused and pressed out of the device through the orifice (50 µm) using distilled water as focused fluid. To avoid the formation of aggregates, the production of the oil

drops was carried out inside a 1% (w/v) PVA solution. The final PVA concentration of the continuous phase was 0.25% (w/v). Therefore, the formation of the oil drops was carried out inside the carrier liquid phase without any shape deformation. The resulting o/w emulsion was continuously stirred at room temperature until most of the organic solvent was evaporated leaving solid microspheres. After this, they were collected by centrifuge (10000 rpm, 10 min), washed three times with distilled water and fully dried by lyophilization (Telstar Cryodos, Spain) and stored at 4 °C. All the formulations were prepared in triplicate.

2.4. Stock and sample solutions

Standard stock solutions of INS at a concentration of about 100 µg/mL were prepared by dissolving the appropriate amount of INS (100 µg) in 1mL of a solution of HCl 0.01M.

This standard solution will be used to quantify the active on the final product. These solutions were stored in the dark under refrigeration at 4 °C and were found to be stable for several weeks. The stability of the standard solutions was checked over this period by preparing and injecting daily a solution of the analyte. To carry out the sample solution (assay of pharmaceutical preparation), an appropriate amount of PLGA microspheres, and equivalent to 0.2 mg of INS was placed in a 2 mL volumetric flask with 400 µL of ACN. The solution was vortexed for 5 min and diluted to volume with HCl 0.01M. This solution was then filtered through a 0.22 µm nylon-membrane filter (Millipore, Barcelona). The resulting filtered solution was *placed in a HPLC vial*.

2.5. Validation study

2.5.1. Selectivity

The selectivity is defined as the capacity of an analytical method to exactly measure the concentration of analyte without interferences of impurities, products of degradation, excipients or related compounds. In this assay, it was tested by running solutions containing the formulation components in the same quantities and conditions that in samples (placebo sample) to

show that there is not peaks in the retention times corresponding to the analyte.

The selectivity of the method was evaluated onto three placebo samples and standard solutions of INS. Within the study of selectivity, a series of degradation studies were carried out, where the standard solutions and the work samples were subjected to different degrees of stress, by following the ICH guidelines [16]:

- *Acid degradation:* in a 2mL volumetric flask, 0.2 mg of insulin was accurately weighed. They were dissolved in 0.5mL of HNO₃ 0.5N keeping the solution during 24 h. Then, 0.5 mL of NaOH 0.1M was added and finally, it was completed to volume with HCl 0.01M and the mixture was shaken.
- *Basic degradation:* in a 2mL volumetric flask, 0.2 mg of insulin was accurately weighed. They were dissolved in 0.5mL of NaOH 0.1M keeping the solution during 24 h. Then, 0.5 mL of HNO₃ 0.5N was added and finally, it was completed to volume with HCl 0.01M and the mixture was shaken.
- *Sun light degradation:* in a 2mL volumetric flask, 0.2 mg of insulin was accurately weighed. They were dissolved in 0.5mL of HCl 0.01M. The volumetric flask was exposed to the sun light during 24 h and finally, it was completed to volume with HCl 0.01M, shaking the mixture.
- *Degradation with temperature (60 °C):* in a 2mL volumetric flask, 0.2 mg of insulin was accurately weighed. They were dissolved in 0.5mL of HCl 0.01M. The volumetric flask was put under heating to 60 ° during 24 h and finally, it was completed to volume with HCl 0.01M, shaking the mixture. After the stress assay, the samples were analyzed by HPLC as shown in the chromatographic conditions. After the stress assay, the samples were analyzed by HPLC as shown in the chromatographic conditions.

2.5.2. Precision

The precision is the parameter that expresses the closeness of agreement (degree of scatter) between a series of measurement obtained from multiple analysis of the same homogenous sample under the prescribed conditions. In our study the repeatability was evaluated as follows:

- *Instrumental precision:* For six consecutive times, a same standard solution prepared according the described method in Section 2.4, was injected. The standard deviation and the relative standard deviation (R.S.D.) were calculated for the six injections. For acceptance, the R.S.D. value must be smaller or equal that 1.5%.
- *Method repeatability:* This parameter was determined by using the obtained results for the accuracy test (low level 50%; middle level 100%; high level 150%) (See Section 2.5.3). The standard deviation and the R.S.D. were calculated. The method repeatability can be accepted when R.S.D. is smaller or equal that 2.0%.
- *Intermediated precision:* The aim of this study consists at establishing the effects of the random events on the analytic method. The intermediated precision was evaluated by analyzing a same sample by different analysts in two different days.

2.5.3. Accuracy (recovery method)

Accuracy of a method is defined as the closeness of the measured value to the true value for the sample. The recovery method was studied at concentration levels of 50%, 75%, 100%, 125% and 150%, where a known amount of the active (50, 75, 100, 125 and 150 µg) was added to a determined amount of placebo solution to obtain drug concentrations of 50, 75,100, 125,150 µg/mL, respectively. The amount of INS recovered in relation to the added amount (recovery percent), was calculated. This study was carried out on the basis of the method describe above.

2.5.4. Linearity

The linearity study verifies that the sample solutions are in a concentration range where analyte response is linearly proportional to the concentration. This study was performed by evaluating the system and method linearity. For the system linearity, standard solutions of INS at five concentration levels, from 50% to 150% of the target analyte concentration, were prepared. The concentrations were 50, 75,100, 125,150 µg/mL. Each level of concentration was prepared in triplicate. The experimental results were

graphically plotted, obtaining a calibration curve and carrying out the corresponding statistical study. For the method linearity, the procedure was the same than system linearity, but the sample was a solution containing the PLGA microspheres of INS, dissolved in the medium.

2.5.5. Limit of detection (LOD)

The LOD of a method is the lowest analyte concentration that produces a response detectable above the noise level of the system, typically three times the noise level. To determine this parameter, a battery of different solutions with different INS concentrations, was prepared. This parameter needs to be determined only for impurity methods, in which chromatographic peaks near the detection limit will be observed.

2.5.6. Limit of quantification (LOQ)

The LOQ is the lower level of analyte that can be accurately and precisely measured.

Similarly to LOD assay, a battery of different concentrations diluted was prepared. The range of prepared concentrations was from 0.025 to 12 µg/mL. The response factor was calculated (relationship between the area and concentration) for each point studied. Afterwards, the concentrations in relation to the R.S.D. obtained for the response factors from each of the concentrations were plotted. The first point which does not fulfil this R.S.D. corresponds to the LOD, and the first point which fits into this specified value corresponds to the LOQ.

3. Results and Discussion

3.1. Method development

In this study, a RP-HPLC method for the determination of INS in PLGA microspheres, was developed and validated with the best chromatographic peak resolution, reduced run time and low cost of analysis. This method permits the analysis of a large series of samples, avoiding possible degradation associated to a long analysis time. The introduction of new

HPLC methods for a routine quality control of pharmaceutical preparations begins with a series of preliminary investigations, which enables establishing the optimal experimental conditions and provide maximum relevant information by analyzing the experimental data [18]. A simple sample preparation, short separation time and a low LOQ were considered when the study started. The aim for sample preparation method was to remove the interferences from the other microsphere constituents to be reproducible with a high recovery involving a minimum number of working steps.

3.2. Validation study

3.2.1. Selectivity

Representative chromatograms of INS standard solution (figure 1a) and solutions of INS-loaded PLGA microspheres (figure 1b) are presented. The peaks were separated with retention time at about 5.8 minutes. It was observed the absence of interferences because none of the peaks appears at the same retention time than INS peak (figure 1b).

No peaks from possible degradation products were observed in the chromatograms, probing the purity of the INS used in the study and its stability in stock solutions.

The study of the purity of the peak showed that the spectrums obtained at different times are within the established threshold for this peak. It was observed the absence of interferences, because none of the peaks appears at the same retention time than INS peak. So, it was concluded that the developed method is selective.

Another study carried out to check the selectivity of the method was the degradation test submitted to the samples under different stress conditions, as described in section of validation study. Table 1 summarizes the results obtained for INS standard and the samples analyzed. The stress studies involving heat, sun light, acid and basic revealed that INS was fully degraded. There is an increment in the number and quantity of impurities, but all of them are separated from the INS peak.

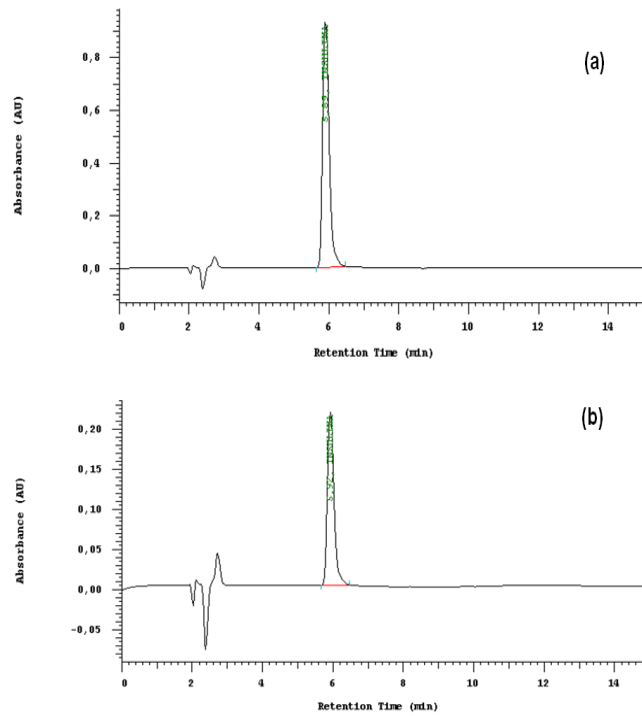


Figure 1. Representative chromatogram of the standard solution of INS (a) and representative chromatogram of a microparticles sample containing INS (b). The retention time was about 5.8 min

Sample	Peak Area	S.D.	% degradation
Standard	1699286	74594.37135	0
Light sun	603351	10234.01356	52.7242029
60°C	458109.5	15917.68075	73.0410596
HNO ₃	708366	2842.56926	58.3139036
NaOH	24177.5	11791.00558	98.5771965

Table 1. Data of the peak areas corresponding to the placebo samples submitted to the specified conditions

3.2.2. Precision

3.2.2.1. *Repeatability.* As defined in the International Conference on Harmonization (ICH) guidelines, repeatability expresses the precision under the same operating conditions over a short interval of time. ICH guidelines suggest a minimum of six readings of a single sample at 100% of target concentration.

3.2.2.2. *Instrumental precision.* The repeatability of the instrumental system was evaluated with this parameter. In this study, a R.S.D. of 0.66786273 % was obtained for the area corresponding to the first day (1010110 ± 6746.148 , $n = 6$), by injecting a standard solution of 100 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, the retention time repeatability was determined, showing a mean value of 5.85 (R.S.D. = 0.22 %). On the basis of the obtained results, it can be concluded that the repeatability of the system is satisfactory (R.S.D. < 1.5%).

3.2.2.3. *Method repeatability.* This parameter was evaluated using the same data obtained for the accuracy study. Table 2 summarizes these results. R.S.D.s for the six recovery values for levels II, III, IV and V of the accuracy test are less than 2.0%. For this reason, the method repeatability was considered validated.

3.2.2.4. *Intermediate precision.* ICH recommendations for this precision parameter are to study the effect of random events during the analysis. In this precision study, two random events were considered: the analysis of microspheres on two different days and two analysts performing the analysis on the same day [19].

The results obtained were expressed as the drug recovery percent and R.S.D. %. They are summarized in table 3. All results are below the established limit according to the variation accepted (R.S.D. < 2.0%), concluding that the variations introduced in the test have no influence on the experimental results.

In addition, the MANOVA statistical test revealed that no statistical differences between days and analysts can be appreciated ($p = 0.658$). Therefore, the proposed analytical technique has a good intermediate precision.

Level	Theoretical	Peak area	Experimental	Recovery (%)
I	Mean	528352.2	51.07	100,3
	SD	13651.15	1.40	0.77
	RSD	2.58	2.75	0.76
II	Mean	766811.33	75.58	99.59
	SD	12461.33	1.28	0.65
	RSD	1.63	1.69	0.66
III	Mean	1046340.67	104.32	100.81
	SD	18450.91	1.90	0.88
	RSD	1.76	1.82	0.88
IV	Mean	1262018.33	126.49	100.48
	SD	21030.27	2.16	0.48
	RSD	1.67	1.71	0.48
V	Mean	1509215.33	151.90	99.41
	SD	21674.17	2.23	0.67
	RSD	1.44	1.47	0.67

Table 2. Recovery results of INS in PLGA microspheres. Concentration range: 50-200 µg/mL (level I: 50 µg/mL mg/mL; level II: 75 µg/mL; level III: 100 µg/mL; level IV: 125 µg/mL; level V: 200 µg/mL). Theoretical: theoretical amount of INS (µg). Experimental: amount of INS obtained (µg). S.D.: standard deviation; R.S.D.: relative standard deviation.

Analyst/day	Area	µg / mL	µg obtained	µg theoretical	%	Average	S.D	R.S.D
1/1 S1	1002361	100.39	100.39	100.99	99.40			
1/1 S1	1011640	101.33	101.33	100.05	101.28	100.86	0.67	0.66
2/1 S1	1016902	101.86	101.86	101.35	100.50			
2/2 S2	1001398	100.29	100.29	100.82	99.47	101.08	1.11	1.10
1/2 S1	1005405	100.70	100.70	99.97	100.73			
1/2 S2	1002806	100.43	100.43	100.67	99.76	100.56	0.19	0.19
2/2 S1	1004946	100.65	100.65	101.15	99.50			
2/2 S2	1006812	100.84	100.84	98.94	101.92	100.74	0.13	0.13
Average	1006533.75	100.81	100.81	100.49	100.32	100.81	0.52	0.52
S.D	5279.76	0.54	0.54	0.80	0.94			
R.S.D	0.52	0.53	0.53	0.79	0.94			

Table 3. Method repeatability, developed by two different analysts (1 and 2 before), in two different days (1 and 2 after) to two replicated samples (S1 and S2). SD: standard deviation. CV: variation coefficient. RSD: relative standard deviation (%).

3.2.3. Accuracy

The results obtained for the accuracy study in the samples ranging a INS concentration between 50 and 150 µg/mL and being the 100% corresponding to 100 µg/mL ($n = 6$ for 50%, 75%, 100%, 125% and 150%) indicated that the recovery percent was between 100.03% and 102.08% of recovery (Table 2), being the mean relative standard deviation, R.S.D. = 0.88 %. According to the obtained results, it would not be necessary to make an additional statistical test, since the defect acceptance number of the ICH for pharmaceutical formulations in this parameter establishes that the percentage of recovery must be between 98% and 102%, which is equivalent to $\pm 2.0\%$ of the relative error. To confirm, apply a test t ; when $t_{\text{exp}} (0.72) < t_{\text{tab}} (2.04)$ there is no significant difference between the mean recovery and 100, so that accuracy is the correct.

3.2.4. Linearity

Linearity is the ability of the method to respond proportionally to the changes in concentration or amount of the analyte in a sample. In routine, unvaried calibration method linearity is established within a specific range. The calibration curve obtained by plotting the INS peak area versus the concentration of standard solution was linear in the above mentioned concentration range (figure 2a). The equation of the regression line obtained (table 4), with all the values, relating the tested concentrations and the response obtained corresponds to $y = 1.03\text{E-}04x - 3.533$ (y : INS concentration (µg/mL); x : peak area, with a standard error of 1.38618 and a correlation coefficient that exceeds 0.9986 ($n = 15$). With respect to the method linearity (table 5), the regression line ($y = 1.01\text{E-}04x - 0.62835$) showed a good linearity in the concentration range of 50–150 µg/mL (figure 2b), obtaining a R^2 of 0.9983 ($n = 15$). Also, the statistical analysis of ANOVA corresponding to the collected data for both system and method linearity, were reported. The F -test statistic (F) and its corresponding p -value (significance F) certainly indicate an overall goodness of fit for the model ($p = 4.43\text{E-}20$ for system linearity and $p = 1.79\text{E-}19$ for method linearity).

The relative standard deviation (RSD) for the response factor should be less than or equal to 2.0%. The response factor (f) expresses the relationship between reading or response (area) and concentration and can be taken as an approximate expression of the sensitivity of the equipment. In a linear calibration response factors should be similar to each other and close to the value of the slope. The RSD obtained for the response factor of 1.85 for the linearity of the system and 1.96 % for the linearity of the method. The deviation of y-intercept and the RSD of y-intercept must be less than or equal to 2.0%. Deviation of y-intercept and the RSD of y-intercept was 1 and 0.00013 for the linearity of the system and 0.8 and 0.0001 for the linearity of the method, respectively.

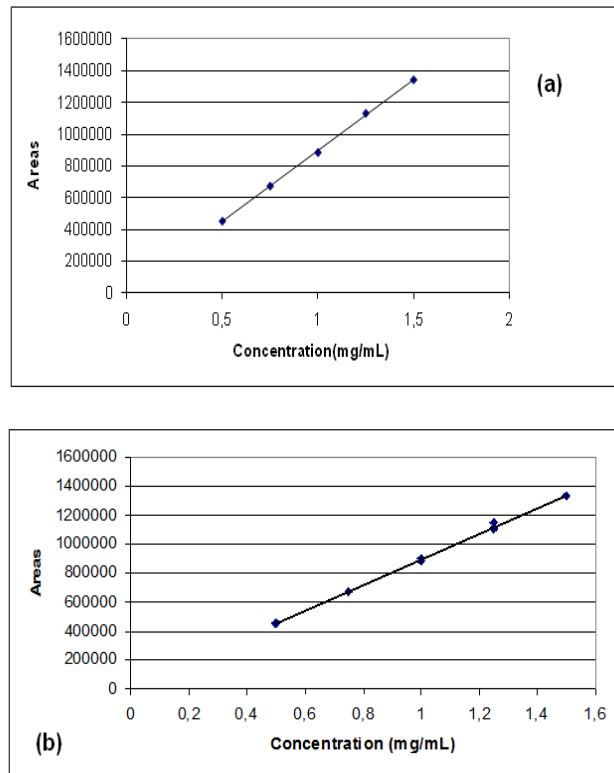


Figure 2. System linearity corresponding to the concentration range of 0.5-1.5 mg/mL of INS solution (a) and Method linearity corresponding to the concentration range 0.5-1.5 mg/mL of INS-PLGA microspheres (b).

3.2.5. Limit of detection (DL) and limit of quantification (QL)

The DL is determined by the analysis of samples with known concentrations of INS and by establishing the minimum level at which this analyte can be reliably detected. The visual observations of the sample chromatograms showed that the lower drug concentration which produces a signal different to that noise signal emitted by the HPLC equipment was 0.025 µg/mL. On the other hand, the LOQ was based on visual evaluation, as recommended the ICH guideline. This parameter is generally determined by the analysis of samples with known concentrations of analyte and by establishing the minimum level at which the analyte can be quantified with acceptable accuracy and precision. The results obtained were plotted in figure 3 showing that for this analytical technique, a QL of 0.5 µg/mL was obtained.

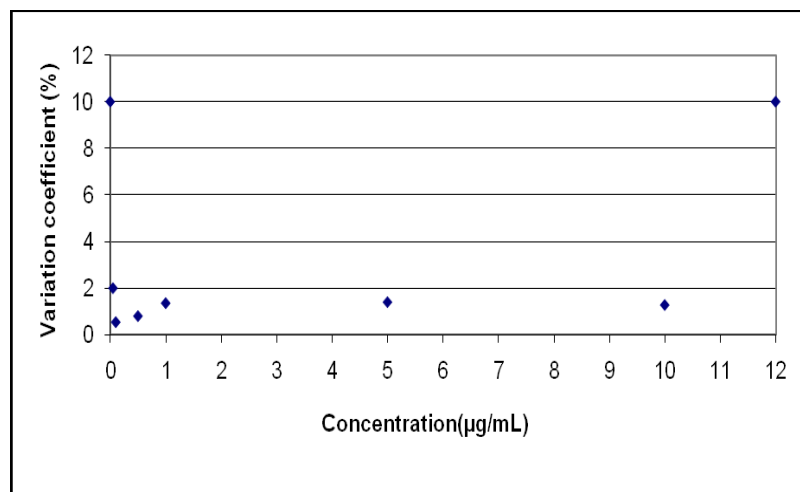


Figure 3. Limit of quantification of the chromatographic method used to determine the INS - PLGA loaded microspheres.

3.4. Method applicability

The proposed method was used to study the content of insulin in PLGA microspheres presenting diameter of around 1.23 µm and zeta potential of -40 mV. Entrapment efficiency and insulin loading were determined to be 98.95 ± 0.21 % and 4.74 ± 0.01 %, respectively ($n = 3$), indicating a high degree of encapsulation of insulin in PLGA microspheres.

4. Conclusions

The proposed high-performance liquid chromatographic method has been evaluated over the linearity, precision, accuracy and selectivity, and proved to be convenient and effective for the quality control of INS in PLGA microspheres. It has been proved that it was selective, linear between 50% and 150% of the work concentration (100 µg/mL) for INS, with a correlation coefficient higher than 0.998, exact and precise. Limits of detection and quantification for the drug were 0.025 and 0.5 µg/mL, respectively, and these values are under the lowest expected concentrations in the samples.

5. Acknowledgements

Authors want to thank to Ingeniatics Tecnología S.L. for the technological supporting.

Financial support from Junta de Andalucía, Spain, under projects P06-CTS-01688.

6. References

- [1] S.P. Butcher. Target Discovery and Validation in the Post-Genomic Era: Dedicated to Dr. Anders Hamberger. *Neurochem. Res.* 28 (2003) 367–371.
- [2] S.D. Patil, D.G. Rhodes, D.J. Burgess. DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review. *AAPS J.* 7 (2005) 9.
- [3] A. Schoubben, P. Blasi, S. Giovagnoli, L. Perioli, C. Rossi, M. Ricci. Novel composite microparticles for protein stabilization and delivery. *Eur. J. Pharma. Sci.* 36 (2009) 226-234.
- [4] H. Hamishehkar, J. Emami, A. R. Najafabadi, K. Gilani, M. Minaiyan, H. Mahdavi, A. Nokhodchi. The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. *Colloids Surf. B: Biointerfaces.* 74 (2009) 340-349.

- [5] B. Kim, N. A. Peppas. In vitro release behavior and stability of insulin in complexation hydrogels as oral drug delivery carriers. *Int. J. Pharm.* 266 (2003) 29-37.
- [6] A. Kumar, S. S. Lahiri, H. Singh. Development of PEGDMA:MAA based hydrogel microparticles for oral insulin delivery. *Int.J.Pharm.* 323 (2006) 117-124.
- [7] C. Damgé, P. Maincent, N. Ubrich. Oral delivery of insulin associated to polymeric nanoparticles in diabetic rats. *J. Control. Release* 117 (2007) 163-170.
- [8] A. Elsayed, M. Al Remawi, N. Qinna, A. Farouk, A. Badwan. Formulation and characterization of an oily-based system for oral delivery of insulin. *Eur. J. Pharma. Biopharm.* 73 (2009) 269-279.
- [9] P. F. Builders, O. O. Kunle, L. C. Okpaku, M. I. Builders, A. A. Attama, M. U. Adikwu. Preparation and evaluation of mucinated sodium alginate microparticles for oral delivery of insulin. *Eur. J. Pharma. Biopharm.* 70 (2008) 777-783.
- [10] K. Sonaje, Y.H. Lin, J.H. Juang, S.P. Wey, C.T. Chen, H.W. Sung. In vivo evaluation of safety and efficacy of self-assembled nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomater.* 30(2009)2329-2339.
- [11] A. M. Gañán Calvo and A. Barrero Ripoll. Producing Homogeneous Size Droplets and Sprays in the Micron/Submicron Range By Micro Suction. *Bull. American Phys. Society Division of Fluid Dynamics* 43 (1998) 2082-2082.
- [12] Holgado, M.A., Arias, J.L., Cózar, M.J., Álvarez-Fuentes, J., Gañán-Calvo, A.M., Fernández-Arévalo, M. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties. *Int. J. Pharm.*, 358 (2008) 27-35.
- [13] Holgado, M.A., Cózar-Bernal, M.J., Salas, S., Arias, J.L., Álvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M. Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: Physicochemical characterization and protein detection by reversed-phase HPLC. *Int. J. Pharm.*, 380 (2009) 147-154.
- [14] L. Martín-Banderas, M. Flores-Mosquera, P. Riesco, A. Rodríguez-Gil, A. Cebolla, S. Chavez, A. M. Gañán-Calvo. Flow Focusing: a Versatile

Technology to Produce Size-Controlled and Specific-Morphology Microparticles. *Small*. 1. (2005) 688-692.

[15] USP 29, NF 24. The United States Pharmacopeia Convention, Rockville, MD (General Chapter 1225).

[16] ICH-Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, Switzerland, 1996.

[17] L. Martín-Banderas, A. Rodríguez-Gil, Á. Cebolla, S. Chávez, T. Berdún-Álvarez, J. M. Fernández García, M. Flores-Mosquera, A. M. Gañán-Calvo. Towards a high throughput production of uniform encoded microparticles. *Adv.Mater.* 18 (2006) 559-564.

[18] S. Salas, B. Talero, A.M. Rabasco, M.L. González-Rodríguez. Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the assay of lidocaine hydrochloride in alginate-Gantrez[®] microspheres. *J. Pharm. Biom. Anal.* 47 (2008), 501-507.

[19] C. Peroza, M.A. Santos, R.J. Romanach. Quantitation of drug content in a low dosage formulation by transmission near infrared spectroscopy. *AAPS Pharm. Sci.* 7 (2006) 1-9.



CAPÍTULO IV

Insulin-loaded PLGA microparticles: flow focusing vs. solvent extraction/evaporation methodologies

M.J. Cózar-Bernal¹, M.A. Holgado¹, J.L. Arias², I. Muñoz-Rubio¹, J. Alvarez-Fuentes¹, M. Fernández-Arévalo¹

¹Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Seville, Spain.

²Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, University of Granada, Spain.

Abstract

In this study, we compare two synthesis procedures for the formulation of insulin-loaded poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) particles. These are the well-known solvent evaporation method (SEV) and the novel and very promising flow focusing (FF) technology. To our knowledge, the latter methodology has been never followed for the incorporation of insulin into biodegradable PLGA colloids. The differences between the polymeric particles obtained by SEV, and FF were analyzed by comparing their geometry (shape and size), surface (electrokinetic properties, and surface thermodynamics), and insulin loading and release capabilities. In addition, a conformational analysis of the protein (by fluorescence spectroscopy and circular dichroism) was done to check its stability during the formulation processes. A qualitative and quantitative investigation of the capacities of the polymer particles to load insulin is described. The FF methodology permitted the formulation of micromedicines that clearly exhibited a more narrow size distribution compared to the particles obtained by SEV. Independently of the synthesis procedure, the surface of the particles was almost indistinguishable from an electrokinetic and thermodynamic point of view. Interestingly, the FF technology allowed higher insulin incorporations and slower release kinetics. The release studies showed a biphasic profile probably due to diffusion-cum-degradation mediated processes. Finally, insulin loaded to PLGA by FF retained more of its native-like (intrinsic) structure in the solid state (and, thus, probably its bioactivity), in comparison to the microparticles prepared by SEV. This demonstrating the potential use of FF for the engineering of PLGA micromedicines based on insulin.

Key Words: conformational structure; electrokinetic properties; flow focusing (FF); insulin; poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA); protein loading and release; solvent evaporation method (SEV); surface thermodynamics.

1. Introduction

Insulin is the most important biomacromolecule in the control of glucose homeostasis, whose replacement is needed in patients suffering from type I diabetes, and in a great percentage of patients suffering from type II diabetes. This protein consists of two polypeptide chains, whose structure, stability, and activity have been widely characterized (Zhou and Po, 1991a,b; Matsuura et al., 1993). Exogenous insulin has demonstrated its capacity to inhibit the hepatic gluconeogenesis, and to suppress the hepatic production of glucose. Thus, this will lead to an adequate control of the glycaemia. Essentially, insulin is administered through the parenteral route (subcutaneously), which usually involves up to 4 injections per day. However, this leads to an important patient discomfort, non-compliance, and an inadequate control of the glucose blood levels. Despite the oral route could become the definitive step towards the control of diabetes, important problems (leading to a very low oral bioavailability of insulin) have discouraged its clinical application: self-aggregation, the great susceptibility to acid pHs and enzymes (proteases) of the gastrointestinal tract, and the poor absorption through the intestinal mucosa (due to its large size and hydrophilic character), to cite just a few (Zhou and Po, 1991a,b; Trotta et al., 2005).

Important research efforts have been focussed on the development of non-invasive strategies for the delivery of insulin. As an example, they have been concentrated on chemical modifications of insulin, and on the co-administration of the protein with absorption enhancers or protease inhibitors (Myers et al., 1997; Bernkop-Schnurch et al., 1998; Sajeesh and Sharma, 2006). However, special attention has been given to the development of biodegradable and biocompatible insulin-loaded polymeric colloids for the oral route. These protein delivery systems could protect the biomacromolecule from *in vitro* and *in vivo* degradation, enhance the oral absorption, and control the release kinetics (Bhardwaj et al., 2005; Florence, 2005; Trotta et al., 2005; Cui et al., 2006; Sajeesh and Sharma, 2006; Hamishehkar et al., 2009; Rekha and Sharma, 2009; Shelma et al., 2010; Sonaje et al., 2010). Furthermore, it has been suggested that the oral absorption of drug-loaded microparticles could mainly occur at the Peyer's patches through receptor mediated endocytosis (lymphoid uptake) and

paracellular pathways (non-lymphoid uptake). This is expected to circumvent the first pass metabolism (Norris et al., 1998).

The wide use of poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) in the formulation of drug delivery nanoplatforms is justified by its excellent biocompatibility and biodegradability. Thus, the Food and Drug Administration (F.D.A.) approved its use in clinic and its introduction in the market (Kumar et al., 2001; Fu et al., 2005; Santander-Ortega et al., 2009). However, the hydrophilic character of most of the proteins and peptides difficults their vehiculization into PLGA particles. It is not thermodynamically favoured the incorporation of the hydrophilic insulin (from the aqueous phase in which the particle formation occurs) into the hydrophobic PLGA matrix. As a consequence, a very low encapsulation efficiency, and an uncontrolled protein release will take place. Despite numerous synthesis procedures have been proposed to increase the drug delivery properties of PLGA particles (e.g., formulation strategies based on the preparation of o/w, and w/o/w) (Mundargi et al., 2008), more investigations are needed to establish an ideal synthesis routine for the formulation of insulin-loaded PLGA particles.

Recently, we have used the Flow Focusing (FF) technology in the microencapsulation of a very wide range of drugs and biomacromolecules (Holgado et al., 2008; 2009). In our opinion, the loading of insulin into PLGA particles by FF has potential interest due to the fact that it enable the control of the particle size, the electrokinetic properties and the surface thermodynamics, and, finally, the internal structure of the colloid. In addition, this technique is expected to present important advantages compared to traditional encapsulation technologies [e.g., solvent extraction/evaporation method or the spray-drying technique]: *i*) a perfect control of the particle geometry (size, and shape), leading to very small nanoparticles with a narrow size distribution, in just one step; *ii*) suitability for the encapsulation of labile biomolecules (proteins, cells, etc.); *iii*) compatibility with fluid mixtures (e.g., liquid-liquid, liquid-gas); and, *iv*) excellent performance and large-scale production (Martín-Banderas et al., 2005; 2006).

In this work, we describe the formulation of insulin-loaded PLGA microparticles for the controlled delivery of this biomacromolecule. The oral route is intended for the administration of these microplatforms. Two synthesis procedures were compared: the novel FF technology and the

traditional solvent evaporation method (SEV). A comparative study is undertaken to check the influence of both techniques on the: *i*) geometry, electrophoresis and surface thermodynamics of PLGA microparticles; and, *ii*) insulin loading and release kinetics.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Insulin Human Recombinant (INS) was purchased from Sigma-Aldrich (Germany). Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA 50:50) Resomer[®] RG 502 (Mw: 12000; inherent viscosity: 0.24 dL/g) was obtained from Boehringer Ingelheim (Germany). All other chemicals used were of analytical quality from Panreac (Spain), except for polyvinyl alcohol (PVA, Mw: 16000, obtained from Fluka, Germany) and trifluoroacetic acid (TFA) (Merck, Germany), respectively. Water used in the experiments was deionized and filtered (Milli-Q Academic, Millipore, France).

The reversed phase HPLC (RP-HPLC) analysis has been previously validated and verified for accuracy, precision and linearity in all conditions tested. It was carried out on a Hitachi LaChrom[®] (D-7000) Series HPLC system equipped with a L-7200 automatic injector, an interphase D-7000 and a quaternary pump (model L-7100), and coupled with a L-7455 diode array detector (Merck-Hitachi, Germany). A Zorbax SB-C18 column (USA, 5 μ m, 4.6 x 250 mm) kept at 25.0 \pm 0.1 $^{\circ}$ C (L-2350 column oven, Elite LaChrom[®]) was used in this analysis. Data collection and calculation was done by using HSM software (Merck-Hitachi, Germany).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of insulin-loaded PLGA particles

PLGA particles with a theoretical insulin loading of 0.99 - 4.76 % (w/w) were prepared following the water-in-oil-in water (w/o/w) emulsion solvent extraction/evaporation method (SEV). Briefly, an insulin solution in acetic acid 10 % (v/v) containing Tween[®] 80 (5 %, v/v) was added to 1 mL of ethyl acetate containing PLGA. A first w/o emulsion was obtained by mixing in an

ultrasonic bath (Selecta S.A., Spain), operating at 50 kHz and with a sonic power of 50 W. Thereafter, this first emulsion was poured into 0.3 % w/v PVA solution and sonicated. The w/o/w emulsion was then diluted in 20 mL of a 2 % w/v PVA solution, and stirred (300 rpm) at 25.0 ± 0.5 °C during 3 hours with a magnetic stirrer hotplate SM6 (Jepson Bolton, UK) to evaporate the organic solvent. The colloidal suspension was then subjected to a cleaning procedure that included 3 cycles of centrifugation (20 min at 10000 rpm, Eppendorf 5804 R, Germany) and re-dispersion in water (10 mL). Finally, the polymeric particles were frozen in liquid nitrogen and lyophilized (Telstar Cryodos, Spain) and stored at 4.0 ± 0.5 °C. All the formulations were prepared in triplicate.

The insulin-loaded PLGA microparticles were further synthesized by FF. Briefly (Martin-Banderas et al., 2006), the technique followed to obtain a theoretical insulin loading 4.76 % (w/w) involves the formation of a w/o emulsion using a standard Flow Focusing nozzle in a liquid-liquid configuration. This w/o emulsion was prepared by mixing in an ultrasonic bath (J.P. Selecta S.A., Spain), operating at 50 kHz and with a sonic power of 50 W, an aqueous insulin solution (10 mg/mL) in acetic acid 10 % (v/v) containing Tween[®] 80 (25 %, v/v), and a 1 % (w/v) PLGA solution in ethyl acetate. This emulsion was sprayed using a standard FF nozzle [model Advant 2 (D = 50 µm), Ingeniatic Tecnologías S.L., Spain] that was immersed into the final continuous phase. The disperse phase is injected through a capillary tube using a syringe pump, and focused and pressed out of the device through the orifice (50 µm) using distilled water or PBS (pH = 7.4 or 9.0) as focusing fluid. The ionic strength of this focusing fluid was adjusted to 50 or 500 µS/cm. To avoid the formation of aggregates, the production of the oil drops was carried out inside a 1 % (w/v) PVA solution. The final PVA concentration of the continuous phase was 0.25 % (w/v). Under these conditions, the formation of the oil drops occurred inside the carrier liquid phase without any shape deformation. The resulting w/o/w emulsion was continuously stirred at 25.0 ± 0.5 °C until the organic solvent was evaporated leaving solid particles. The colloidal suspension was then subjected to a cleaning procedure that included 3 cycles of centrifugation (20 min at 10000 rpm, Eppendorf 5804 R, Germany) and re-dispersion in water (10 mL). Finally, the polymeric particles were frozen in liquid nitrogen

and lyophilized (Telstar Cryodos, Spain) and stored at 4.0 ± 0.5 °C. All the formulations were prepared in triplicate.

Table 1 collects the conditions to prepare insulin-loaded PLGA particles by SEV, and FF. As can be seen in this table, we also studied the effect of the pH of the PVA solution on the formulations.

Formulation	Insulin (% w/v)	PLGA (% w/v)	Focusing fluid	Ionic strength ($\mu\text{S/cm}$)	PVA solution (pH)
SEV-1	0.5	10	—	—	6.5
SEV-2	0.5	10	—	—	9
SEV-3	1	1	—	—	6.5
SEV-4	1	1	—	—	9
FF-1	1	1	water	50	6.5
FF-2	1	1	water	50	9
FF-3	1	1	water	500	6.5
FF-4	1	1	water	500	9
FF-5	1	1	pH7.4	50	6.5
FF-6	1	1	pH7.4	50	9
FF-7	1	1	pH7.4	500	6.5
FF-8	1	1	pH7.4	500	9
FF-9	1	1	pH 9	50	6.5
FF-10	1	1	pH 9	50	9
FF-11	1	1	pH 9	500	6.5
FF-12	1	1	pH 9	500	9

Table 1. Formulation conditions for the preparation of insulin-loaded PLGA particles by solvent evaporation method (SEV) and flow focusing (FF).

2.2.2. Characterization methods

The geometry of the insulin-loaded PLGA particles was determined from scanning electron microphotographs (Philips XL-30, Philips Electron Optics, The Netherlands). Prior to observation, a dilute (≈ 0.1 %, w/v) suspension of polymeric particles was sonicated for 5 min, and drops of the suspension were placed on copper grids with formvar film. The grids were then dried at

35.0 ± 0.5 °C in a convection oven. Alternatively, the mean particle size and particle size distributions of the PLGA particles were measured at 25.0 ± 0.5 °C by a Laser Diffraction Analyser (Partica LA-950V2 Horiba, Japan). Particle size distributions were determined using the Mie scattering theory. The measurement ranged from 0.01 to 3000 µm, and it was done after dilution of the aqueous suspensions.

The surface electrical properties of PLGA particles (loaded or not with insulin) were evaluated by measuring their electrokinetic properties [electrophoretic mobility (u_e) determinations]. With that aim, the zeta potential (ζ)-pH trend and ζ -ionic strength dependence were evaluated in all the formulations. Briefly, PLGA aqueous suspensions (\approx 0.1 %, w/v) were analyzed by electrophoresis as a function of both KNO₃ concentration and pH (adjusted with either KOH or HNO₃), using a Malvern Zetasizer 2000 electrophoresis device (Malvern Instruments Ltd., U.K.). Measurements were performed at 25.0 ± 0.5 °C, after 24 h of contact at this temperature under mechanical stirring (50 rpm). The experimental uncertainty of the measurements was < 5 %. The theory of O'Brien and White (1978) was used to convert u_e into ζ values. This analysis was used to determine the influence of the preparation method (SEV and FF) on the surface electrical properties of the PLGA particles, and to extensively characterize the type of insulin loading (surface adsorption or absorption inside the polymeric matrix). We have to keep in mind that electrophoresis is extremely sensitive to small modifications on the particle surface induced by adsorption of charged entities, even at rather small amounts (Arias et al., 2001; 2007; Holgado et al., 2009).

The surface thermodynamics were measured by Atomic Force Microscopy (AFM). This technique is commonly used for high-resolution topographical imaging of surfaces. Another application of AFM is the measurement of forces between a tip and surface under specific media. The AFM measurements are extensively used for a detailed understanding of molecular and surface forces. It has been shown that both attractive forces and particle adhesion were promoted by the hydrophobic character of the substratum surfaces. In addition, several studies have shown that quantitative force measurements can be obtained by functionalizing AFM probes (Vadillo-Rodriguez et al., 2005). In order to define the surface thermodynamics of the PLGA particles, AFM measurements were done in

air under normal atmospheric conditions, using a Molecular Imaging's Pico Plus (pico Scan 2500). Imaging was performed in contact mode using a force ranging from 1 to 10 nN with triangular silicon nitride gold coated mounted on cantilevers of spring constant 0.58 N/m. Height and surface roughness measurements were obtained using a Molecular Imaging Corporation PicoScan 5.3.3 image analysis software. The slopes of the retraction force curves in the region, where probe and sample are in contact, were used to convert the voltage into cantilever deflection. The conversion of deflection into force was determined by the slope of the repulsive zone of the force curve. The cantilever was used to measure the forces of interaction with hydrophobic surfaces. The AFM images were taken in contact mode to check the existence of two parameters related to hydrophobicity: contrast of friction and contact curves. The samples were prepared by placing a drop of the PLGA suspension in distilled water, previously dried on mica sheets properly cleavage. Then, the sample is allowed to dry to ambient temperature to ensure a good grip on the particles on mica sheets. All the experiments were performed in triplicate.

2.2.3. *Insulin loading*

In order to determine the protein loading, 20 mg of insulin-loaded PLGA particles were added to 100 μ L of acetonitrile, and the mixture was vortexed for 5 min. Then 1.4 mL of a 0.01 M HCl solution was added and vortexed for 2 min. After centrifugation at 5000 rpm at 4 $^{\circ}$ C \pm 0.5 $^{\circ}$ C for 20 min, the supernatant was filtered through a 0.45 μ m Millipore filter for RP-HPLC analysis (Kumar et al., 2007; Hamishehkar et al., 2009). The amount of insulin loaded was determined at 214 nm.

Protein loading to PLGA particles was expressed in terms of insulin entrapment efficiency (EE) (%) [(incorporated insulin (mg) / total insulin (mg)) \times 100] and insulin loading (%) [(incorporated insulin (mg) / particles (mg)) \times 100].

The normal distribution of each continuous variable was assessed by using the Shapiro-Wilk test. A factorial analysis of the variance was performed to determine the effect on the entrapment efficiency of the: $\hat{1}$) amount of polymer used, and the pH of the PVA solution when SEV was followed; and,

ii) effect of the type of focusing fluid, environmental ionic strength, and pH of the PVA solution when FF was used. The Leven test was used for the analysis of the homogeneity of the variance. Data with $p < 0.05$ was considered as significant.

Insulin loading was also qualitatively investigated by circular dichroism (CD) and fluorescence spectroscopy (tertiary structure) analyses. Both techniques were further used to determine the stability of insulin after the loading process. The secondary structure of insulin in PLGA was investigated by a Jasco CD-2095 circular dichroism detector (Jasco, Tokyo, Japan). The Jasco CD-2095 is a commercially available detector specifically designed for the on-line monitoring of circular dichroism at a fixed wavelength. The detector has an Hg-Xe lamp and can be used for CD detection in the 220-420 nm UV wavelength range. Insulin unloaded- and insulin-loaded PLGA particles were dissolved in 0.01M HCl. The final concentration of insulin in the samples was 0.1 mg/mL.

The fluorescence measurements were performed with an F-2500 fluorospectrophotometer (Hitachi, America). The excitation wavelength was set at 276 nm while emission intensities were scanned from 290 to 450 nm. The splits of excitation and emission were 10 nm (Yong et al., 2009). Finally, the spectra were shown as a result of the average of 3 measurements.

2.2.4. In vitro insulin release from PLGA particles

Insulin release from PLGA particles was performed by using PBS (pH = 7.4 \pm 0.1) as the release medium and following the dialysis bag method (Sahana et al., 2008; Arias et al., 2009). The bags were soaked in PBS for 2 h before use. The dialysis bag (cutoff 12-14000 Da; Spectrum® Spectra/Por® 6 dialysis membrane tubing, USA) retained the PLGA particles, but allowed the free protein to diffuse into the dissolution medium. Insulin-loaded PLGA particles were redispersed in 1 mL of PBS, and placed into the dialysis bags with the two ends fixed by clamps. The bags were then placed in a glass beaker containing 39 mL of PBS, which were shake at 100 rpm (shaker water bath; Selecta S.A., Spain) at 37.0 \pm 0.5 °C. Under these conditions, the release experiments were performed in triplicate. At

prefixed time intervals, 1 mL of the medium was withdrawn and analyzed for insulin content. An equal volume of PBS, kept at the same temperature, was added after sample withdrawal to ensure the sink conditions. The insulin content was quantified using the validated RP-HPLC method.

3. Results and Discussion

3.1. Particles geometry

All the formulations of insulin-loaded PLGA particles were of spherical shape and present a smooth surface. Interestingly, the preparation procedure did not seem to influence the final morphology and surface characteristics of the particles. Figure 1 shows an example of SEM photographs of the particles (formulations SEV-4 and FF-12).

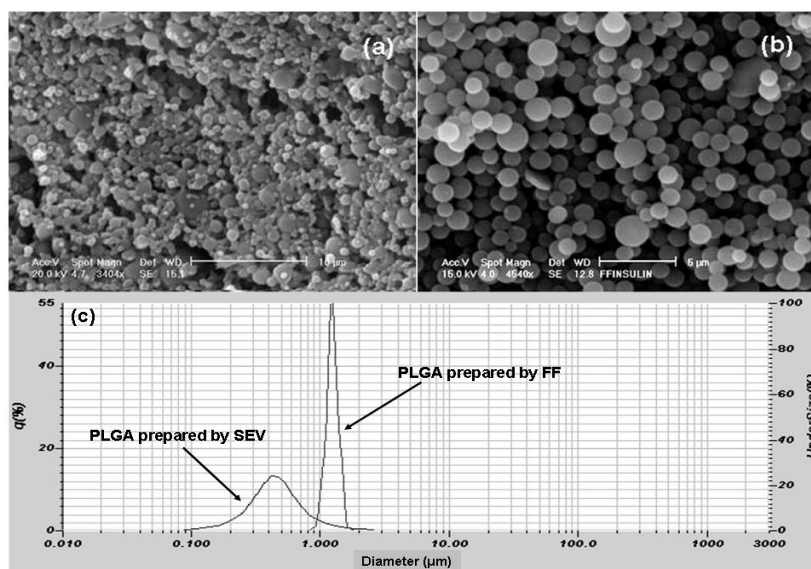


Figure 1. Scanning electron microscopy photographs of insulin-loaded PLGA particles obtained by SEV-4 (a) and FF-12 (b). (c) Histogram of particle size distribution of insulin-loaded PLGA particles obtained by SEV and FF

The size (mean diameter \pm S.D.) of the formulations is shown in table 2. Compared to FF, smaller sizes were obtained following SEV. This result was confirmed by the statistical analysis of the data, which shows

statistically significant differences between the average particle size of the formulations prepared by both SEV and FF ($F_{1,12} = 13.8229$; $p = 0.0034$).

However, the FF technique allows obtaining clearly a more narrow size distribution (figure 1c). We considered the geometric standard deviation (GSD) of the particle size (expressed in absolute value) to determine the variability of the geometric diameters of the particles. Ideally, the GSD value should be close to 1. GSD values between 1.2 and 1.3 are also generally associated to monodisperse samples (Luque et al., 2009). As shown in table 2, the SEVM formulations showed GSD values near 2 and, therefore, these sample could not be considered monodisperse. In contrast, all the formulations prepared by FF showed GSD values ≈ 1.1 , confirming the high homogeneity in size of these samples.

Formulation	Mean particle size (μm)	CV (%)	GSD (μm)	Insulin loading (%)	CV (%)	EE (%)	CV (%)
SEVM-1	1.03 ± 0.84	61.46	1.65	0.53 ± 0.01	1.89	53.87 ± 1.54	2.86
SEVM-2	1.04 ± 0.85	75.10	1.70	0.57 ± 0.02	3.51	57.58 ± 2.02	3.51
SEVM-3	0.49 ± 0.31	80.66	1.99	2.85 ± 0.03	1.05	59.52 ± 0.52	0.89
SEVM-4	0.48 ± 0.36	80.26	1.98	2.92 ± 0.04	1.36	61.27 ± 0.64	1.05
FF-1	1.32 ± 0.14	10.21	1.11	3.32 ± 0.06	1.81	69.82 ± 1.23	1.76
FF-2	1.37 ± 0.13	10.18	1.11	3.80 ± 0.17	4.47	79.90 ± 3.52	4.41
FF-3	1.26 ± 0.11	8.40	1.08	3.53 ± 0.08	2.26	74.30 ± 1.69	2.28
FF-4	1.27 ± 0.12	8.67	1.09	3.99 ± 0.10	2.51	83.96 ± 2.11	2.52
FF-5	1.31 ± 0.11	9.31	1.10	3.86 ± 0.06	1.55	81.16 ± 1.35	1.66
FF-6	1.20 ± 0.14	11.62	1.18	4.08 ± 0.03	0.73	85.71 ± 0.55	0.65
FF-7	1.21 ± 0.15	12.56	1.13	4.12 ± 0.03	0.72	86.62 ± 0.53	0.61
FF-8	1.28 ± 0.12	9.36	1.10	4.29 ± 0.02	0.46	90.19 ± 0.32	0.36
FF-9	1.20 ± 0.14	11.50	1.18	4.54 ± 0.04	0.88	95.37 ± 0.75	0.79
FF-10	1.21 ± 0.14	11.21	1.17	4.60 ± 0.01	0.21	96.64 ± 0.21	0.21
FF-11	1.32 ± 0.17	12.47	1.13	4.68 ± 0.02	0.43	98.39 ± 0.32	0.33
FF-12	1.23 ± 0.11	9.38	1.10	4.74 ± 0.01	0.21	98.95 ± 0.21	0.21

Table 2. Mean particle size (μm), insulin loading (%), and insulin entrapment efficiency (%) of the insulin-loaded PLGA particles prepared by SEV or FF.

3.2. Electrokinetic characterization

We start our investigation establishing the effect of pH on the zeta potential, ζ , of the insulin-loaded and non-loaded PLGA particles. Figures 2a and 2b show the evolution of ζ as a function of pH of the PLGA particles prepared by SEV, and FF, respectively. Note that ζ values are negative for the whole pH interval investigated and that they rise in absolute value as the pH increases. This negative surface charge has been previously associated to both the ionization of weak acid groups of the polymer (presumably carboxylic end groups), and to dissociated end molecules of the polysorbate surfactant Tween[®] 80 used in the formulation that remain adsorbed on the PLGA surface even after the cleaning procedure (Teixeira et al., 2005; Musumeci et al., 2006; Okassa et al., 2007; Holgado et al., 2009). The increasingly negative values and charge density may be explainable by the effect of increasing OH⁻ ion concentration in the solution, which tends to favour a gain in protons. In contrast, a decrease in absolute ζ as pH becomes more acidic may be explainable by neutralization of the negative regions as a result of chemical adsorption of increasing numbers of H⁺ ions (Ruiz et al., 2004; Arias et al., 2007; Holgado et al., 2009).

With the aim of confirming these results, we also measured ζ as a function of KNO₃ concentration at a constant pH = 6. ζ values are negative for the whole ionic strength interval investigated and they fall in absolute value as the KNO₃ concentration increases, due to the double-layer compression (figures 2c and 2d). The counterions accumulate closer to the particle surface, such that the double layer shrinks as concentration increases. This leads to a lower electrical potential in the shear plane (or slip surface) that limits the ζ value (Dillen et al., 2004; Holgado et al., 2009).

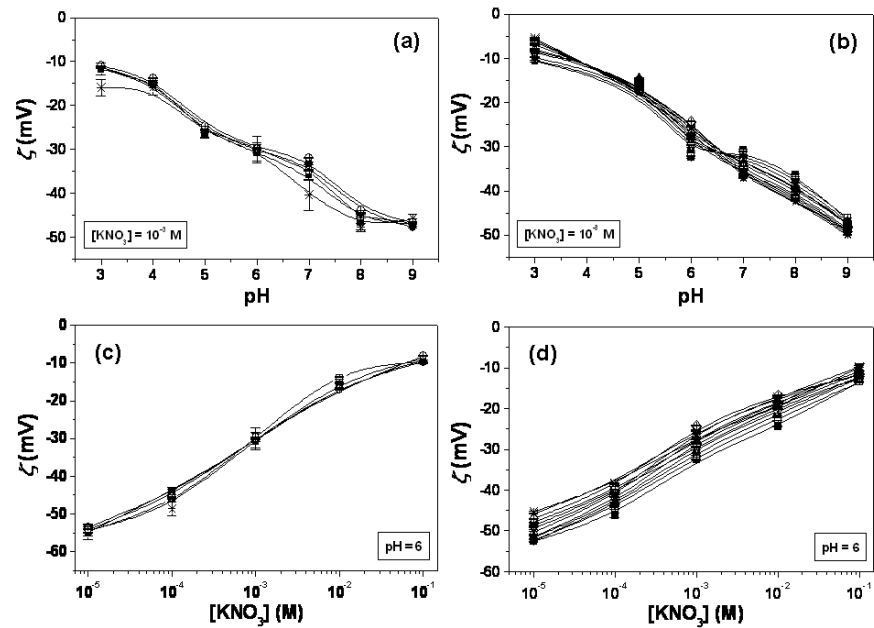


Figure 2. Zeta potential of insulin-loaded and non-loaded PLGA particles prepared by SEV and FF as a function of pH in the presence of 10^{-3} M KNO_3 (a, and b, respectively), and as a function of the molar concentration of KNO_3 at $pH \approx 6$ (c, and d, respectively). Formulations: non-loaded (*), SEV-1 (■), SEV-2 (□), SEV-3 (●), SEV-4 (○), FF-1 (■), FF-2 (□), FF-3 (●), FF-4 (○), FF-5 (▲), FF-6 (Δ), FF-7 (▼), FF-8 (∇), FF-9 (◆), FF-10 (◇), FF-11 (►), and FF-12 (◄)

Interestingly, no significant differences were found between the PLGA particles formulated by SEV and FF. This suggests that the PLGA particles formulated are, from an electrokinetic point of view, indistinguishable. In addition, our results clearly showed how similar are the electrokinetics of non-loaded PLGA particles and of all the formulations of insulin-loaded PLGA particles, independently of the preparation procedure. This demonstrating that insulin was not adsorbed onto the PLGA surface and, consequently, a very efficient insulin entrapment have led to insulin-loaded PLGA microparticles which, from an electrokinetic point of view, are indistinguishable from non-loaded microparticles (Nicoli et al., 2001; Dillen et al., 2004; Teixeira et al., 2005; Díez and Tros de Ilarduya, 2006; Gómez-Gaete et al., 2007). Finally, it is expected that the negative surface charge will favour the oral absorption of the insulin-loaded PLGA microparticles

through the intestinal membrane: a more intense interaction with the enterocytes will take place (Gaumet et al., 2010).

3.3. Surface thermodynamics

AFM consists of a microfabricated cantilever whose deflection is recorded (usually by laser reflection) as it interacts with a moving substrate. Direct force measurement can be done by ramping the tip vertically (z axis), towards and away from the sample. The relative deflection of the cantilever as the tip approaches makes contact with it, and the removal from the surface produces a force-distance curve. The change in hysteresis in the cantilever deflection during the approach and retraction can be associated to the magnitude and type of forces acting between the two surfaces.

Force is measured in an AFM by collecting a force curve, which is a plot of cantilever deflection (d_c) as a function of the sample position along the z axis (i.e., towards or away from the probe tip, the z -piezo position). It assumes a simple relationship between the force (F) and the cantilever deflection (Hooke's Law):

$$F = -k \cdot d_c \quad (1)$$

where k , is the spring constant of the cantilever.

To calculate the hydrophobicity of the samples, we did a comparative study between insulin-loaded PLGA and polystyrene (a more hydrophobic polymer used as a reference). The relative values of hydrophobicity (ratio of the adhesion force probe - particle adhesion force, divided by probe-mica) allowed us to compare the results for each sample (table 3).

A direct relationship between the adhesion force and the surface free energy of the particles can be established by the JKR theory (Johnson et al., 1971):

$$F_{adh} = 3/2\pi RW \quad (2)$$

where, F_{adh} is the adhesion force measured in AFM; R is the tip radius, and W is the thermodynamic work of adhesion. The adhesion force can be related to the surface free energy of the particles ($W_{adh} = \Delta G$) by applying one of the contact mechanic models. Changes in the surface free energy

manifest themselves in the hydrophobic/hydrophilic character of the materials.

As it is observed in table 3, all the PLGA formulations were more hydrophilic than polystyrene (Das et al., 2010). In addition, the PLGA microparticles formulated by FF exhibited higher hydrophobicity than those obtained by SEV (hydrophobicity relative values closer to the ones of polystyrene). It could be explained by a higher adsorption of hydrophilic PVA molecules onto PLGA microparticles prepared by SEV, which tends to reduce the hydrophobic character of PLGA (Sahoo et al., 2002). This is the consequence of the higher concentration of PVA used in the formulation of PLGA microparticles by SEV.

	Adhesión force (nm)	Relative values
Polystyrene	50.2 ± 0.10	0.33
SEVM-1	129 ± 0.20	0.85
SEVM-2	131 ± 0.25	0.86
SEVM-3	133 ± 0.22	0.88
SEVM-4	132 ± 0.24	0.87
FF-1	103.25 ± 0.15	0.68
FF-2	102.36 ± 0.19	0.67
FF-3	101.50 ± 0.22	0.66
FF-4	103.54 ± 0.21	0.68
FF-5	105.25 ± 0.24	0.69
FF-6	101.99 ± 0.29	0.67
FF-7	104.84 ± 0.27	0.69
FF-8	105.28 ± 0.24	0.69
FF-9	103.62 ± 0.11	0.68
FF-10	104.87 ± 0.16	0.69
FF-11	105.73 ± 0.18	0.69
FF-12	104.3 ± 0.20	0.68

Table 3. Relative values of hydrophobicity of the PLGA formulations as a function of the preparation procedure (SEV or FF) (The adhesion force of probe-mica was 151.8 nm).

Hence, it can be concluded that SEV allows obtaining a slightly smaller particle size than FF. However, the formulations prepared by SEV exhibited

a wider size distribution and were more hydrophilic. All these properties (size, size distribution, surface charge and surface thermodynamics) are expected to determine the oral absorption of the formulations (Gaumet et al., 2010). Despite each kind of formulation must be considered different, it is believed that a decrease in the gastrointestinal uptake of protein-loaded microparticles should occur in more hydrophilic materials (Hillery and Florence, 1996). Thus, the formulation of insulin-loaded PLGA microparticles could improve the oral absorption of insulin. In any case, further studies on cellular uptake are needed to clarify the biological fate of these formulations.

3.4. Insulin loading

As can be observed in table 2, the insulin entrapment efficiency (%) is much higher when PLGA microparticles are prepared by FF. We also determined the effect of the synthesis conditions (polymer concentration in the organic phase, and the pH of the PVA solution) on the mean drug content of the particles prepared by SEV. It was expected that the polymer concentration will influence the particle size and the protein loading (Budhian et al., 2007). Basic pHs in the PVA solution are intended to improve insulin loading by minimizing the insulin leakage from the polymer droplet (Kawashima et al., 1999). A factorial analysis of variance was carried out to define these effects. The effect of the amount of PLGA ($F_{(1, 8)} = 36.67$, $p < 0.001$), and the pH of the PVA solution ($F_{(1, 8)} = 12.48$, $p = 0.008$) on the entrapment efficiency were statistically significant. However, no significant interaction between both factors was observed ($F_{(1, 8)} = 1.6$, $p = 0.242$). This indicates that the effect of the PLGA concentration was independent of the influence of the PVA solution pH on the insulin loading.

Regarding the insulin-loaded PLGA microparticles formulated by SEV, the protein entrapment efficiency was clearly affected by the PLGA concentration in the organic phase: insulin entrapment raised as the polymer concentration was increased (protein:polymer ratio 1:20 vs. 1:100). It has been pointed out that higher PLGA concentrations determine an increase in the viscosity of the organic phase, which difficult the diffusion resistance of insulin from the organic phase to the aqueous phase (Manchanda et al., 2010). A similar effect was observed when fixing a basic

pH in the PVA solution: higher insulin entrapment was the consequence of a strong electrostatic interaction between the positively charged insulin and the negative PLGA surface (Kawashima et al. 1999).

Similarly, we also investigated the effect of the formulation conditions on the insulin loading into PLGA microparticles prepared by FF. These are the pH and ionic strength of the focusing fluid, and the pH of the PVA solution in the collected bath. All the formulations were prepared by using a 1 % (w/v) polymer concentration. Table 2 shows a positive effect on the protein loading when the pH and ionic strength of the focusing fluid, and the pH of the PVA solution were increased. The factorial analysis of variance of our results proved the existence of a statistically significant effect of each variable on insulin loading: pH of the focusing fluid ($F_{(2, 26)} = 290.85$, $p < 0.001$), ionic strength of the focusing fluid ($F_{(1, 26)} = 47.10$, $p < 0.001$), and pH of the PVA solution ($F_{(1, 26)} = 92.48$, $p < 0.001$).

It is well-known that the pH and the ionic strength of the aqueous medium can significantly affect the solubility of insulin (Lakhiari and Muller, 2004). When a basic pH is fixed in the focusing fluid, insulin became less hydrosoluble (Leo et al., 1998, Kawashima et al., 1999, Pinto-Reis et al., 2007). It is expected that a high ionic strength in the focusing fluid will also decrease the solubility of insulin, due to the loss of the hydrated shell and the reduction in the surface charge (Fan et al., 2006). Hence, in order to prevent insulin diffusion from the focusing fluid and to improve its entrapment into PLGA, it is necessary to fix a high ionic strength and a basic pH in the focusing fluid.

It was also observed that the effect of the pH of the PVA solution on the insulin loading strongly depends on the composition of the focusing fluid ($F_{(2, 26)} = 49.767$, $p < 0.001$). It can be observed in figure 3 that when the pH of the PVA solution was increased from 6.5 to 9.0, the entrapment efficiency rises up to 13.70 %, 4.84 % and 0.93 % when water, PBS of pH = 7.4, and PBS of pH = 9.0 were used as focusing fluids, respectively.

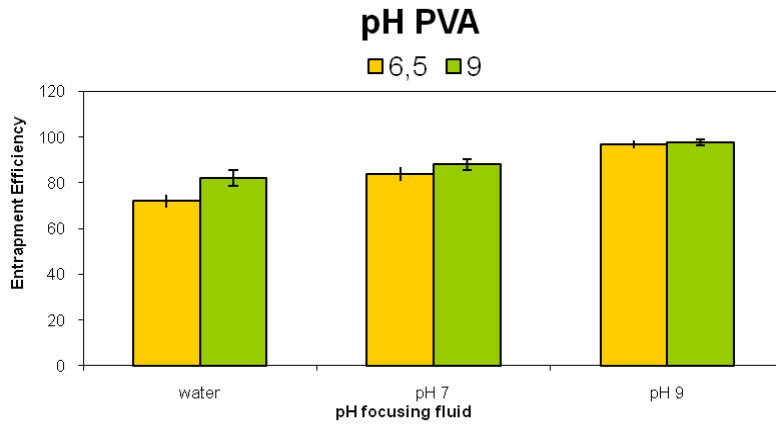


Figure 3. Influence of the type of focusing fluid on the effect of the pH of the PVA solution on the insulin entrapment efficiency into PLGA.

Additionally, Figure 4 shows that compared to water as focusing fluid, when the pH of the focusing fluid is 9.0 and the pH of the PVA solution is 9.0, the entrapment efficiency is increased in 19.36 %. Under the same conditions, a higher increase in the insulin entrapment efficiency was achieved (≈ 34.44 %) when the pH of the PVA solution was 6.5. Previous studies (Leo et al.,1998) have demonstrated that the use of basic pHs enhances the entrapment efficiency. This increment is less important when the pH of the focusing fluid and the pH of the PVA solution are closer.

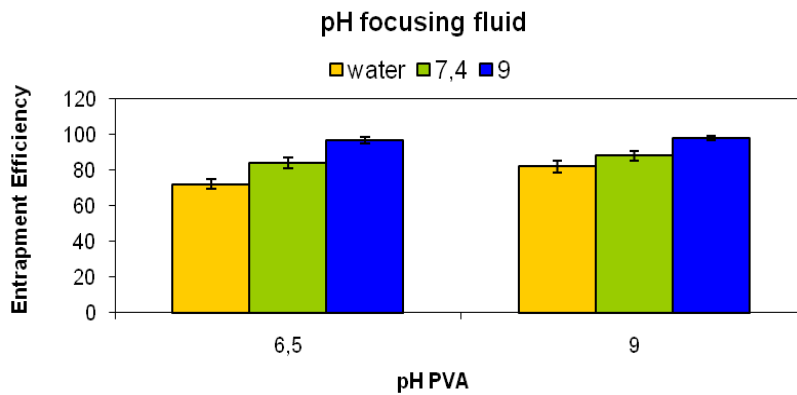


Figure 4. Influence of the pH of the PVA solution on the effect of the type of focusing fluid on the insulin entrapment efficiency into PLGA.

Nevertheless, the highest insulin entrapment efficiency was obtained when the pH of the focusing fluid and the pH of the PVA solution were fixed to 9.0. In addition, no significant differences were determined between the pH and the ionic strength of the focusing fluid ($F_{(2, 36)} = 0.736$, $p = 0.608$), and between the ionic strength of the focusing fluid and the pH of the PVA solution ($F_{(2, 36)} = 0.736$, $p = 0.608$). This indicating that the effect of the pH of the focusing fluid, and the pH of the PVA solution on the insulin loading were not influenced by the ionic strength of the focusing fluid.

Finally, the synthesis procedure clearly influenced insulin loading into PLGA microparticles (table 2). The statistical comparison between SEV-3 and SEV-4 with FF-1 and FF-2 formulations demonstrated that FF induced a greater insulin entrapment into the PLGA matrix ($F_{(1,5)} = 14407.6818$; $p < 0.0001$). Compared to SEV, insulin-loaded PLGA microparticles are obtained in one step and, hence, the probability of protein loss during the synthesis procedure is kept to a very minimum. Similar results have been observed when using lidocaine as model drug (Holgado et al., 2008).

3.5. Qualitative determination of insulin loading into PLGA microparticles by CD-HPLC and fluorescence spectroscopy

The differences in absorption between left- and right-handed circularly polarized light in circular dichroism (CD) can be considered as a manifestation of the optical activity of biomacromolecules and, thus, provides information on asymmetries in their structure. CD is an absorption difference that can be only observed in an absorption band (Bloemendal et al., 2005). CD spectra provide both qualitative and quantitative information on protein conformations (Shelma et al., 2010). Hence, changes in the secondary and tertiary structures of insulin could be detected by using a far-UV (200-260nm) and near-UV (250-320nm) circular dichroism (CD) detector, respectively. In addition, the changes in the secondary structure of insulin (detected by CD monitoring) can be compared with reference spectra of standard structures (Tatford et al., 2004). In view of this fact, we will be able to determine if protein loading into PLGA microparticles could alter the protein structure and, as a consequence, compromise its *in*

vivo activity. With that aim, native insulin and insulin-loaded PLGA microparticles were dissolved in 0.01M HCl prior to CD characterization.

Figure 5 shows the CD spectra of insulin prior and after loading into PLGA. Native insulin shows a spectrum with a minimum at 222 nm, characteristic of proteins with α -helical structure. No significant differences in the CD spectra (shape and intensity) were observed within native insulin and the insulin loaded into PLGA. Very small changes could be associated to interferences of the polymeric material in the analysis. Hence, it can be concluded that the secondary structure of insulin (α -helical structure) was not altered when loaded into PLGA microparticles, independently of the synthesis procedure (Emami et al., 2009).

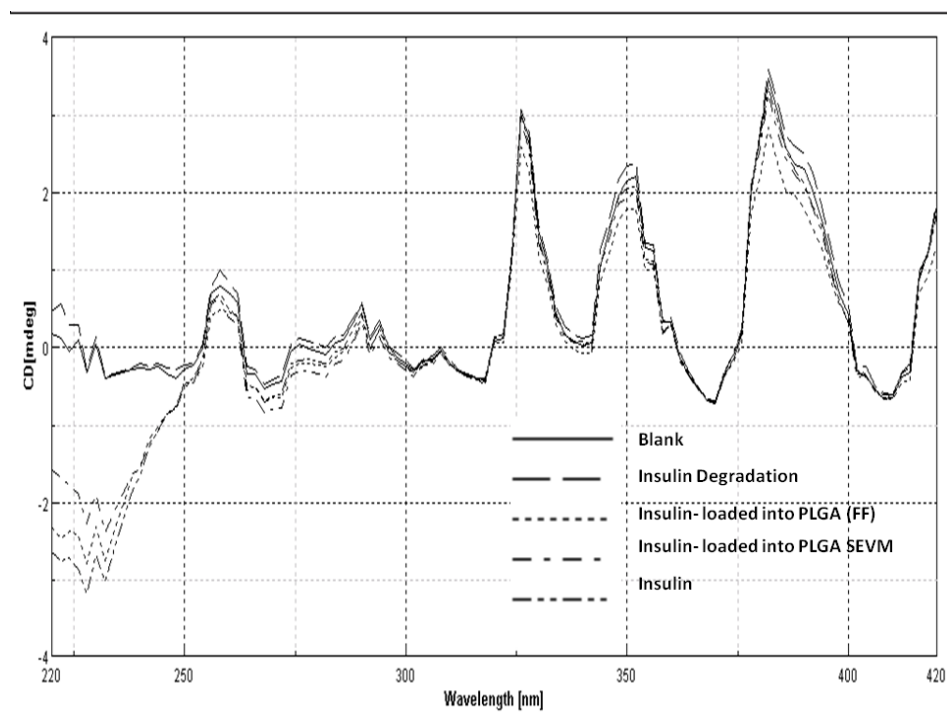


Figure 5. CD spectra of insulin and insulin-loaded PLGA microparticles (formulations SEV-4, and FF-12).

In order to verify the very promising results coming from near-UV CD characterization, the tertiary structure of insulin was investigated by

fluorescence spectroscopy. Insulin consists of 51 amino acids which determine a unique tertiary and secondary polypeptide structure. In the UV region ranging from 260 nm to 300 nm, the major absorbance of insulin comes from its tyrosine residues (A14, A19, B16, and B26). The fluorescence spectrum of the biomacromolecule depends on the tyrosine residues and their chemical environment. No significant modifications were ascertained between the fluorescence spectra of insulin and insulin-loaded PLGA microparticles, independently of the synthesis procedure (figure 6). The data indicated that the tyrosine amino acids were located at the external side of the polypeptide, which was in agreement with the near-UV CD data (Gök and Olgaz, 2004; Sajeesh and Sharma, 2006, Nyambura et al., 2009, Yong et al., 2009). Finally, the less intense fluorescence band of insulin when it is loaded into PLGA by SEVM could be due to the smaller protein loading achieved following this methodology, compared to FF.

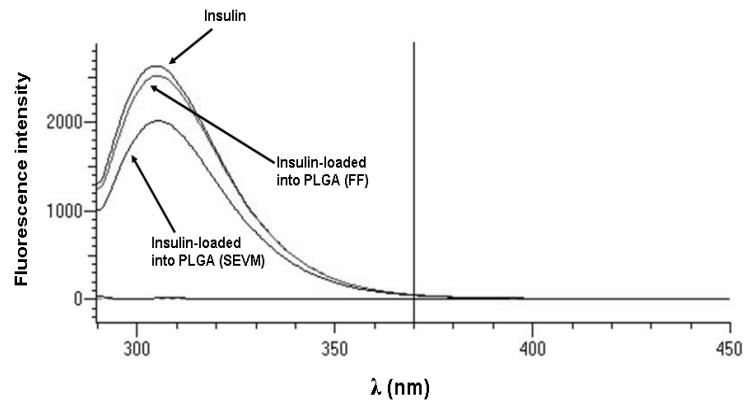


Figure 6. Fluorescence spectra of insulin and insulin-loaded PLGA microparticles (formulations SEV-4, and FF-12).

3.6. Release of insulin from PLGA particles

Drug release from biodegradable PLGA microparticles could occur through different mechanisms, such as: *i*) drug desorption from the polymeric surface; *ii*) surface and/or bulk degradation/disintegration; *iii*) drug diffusion through the polymeric matrix (or through the polymer wall if it is

encapsulated into a microcapsule; and, v) combined drug diffusion through the polymeric matrix and drug release from polymer degradation (Sahana et al, 2008). Additionally, several characteristics of the polymer (e.g., size, molecular weight, hydrophobicity/hydrophilicity, and the nature of the polymer used) have been reported to influence the release profile. This could justify the controversy between the drug release profiles reported in literature. Hence, it is very difficult to establish a general trend.

Independently of the synthesis procedure, insulin release from PLGA microparticles follows a biphasic profile probably due to diffusion-cum-degradation mediated processes. The very rapid initial phase is supposed to be the consequence of the loss of insulin located closer to the PLGA surface (protein diffusion through the external side of the polymeric matrix) (Ibrahim et al., 2005). Regarding the insulin release during the slower phase, it may result from polymer degradation, from drug diffusion through the polymeric matrix, or both (Mittal et al., 2007; Holgado et al., 2008).

Some differences were observed between the insulin release profiles from PLGA microparticles prepared by SEV (figure 7) and FF (figure 8). Interestingly, faster release rates were achieved by formulations obtained by SEV: first, an early rapid release of around 60 % takes place within ≈ 2 h, while the remaining 40 % was slowly liberated during the next 4 h. This biphasic release pattern has been previously reported (Niwa et al., 1993). On the opposite, the insulin release rate from PLGA microparticles obtained by FF was slower: ≈ 30 % was released within ≈ 2 h, while the remaining 70 % was liberated during the next 8 h (formulations FF-1 to FF-4), 16 h (formulations FF-5 to FF-8), or 28 h (formulations FF-9 to FF-12). Interestingly, when the amount of insulin loaded into the polymeric microparticles obtained by FF rises, the release rate decreased.

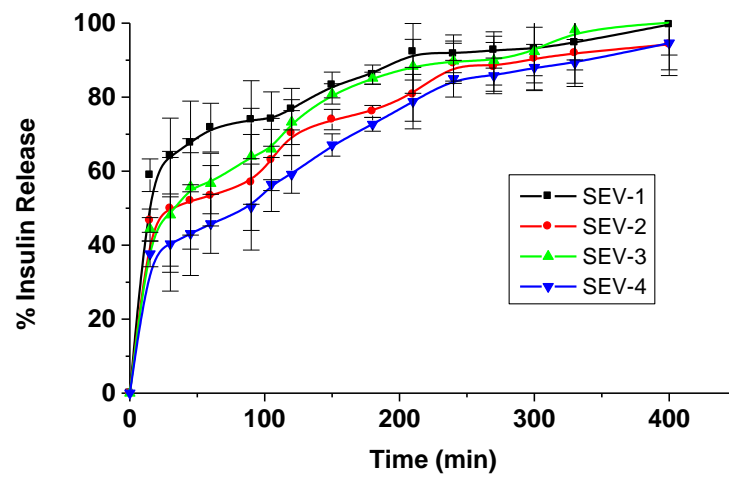


Figure 7. Insulin release (%) from PLGA microparticles prepared by SEV as a function of the incubation time in PBS ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$).

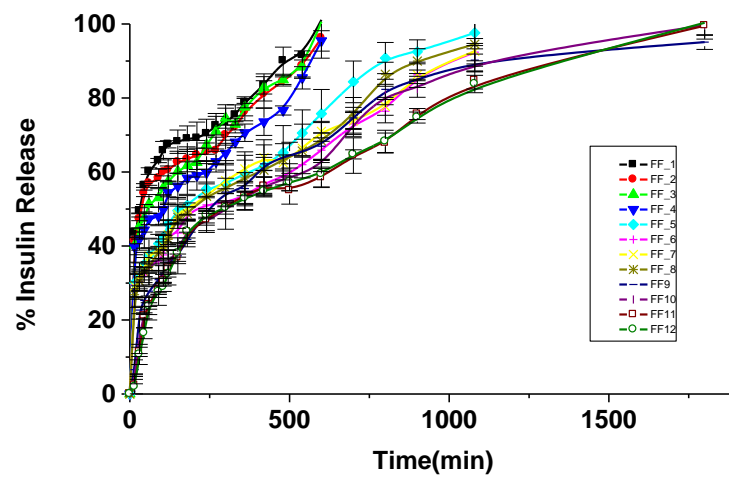


Figure 8. Insulin release (%) from PLGA microparticles prepared by FF as a function of the incubation time in PBS ($\text{pH} = 7.4 \pm 0.1$).

These differences could be due to a stronger interaction between the lipophilic centre of the insulin macromolecule and the more hydrophobic

PLGA microparticles obtained by FF that induces a slower drug release process (Gibaud et al., 1998; McCarron et al., 2000; Arias et al., 2007; Holgado et al., 2008). Furthermore, it is expected that the much higher hydrophobic character of the PLGA microparticles obtained by FF could contribute to a decrease in the degradation rate and, hence, in insulin release (Mittal et al., 2007; Holgado et al., 2008). We could also suggest a minor contribution to the slower release rate observed in PLGA microparticles formulated by FF: the particle size. The slight increase in size when PLGA is formulated by FF could reduce the surface area/volume ratio of the polymer, leading to a decreased buffer penetration into the polymer, and to slower insulin (Mittal et al., 2007; Holgado et al., 2008; Sahana et al., 2008; Corrigan and Li, 2009).

In relation to the release behaviours, no important differences have been found by using the two technologies, considering the same conditions for the production (SEV-1-4, FF-1-4).

As it can be seen in figures 7 and 8, all formulations assayed show the well-known biphasic release profiles. Nevertheless, it must be considered that FF technologies allow obtaining microparticles with a more narrow size distribution and high loading of insulin. That means that systems produced by FF are able to exert a greater control over the release behaviours of the particles (FF-1-4).

Moreover, considering only FF technologies (FF- 5-12), it has been found a very important influence of the pH of the production medium over the content of insulin. In this sense, formulations obtained at pH 5.5-6 show an EE of 70-84%, while systems elaborated at pH 7-9 implicate an increase of EE up to 90%. Furthermore, despite this higher content of insulin, greater controls in the release behaviour have been found in these systems.

Further studies must be realized in order to investigate the release kinetics of these systems and the *in vivo* behaviours.

4. Conclusions

In this work, we have established the most significant differences between the formulation of insulin-loaded PLGA microparticles by the well-known solvent evaporation method (SEV) and the very promising flow focusing

(FF) technique. Compared to SEV, it is found that the FF technology allowed the formulation of insulin-loaded PLGA microparticles with a more narrow size distribution. In addition, the PLGA microparticles obtained by FF showed a higher insulin loading, and a slower insulin release profile. These interesting results could be the consequence of the formulation technique, the particle size, and the hydrophobic/hydrophilic character of PLGA. Further investigations are encouraged to establish the *in vitro* and *in vivo* behaviour of insulin-loaded PLGA microparticles formulated by FF.

5. Acknowledgements

Technical support from Ingeniatics Tecnologías S.L. (Spain) is gratefully acknowledged. Circular Dichroism (CD-HPLC) provided by Instituto de la Grasa (CSIC, Seville) and Microscopy techniques (SEM and AFM) provided by CITIUS (Seville) is also acknowledged.

Financial support from Junta de Andalucía, Spain, under projects P06-CTS-01688 and PE2008-FQM-3993 is gratefully acknowledged.

6. References

Arias, J.L., Gallardo, V., Gómez-Lopera, S.A., Plaza, R.C., Delgado, A.V. 2001. Synthesis and characterization of poly(ethyl-2-cyanoacrylate) nanoparticles with a magnetic core. *J. Control. Release*, 77, 309-321.

Arias, J.L., Gallardo, V., Ruiz, M.A., Delgado, A.V. 2007. Ftorafur loading and controlled release from poly(ethyl-2-cyanoacrylate) and poly(butylcyanoacrylate) nanospheres. *Int. J. Pharm.*, 337, 282-290.

Arias, J.L., Harivardhan Reddy, L., Couvreur, P. 2009. Polymeric nanoparticulate system augmented the anticancer therapeutic efficacy of gemcitabine, *Journal of Drug Targeting*, 17, 586-598.

Bernkop-Schnurch, A. 1998. The use of inhibitory agents to overcome the enzymatic barrier to perorally administrated therapeutic peptides and proteins. *J. Control. Release*, 52, 1-16.

Bhardwaj, V., Hariharan, S., Bala, I., Lamprecht, A., Kumar, N., Panchagnula, R., Kumar, N. 2005. Pharmaceutical aspects of polymeric nanoparticles for oral delivery. *J Biomed. Nanotechnol.*, 1, 235–258.

Bloemendal, M., Jiskoot, W., in: W. Jiskoot and D. Crommelin (Eds.), *Methods for Structural Analysis of Protein Pharmaceuticals*, Ed. AAPS Press, Arlington, 2005.

Budhian, A., Siegel, S. J., Winey, K. I. 2007. Haloperidol-loaded PLGA nanoparticles: Systematic study of particle size and drug content. *Int. J. Pharm.*, 336, 367-375.

Corrigan, O.I., Li, X. 2009. Quantifying drug release from PLGA nanoparticulates. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 37, 477-485.

Cózar-Bernal, M.J., Salas, S., Álvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M., Holgado, M.A., 2010. Development and validation of a reverse-phase liquid chromatographic method for the assay of insulin in PLGA microspheres. *J. Pharm. Biomed. Anal.* (Under review).

Cui, F., Shi, K., Zhang, L., Tao, A., Kawashima, Y. 2006. Biodegradable nanoparticles loaded with insulin-phospholipid complex for oral delivery: Preparation, in vitro characterization and in vivo evaluation. *J. Control. Release*, 114, 242-250.

Das, T., Becker, T., Nair, B.N. 2010. Measurements on hydrophobic and hydrophilic surfaces using a porous gamma alumina nanoparticle aggregate mounted on Atomic Force Microscopy cantilevers. *Thin Solid Films*, 518, 2769–2774.

Díez, S., Tros de Ilarduya, C., 2006. Versatility of biodegradable poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for plasmid DNA delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 63, 188-197.

Dillen, K., Vandervoort, J., Van den Mooter, G., Verheyden, L., Ludwig, A., 2004. Factorial design, physicochemical characterisation and activity of ciprofloxacin-PLGA nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 275, 171-187.

Emami, J., Hamishehkar, H., Najafabadi, A. R., Gilani, K., Minaiyan, M., Mahdavi, H., Nokhodchi, A., 2009. A novel approach to prepare insulin-

loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microcapsules and the protein stability study. *J. Pharm. Sci.*, 98, 1712-1731.

Fan, Y.F., Wang, Y.N., Fan, Y.G. Ma, J.B. 2006. Preparation of insulin nanoparticles and their encapsulation with biodegradable polyelectrolytes via the layer-by-layer adsorption. *Int. J. Pharm.*, 324, 158-167.

Florence, A.T., 2005. Nanoparticle uptake by the oral route: Fulfilling its potential? *Drug Discov Today Technol.*, 2, 75-81.

Fu, X., Ping, Q., Gao, Y. 2005. Effects of formulation factors on encapsulation efficiency and release behaviour in vitro of huperzine A-PLGA microspheres. *J. Microencapsulation*, 22, 705-714.

Gaumet, M., Gurny, R., Delie, F. 2010. Interaction of biodegradable nanoparticles with intestinal cells: The effect of surface hydrophilicity. *Int. J. Pharm.*, 390, 45-52.

Gibaud, S., Rousseau, C., Weingarten, C., Favier, R., Douay, L., Andreux, J.P., Couvreur, P., 1998. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as carriers for granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF). *J. Control. Release* 52, 131-139.

Gómez-Gaete, C., Tsapis, N., Besnard, M., Bochet, A., Fattal, E., 2007. Encapsulation of dexamethasone into biodegradable polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 331, 153-159.

Gök, E., Olgaz, S. 2004. Binding of fluorescein isothiocyanate to insulin: a fluorimetric Labeling study. *J. Fluoresc.*, 14, 203-206.

Hamishehkar, H., Emami, J., Najafabadi, A.R., Gilani, K., Minaiyan, M., Mahdavi, H., Nokhodchi, A. 2009. The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 74, 340-349.

Hillery, A.M., Florence, A.T. 1996. The effect of adsorbed poloxamer 188 and 407 surfactants on the intestinal uptake of 60-nm polystyrene particles after oral administration in the rat. *Int. J. Pharm.*, 132, 123-130.

Holgado, M.A., Arias, J.L., Cózar, M.J., Álvarez-Fuentes, J., Gañán-Calvo, A.M., Fernández-Arévalo, M., 2008. Synthesis of lidocaine-loaded PLGA

microparticles by flow focusing. Effects on drug loading and release properties. *Int. J. Pharm.*, 358, 27-35.

Holgado, M.A., Cózar-Bernal, M.J., Salas, S., Arias, J.L., Álvarez-Fuentes, J., Fernández-Arévalo, M. 2009. Protein-loaded PLGA microparticles engineered by flow focusing: Physicochemical characterization and protein detection by reversed-phase HPLC. *Int. J. Pharm.*, 380, 147-154.

Ibrahim, M.A., Ismail, A., Fetouh, M.I., Göpferich, A. 2005. Stability of insulin during the erosion of poly(lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) microspheres. *J. Control. Release*, 106, 241-252.

Johnson, K.L., Kendall, K., Roberts, A.D. 1971. Surface Energy and the Contact of Elastic Solids. *Proc. R. Soc. Lond. A* 324, 301-313.

Kawashima, Y., Yamamoto, H., Takeuchi, H., Fujioka, S., Hino, T. 1999. Pulmonary delivery of insulin with nebulized dl-lactide/glycolide copolymer (PLGA) nanospheres to prolong hypoglycemic effect. *J. Control. Release*, 62, 279-287.

Kumar, N., Ravikumar, M.N.V., Domb, A.J. 2001. Biodegradable block copolymers. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 53, 23-44.

Kumar, P.S., Saini, T.R., Chandrasekar, D., Yellepeddi, V.K., Ramakrishna, S., Diwan, P. 2007. Novel Approach for Delivery of Insulin Loaded Poly(lactide-co-glycolide) Nanoparticles Using a Combination of Stabilizers. *Drug Deliv.* 14, 517-523.

Lakhiari, H., Muller, D. 2004. Insulin adsorption on coated silica based supports grafted with *N*-acetylglucosamine by liquid affinity chromatography. *J. Chromatogr. B*, 808, 35-41.

Leo, E., Pecquet, S., Rojas, J., Couvreur, P., Fattal E. 1998. Changing the pH of the external aqueous phase may modulate protein entrapment and delivery from poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by a w/o/w solvent evaporation method. *J. Microencapsulation*, 15, 421-430.

Luque, A., Perdignes, F., Estevé, J., Montserrat, J., Gañán-Calvo, A.M., Quero, J.M. 2009. Reduction of droplet-size dispersion in parallel flow-focusing microdevices using a passive method. *J. Micromech. Microeng.*, 19, 45029-45036.

Manchanda, R., Fernandez-Fernandez, A., Nagesetti, A., McGoron, A. J. 2010. Preparation and characterization of a polymeric (PLGA) nanoparticulate drug delivery system with simultaneous incorporation of chemotherapeutic and thermo-optical agents. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 75,260-267.

Martín-Banderas, L., Rodríguez-Gil, A., Cebolla, A., Chávez, S., Berdún-Álvarez, T., Fernández, J.M., Flores-Mosquera, M., Gañán-Calvo, A.M., 2006. Towards a high throughput production of uniform encoded microparticles. *Adv. Mater.* 18, 559–564.

Martín-Banderas, L., Flores-Mosquera, M., Riesco-Chueca, P., Rodríguez-Gil, A., Cebolla, A., Chávez, S., Gañán-Calvo, A.M., 2005. Flow Focusing: a Versatile Technology to Produce Size-Controlled and Specific-Morphology Microparticles. *Small*, 1, 688-692.

Matsuura, J., Powers, M.E., Manning, M.C., Shefter, E. 1993. Structure and stability of insulin dissolved in 1-octanol. *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 1261-1264.

McCarron, P.A., Woolfson, A.D., Keating, S.M., 2000. Sustained release of 5-fluorouracil from polymeric nanoparticles. *J. Pharm. Pharmacol.*, 52, 1451-1459.

Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V., Ravi Kumar, M.N.V., 2007. Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *J. Control. Release*, 119, 77-85.

Mundargi, R.C., Ramesh Babu, V., Rangaswamy, V., Patel, P., Aminabhavi, T.M. 2008 Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(d,l-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control. Release*, 125, 193- 209

Musumeci, T., Ventura, C.A., Giannone, I., Ruozi, B., Montenegro, L., Pignatello, R., Puglisi, G., 2006. PLA/PLGA nanoparticles for sustained release of docetaxel. *Int. J. Pharm.*, 325, 172-179.

Myers, S.R., Yakubu-Madus, F.E., Johnson, W.T., Baker, J.E., Cusick, T.S., Williams, V.K., Tinsley, F.C., Kriauciunas, A., Manetta, J., Chen, V.J. 1997.

Acylation of human insulin with palmitic acid extends the time action of human insulin in diabetic dogs. *Diabetes*, 46, 637-642.

Nicoli, S., Santi, P., Couvreur, P., Couarraze, G., Colombo, P., Fattal, E., 2001. Design of triptorelin loaded nanospheres for transdermal iontophoretic administration. *Int. J. Pharm.*, 214, 31-35.

Niwa, T., Takeuchi, H., Hino, T., Kunou, N., Kawashima, Y. 1993. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with d,l-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behaviour. *J. Control. Release* 25, 89-98.

Nyambura, B.K., Kellaway, I.W., Taylor, K.M.G. 2009. Insulin nanoparticles: Stability and aerosolization from pressurized metered dose inhalers *Int. J. Pharm.*, 375, 114-122.

Norris, D.A., Puri, N., Sinko, P.J. 1998. The effect of physical barriers and properties on the oral absorption of particulates. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 34, 135-154.

O'Brien, R.W., White, L.R., 1978. Electrophoretic mobility of a spherical colloidal particle. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 2, 1607-1626.

Okassa, L.N., Marchais, H., Douziech-Eyrolles, L., Hervé, K., Cohen-Jonathan, S., Munnier, E., Soucé, M., Linassier, C., Dubois, P., Chourpa, I., 2007. Optimization of iron oxide nanoparticles encapsulation within poly(D,L-lactide-co-glycolide) sub-micron particles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67, 31-38.

Pinto-Reis, C., Ribeiro, A.J., Houg, S., Veiga, F., Neufeld, R.J. 2007. Nanoparticulate delivery system for insulin: design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 30, 392-397.

Rekha, M.R., Sharma, C.P. 2009. Synthesis and evaluation of lauryl succinyl chitosan particles towards oral insulin delivery and absorption. *J. Control. Release*, 135, 144-151.

Ruiz, M.A., Gallardo, V., Ouazzani, N., López-Viota, J., López-Durán, J.D.G., 2004. Electrophoretic properties of acrylic latex suspensions (Kollicoat[®] MAE 30 D) and ibuprofen. *Il Farmaco*, 59, 657-662.

Sahana, D.K., Mittal, G., Bhardwaj, V., Ravikumar M.N.V., 2008. 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.*, 97, 1530-1542.

Sahoo, S.K., Panyam, J., Prabha, S., Labhasetwar, V. 2002. Residual polyvinyl alcohol associated with poly (D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles affects their physical properties and cellular uptake. *J. Control. Release*, 82, 105-114.

Sajeesh, S., Sharma, C.P. 2006. Cyclodextrin-insulin complex encapsulated polymethacrylic acid based nanoparticles for oral insulin delivery. *Int. J. Pharm.*, 325, 147-154.

Santander-Ortega, M.J., Bastos-González, D., Ortega-Vinuesa, J.L., Alonso, M.J. 2009. Insulin-Loaded PLGA Nanoparticles for Oral Administration: An In Vitro Physico-Chemical Characterization. *Journal Biomed. Nanotechnol.*, 5, 45-53.

Shelma, R., Paul, W., Sharma, C.P. 2010. Development and characterization of self-aggregated nanoparticles from anacardoylated chitosan as a carrier for insulin. *Caborhydr. Polym.*, 80, 285-290.

Sonaje, K., Chen, Y.J., Chen, H.L., Wey, S.P., Juang, J.H., Nguyen, H.N., Hsu, C.W., Lin, K.J., Sung, H.W. Enteric-coated capsules filled with freeze-dried chitosan/poly(γ -glutamic acid) nanoparticles for oral insulin delivery. *Biomaterials*, 31, 3384-3394.

Tatford, O.C., Gomme, P.T., Bertolini, J. 2004. Analytical techniques for the evaluation of liquid protein therapeutics. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 40, 67-81.

Teixeira, M., Alonso, M.J., Pinto, M.M.M., Barbosa, C.M., 2005. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59, 491-500.

Trotta, M., Cavalli, R., Carlotti, M.E., Battaglia, L., Debernardi, F. 2005. Solid lipid micro-particles carrying insulin formed by solvent-in-water emulsion-diffusion technique. *Int. J. Pharm.*, 288, 281-288.

Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H.J., van der Mei, H.C., Vries, J., Norde, W. 2005. Role of lactobacillus cell surface hydrophobicity as probed by AFM in adhesion to surfaces at low and high ionic strength. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, 41, 33-41.

Yong, Z., Yingjie, D., Xueli, W., Jinghua, X., Zhengqiang. 2009. Conformational and bioactivity analysis of insulin: Freeze-drying TBA/water co-solvent system in the presence of surfactant and sugar. *Int. J. Pharm.*, 371, 71-81.

Zhou, X.H., Po, A.L.W. 1991a. Peptide and protein drugs: I. Therapeutic applications, absorption and parenteral administration. *Int. J. Pharm.*, 75, 97-115.

Zhou, X.H., Po, A.L.W. 1991b. Peptide and protein drugs: II. Non-parenteral routes of delivery. *Int. J. Pharm.*, 75, 117-130.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Según se indicó al principio de esta memoria, el principal objetivo de la presente Tesis Doctoral ha sido diseñar, producir, evaluar y optimizar sistemas micro- y nano-particulares de naturaleza polimérica (PLGA) conteniendo moléculas activas de naturaleza diversa, realizando un estudio comparativo entre una tecnología considerada como tradicional (SEV) y una nueva tecnología basada en microdinámica de fluidos (FF). Para ello, se plantearon una serie de objetivos parciales organizados por capítulos. En base a esos objetivos, las conclusiones obtenidas en este trabajo se exponen siguiendo la misma estructuración:

I. *SYNTHESIS OF LIDOCAINE LOADED PLGA NANOPARTICLES BY FLOW FOCUSING. EFFECTS ON DRUG LOADING AND RELEASE PROPERTIES.*

Según se indicó, se hace un estudio comparativo entre dos técnicas de microencapsulación de lidocaína (fármaco tomado a modo de ejemplo), con objeto de optimizar las condiciones de producción en función de la caracterización de los sistemas obtenidos. Se concluye lo siguiente:

1. Método de cuantificación de lidocaína: el método por HPLC empleado es lineal, exacto y preciso en el intervalo de concentraciones 0.05 – 0.5 mg/mL
2. Estudios de compatibilidad:
 - a. Los análisis térmicos determinan la compatibilidad entre los diferentes PLGA empleados y la lidocaína, en las condiciones empleadas para elaborar las micropartículas.
 - b. Los termogramas y los difractogramas de rayos X han revelado que (I) no se ha producido interacción alguna entre los componentes, y (II) el fármaco no experimenta ningún cambio en su estado físico, con ninguna de las dos técnicas ensayadas.

Estas circunstancias permiten concluir que ambos métodos (SEV y FF) proporcionan sistemas multiparticulares de PLGA que no

implican ningún tipo de alteración en la estructura de la molécula usada a modo de fármaco modelo.

3. Estudio comparativo del tamaño medio de las micropartículas:

- a. Considerando la capacidad de las dos técnicas de microencapsulación ensayadas para ejercer un control sobre el tamaño medio de las micropartículas obtenidas, los resultados son concluyentes: FF produce microesferas con un grado de dispersión mucho menor que SEV. En todos los lotes producidos, la reducción del grado de dispersión mediante Flow Focusing ha sido superior al 60 %.
- b. En ningún caso se han encontrado influencias sobre el tamaño medio de las micropartículas ni en función del peso molecular de los polímeros usados ni en función de la presencia o no de grupos carboxílicos finales en las macromoléculas.

4. Estudios de rendimiento: FF permite un grado de incorporación del fármaco extraordinariamente superior en comparación con SEV (incrementos superiores al 1000 %). Además, las influencias que ejercen los factores de formulación derivados de las viscosidades inherentes de los polímeros sobre este parámetro son claramente inferiores en el caso de FF.

5. Estudios de liberación *in vitro*:

- a. Micropartículas obtenidas por FF ejercen un mayor control en la velocidad de liberación que SEV, debido tanto a la mayor hidrofobicidad exhibida por la superficie del sistema como por su mayor control ejercido sobre la dispersión del tamaño.
- b. Independientemente de la técnica, los polímeros más hidrofílicos aceleran el proceso de liberación.

II. PROTEIN-LOADED PLGA MICROPARTICLES ENGINEERED BY FLOW FOCUSING: PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION AND PROTEIN DETECTION BY REVERSED-PHASE HPLC.

Este capítulo está centrado en el estudio de la aplicación de la tecnología FF en la producción de micropartículas peptídicas, empleando para ello GFP, con la intención de controlar y optimizar las condiciones implicadas en la microdinámica de fluidos y su aplicabilidad en biomoléculas peptídicas de uso terapéutico. Las conclusiones obtenidas son:

1. Cuantificación de GFP: se ha desarrollado y validado un método por RP-HPLC para cuantificar el péptido en las micropartículas, no recogido en bibliografía hasta el momento. Este método permite reducir el tiempo y el coste del análisis.
2. Se ha aplicado un modelo teórico para predecir los tamaños de micropartículas de GFP obtenidos por FF, habiéndose obtenido una muy buena correlación entre los valores teóricos y los reales, independientemente de la carga de péptido.
3. Las micropartículas obtenidas están en el rango coloidal, son monodispersas y presentan un elevado contenido en GFP (> 90 %), independientemente de las condiciones de producción.
4. Las propiedades electrocinéticas de las micropartículas demuestran que el péptido GFP está localizado en el interior del sistema polimérico, no habiendo adsorción de la proteína en la superficie de las partículas. Esta circunstancia es independiente de las condiciones de producción ensayadas.
5. La producción de las micropartículas por FF implica la obtención de sistemas cuyas propiedades de geometría (tamaño, superficie, morfología) no se ven alteradas por la incorporación de GFP.

III. **DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A REVERSE-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE ASSAY OF INSULIN IN PLGA MICROSPHERES.**

Como se indicó, en este capítulo, el desarrollo de una técnica analítica para evaluar y cuantificar los sistemas micro- y nanoparticulares de insulina se hizo esencial por los problemas que planteaban los métodos recogidos en bibliografía, principalmente referidos a daños en el equipo, debido a la elevada concentración de sales, y duración del método.

Se ha desarrollado y validado un método de HPLC adecuado para el control de calidad de micropartículas poliméricas (PLGA) de insulina, empleando medios sin sales y, por tanto, más compatibles tanto con los equipos analíticos como con los péptidos a emplear.

Se ha demostrado que el método es selectivo, lineal, exacto y preciso en un intervalo del 50 – 150% de la concentración de insulina ensayada (100 µg/mL) con un coeficiente de correlación superior a 0,998. Los límites de detección y cuantificación fueron 0.025 y 0.5 µg/mL, respectivamente, valores en una concentración mucho más baja que la esperada en los sistemas.

Se ha acertado de forma significativa el tiempo de retención de la insulina con respecto al método propuesto por la USP, permitiéndose reducir los tiempos de retención de 20 minutos a 5.5 minutos (esto supone una reducción de más de 350 %)

IV. INSULIN-LOADED PLGA MICROPARTICLES: FLOW FOCUSING VS. SOLVENT EXTRACTION/EVAPORATION METHODOLOGIES.

Los datos de microdinámica de fluidos (Capítulo II) han permitido producir sistemas multiparticulares de insulina por medio de FF, habiéndose optimizado un método analítico alternativo del péptido (Capítulo III). En este capítulo se ha llevado a cabo una comparativa entre esta tecnología y la SEV, con objeto de seleccionar las mejores condiciones de producción de estos sistemas referidos a control de tamaños, rendimientos y caracterización tecnológica y biofarmacéutica. Además, se ha estudiado la integridad del péptido tras su encapsulación en las condiciones de formulación ensayadas.

1. Las dos técnicas ensayadas generan partículas con superficies lisas y formas esféricas. Presentando unos potenciales electrocinéticos en función del pH y de la fuerza iónica siempre negativos. El estudio electrocinético comparativo entre partículas cargadas de insulina y no cargadas, reveló que la insulina no se adsorbe en la superficie de las partículas. Hecho ya demostrado en el capítulo II.

2. Tamaño medio de los sistemas particulares:

- a. Según los resultados obtenidos en el capítulo II, se han reproducido las condiciones teóricas de microencapsulación generándose partículas de insulina de los tamaños previstos.
- b. Tanto FF como SEV genera sistemas dentro de la escala nanométrica, siendo algo superiores las de FF; no obstante, FF ejerce un control mucho más exhaustivo sobre el tamaño medio (de nuevo se obtiene una reducción de la polidispersión superior al 60%).

3. Contenido en insulina:

- 3.1. Manteniendo las mismas condiciones de pH en las soluciones implicadas en la síntesis de las

micropartículas, FF genera sistemas con el doble de carga de insulina que SEV.

3.2. Respecto a la optimización con FF, se consigue aumentar la eficacia de encapsulación aumentando el pH tanto del líquido enfocante como de la solución de PVA de recogida. En este sentido, se ha demostrado que cuanto más parecidos sean estos valores básicos de pH, mayor es la tasa de incorporación del péptido.

4. Integridad de la insulina:

- a. Los datos de los espectros de dicroísmo circular determinan que la insulina mantiene su estructura secundaria tras el proceso al que se ve sometida para su nanoencapsulación, tanto por SEV como por FF.
- b. Los estudios de fluorescencia llevados a cabo demuestran que la estructura terciaria de la proteína también se mantiene intacta, en ambos casos.

5. Los estudios de liberación *in vitro* muestran un perfil bifásico. La primera etapa implica una liberación inmediata debido a la difusión de la insulina más superficial de la matriz polimérica (el FF muestra un menor efecto burst que el SEV: 60% de insulina en 3 h (SEV) vs. 2 h (FF)). La etapa lenta, como consecuencia de la degradación de la matriz polimérica, libera la insulina total del sistema en aproximadamente 8 h para SEV frente a 36 h para FF. El mayor control sobre la liberación de las formulaciones elaboradas por FF se debe a una mayor interacción entre la insulina y el polímero, a la mayor hidrofobicidad de los sistemas y al mayor control sobre la dispersión de tamaño.

Con la intención de extraer una conclusión global a modo de resumen, se puede señalar que la tecnología FF aplicada a la producción de sistemas multiparticulares permite ejercer un mayor control sobre el tamaño medio de las partículas, además de un mayor valor de atrapamiento de los activos empleados y un mayor control sobre los procesos de liberación, en comparación con una tecnología tradicional como el SEV. Esto es así tanto para el caso de lidocaína, empleado a modo de ejemplo, como de moléculas peptídicas, GFP e insulina, también entendidas como ejemplos de biomoléculas.

Además, se han desarrollado y validado dos nuevos métodos analíticos para cuantificar por HPLC tanto GFP como insulina. En el caso de GFP, no había ningún método por HPLC recogido en la bibliografía, y en el caso de insulina, el método validado mejora el recogido en USP tanto en manejabilidad como en rapidez.

