



Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Desarrollo de tintas nanoestructuradas para la incorporación de fármacos biomacromoléculares

Memoria de pregrado para optar al título de Químico Farmacéutico
Felipe Aaron Campano Hantscheruk

Santiago de Chile, 2016

Director de Memoria y Patrocinante

Dr. Javier Morales Montecinos

Dedicatoria

A veces uno se plantea, ¿estaré haciendo lo apropiado?...

Hasta tercer año de carrera, esa premisa fue mi bastión para esconder mis debilidades, siendo la duda sobre mi futuro, una de ellas.

Es ahí donde conocí dos proverbios que han sido mis cimientos en el desarrollo como estudiante de la carrera de Química y Farmacia, lo cual me permitió seguir adelante.

“塵も積もれば山となる”

Si acumulas mucho polvo, puedes crear una montaña

Como estudiante, es común plantearse “¿Son útiles estos ramos?”. Más aun, está el dicho universitario “Ramo pasado, ramo olvidado”. Siendo tesista, todavía recuerdo los controles de Química General I, los refranes del profesor Pedro Aguirre, el dolor de cabeza que fue para mí fisicoquímica I, estadísticas y Química analítica II. Curiosamente, estos tres ramos fueron la base para el desarrollo de este trabajo y ahora no saben cuánto apreciaría el volver a dar estos ramos, al ver como cabeceo ordenando tablas, entendiendo las bases de ciertas técnicas analíticas y más aún, entender las bases fisicoquímicas de cómo se encapsulan los fármacos por los polímeros.

“猿も木から落ちる”

Incluso los monos se caen de los árboles

Es proverbio tiene dos posibles concepciones:

- 1) Ser humilde. Incluso los que más saben de su área, pueden caer en algún momento.
- 2) Ser cauteloso al progresar. En cualquier momento uno puede caer

Cuando era mechón, solía ser poco humilde y aun me consideró una persona soberbia, peor aún, varias veces di pasos seguros y con un horizonte. No sé en qué momento deje el suelo para caminar en las nubes y aún peor que eso, en que momento mi cara toco el suelo al caer de mi paraíso del ego.

Y es por estos dos proverbios, que agradezco tanto el haber conocido a ciertas personas en la carrera. Personas que derribaron mis falsos triunfos, detectaron y pulieron capacidades que yo consideraba escasas, compañeros de lágrimas y risas.

Lamentó solo 2 cosas:

- 1) Haber perdido el tiempo en las clases y no haber rendido lo que realmente podía
- 2) Haber perdido amigas y amigos por no valorarlos

Pero hay varias cosas que agradezco en mi vida:

- 1) Tener la mejor madre del universo (sí, incluso que la de usted señor lector). Una mujer que se ha descrestado para que yo salga adelante y que no ha dudado de mí en ningún momento. Por mí... ella pasó hambre, frío y enfermedad, solo para que yo tuviese algo que comer y vestir cada día.
- 2) Una gran asistente social y una gran madrina, que me apoyaron en mis peores momentos
- 3) Mi polola Carito y su padre, Don Patricio. Quienes me han apoyado mucho en estos últimos meses. Han sido meses complicados, en donde ha muerto dos veces el notebook donde se redactó esta tesis y me han ayudado en esos momentos de frustración ante las adversidades que plantea la vida misma.
- 4) Personas que me ayudaban a metros de distancia. No me considero alguien amigable y creo que nadie es imprescindible en esta vida, pero aun así, hubieron personas a mi lado.
- 5) Un buen director de tesis, quien conociendo mis defectos, me acepto como su discípulo.
- 6) Buenos compañeros de laboratorio, que al existir un equipo multidisciplinario, me han auxiliado en las preguntas que uno se va planteando a medida que se desarrolla la investigación.

Y son estas personas, a las que les dedico mis derrotas y mis victorias.
¡Gracias por todo!

Agradecimientos

- 1) Integrantes del laboratorio de liberación de fármacos (Drug Delivery). Dentro de estos, mi director Javier Octavio Morales Montecinos.
- 2) Marcelo Kogan por haber concedido su tiempo en revisar esta tesis al igual que Javier Morales Montecinos.
- 3) A los tres integrantes de la comisión evaluadora (Javier Morales M, Marcelo Kogan y Felipe Oyarzún) por ceder parte de su acotado tiempo en la defensa de esta tesis.
- 4) Profesores del Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéutica
- 5) Asistentes sociales de Bienestar Estudiantil de la Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas.
- 6) Por sobre todo, mi madre: Helena Hantscheruk. Mi madrina: Dorila Inostroza, mis 7 gatos (Dolly, Tommy, Zura, Lady, Pipo, Gatalina y Chica) y mi polola, Carito puerca, que me ha ayudado en los malos momentos, que me ha dado su hombro en los peores momentos de la tesis y que ha sido una compañera primordial en esta etapa de la vida. Su padre, Patricio Avendaño, quien hace más de 20 años trabajo con nanopartículas y por tanto, comparte mi sentir por las derrotas y victorias generadas en esta tesis, además de ser alguien interesante para conversar los viernes en la noche.
- 7) Freddie Mercury, John Lennon, George Harrison y Frédéric Chopin por su música que me acompañaron en la redacción de esta tesis y en su desarrollo experimental.

Índice

Dedicatoria	2
Agradecimientos	4
Índice de ecuaciones, gráficos, ilustraciones y tablas	7
Ecuación	7
Gráficos	7
Ilustraciones	9
Tablas	9
Resumen	10
Abstract	11
Introducción	12
Hipótesis y Objetivos	19
Hipótesis	19
Objetivos Generales	20
Objetivos Específicos	20
Materiales	21
Metodología	22
Síntesis de Nanopartículas Poliméricas	22
Estimación de eficiencia de asociación	23
Resuspensión de nanopartículas (generación de tintas)	24
Impresión de la nanosuspensión	26
Caracterización de Nanopartículas	27
Determinación de Tamaño, Polidispersión y Potencial Z	27
Cuantificación de la actividad de la lisozima	27
Actividad basal de la Lisozima y actividad residual en distintos medios	28
Actividad de la lisozima en función de la concentración de lisozima	28
Actividad de la lisozima encapsulada	29
Estudio de liberación	29
Estudio de estabilidad	30
Análisis Estadístico	31

Resultados y Discusión	32
1) Sintetizar nanopartículas poliméricas y caracterizar tamaño, polidispersión, potencial zeta y eficiencia de asociación	32
2) Estudiar los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas a través del proceso de resuspensión e impresión	38
3) Estudiar la liberación de la lisozima desde su matriz	49
4) Además de estudiar el comportamiento de la actividad en función de la concentración	51
5) Estudiar la estabilidad de las nanopartículas	57
Conclusiones	59
Limitaciones experimentales	60
Perspectivas	60
Referencias	61

Índice de ecuaciones, gráficos, ilustraciones y tablas

Ecuación

Ecuación 1. Eficiencia de asociación, donde M_c es la masa de lisozima cargada al inicio y M_s es la masa encontrada en el sobrenadante.....	24
Ecuación 2. Ecuación termodinámica de Gibbs.....	33
Ecuación 3. Ecuación de Einstein-Stokes, en donde podemos observar como la proporcionalidad inversa entre el radio hidrodinámico y el coeficiente de difusión.	40
Ecuación 4. Ecuación de Henry para determinar la movilidad electroforética. ϵ es la constante dieléctrica, z es el potencial Z de la nanopartícula, $f(\kappa a)$ es la aproximación de Smoluchowski (la cual puede valer 1 o 1,5 en función del valor de la constante dieléctrica) y η es la viscosidad del medio.....	42
Ecuación 5. Porcentaje de ionización para el Glu35 a pH 4,6.....	54
Ecuación 6. Porcentaje de ionización para el Asp52 a pH 4,6.....	54
Ecuación 7. Porcentaje de ionización del Glu35 a pH 6,2.....	54
Ecuación 8. Porcentaje de ionización del Asp52 a pH 6,2.....	54

Gráficos

Gráfico 1. Tamaño de partícula asociado al cociente entre cargas. (N= 3, P > 0.05; * Estadísticamente distinto entre distintas razones de cargas. +: Estadísticamente distinto entre una formulación antes de la carga con lisozima y después de la carga con lisozima).	32
Gráfico 2. Polidispersión de las nanopartículas, antes y después de agregar lisozima. (N= 3, P > 0.05; * Estadísticamente distinto entre distintas razones de cargas. +: Estadísticamente distinto entre una formulación antes de la carga con lisozima y después de la carga con lisozima).....	35
Gráfico 3. Relación entre el cociente de cargas y el potencial Z al agregar lisozima al medio. (N=3, P>0.050). * Estadísticamente diferente.....	35
Gráfico 4. Eficiencia de asociación en función del cociente de cargas. Se observa que mientras mayor es la razón de carga (o sea, la proporción de polímeros es cercana a 1), es mayor la eficiencia de asociación. (N = 3 para cada muestra. Las 3 son estadísticamente distintas entre sí)	37
Gráfico 5. Impacto de la glicerina en el tamaño de la nanopartícula. (N=3, P>0.050). Todas estadísticamente distintas entre antes de agregar glicerina y después de agregar.....	39

Gráfico 6. Impacto de la glicerina en la polidispersión de las nanopartículas. *significa que son estadísticamente diferentes entre antes de cargar la glicerina y después. (N=3, P>0.050).....	41
Gráfico 7. Impacto de la glicerina en el potencial Z de las nanopartículas. (N=3, P>0.050). Todas son estadísticamente distintas entre la formulación con y sin glicerina, pero estadísticamente semejantes entre distintas razones de carga.	42
Gráfico 8. En este gráfico, podemos observar los cambios de tamaño por efecto de la resuspensión y la impresión de la nanopartícula. (P>0.050, N = 3). Los descriptores estadísticos funcionan de la siguiente manera, tal que si posee la letra a, significa que la formulación es distinta de la sin glicerina. Si posee b, es distinta de la con glicerina y si posee c, es distinta de la que fue impresa.....	44
Gráfico 9. En este gráfico, podemos observar los cambios de polidispersión por efecto de la resuspensión y la impresión de la nanopartícula. (P>0.050, N = 3). Los descriptores estadísticos funcionan de la siguiente manera, tal que si posee la letra a, significa que la formulación es distinta de la sin glicerina. Si posee b, es distinta de la con glicerina y si posee c, es distinta de la que fue impresa. Para el caso de 0,5; No se usaron descriptores ya que entre las 3 eran estadísticamente distintas.	46
Gráfico 10. En este gráfico, podemos observar los cambios de potencial Z por efecto de la resuspensión y la impresión de la nanopartícula. (P>0.050, N = 3). Los descriptores estadísticos funcionan de la siguiente manera, tal que si posee la letra a, significa que la formulación es distinta de la sin glicerina. Si posee b, es distinta de la con glicerina y si posee c, es distinta de la que fue impresa.....	47
Gráfico 11. Perfil de liberación para 2 formulaciones en función de la razón de carga (cargas positivas/cargas negativas). Posee N=3 para cada una. Para 0.5%, no supera el 1% la SD; mientras que para 0.25, no supera el 15% para cada una. La formulación de 0,1 no fue mostrada en el gráfico, ya que liberaba un 100% desde el principio y se mantenía esa cantidad durante las 8 horas.	49
Gráfico 12. Relación entre actividad enzimática y concentración de lisozima. (N=3; A modo de observación, desviaciones estándares inferiores al 1% no son posibles observarlas en el gráfico.)	51
Gráfico 13. Caída de actividad en dos medios. El primero, buffer acetato 4.6 (100mM) y sin glicerina. El segundo, buffer fosfato 6.2 (100mM) pero con un 30% de glicerina. (N=3; P<0.050). * corresponde a que es estadísticamente diferente.....	52
Gráfico 14. Actividad de la lisozima en tres formulaciones. En eje X corresponde a la razón de carga y su respectiva concentración liberada en 1 hora (y por tanto, es la concentración del estándar generado que equivale al 100% de la actividad) mientras que el Y corresponde al porcentaje de actividad. (N=2, P>0.050), donde * es estadísticamente distinto de otro.	56

Gráfico 15. Eficiencia de asociación en el día 30 de tres formulaciones con nanopartículas. Se definió como el 100% la masa interna dada por la eficiencia de asociación en el día 0 de estas mismas tres formulaciones. (P>0.050, N=3).....57

Ilustraciones

Ilustración 1. Estructura de los monómeros que conforman el ácido alginico	15
Ilustración 2. Estructura del ácido alginico.....	15
Ilustración 3. Estructura del polímero EE.....	16
Ilustración 4. Esquema que representa el funcionamiento y las partes del sistema novedoso propuesto en esta tesis basada en la impresión de una suspensión con nanovehículos de alginato-polímero EE cargados con lisozima sobre un sustrato inerte (en este caso, la mica radiológica).	18
Ilustración 5. En esta ilustración, es posible ver los órdenes de transferencia para cada solución en la preparación de las nanopartículas	23
Ilustración 6. Proceso de separación de las nanopartículas para estimar la eficiencia de asociación.....	24
Ilustración 7. Proceso de separación para resuspensión de la nanopartículas.....	25
Ilustración 8. Representación del proceso de reflujo para recuperar las nanopartículas de la mica radiológica.	26
Ilustración 9. Estudio de liberación paso a paso	30
Ilustración 10. Esquema extraído del Manual de Malvern en donde es posible visualizar las capas de una partícula y la importancia de la distancia en la determinación del potencial Z.	44
Ilustración 11. Perfil de liberación extraído del trabajo de Jiang et al, en donde se observan distintos medios de liberación. Es relevante para nosotros notar a pH 7,4, en donde se observa una caída en la cantidad liberada (desde un 100% a 50% en 2 días y fracción) a pH 7,4.....	51
Ilustración 12. Mecanismo de Vernon [47] que explica cómo se lisan los poliaminosacaridos por efecto de la lisozima	53

Tablas

Tabla 1. Comparación entre vía sublingual y bucal.....	13
Tabla 2. Volúmenes y masas de cada reactivo usado para preparar las nanopartículas ..	23

Resumen

En los últimos 20 años, los medicamentos biotecnológicos han tenido un fuerte impacto en el tratamiento de enfermedades. Dentro de estos medicamentos, la administración de péptidos y proteínas está restringida en la mayoría de sus casos a la vía parenteral, ya que, por ejemplo, por la vía oral son degradados. El problema de la vía parenteral, es que posee muchas limitantes que a largo plazo, generan baja adherencia al tratamiento. En la literatura, se ha descrito una posible solución alternativa que es la administración a través de la mucosa bucal. Esta vía es cómoda y poco invasiva, lo que facilita la adhesión al tratamiento, por un lado, y además permite corregir posibles efectos adversos en su administración, al retirar el dispositivo que suministra el fármaco. Como la ruta bucal posee bacterias que pueden degradar la proteína, es que es necesario protegerlas fisicoquímicamente del medio. La nanotecnología nos ofrece distintas herramientas para protegerlas, tal como el uso de nanovehículos. Por otro lado, los nanovehículos pueden ser deglutidos, por lo que requieren una inmovilización sobre la mucosa, es por esto, que la literatura ofrece como solución el desarrollo de film mucoadhesivos.

En esta tesis, he planteado como posible solución a los problemas descritos arriba, el usar nanopartículas poliméricas cargadas con una proteína modelo (lisozima), las cuales van impregnadas sobre un film polimérico, que es usado para inmovilizar las nanopartículas en la mucosa de las mejillas. Para impregnar el *film* polimérico, he propuesto el uso de una impresora común, cuyo *cartridge* se carga con una suspensión con las nanopartículas y ésta se imprime sobre el *film*.

La tesis está dividida experimentalmente en dos puntos. Por un lado, generar distintas formulaciones de nanopartículas para proteger la proteína modelo. Estas nanopartículas fueron caracterizadas fisicoquímicamente (tamaño, polidispersión y potencial zeta) y se observó su viabilidad como vehículo en el proceso de generación de la nanosuspensión e impresión de éstas, además de caracterizar su perfil de liberación y su estabilidad durante un mes a dos temperaturas distintas. El segundo punto fue ver si estos vehículos protegen la proteína modelo del proceso de resuspensión, el cual es el punto más crítico al trabajar con un viscosante (glicerina) que podría desnaturalizar la proteína modelo.

Los principales hallazgos de este trabajo es la indicación de que es posible imprimir diversas formulaciones de nanovehículos con distintas propiedades fisicoquímicas, lo que genera diferentes eficiencias de asociación, perfil de liberación y estabilidad de la estructura de las nanopartículas. Por otro lado, estas mismas propiedades fisicoquímicas, condicionan la estabilidad de la proteína dentro de los nanovehículos. Por lo tanto, es posible usar la técnica de impresión para obtener *film* cargados con nanopartículas y además, proteger las proteínas con estos nanovehículos.

Abstract

In the last 20 years, biotech drugs have had a major impact in the treatment of diseases. Among these drugs, the administration of peptides and proteins is limited mostly to the parenteral route. The problem of injecting, is that it has many long-term constraints that generate low adherence to the treatment. In the literature, it is described a possible alternative solution which is the administration through the buccal mucosa. This route is convenient and minimally invasive, which facilitates adherence to treatment, allows correcting any adverse effects on administration, and allows for the dosage form removal if required. As the buccal route has bacteria that can degrade the protein, it is required a physicochemical protection from the environment. Nanotechnology offers different tools to protect them, such as the use of nanocarriers. Nevertheless, nanocarriers can be swallowed if not adequately immobilized; therefore, they require intimated and sustained contact with the mucosa, which is why that literature offered as solution the development of mucoadhesive films.

In this thesis, I raised as a possible solution to the issues detailed above, the use of polymeric nanoparticles loaded with a model protein (lysozyme), which are impregnated on a polymeric film. This film is used to immobilize the nanoparticles in the buccal mucosa. To incorporate the nanocarriers on films. I have proposed the use of a common printer. In this printer, the cartridge is charged with a suspension of nanoparticles which is printed on the film.

The thesis is divided into two points experimentally. Firstly, the fabrication of various nanoparticle formulations to protect the model protein. These nanoparticles were physicochemically characterized (size, polydispersion and zeta potential) and viability as a vehicle was observed in the generation process of the nanosuspension and printing them. Furthermore, their release profile and stability for one month at two different temperatures was evaluated. Secondly, the potential of these vehicles to protect the model protein of the resuspension process was determined. This is the most critical step when working with a thickener agent (glycerin) that could denature the protein model.

The main finding of this work is that it is possible to print various formulations of nanocarriers with different physicochemical properties, resulting in different association efficiencies, release profile and stability of the structure of nanoparticles. Furthermore, these same physicochemical properties determine the stability of the protein within the nanocarriers. Therefore, it is possible to use the printing technique to fabricate films loaded with nanocarriers, and by doing this, protecting proteins incorporated in these nanocarriers.

Introducción

En los últimos 20 años, los medicamentos biotecnológicos han tenido un fuerte impacto en la farmacoterapia, ya que ofrecen eficacia y selectividad para patologías que generalmente requieren de un farmacoterapia polifarmacéutica y en la mayoría de los casos, son solo tratamientos paliativos [1]. Todos los medicamentos biotecnológicos comparten una característica molecular y es que son biomacromoléculas.

Las biomacromoléculas [2] se dividen en los siguientes grupos:

- Polisacáridos
- Lípidos
- Bases nitrogenadas
- Proteínas/péptidos

Principalmente, los medicamentos biotecnológicos pertenecen al último tipo de las agrupaciones antes mencionadas. Los productos biotecnológicos [3], son proteínas/péptidos que han sido fabricadas por un organismo vivo que ha sido modificado a través de tecnología de ADN recombinante. Pero, a pesar de la eficacia y selectividad de esta clase de medicamentos, éstos presentan limitaciones por ser proteínas y péptidos, ya que presentan:

- Metabolismo de primer paso [4]
- Degradación por el pH estomacal[5]
- Desestabilización por sales biliares[5]
- Biodegradación por bacterias intestinales[5]
- Limitada absorción [4,5]

Como podemos observar, estas cuatro características son propias de la vía oral, por lo que tienen una limitada absorción y es por esto, que la administración convencional es por vía parenteral [6,7]. Como son de administración parenteral, aparecen los siguientes inconvenientes [8]:

- Requerimiento de asepsia y personal calificado
- Toxicidad tisular por irritación local
- Dolor
- Imposibilidad de corregir un error de administración

Es por estas razones, que sería mejor una vía más cómoda y sencilla para administrar. La presente tesis fue dirigida a la formulación de productos para la vía transmucosa oral y en particular la ruta bucal debido a sus particulares ventajas (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre vía sublingual y bucal

	Ventajas	Desventajas
Sublingual [9]	<ul style="list-style-type: none"> • Alternativa de la vía oral para la medicación que se encuentre comercializada en esta presentación. • Permite la incorporación directa al torrente circulatorio. • Se evita el tránsito por el tracto gastrointestinal inferior y el sistema portal. 	<ul style="list-style-type: none"> • Esta vía al ser sublingual, interfiere los procesos de ingerir, beber y hablar, lo que dificulta su uso a largo plazo. • No es una vía recomendada para sistemas de liberación prolongada. • No puede ser usada en pacientes que no cooperan o están inconscientes. • El paciente no puede fumar mientras usa este dispositivo, ya que la nicotina genera vasoconstricción y disminuye la absorción del fármaco.
Bucal [10]	<ul style="list-style-type: none"> • Comodidad: fácil manejo, buena aceptación. • No es invasiva. • Llega a la circulación sistémica rápidamente. • Elimina el primer paso hepático. 	<ul style="list-style-type: none"> • La velocidad de disolución determina la velocidad de paso a través de la mucosa. • La permeabilidad a los medicamentos: máxima a nivel sublingual y mejillas, mínima a nivel de encías y lengua. • Variación del pH de la boca.

Como podemos observar en esta tabla resumen, la vía sublingual altera procesos cotidianos tales como ingerir, beber o conversar y por tanto, no es recomendada para sistemas de liberación prolongada. Es por esto, que optamos por la vía bucal. Sin embargo, la boca posee bacterias que degradan proteínas [11] y además, las proteínas pueden ser deglutidas si no están debidamente inmovilizadas. En el primer caso, la ciencia ha ofrecido una posible solución para esto y es el uso de la nanotecnología para proteger la estructura de las proteínas. En general [12], la nanotecnología ha brindado las siguientes soluciones en las ciencias farmacéuticas para mejorar los tratamientos farmacológicos, tales como:

- Mejora de las propiedades de drogas poco solubles
- Liberación localizada en tejidos

- Transcitosis de drogas a través de membranas
- Co-liberación de dos o más drogas para tratar una enfermedad
- Visualización de sitios de liberación de fármacos
- Observación *in vivo* de la eficacia de un agente terapéutico
- Vehiculización y liberación de fármacos

La mayoría de los beneficios antes descritos están englobados en un concepto mayor denominado “nanovehículos”. Los nanovehículos en general, se comportan como barreras fisicoquímicas que protegen a los fármacos al evitar la interacción de los principios activos con el medio y en función de las propiedades fisicoquímicas de los nanovehículos, aparecen los efectos antes enumerados [13,14]. Se ha observado que estos vehículos pueden pasar a través de las membranas celulares, pero existen puntos críticos para la optimización de este paso: el tamaño [15] y las propiedades fisicoquímicas de los nanovehículos [13].

En general, el tamaño y las propiedades dependerán del tipo de material con el que se trabaje. Los nanovehículos nos ofrecen una gran cantidad de propiedades fisicoquímicas y tamaños, ya que existen distintas técnicas de nanovehiculización [16]. Existen sistemas orgánicos e inorgánicos como por ejemplo:

Orgánicos:

- Sistemas lipídicos (como liposomas y nanoemulsiones)
- Sistemas micelares
- Sistemas poliméricos

Inorgánicos [17]:

- Agentes focalizadores magnéticos [18]
- Nanopartículas metálicas
- Nanopartículas no metálicas
- Nanopartículas carbonadas (Fullerenos, diamantes y varillas)

En esta tesis, utilizaremos sistemas poliméricos [19,20] ya que son sistemas con alta absorción en función de su tamaño y propiedades superficiales [21], alta superficie de adsorción [22], propiedades de superficies controlables [21–23], toxicidad, distribución y excreción controlables [24].

El sistema de síntesis propuesta en esta tesis es la coacervación compleja [25,26], en la cual, interaccionan dos polímeros de cargas contrarias y se mantienen en suspensión. La técnica fue elegida ya que es simple, fácil de producir y evita la exposición de la proteína a solventes orgánicos y aceites, como por ejemplo la precipitación por antisolvente y nanoemulsiones por desplazamiento de solvente.

Actualmente los polímeros usados abarcan desde polímeros naturales hasta sintéticos, siendo para nosotros, el alginato de sodio y un derivado de metacrilato (polímero EE) los polímeros de interés. El alginato de sodio [27] es un polímero obtenido de las algas pardas, caracterizado por su alto peso molecular, su extensión de cadenas en función de la fuente de extracción y variedad de la especie, además de poder ser biodegradado [28]. A nivel biofarmacéutico, es de interés resaltar su alta mucoadhesión ya que al ser un carbohidrato, se adsorbe con facilidad sobre proteínas altamente glicosiladas como las mucinas que son proteínas de superficie anionica, las cuales se encuentran en la superficie de las mucosas [29–32]. El alginato está compuesto por una cantidad variable de ácido D-manurónico (Ilustración 1) y ácido L-gulurónico (Ilustración 1). Como posee estos monómeros ácidos, es que se comporta como un polímero aniónico (Ilustración 2).

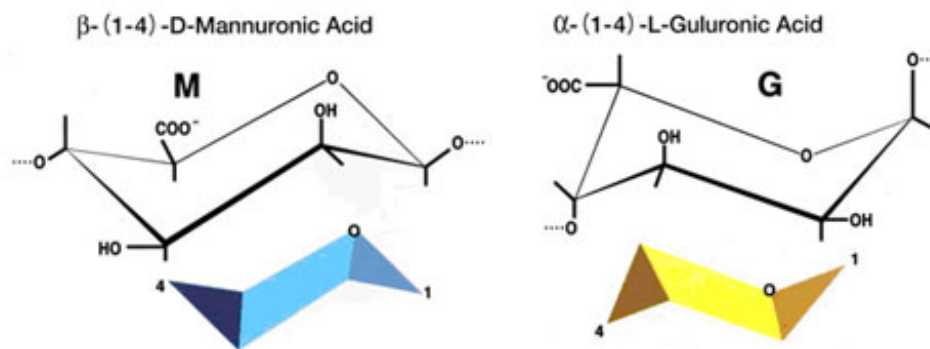


Ilustración 1. Estructura de los monómeros que conforman el ácido alginico

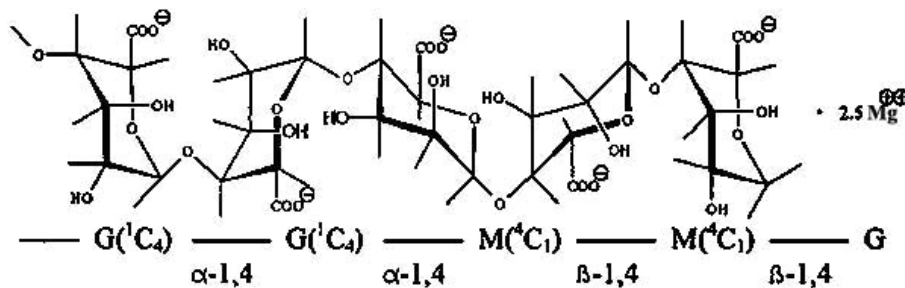


Ilustración 2. Estructura del ácido alginico

Como usaremos coacervación compleja como método de producción, necesitamos un polímero con carga contraria para que interaccione con el alginato. Es por eso, que

decidimos optar por el Polímero EE [33], que es un copolímero de 3 metacrilatos (Ilustración 3), con una amina terciaria, un metil y un butil como cadenas alquílicas accesorias. De tal manera, que tenemos un polímero pH-dependiente al variar la ionización del polímero por la amina terciaria. EE es un polímero soluble a pH inferior a 5 y permeable e hinchable a pH sobre 5.

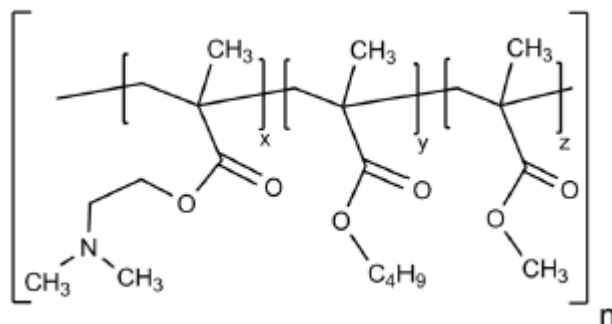


Ilustración 3. Estructura del polímero EE

Los metacrilatos han sido poco aceptados por su toxicidad observada en cirugía plástica, pero en el área de nanotecnología y *drug delivery*, son excelentes candidatos para liberación prolongada, ya que tienen baja excreción [34] y una gran distribución a órganos, como es el caso de pulmones, hígado, bazo, riñones, corazón y cerebro. Además, la literatura reporta que los polimetacrilatos son seguros *in vivo/in vitro*, ya que prueba en cultivos celulares de los órganos antes nombrados y prueba en ratones Winsler no han demostrado alteración alguna con grandes cantidades de nanopartículas de polimetacrilatos (desde 1mg de nanopartículas por kilogramo de ratón, hasta 2.5mg/kg) administrados por vía intravenosa [35]. Se han propuesto sistemas de metacrilato para diabetes [35], patologías pulmonares [36] y patologías cerebrales [37].

Para controlar las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, esta tesis plantea el uso de distintas proporciones de los polímeros antes descritos. La proporción de polímeros está dada en función de la razón de carga, o sea, la cantidad de moles de carga positiva dada por el polímero EE dividido por la cantidad de moles de carga negativa. Teóricamente, cocientes sobre uno se traducen en nanopartículas con potencial zeta positivo, mientras que proporciones inferiores uno generaría nanopartículas con potencial zeta negativo.

La otra estrategia complementaria es la inmovilización de los nanovehículos farmacéutico en un segundo vehículo. Uno de los métodos más explorados para la inserción de nanovehículos para la ruta bucal son los *films* poliméricos [38,39]. En la actualidad, estos sistemas son obtenidos por distintas metodologías (extrusión en caliente, electrospinning,

moldeo por evaporación de solvente, etc). La última, el moldeo de evaporación de solvente, ha sido una de las técnicas más estudiadas en la literatura ya que es un método rápido y sencillo para obtener *films* poliméricos. En resumidas palabras, se vierte una solución de un solvente volátil y un polímero en un molde, luego se somete a secado para eliminar el solvente y se genera el *film* polimérico.

Esta técnica puede ser aprovechada para la incorporación de nanopartículas, ya que se puede usar una mezcla de solvente volátil, polímero inmovilizador y nuestras nanopartículas, en los cuales se elimina el solvente y de esta manera, quedan inmovilizadas la nanopartículas en la matriz del *film* polimérico. De acuerdo a las propiedades del polímero inmovilizador, es su capacidad para liberar y proteger las nanopartículas [39].

Ahora, este sistema también nos genera una desventaja y es que hay un riesgo, de que las nanopartículas:

- Quedan fuertemente retenidas en el seno del *film* y no liberan las nanopartículas.
- Se hinchan las nanopartículas por efecto del solvente, generando pérdida de su contenido.

Es por esta razón, que hemos planteado la posibilidad de “inmovilizar” sobre la superficie del *film* a través de otro sistema, el cual evitaría los dos problemas antes mencionados. El sistema propuesto (Ilustración 4) es una inyección de una nanosuspensión sobre un *film* polimérico a través de una impresora doméstica convencional. Hemos elegido el uso de una impresora ya que su función primaria, es depositar gotas de tinta sobre la superficie de algún material [40,41], en nuestro caso, sería el *film* antes descrito. Pero además de esta función, aparecen distintos beneficios de interés en el área farmacéutica, tales como [40,42]:

- Es económico de producir.
- Genera pocos desechos.
- Es reproducible y exacto.
- Permite generar grandes cantidades de material en poco tiempo.
- Es posible generar material con baja contaminación.

Pero, también trae desventajas:

- Exposición a temperaturas altas (solo en el caso de las impresoras térmicas).
- Exposición a la matriz y componentes de la tinta.

Ilkhanizadeh *et al.* [43] lograron imprimir un péptido en una superficie en donde se observaba un crecimiento celular por efecto del péptido. Derby [44] también observó la posibilidad de imprimir proteínas y aún más, células.

En general, el estado del arte ya ha descrito nanopartículas poliméricas impresas en superficie [45,46] y por otro lado, la inclusión de fármacos en éstas. Pero estos fármacos están restringidos a fármacos de estructura simple [47] y algunos más complejos como ciertos antineoplásicos [48], por lo que los productos biotecnológicos no están descritos bajo esta técnica de manufactura.

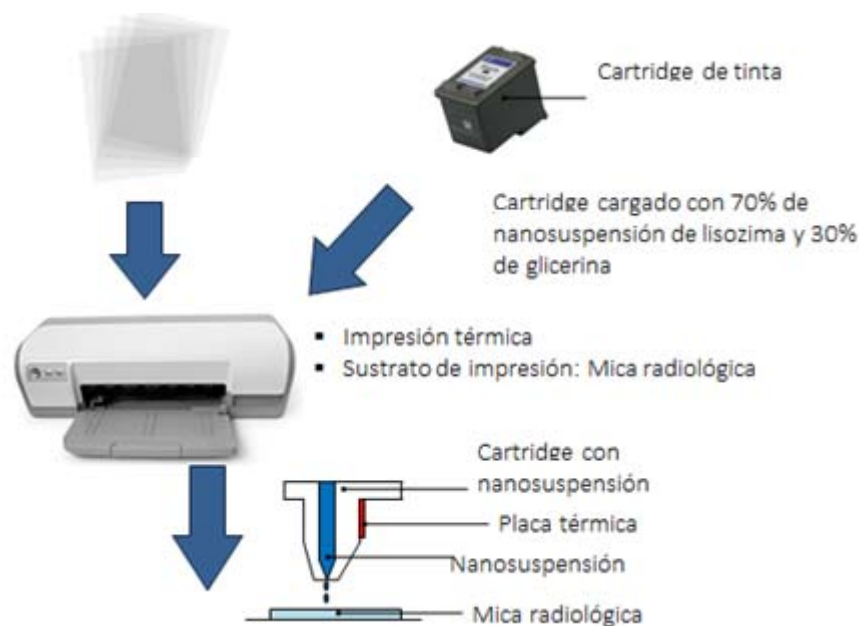


Ilustración 4. Esquema que representa el funcionamiento y las partes del sistema novedoso propuesto en esta tesis basada en la impresión de una suspensión con nanovehículos de alginato-polímero EE cargados con lisozima sobre un sustrato inerte (en este caso, la mica radiológica).

Como necesitamos un modelo estructural de proteína que represente a los productos biotecnológicos, en esta tesis se ha optado por la lisozima (Lys como abreviatura general) por ser una proteína altamente descrita en la literatura. Se ha estudiado desde su estructura tridimensional y su mecanismo enzimático [49] hasta las propiedades de su superficie [50]. Posee una masa molecular de 14.3 kDa [51], por lo que puede ser representante tanto de polipéptidos que tienen pesos inferiores a 10 kDa [52] como de proteínas, que presentan masas moléculas sobre o igual a 10 kDa [52].

Hipótesis y Objetivos

Hipótesis

Es posible generar nanopartículas poliméricas como vehículos viables para el proceso de impresión en film inerte, y que este vehículo proteja la proteína de la denaturación producida por los procesos de nanosuspensión y de nanoimpresión.

Objetivos Generales

- Obtener nanovehículos para su posterior inmovilización en film inerte a través del proceso de impresión.
- Proteger a la proteína modelo por medio de estos nanovehículos.

Objetivos Específicos

- 1) Sintetizar nanopartículas poliméricas y caracterizar tamaño, polidispersión, potencial zeta y eficiencia de asociación.
- 2) Estudiar los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas a través del proceso de resuspensión e impresión.
- 3) Determinar la liberación de la lisozima desde su matriz.
- 4) Determinar el comportamiento de la actividad de la lisozima al ser sometida al proceso de encapsulación.
- 5) Estudiar la estabilidad de las nanopartículas durante el almacenamiento.

Materiales

Reactivos:

- Lisozima de huevo de pollo (Sigma Aldrich, USA)
- Alginato Baja Viscosidad (Sigma Aldrich, USA)
- Polímero EE Polvo oral (Eudragit[®] E PO, Evonik, USA)
- Pared de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Aldrich, USA)
- MicroBCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, USA)
- Agua MiliQ (Conductancia 18,2 mΩ a 25 °C)
- Glicerina (Merck, Alemania)

Equipos:

- Para la lectura de las microplacas en los estudios de microBCA, se usó el lector Synergy MX (BioTek, USA) a 562nm como longitud de medición.
- Para la medición de la actividad de la lisozima, se usó el espectrofotómetro Lambda 25 (Perkin Elmer, Singapur) en modo cinético, a 450nm durante 8 minutos.
- Para separar las nanopartículas de los polímeros y proteínas que no reaccionaron, se usó la Centrifuga Z326-K (Hermle, Alemania) durante 30 minutos a 10.000 rpm (o 11.510 RCF), con una temperatura controlada a 25 °C.
- Para caracterizar tamaño, polidispersión y potencial Z, se usó el Nano Zetasizer S90 (Malvern, USA).
- Agitador multipunto de 9 velocidades para agitar las soluciones
- Incubadora agitadora (Daihan Labco, Corea del sur)
- Impresora HP DeskJet 1000 (Hewlett-Packard, USA)
- Purificador de agua Simplicity (Merck-Alemania); Acoplado con un filtro Millipak 0,22 μm.

Metodología

Síntesis de Nanopartículas Poliméricas

Se prepararon 6 formulaciones de nanopartículas, con una razón de cargas variables (0,1; 0,25; 0,5; 2,0; 4,0 y 10), pero con una suma de cargas constante (las 6 formulaciones presentan una suma de cargas positivas y negativas igual a 30 μmol , sin considerar el aporte de cargas de la lisozima).

De la suma de masa de los polímeros para cada formulación, se estimó el 10% para cada formulación, lo que sería la masa de lisozima cargada para cada una.

Para la síntesis de nanopartículas se prepararon 3 soluciones:

- Alginato 2,5 mg/mL: Se pesan 250 mg de Alginato de baja viscosidad y se lleva a un volumen de 70 mL con agua miliQ. Se agita durante 4 horas y se ajusta a pH 4,9 con HCl 0.1M/ NaOH 0.1 M, para luego ser aforado a 100 mL con agua miliQ. Se vuelve a estimar el pH para observar que este valor no varíe al aforar.
- EE 2.5 mg/mL: Se pesan 250mg de E® PO en un vaso de precipitado de 100mL. Se agrega 1 mL de ácido acético glacial y 49 mL de agua miliQ. Se agita 1 hora y se ajusta pH 4,6 con HCl 0,1 M/NaOH 0,1 M, aforando la mezcla a 100mL con agua miliQ. Se vuelve a estimar el pH para observar que este valor no varié al aforar.
- Lisozima 1 mg/mL: Se pesan 25 mg de lisozima y se aforan en 25 mL de agua miliQ.

En un vial de vidrio de 20 mL (Ilustración 5), se depositó un magneto de 1 cm y se agita a velocidad 1. En esto, se deposita una alícuota de agua miliQ, una alícuota de EE y una alícuota de lisozima en función de la razón de cargas (Tabla 2); El volumen total de la solución es de 6 mL. Se agita 1 minuto esta solución y se vierte, en el centro del vórtice, la solución de alginato, generando una nanosuspensión opalescente.

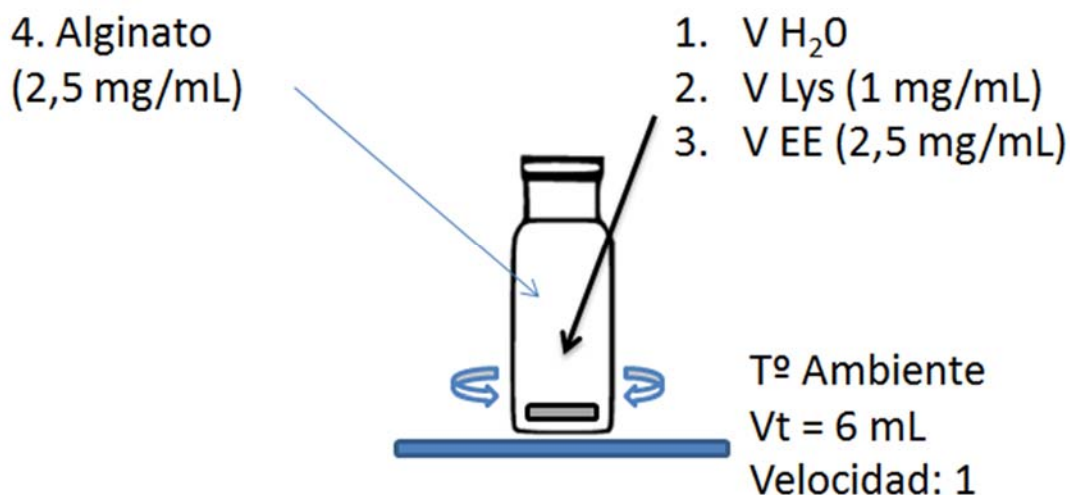


Ilustración 5. En esta ilustración, es posible ver los órdenes de transferencia para cada solución en la preparación de las nanopartículas

Tabla 2. Volúmenes y masas de cada reactivo usado para preparar las nanopartículas

Cargas positivas (μmol)	Cargas Negativas (μmol)	Σ Cargas (μmol)	Razón de Cargas	EE (μL)	Alg (μL)	Masa Total (μg)	Lisozima (μg)
2,727	27,273	30	0,10	303,3	2919,4	6161,8	616,2
6	24	30	0,25	667,2	2696,6	6422,6	642,3
10	20	30	0,50	1112,0	2788,7	6742,2	674,2
20	10	30	2,00	3032,7	216,10	7541,1	754,1
24	6	30	4,00	2666,8	475,50	7860,6	786,1
27,273	2,727	30	10,0	2224,0	792,40	8112,1	811,1

Razón de cargas comprende a la cantidad de cargas positivas divididas por las cargas negativas. Para la lisozima, se puede usar μg o μL, ya que la concentración de la solución madre es de 1 mg/mL, mientras que para ambos polímeros, es de 2.5 μg/mL. La masa de lisozima usada fue definida como el 10% de la masa total de polímeros y el volumen final para cada formulación es de 6 mL.

Estimación de eficiencia de asociación

El tubo de centrifugación de 1,5 mL se inclinó a 70° y en la apertura de este, se agregó por goteo una alícuota de 1,5 mL de la nanosuspensión. Se lleva a la centrifuga y se somete a centrifugación con las condiciones y tiempo anteriormente descritas en la sección Equipos (Ilustración 6). Se obtuvo un pellet blanquecino dentro de la solución de un sobrenadante

trasparente. De esta sobrenadante, se extrajo 1 mL y se transfirió a otro tubo de centrifugación de 1,5 mL. Se toman 4 alícuotas de 150 μ L y se siembra en una placa de 96 pocillos. En general, se trabajaron con curvas de calibración que van desde 0 μ g/mL hasta 150 μ g/mL y se contemplaron desde 5 a 7 puntos.

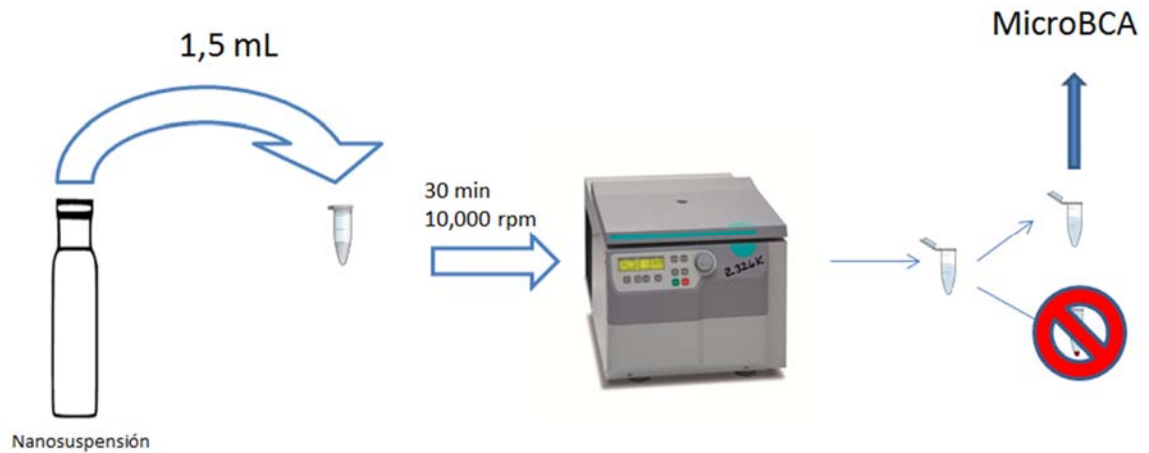


Ilustración 6. Proceso de separación de las nanopartículas para estimar la eficiencia de asociación

Una vez obtenida la masa del sobrenadante, se estimó por diferencia la eficiencia de asociación a través de esta ecuación.

$$EA\% = \frac{(M_c - M_s)}{M_c} \times 100$$

Ecuación 1. Eficiencia de asociación, donde M_c es la masa de lisozima cargada al inicio y M_s es la masa encontrada en el sobrenadante.

Resuspensión de nanopartículas (generación de tintas)

Se tomó un tubo de centrifuga de 1,5 mL y se agregaron 50 μ L de glicerina. El tubo de centrifuga se inclina 70° y en la apertura de este, se agrega por goteo una alícuota de 1,45 mL de la nanosuspensión. Se lleva a la centrifuga y se somete a centrifugación con las condiciones y tiempo anteriormente descritas. Se obtuvo un *pellet* blanquecino dentro de la solución de glicerina y un sobrenadante transparente.

Se descartó el sobrenadante (Ilustración 7). Para este procedimiento, se acerca la micropipeta de 1 mL y se rebaja el volumen en 1 mL. Luego, se redujo el volumen de

succión a 500 μ L y se procedio de manera meticulosa, a succionar el remanente de sobrenadante.

Se preparó una solución de agua y glicerina, en proporción 70% agua y 30% glicerina. A este 30% de glicerina, se le restan los 50 μ L de glicerina agregado anteriormente en el tubo de centrifuga como agente disgregante. De acuerdo a la cantidad de viales que se preparen para resuspensión, será el volumen restado al 30% de glicerina.

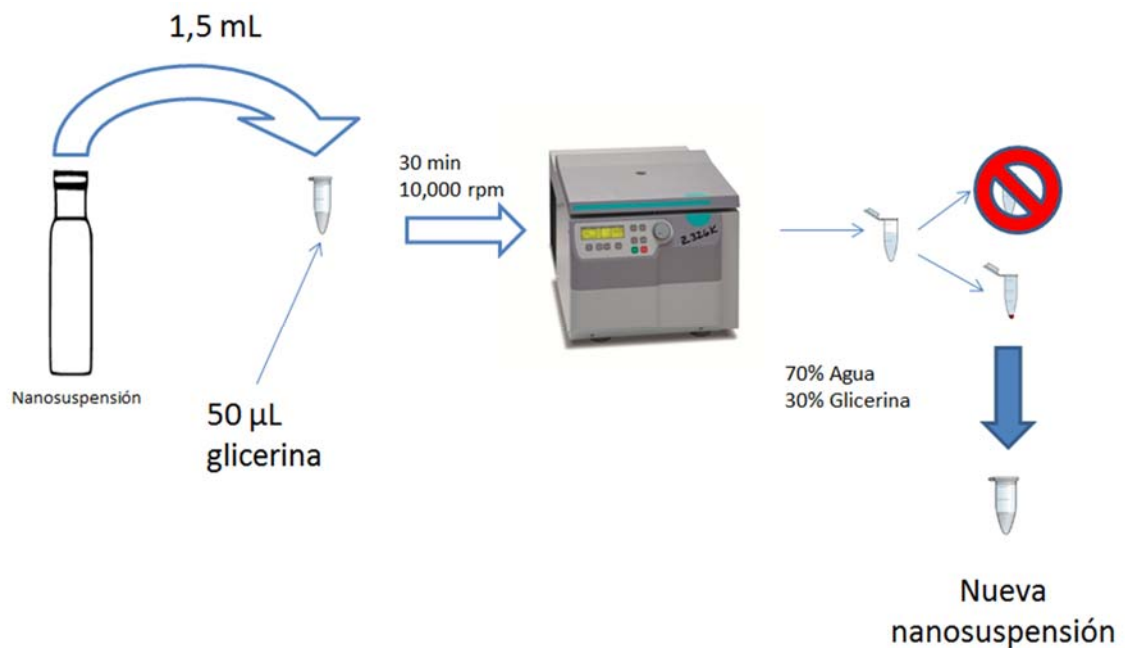


Ilustración 7. Proceso de separación para resuspensión de la nanopartículas

Una vez lista la solución de glicerina-agua, se procede a resuspender la tinta con 1,45 mL de solución glicerina-agua para cada vial, obteniendo un tubo de centrifuga con 1,5 mL de cada tinta.

Por experiencia vista en el laboratorio, también es posible hacer este procedimiento con tubos de centrifuga de 15 mL, solo que el volumen de glicerina es de 200 μ L. El tiempo de centrifugación de centrifugación se eleva a 1 hora y se centrifuga en las mismas revoluciones que los de 1,5 mL.

Impresión de la nanosuspensión

Se toma un cartridge de la impresora HP Deskjet 1000 y se remueve la tapa superior; se remueve la tinta original y se deja sonicando durante 15 minutos, en una solución etanol absoluto/agua con detergente. Posteriormente, se remueve la solución limpiadora a través de un lavado exhaustivo con agua miliQ. Luego, se lleva a la incubadora a 37 °C durante 15 minutos.

Por limitantes analíticas en cuanto a determinación de características fisicoquímicas por DLS, es que se generaron tintas similares al punto anterior, pero con una pequeña modificación:

Se prepararon 4 tubos de centrifugación de 1,5 mL cada uno y se llevaron a centrifugación. Se elimina el sobrenadante de estos y se resuspendió uno de ellos con la solución glicerina/agua. Con esta solución resuspendida, se procede a resuspender de manera seriada uno por uno los *pellets* de cada tubo de centrifugación, hasta tener una suspensión de 1,5 mL con la masa de cuatro *pellets*.

A la solución glicerina/agua, se le descontó 200 μL de glicerina, ya que cada tubo de centrifugación aporta 50 μL de glicerina, ya que como anteriormente mencionamos, usamos una pequeña cantidad de glicerina para evitar que se forme un *pellet* muy compacto? y por tanto, sea difícil de resuspender.

Se rellena el cartridge con 1 mL de esta solución concentrada y se imprime en 4 cuadros de 9 cm^2 en una mica radiológica. Estos cuadros con nanopartículas, se recuperan realizando un reflujado de 1 mL de agua miliQ (Ilustración 8). Los cuatro cuadros son lavados por el mismo mililitro de agua.

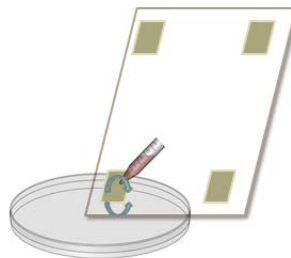


Ilustración 8. Representación del proceso de reflujado para recuperar las nanopartículas de la mica radiológica.

La impresión se hizo por triplicado para las 6 formulaciones y posteriormente, se caracterizó tamaño, polidispersión y potencial Z de las nanopartículas impresas.

Caracterización de Nanopartículas

Determinación de Tamaño, Polidispersión y Potencial Z

Para determinar estas tres características, se usó el equipo Zetasizer, el cual posee varias técnicas integradas para la caracterización de nanopartículas y micropartículas.

Se toma una celda (DTS 1060) y se hace un lavado con etanol absoluto, posteriormente, se escurre el exceso de etanol y ulteriormente, se hace un lavado con agua miliQ. Se vuelve a escurrir el exceso de agua miliQ. Una vez seca la celda, se agrega una alícuota de 700 μL de las nanopartículas a caracterizar. El tamaño y dispersión es determinado a través de dispersión dinámica de luz (DLS por su nombre en inglés), mientras que el potencial zeta, fue determinado a través de microelectroforesis laser Doppler.

Las mediciones se hacen por triplicado y el sistema está configurado para que mida cada muestra 3 veces el tamaño y 4 veces el potencial zeta. Los datos fueron visualizados a través del software de Malvern desarrollado para el instrumento Zetasizer Nano S90. El software usado está en la versión 7,03v y su fecha de desarrollo fue el 20/09/2013.

Entre medición y medición, se hicieron tres lavados por duplicado de la celda para evitar contaminación cruzada.

Cuantificación de la actividad de la lisozima

La actividad de lisozima fue determinada a través de una turbidimetría, ya que la lisozima degrada la pared de *Micrococcus lysodeikticus* volviendo transparente una dispersión turbia y amarillenta de esta pared. Se usó el espectrofotómetro Lambda 25 y se cuantificó durante 5 minutos a 450nm la degradación de la pared de *Micrococcus lysodeikticus*.

El proceso experimental para determinar la actividad, es el siguiente:

Se toma una alícuota de 2,25 mL de *Micrococcus lysodeikticus* y se deposita en la cubeta de cuarzo. A esta cubeta, una vez inserta en la celda del espectrofotómetro, se le agrega 0,25 mL de la solución de lisozima. Se mide bajo las condiciones planteadas (450nm, 8 minutos) y el análisis de datos se hace contemplando los primeros 50 segundos, en donde se observa la mayor pendiente de la curva. De ahí se desprende una pendiente la cual denominamos “actividad”.

Actividad basal de la Lisozima y actividad residual en distintos medios

La actividad basal fue estimada en una solución de lisozima de 100 µg/mL, 150 µg/mL y 200 µg/mL, las cuales se encontraban en un buffer fosfato 100 mM a pH 6,2, ya que la bibliografía ha estimado que a este pH se obtiene la actividad máxima. Las soluciones fueron conservadas en un baño térmico a 37 °C mientras eran medidas, para que todas estuvieran a la misma temperatura.

Se plantearon 2 medios artificiales. El primer medio, era uno que emulaba las condiciones de la nanosuspensión inicial. Se generaron 3 soluciones (100 µg/mL, 150 µg/mL y 200 µg/mL) de lisozima y se usó como medio, una solución de buffer acetato 100 mM a pH 4,6 (en general, el pH del medio cuando encapsula se mueve entre 4,6 y 4,9 dependiendo que solución de polímeros este en mayor cantidad).

El segundo medio, eran 3 soluciones (100 µg/mL, 150 µg/mL y 200 µg/mL) de lisozima, las cuales se encontraban en un 30% de glicerina y un 70% de agua tamponada a pH 6,2 (buffer fosfato 100 mM).

Además, se prepararon tres soluciones de pared de *Micrococcus lysodeikticus*, las tres de concentración 0,3 mg/mL, pero una estaba tamponada a pH 4,6 (buffer acetato 100 mM) y otra a pH 6,2 con un 70% de Buffer/30% Glicerina. La tercera se encontraba a pH 6,2 sin glicerina.

Actividad de la lisozima en función de la concentración de lisozima

La actividad de la lisozima en función de la concentración se hizo a pH 6,2 (Buffer Fosfato 100 mM), en donde se trabajó con una serie de concentraciones que van desde 200 µg/mL hasta 2,5 µg/mL.

Similar al procedimiento anterior, se trabajó con una solución de pared de *Micrococcus lysodeikticus*, en una concentración de 0,3 mg/mL y buffer fosfato 100 mM con un pH de 6,2.

Se usó la pendiente obtenida por regresión lineal durante los primeros 50 segundos. Se usó como criterio de aceptación, un R^2 de >0.95 , ya que la curva es una función exponencial decreciente y no es lineal, pero al tomar los primeros 50 segundos, el descenso es lineal.

Actividad de la lisozima encapsulada

Como no es posible determinar la actividad de la lisozima en el interior de la nanopartículas y es difícil abrir las nanopartículas por medios químicos-físicos, ya que la lisozima se puede denaturar.

Se trabajó con la tinta de 0,1; 0,25 y 0,5. Se prepararon 6 mL de las tres tintas y se tomó 6 mL de cada una y se transfirieron a un tubo de centrifuga de 15 mL. Se llevaron los 9 tubos de centrifuga a la incubadora (triplicado para cada tinta) y se dejó liberar su contenido durante una hora, a 37°. El pH de liberación fue 4,6 para las 3 (medición por pH-metro una vez resuspendidas con glicerina/agua).

Se tomaron los 6 mL de cada una y se transfirieron a un nuevo tubo de centrifugación de 15mL. Se centrifugaron y se extrajo 4,5 mL, lo cual se distribuyó en 3 tubos de centrifuga de 1,5 mL, de esa manera, tenemos 1 para analizar por microBCA y 2 en caso de que aparezca algún problema.

Se midió por microBCA la concentración de uno de los viales para cada tinta (medición por cuadruplicado, curva de calibración por duplicado y con 7 puntos). Una vez obtenidas las concentraciones, se hicieron estándares de lisozima con las respectivas concentraciones. La lisozima se pesó y se solubilizo en un 70% de buffer acetato 100 mM a pH 4,6 y 30% de glicerina.

Por otro lado, se hizo una solución de *Micrococcus lysodeikticus* de 0,3 mg/mL a pH 4,6 (buffer acetato 100 mM) y otra solución parecida, pero con un 30% de glicerina y un 70% de buffer acetato 4,6 100 mM. Y se replicó el procedimiento descrito anteriormente (véase Cuantificación de la actividad de lisozima).

Se comparó la actividad de la lisozima de las nanopartículas versus la lisozima de los estándares y se hizo análisis estadístico para ver qué tan significativa fue la diferencia.

Estudio de liberación

El estudio de liberación se hizo sólo para las nanopartículas negativas (0,1, 0,25 y 0,5), ya que las positivas presentan interferencia al medir por microBCA.

Se prepararon 30 mL de nanopartículas para cada formulación y se transfirieron 10 mL de cada una a un tubo de centrifuga de 15 mL con 200 µL de glicerina. Se centrifugaron los 9 tubos de centrifuga y se eliminó el sobrenadante (como todo el *pellet* quedo en la

glicerina, se eliminaron los 10 mL). Se resuspendieron los pellet con 15 mL de un 70% de solución buffer fosfato 7,4 100 mM y un 30% de glicerina (Ilustración 9).

Los 9 tubos de centrifugación (3 para cada formulación), fueron llevados a la incubadora a 37 °C y se agitó a 100 rpm. Se muestreó cada una hora, durante 8 horas continuas, y el resto del volumen se dejó en evaluación hasta completar las 24 horas para la determinación de un punto final.

Se extrajo 1 mL en cada muestreo y este mililitro, fue llevado a un tubo de centrifugación de 1.5 mL, para posteriormente centrifugar y separar el sobrenadante, el cual fue analizado por microBCA para estimar la concentración. En el microBCA, se hizo curva de calibración por duplicado y con 8 puntos. Por otro lado, cada medición para cada muestra fue por cuadruplicado.

Se hizo un porcentaje acumulado para poder estimar el porcentaje liberado y se usó como el 100%, la masa teórica que se encuentra en la nanopartículas en función de la eficiencia de asociación que se ha estudiado previamente.

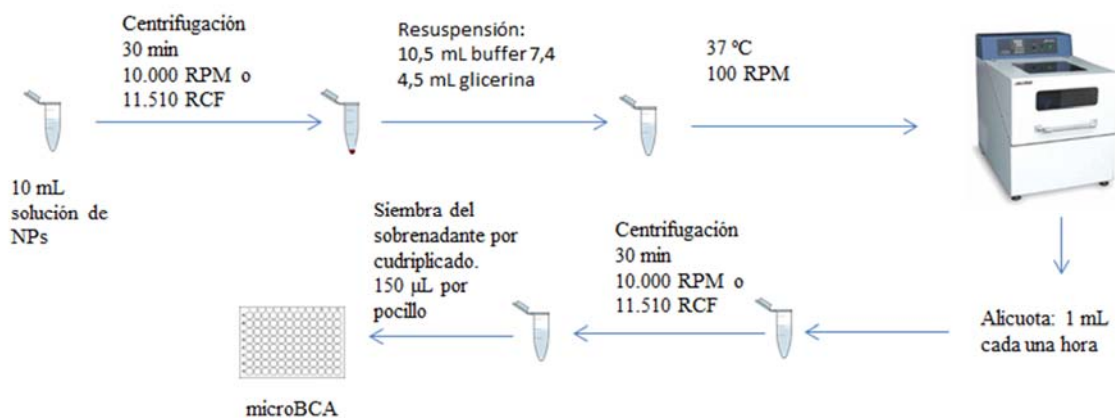


Ilustración 9. Estudio de liberación paso a paso

Estudio de estabilidad

Para el estudio de estabilidad, se consideraron sólo las nanopartículas de carga negativa, ya que no podemos caracterizar la eficiencia de asociación de las positivas por microBCA.

Se generaron 3 tintas por triplicado (0,1; 0,25 y 0,5), de tal forma, que cada formulación estará a temperaturas distintas:

- 25 °C (Temperatura Ambiente)
- 40 °C (Temperatura Caliente)

Las 3 muestras se almacenaron por 1 mes (29/01/16-29/02/2016) y previo a su almacenamiento, se caracterizó la eficiencia de asociación.

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se hizo a través del software Minitab v17.1.0 (Universidad de Pennsylvania, USA). Se usó ANOVA en un sentido para la comparación múltiple y Tukey post-hoc para evaluar si pares de poblaciones son estadísticamente iguales o diferentes. Se contempló un $p > 0.05$ para que dos poblaciones de datos sean significativamente iguales.

Resultados y Discusión

1) Sintetizar nanopartículas poliméricas y caracterizar tamaño, polidispersión, potencial zeta y eficiencia de asociación.

Primero debería desicuirse el efecto del cuociente sobre el tamaño.

- i. Síntesis de nanopartículas poliméricas en función del cociente de cargas (n^+/n^-).
- ii. Caracterización de sus propiedades fisicoquímicas.

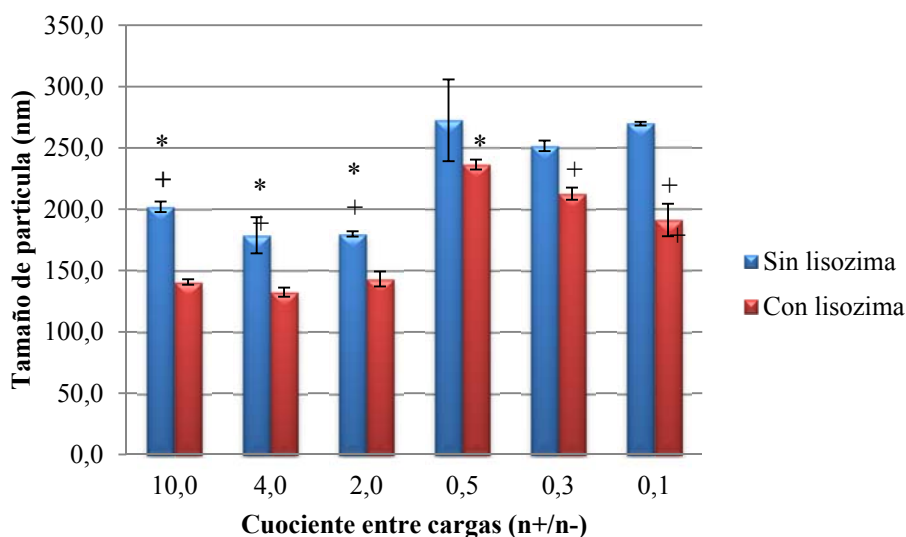


Gráfico 1. Tamaño de partícula asociado al cociente entre cargas. (N= 3, P > 0.05; * Estadísticamente distinto entre distintas razones de cargas. +: Estadísticamente distinto entre una formulación antes de la carga con lisozima y después de la carga con lisozima).

Entre las distintas razones, se observa que las nanopartículas con predominancia del polímero alginato presentan hasta 50nm de diferencia con las nanopartículas positivas. Una posibilidad, es que el alginato tiende tener una buena asociación con solventes polares (Avella et al) y por tanto la exclusión de agua en su interior.

En general, se observa una contracción del tamaño por efecto de la lisozima (Gráfico 1), lo cual tiene un sentido, ya que al existir una adsorción proteína-polímero, hay un desplazamiento del solvente [53] ya que la proteína ocupa sitios de solvatación del polímero. Este fenómeno no solo se observa en la adsorción proteína-polímero, también se observa en otros fenómenos de esta clase como adsorción polímero-polímero (como el

plegamiento proteico [54] o la unión polímero-ligando [55]). En estos tres procesos existe un componente termodinámico (Ecuación 2) que favorece la adsorción de la proteína y el desplazamiento del solvente:

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S$$

$$\Delta G = \sum (H_{H_2O-Roto} + H_{H_2O-Formados} + H_{Polimero-proteina} + H_{Polimero-Polimero}) - T_c \cdot \Delta(S_E - S_S)$$

∴

$$Si: \sum (H_{H_2O-Roto} + H_{H_2O-Formados} + H_{Polimero-proteina} + H_{Polimero-Polimero}) - T_c \cdot \Delta(\uparrow S_E - \downarrow S_S)$$

∴

$$\Delta G < 0$$

S_E : Entropía del entorno. S_S : Entropía del sistema. T_c : Temperatura constante. $H_{H_2O-roto}$: Entalpía de interacciones agua-polímero rotos por el desplazamiento. $H_{H_2O-formados}$: Entalpía de interacciones agua-agua que se generan integrarse el agua desplazada al seno de la suspensión. $H_{Polimero-proteina}$: Entalpía de interacciones polímero-proteína que se generan al desplazar el agua por la proteína. $H_{Polimero-polimero}$: Entalpía de interacciones alginato-polímero EE. ΔG corresponde a la energía libre de Gibbs.

Ecuación 2. Ecuación termodinámica de Gibbs

Para explicar esta simple expresión, se plantea lo siguiente [54–56]:

- A nivel de la entalpía, el sistema está rompiendo enlaces agua-polímero (tanto polímero complejo-agua como proteína-agua), lo que crea una entalpía positiva. Pero, ese sistema al estar formando nuevas interacciones (polímero-polímero, polímero-proteína y agua-agua, en referencia al agua desplazada que se une al agua en la solución), lo que genera una alta entalpía negativa.
- La entropía entre los polímeros tienden al orden, ya que estos se acercan e interaccionan. Por tanto, la entropía se vuelve negativa para el sistema; además, existe un proceso de ordenamiento de las proteínas al migrar del entorno y ordenarse en el sistema. Pero, existe una migración de agua desde el sistema al entorno y por tanto, el entorno se desordena [55]. Como la entropía es una función

extensiva, depende de la cantidad de materia que se transfiera dentro del universo. La masa total de lisozima en el universo es inferior a la masa de agua, por lo que variación de la masa de lisozima no es mayor que la variación de la masa de agua a medida que la va excluyendo en el proceso de nanoencapsulación, por lo que teóricamente, la entropía que genera la lisozima es menor que la entropía que genera el agua y por tanto, la entropía del universo, debiese ser positiva. En el trabajo de Li y Lizaridis [55], observaron que la unión de una biomacromoléculas (un carbohidrato) a la concanavalina-a (como modelo polimérico), el agua contribuía de manera importante en el proceso del cambio conformacional de la concanavalina-a, ya que existía una exclusión de esta, generando una entropía positiva y a través de las interacciones entre el carbohidrato y la concanavalina-a, se generaba una entalpía negativa, lo que explica el por qué es espontaneo este proceso.

Si bien lo explicado anteriormente es complicado de demostrar experimentalmente en nanopartículas por su complejidad, este fenómeno sí se ha observado en el plegamiento de proteínas (el efecto hidrofóbico[56]) y en la unión de polímero-ligando[55] ya que son polímeros más pequeños y fáciles de secuenciar el paso a paso de cada interacción.

Por tanto, al emigrar el agua y acercarse las cadenas poliméricas, se observa la contracción de la nanopartícula. La contracción de las nanopartículas se puede observar en las nanopartículas negativas, en donde al aumentar la cantidad de alginato, es más marcado este efecto, ya que aumenta la cantidad de interacciones electrostáticas e interacciones dipolo-dipolo/puentes de hidrogeno por la presencia de muchos hidroxilos en la estructura del alginato, lo que podría generar una mayor exclusión de agua y como resultado, un mayor acercamiento entre la lisozima y la cadena polimérica. Por otro lado, las positivas también manifiestan este fenómeno y se ve que es más marcado en 10 (similar a su otro extremo, la formulación de 0,1). De esta manera, tenemos una posible explicación que engloba las seis formulaciones.

Otras técnicas que podrían investigar estas interacciones en mayor detalle podrían ser por ejemplo estudios de dicroísmo circular que contribuirían a dilucidar las interacciones de la proteína con la nanopartículas a través de evaluar los efectos sobre la estructura secundaria de la proteína. De acuerdo a sus propiedades fisicoquímicas, la lisozima podría estar preferencialmente distribuida al interior como la superficie de nanopartículas.

Debido a su alta desviación estándar, en la formulación de 0,5 no se observan diferencias, y ambas poblaciones son estadísticamente semejantes.

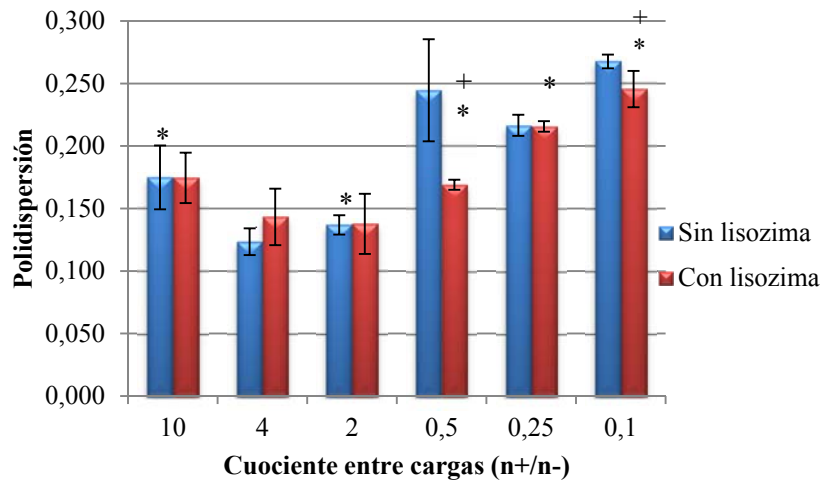


Gráfico 2. Polidispersión de las nanopartículas, antes y después de agregar lisozima. (N= 3, P > 0.05; * Estadísticamente distinto entre distintas razones de cargas. +: Estadísticamente distinto entre una formulación antes de la carga con lisozima y después de la carga con lisozima)

En general, no se observa una diferencia estadísticamente significativa antes y después de la carga de lisozima para las nanopartículas positivas (Gráfico 2). De acuerdo al resultado de potencial Z (Gráfico 3), este mismo comportamiento se vio para las nanopartículas positivas cuando se carga con lisozima, de tal forma, que este potencial inalterado podría explicar en parte el por qué su polidispersión no varía.

Para 0.5 y 0.1, si se observa una caída en su polidispersión. En ambos casos, puede ser por la reducción de tamaño como se comentó anteriormente.

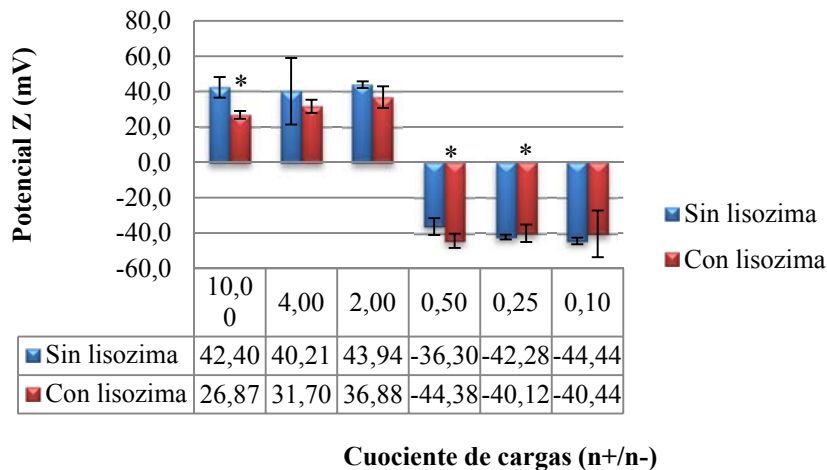


Gráfico 3. Relación entre el cociente de cargas y el potencial Z al agregar lisozima al medio. (N=3, P>0.050). * Estadísticamente diferente

En general, se ven dos comportamientos:

- Si bien las barras para las nanopartículas positivas (Gráfico 3) se ven distintas entre sí antes y después de cargar lisozima, estadísticamente son semejantes para la formulación 4 y 2, ya que presentan desviaciones estándar altas (hasta 40 unidades para la formulación N° 4). Probablemente debe ser por el poco impacto que tiene la lisozima como molécula cargada [50], ya que la lisozima presenta pequeñas áreas con residuos con carga positiva (Ilustración), pero la cantidad de áreas con residuos positivos son mayor que las áreas con residuos negativos, por lo que presenta un carácter más positivo en su superficie. Sin embargo, la superficie cargada de lisozima no supera el 30% de su área total, de tal manera, que el otro 70% corresponde a los residuos no ionizables más los residuos hidrofóbicos de ciertos aminoácidos (Ilustración 10). En el caso de la formulación de razón de cargas 10, por la alta hidrofobicidad de la nanopartícula (por tener mayor cantidad de polímero EE), se esperaría una mayor adsorción de la lisozima, ya que esta también presenta varios sitios hidrofóbicos que permiten interaccionar con las cadenas alquílicas del polímero EE. La adsorción de lisozima puede generar un apantallamiento de la carga superficial de la nanopartícula, disminuyendo su potencial Z.
- Para las nanopartículas negativas, se observa que el impacto aparece en las de 0,5 y 0,25 lo cual tiene sentido, ya que estas formulaciones comparten características del polímero EE, que aporta hidrofobicidad y carga positiva (Ilustración 3) y del polímero alginato (Ilustración 2), que aporta carga eléctrica negativa, lo que facilita la adsorción de la lisozima tanto en su interior como exterior, generando alteración de su potencial Z. No hay tendencia en 0.5 y 0.25, además, el aumento de carga para 0.5 y la caída de carga para 0.25 es muy pequeña (8 unidades, con una desviación alta para 0.5 y 2, con una desviación de 2 unidades).

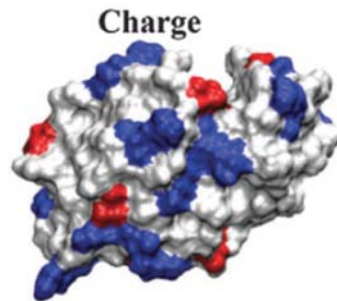


Ilustración 10. Representación computarizada de lisozima (Kubiak-Ossowska et al, 2015) en donde se observa la sitios con carga de esta proteína. Se observa en azul los sitios con cargas positivas, en rojo los sitios con carga negativa y en blanco los sitios sin carga.

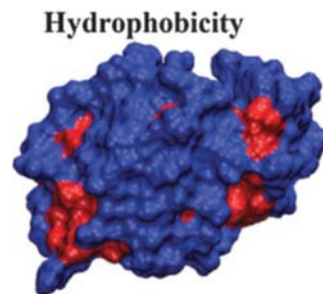


Ilustración 11. Representación computarizada de lisozima (Kubiak-Ossowska et al, 2015) en donde se observa la hidrofobicidad de esta proteína. Se observa en azul los sitios hidrofílicos y en rojo los sitios hidrofóbicos.

- iii. Cuantificación de la lisozima liberada y estimación de la eficiencia de asociación.

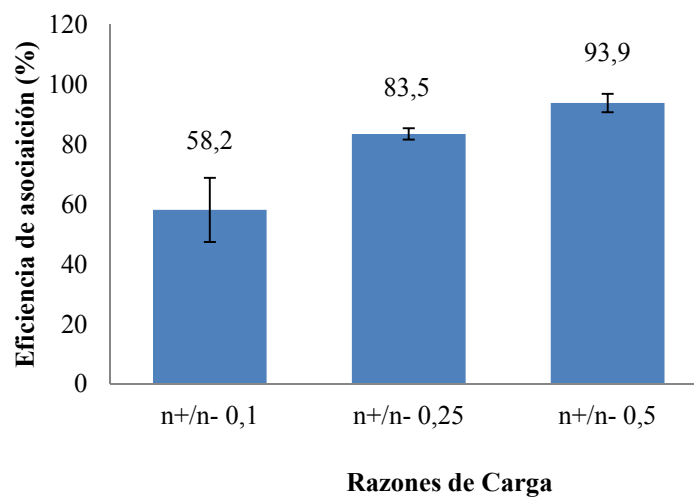


Gráfico 4. Eficiencia de asociación en función del cociente de cargas. Se observa que mientras mayor es la razón de carga (o sea, la proporción de polímeros es cercana a 1), es mayor la eficiencia de asociación. (N = 3 para cada muestra. Las 3 son estadísticamente distintas entre sí)

La eficiencia de asociación para nanopartículas positivas fue descartada, ya que se observaba una fuerte interferencia en HPLC. Lo que creemos, es que como los polímeros presentan cadenas de distintos tamaños, han de existir cadenas con tiempos de retención similar a la lisozima, lo que genera estos peaks montados.

Por otro lado, microBCA también presento problemas, ya que la coloración para nanopartículas positivas era de un lila muy intenso, dando absorbancias sobre 3 o más. Este fenómeno está dado por el polímero EE, ya que observamos similar comportamiento con las nanopartículas positivas sin lisozima.

Como nuestros dos métodos analíticos fallaron, preferimos solo caracterizar fisicoquímicamente las nanopartículas positivas y no medir su eficiencia de asociación.

Se puede observar en nanopartículas negativas que a mayor cantidad de polímero EE, es mayor la eficiencia de asociación. Teóricamente es esperable este comportamiento, ya que la lisozima (Ilustración) presenta dominios hidrofóbicos importantes [49], siendo el más importante, su sitio catalítico y ciertos residuos de superficie (Trp 62, Trp 63, Ile 98, Val 109 y Trp 123).

De acuerdo a estudios de superficie de sílice y simulación computacional, a pH 4,6; existen interacciones principalmente electrostáticas en la lisozima. Pero no deja de ser importante la función de los residuos hidrofóbicos en la superficie de esta proteína [50]. De tal forma, que estos residuos hidrofóbico podrían interaccionar con las cadenas alquílicas del polímero EE. Por esta razón, podría ser que a medida que se va entrecruzando la lisozima con ambos polímeros, se vaya estabilizando la nanopartícula por la suma de ambas interacciones (hidrofóbicas y electrostáticas). Pero en el caso de 0,1, al ser menor el polímero EE, puede que la menor cantidad de interacciones hidrofóbicas dificulte la adsorción de la lisozima en la nanopartícula, disminuyendo su eficiencia de adsorción. De tal manera, que al aumentar la proporción del polímero EE (un metacrilato), existen mayor sitios de adsorción de la lisozima en el sistema EE-alginato.

A modo de ejemplo, se usan columnas con revestimientos de metilmetacrilato-glicidilmetacrilato[57] para poder cuantificar proteínas con sitios extensos hidrofóbicos, como es el caso de la lisozima, ya que se adsorben con mucha facilidad en estos polímeros.

2) Estudiar los cambios en las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas a través del proceso de resuspensión e impresión.

- i. Preparación de tintas de impresión, a través de la resuspensión de las nanopartículas en un medio con viscosidad definida.

- ii. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas al ser sometidas a este proceso.

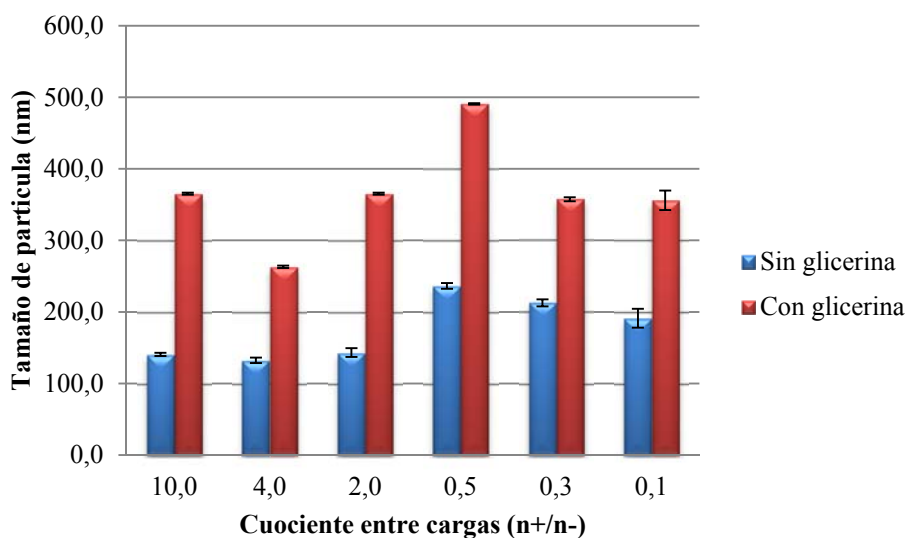


Gráfico 5. Impacto de la glicerina en el tamaño de la nanopartícula. (N=3, P>0.050). Todas estadísticamente distintas entre antes de agregar glicerina y después de agregar.

De acuerdo al gráfico (Gráfico 5), es observable un aumento del tamaño para todas las formulaciones, prácticamente, más del doble en algunas. A través del movimiento de las nanopartículas, se generan “fluctuaciones” en el paso del láser de tal manera, que va haciendo un acumulado de estas fluctuaciones y a través de una correlación, obtiene un intercepto el cual corresponde al coeficiente de difusión para un tamaño de nanopartícula. Por tanto, usando ciertas constantes y la viscosidad del medio, el intercepto es transformado en tamaño. De tal manera, que al aumentar la proporción del polímero EE (un metacrilato), existen mayor sitios de adsorción de la lisozima en el sistema EE-alginato. En las nanopartículas sin glicerina, tenemos una viscosidad dada principalmente por el agua, pero cuando agregamos glicerina, la viscosidad aumenta (ya que esa es la función de la glicerina en nuestro sistema). De tal manera, que al aumentar la viscosidad, disminuye el coeficiente de difusión y por tanto la conversión del intercepto nos generará un mayor tamaño de partícula en nuestro sistema (Ecuación 3). De acuerdo a Glycerine Producers’ Association [59], la viscosidad para una mezcla 30% glicerina/70% agua, es de 1,87 cP; Lo que es 1,87 veces la viscosidad del agua (en nuestro caso, la formulación sin glicerina). Además, existen trabajos [60,61] en donde se ha observado un aumento de la viscosidad de hasta 1,2 veces por efecto de las nanopartículas en nanofluidos. Por lo

que teóricamente, tendríamos un valor de 2.2 cP, lo cual explicaría el por qué aumenta tanto el tamaño de partícula en la formulación con glicerina.

$$D = \frac{k_b T}{6\pi\eta R_h}$$

Ecuación 3. Ecuación de Einstein-Stokes, en donde podemos observar como la proporcionalidad inversa entre el radio hidrodinámico y el coeficiente de difusión.

Asimismo, existe un fenómeno denominado “agregación”, en donde una nanopartícula se adsorbe sobre otra en cadena, como resultado de esto, el Zetasizer genera una “esfera virtual” que corresponde a la mínima suma de los radios de las nanopartículas [58] que compone el agregado y por tanto, el “radio” de las nanopartículas es mayor (ya que no es una nanopartícula lo que está viendo, son varias en una). Boal et al [62], demostraron que el estado de agregación era variable para una misma nanopartícula y era viable obtener distintos tipos de ensamblaje en función de distintas condiciones fisicoquímicas, de tal manera que era posible no agregar una nanopartícula, hasta generar bloques de hasta 10.000 o más nanopartículas; Si aplicamos esto al resultado obtenido, puede ser que en las condiciones que esta nuestro sistema se generen agregados de dos o más nanopartículas, lo que explicaría este aumento de tamaño. El Zetasizer lamentablemente, no nos indica este fenómeno si la agregación es pequeña. La forma más factible de saberlo es con microscopía electrónica de transmisión [63,64], ya que es posible ver los límites físicos de cada nanopartícula y en el caso de que este agregada n veces, es posible ver n nanopartículas juntas.

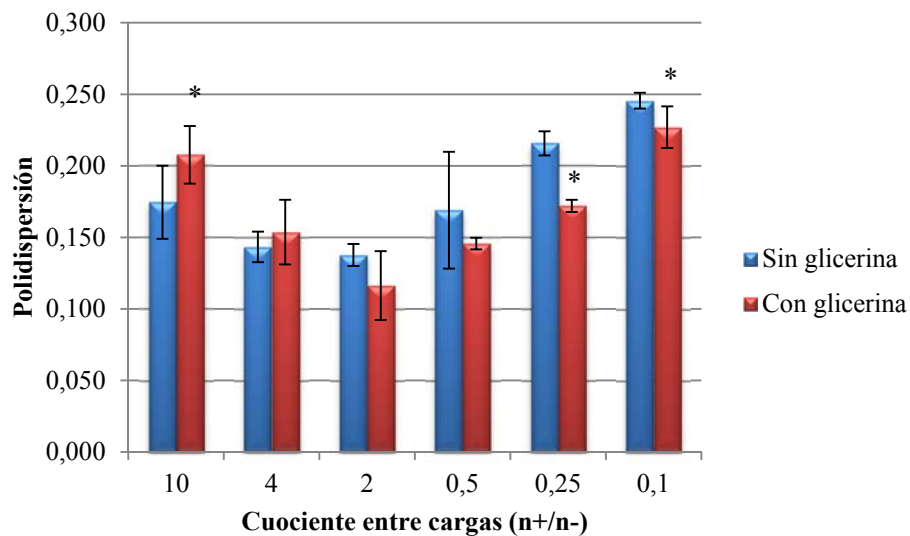


Gráfico 6. Impacto de la glicerina en la polidispersión de las nanopartículas. *significa que son estadísticamente diferentes entre antes de cargar la glicerina y después. (N=3, P>0.050)

En el Gráfico 6, se observa variación de PDI solo para 3 de 6 formulaciones. Para 10 aumenta, para 0,25 y 0,1 disminuye; Por otro lado, los cambios de PDI son inferiores a 0,03 unidades. De acuerdo al Manual del Zetasizer [58], es poco significativo un cambio de 0,03 unidades, ya que para que aparezca una población dispersa, es necesario que el PDI este sobre 0,5 unidades. Probablemente, es porque el algoritmo que usa el Zetasizer para estimar el PDI es independiente de factores fisicoquímicos, ya que es la brecha entre una función lineal generada por el acumulativo del tamaño promedio y la función lineal de las distintas poblaciones de nanopartículas. Como todas las poblaciones están siendo afectadas por el mismo solvente, entonces las características de este no tienen impacto sobre la polidispersión.

Otro aspecto de este resultado, es que la baja variación del PDI y el valor inferior a 0,25 descartan la agregación de las nanopartículas [58]. Ya que la generación de agregados genera PDI sobre 0,5.

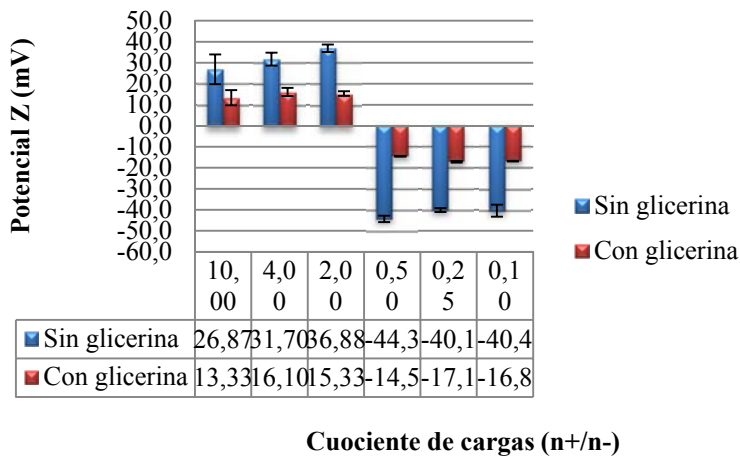


Gráfico 7. Impacto de la glicerina en el potencial Z de las nanopartículas. (N=3, P>0.050). Todas son estadísticamente distintas entre la formulación con y sin glicerina, pero estadísticamente semejantes entre distintas razones de carga.

En los 6 casos se observa una caída importante en el valor absoluto del potencial Z y es más marcado para las nanopartículas negativas. El Zetasizer de Malvern[58], estima el potencial Z en base a la movilidad de la nanopartícula, la cual al ser sometida a un campo eléctrico, se crea un movimiento armónico el cual varía su velocidad en función del potencial Z de la superficie de la nanopartícula. La variación de la velocidad es observada a través de pulsos que se generan al pasar las nanopartículas a través de una laser continuo, de tal manera, que al igual que el tamaño, se extrapola un factor fisicoquímico, en este caso, la movilidad electroforética. Con la movilidad electroforética, el sistema usa la Ecuación de Henry para transformar la movilidad en potencial Z.

$$M_e = \frac{2\varepsilon z f(\kappa a)}{3\eta}$$

Ecuación 4. Ecuación de Henry para determinar la movilidad electroforética. ε es la constante dieléctrica, z es el potencial Z de la nanopartícula, $f(\kappa a)$ es la aproximación de Smoluchowski (la cual puede valer 1 o 1,5 en función del valor de la constante dieléctrica) y η es la viscosidad del medio.

De acuerdo a esta ecuación, solo tenemos una variable la cual es la viscosidad. Como discutimos previamente cuando analizamos el tamaño, existe un aumento de la viscosidad cuando agregamos un 30% de glicerina. De acuerdo a la función de Henry, un aumento de 1,87 veces la viscosidad genera una movilidad electroforética que es casi la mitad de la movilidad de nanopartículas en agua sola (en nuestro caso, nanopartículas sin glicerina). Aun así, solo tendríamos una caída del 50% del potencial Z, pero, hay otra variable que se ve afectada por el glicerol y es la constante dieléctrica. La constante dieléctrica en agua pura a 20° [65] es 80,37 mientras que para un 30% glicerina/70% es de 71,77. De tal manera, que hay una caída de casi 8 unidades. De acuerdo a los dos argumentos mostrados,

tenemos una importante disminución de la movilidad de la nanopartícula por efecto de la glicerina y como el Zetasizer transforma esta movilidad en potencial Z, tendremos un menor valor de potencial Z. lo cual se condice con los resultados extraídos del gráfico y además, la variación de la viscosidad también afectaba el tamaño como vimos anteriormente, de tal forma, que ambos resultados que podrían ser perturbados por la viscosidad, se ven igual de afectados (o sea, doble tamaño, mitad de potencial).

Además, mencioné que este efecto era más marcado para las nanopartículas negativas. La glicerina ha sido estudiada [66] como agente plastificante, ya que puede generar varias interacciones con polímeros polihidroxilados como el alginato. El trabajo de Avella et al [66], estudió el cómo interactúa el alginato con la glicerina a través de DSC (Calorimetría diferencia de barrido), en donde se observaba:

- Interacción ión-dipolo (COO^- del Alginato y OH de la glicerina)
- Interacción dipolo-dipolo (OH del Alginato y OH de la glicerina)
- Puentes de hidrogeno (OH del Alginato y OH de la glicerina)
- Interacción dipolo-dipolo (éter del Alginato y OH de la glicerina)

De acuerdo a esto, se generaría una solvatación más marcada sobre la superficie de las nanopartículas negativas que tienen mayor cantidad de alginato a diferencia de las positivas que tienen menos alginato. Una partícula en medio acuoso está recubierta de dos capas, una capa de iones fuertemente unida a su superficie (capa de Stern) y una segunda capa (capa difusa) que es una región de donde los iones están menos unidos. Mangeldorsf et al [67] estudiaron profundamente los factores fisicoquímicos que afectan estas capas y como consecuencia, el cómo cambia la movilidad electroforética en función de ellas. A medida que se adsorbe solvente e iones en la superficie de la partícula, la capa de Stern empieza a engrosarse. Una partícula en su superficie tiene un potencial de superficie, el cual a medida que uno se va alejando de ella, va disminuyendo. Si la capa de Stern es más gruesa (Ilustración 10), el potencial de superficie será cada vez menor y como el Zetasizer mide el potencial Z de la superficie de la capa de Stern (no de la superficie de la nanopartícula o sea, el potencial de superficie), se verá reflejado como un menor potencial Z a medida que se engrosa esta capa.

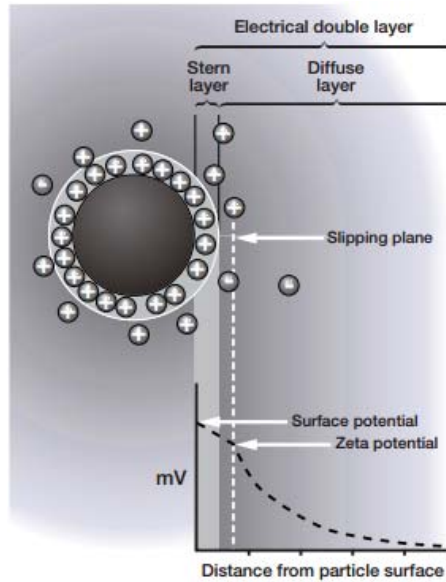


Ilustración 10. Esquema extraído del Manual de Malvern en donde es posible visualizar las capas de una partícula y la importancia de la distancia en la determinación del potencial Z.

- iii. Impresión de nanopartículas en un film inerte.
- iv. Caracterización de las propiedades fisicoquímicas al ser sometidas a este proceso.

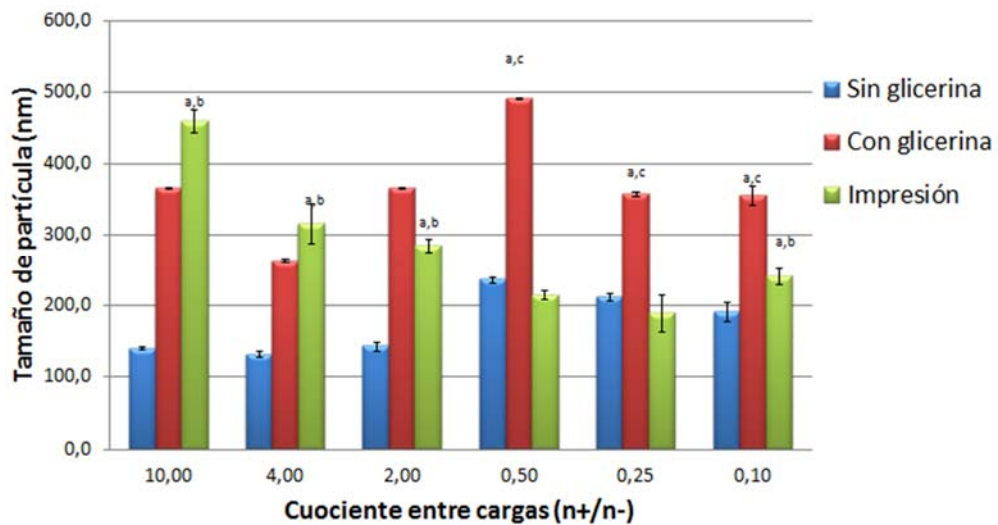


Gráfico 8. En este gráfico, podemos observar los cambios de tamaño por efecto de la resuspensión y la impresión de la nanopartícula. ($P > 0.050$, $N = 3$). Los descriptores estadísticos funcionan de la siguiente manera, tal que si

posee la letra a, significa que la formulación es distinta de la sin glicerina. Si posee b, es distinta de la con glicerina y si posee c, es distinta de la que fue impresa.

En el Gráfico 8 se observan los siguientes cambios que el tamaño de partícula vuelve a un valor cercano al de antes de que se agregará glicerina para las nanopartículas negativas. Como vimos anteriormente en el argumento del tamaño, la cuantificación del tamaño de partícula depende de la viscosidad del medio. A medida que aumenta la proporción de agua, la viscosidad se acerca a la del agua [59] y por tanto, el efecto que observamos anteriormente desaparece en su mayoría para ambas nanopartículas, pero aunque diluyamos mucho una solución glicerina/agua con agua (como es el caso del reflujó con agua usado para recuperar las nanopartículas), esta solución sigue conservando glicerina, de tal forma, que su viscosidad es levemente mayor al del agua, de tal forma, que no obtenemos el tamaño original, si no, que uno cercano a antes que se agregará glicerina.

Para las nanopartículas positivas se observa lo contrario, ya que aumentan su tamaño y más aún, se observa una tendencia en donde la razón de cargas 10 es la más afectada, mientras que la de 2 es la menos afectada. De acuerdo a esto, podríamos sospechar que es una propiedad dada ya sea por tener una mayor cantidad del polímero EE o por tener una menor cantidad de alginato. A medida que aumenta la dilución de la muestra, su pH va variando desde 4,6 (pH de las suspensiones con nanopartículas) hasta el pH del agua miliQ (el pH del agua puede variar en función de la concentración de CO₂, de tal forma, que va entre 6,0 y 5,5 [68]) por mera curiosidad es muy coloquial). De acuerdo al prospecto de Evonik sobre el polímero EE, este se vuelve insoluble a pH sobre 5 [33], de tal manera, que podría ser que por el pH de la solución diluida las nanopartículas empiecen a agregarse entre sí para evitar el contacto con el agua al disminuir la solubilidad del polímero EE. Posteriormente veremos, que los potenciales Z para estas 3 formulaciones son inferiores a 30 mV, lo que favorece la agregación.

Otra opción, es que el polímero se esté hinchando ya que según el prospecto de Evonik, el polímero EE se empieza a hinchar a pH sobre 5 y por tanto, nuestras nanopartículas positivas se están hinchando al estar altamente diluidas y como la formulación de 10 es la que tiene más polímero EE, es la que va a presentar mayor cambio, lo que se condice con los resultados.

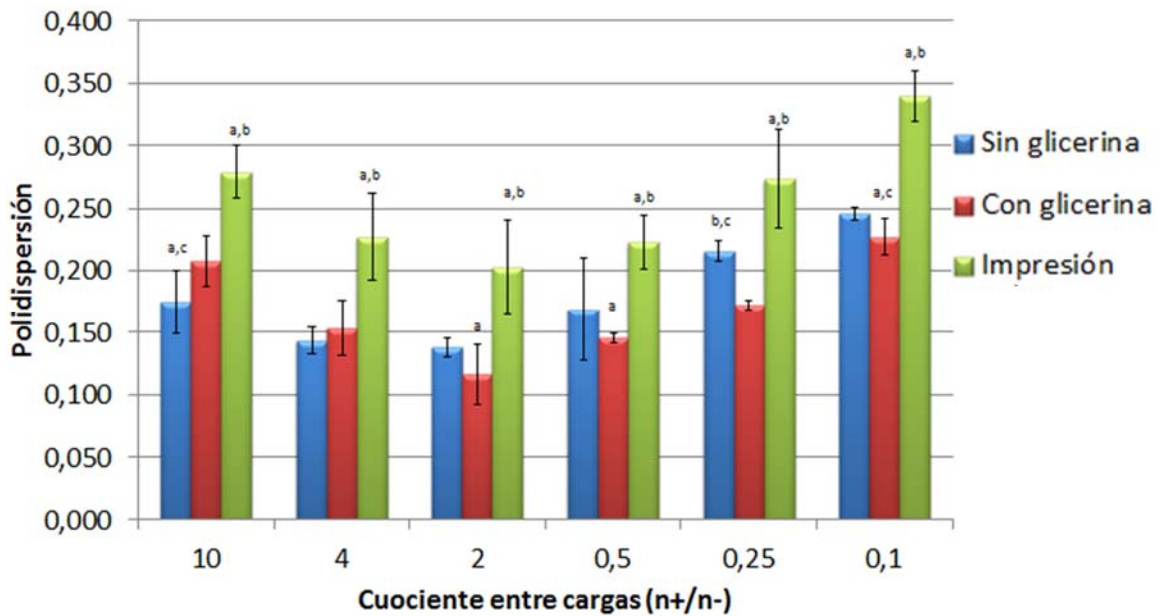


Gráfico 9. En este gráfico, podemos observar los cambios de polidispersión por efecto de la resuspensión y la impresión de la nanopartícula. ($P > 0.050$, $N = 3$). Los descriptores estadísticos funcionan de la siguiente manera, tal que si posee la letra a, significa que la formulación es distinta de la sin glicerina. Si posee b, es distinta de la con glicerina y si posee c, es distinta de la que fue impresa. Para el caso de 0,5; No se usaron descriptores ya que entre las 3 eran estadísticamente distintas.

De acuerdo al Gráfico 9, se observa un aumento de la polidispersión para las seis formulaciones. Para las nanopartículas negativas como vimos anteriormente, hay un cambio en el tamaño de las poblaciones al volver a una viscosidad cercana a la original ya que el reflujó con 1 mL de agua diluye mucho las muestras. Por tanto, podría ser que exista un reordenamiento de las nanopartículas, generando nuevas poblaciones. A modo de ejemplo, el Zetasizer cuantifica un agregado generando una esfera virtual, el cual corresponde a la suma mínima de los radios de las nanopartículas que componen el agregado. Siguiendo el ejemplo, si tenemos una población con un pico de 100% de dos nanopartículas de 70 nm unidas, el sistema observará su movilidad como una de 140 nm. Como solo tenemos una población, su polidispersión es de 0. Ahora, si rompemos la mitad de ellas, tendremos 75% de 70 nm y 25% de 140 nm. Por consiguiente, tendremos 2 poblaciones, de tal manera, que el coeficiente de difusión de ese 25% y también del 75% se desviarán del coeficiente de difusión del nuevo tamaño promedio y por tanto, la polidispersión aumentará.

Además, es interesante observar que a medida que aumenta el alginato (o sea, disminuye la razón de cargas), es mayor la polidispersión del sistema. Lo que nos hace pensar que este fenómeno está dado principalmente por las propiedades de los polímeros (ya que se observa algo parecido con las razones de carga positivas). Una posible explicación, es que

por la alta solubilidad del alginato, éste facilita el reordenamiento de las nanopartículas, ya que como las nanopartículas son más ricas en alginato al acercarnos a 0,1, esta se puede solvatar mucho más que las de 0,5 y por tanto, reordenarse para aumentar el contacto con el agua. Posteriormente veremos que en el Gráfico 10, el potencial Z de estas partículas vuelve en un 80% a su valor antes de agregar la glicerina, porque al tener un potencial Z mayor, las nanopartículas tenderán a repelerse unas con otras y esto puede generar nuevas poblaciones de nanopartículas.

Como pudimos observar anteriormente en el gráfico de tamaños (Gráfico 8) se ve que hay un aumento de tamaño que es menor a medida que disminuye la proporción de polímero EE, similar a como pasa con el tamaño. Es posible que con el agua se estén agregando las nanopartículas por su baja solubilidad y consiguientemente, estén generando distintas poblaciones de nanopartícula y por tanto, mayor dispersión, lo que explicaría esta tendencia en ambos gráficos.

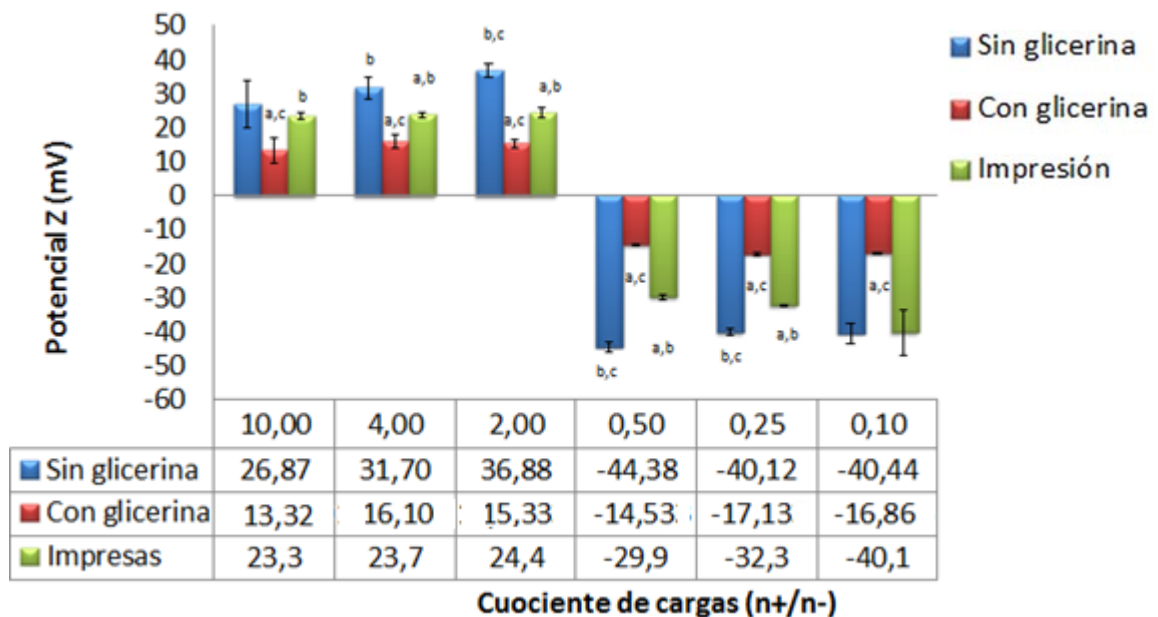


Gráfico 10. En este gráfico, podemos observar los cambios de potencial Z por efecto de la resuspensión y la impresión de la nanopartícula. ($P > 0.050$, $N = 3$). Los descriptores estadísticos funcionan de la siguiente manera, tal que si posee la letra a, significa que la formulación es distinta de la sin glicerina. Si posee b, es distinta de la con glicerina y si posee c, es distinta de la que fue impresa.

Se observa un aumento en el potencial Z al imprimir (Gráfico 10). Siendo mayor para las nanopartículas negativas que para las positivas. Como vimos anteriormente en el argumento de la glicerina y el potencial Z, el Zetasizer convierte la movilidad

electroforética usando la Ecuación de Henry y una de sus variables, es la viscosidad. Como nuestro sistema fue diluido n veces por el reflujo de 1 mL de agua, es probable que su viscosidad sea cercana a la del agua y por tanto, la transformación de datos por parte del Zetasizer generó un potencial levemente menor al que se generaría en una solución con solo agua. Pero a pesar de esta alta dilución, sigue existiendo glicerina en el medio, de tal manera, que no es posible recuperar del todo el potencial Z para las primeras cinco formulaciones, pero sí para la razón de cargas 0,1. Las nanopartículas negativas como se mencionó anteriormente en este párrafo, recuperaron más su potencial Z que las positivas ya que el alginato tiene más afinidad por la glicerina y por tanto, al aumentar su proporción (o sea, al acercarnos a 0,1) es más el impacto de la glicerina y por tanto, si quitamos esta perturbación, se esperaría que la de 0,1 sea la que recupere más su potencial antes de que se agregará glicerina, como se puede observar en el Gráfico 10.

Para las nanopartículas positivas también se observa que aumenta su potencial Z , pero no es tan marcado el efecto como en las negativas. De acuerdo al resultado de tamaño, observamos que hubo un aumento de tamaño para las nanopartículas positivas, lo que disminuye la movilidad de la nanopartícula. Como el Zetasizer usa la movilidad electroforética para estimar el potencial Z , una menor movilidad se traduce en un menor potencial Z .

3) Estudiar la liberación de la lisozima desde su matriz.

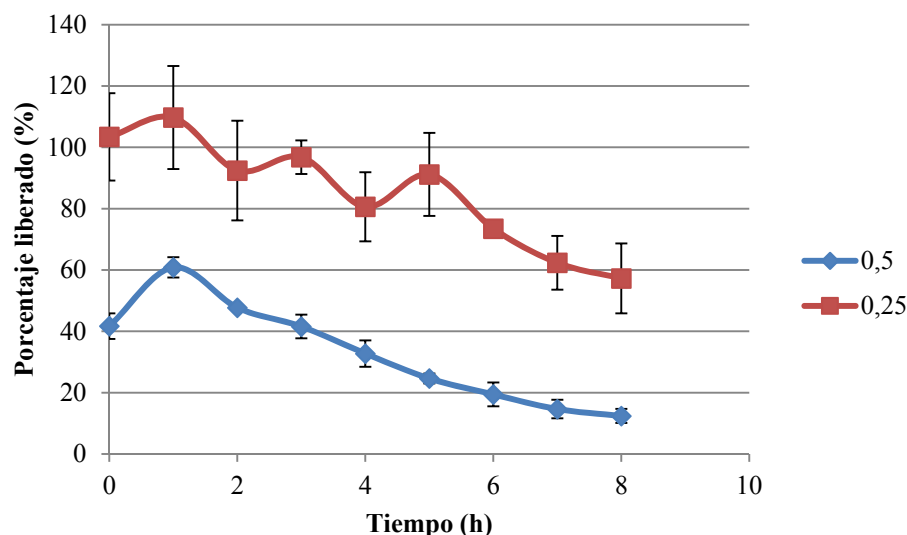


Gráfico 11. Perfil de liberación para 2 formulaciones en función de la razón de carga (cargas positivas/cargas negativas). Posee N=3 para cada una. Para 0,5%, no supera el 1% la SD; mientras que para 0,25, no supera el 15% para cada una. La formulación de 0,1 no fue mostrada en el gráfico, ya que liberaba un 100% desde el principio y se mantenía esa cantidad durante las 8 horas.

De acuerdo al Gráfico 11, se observa que a mayor proporción de polímero EE:

- El perfil de liberación empieza con una liberación de 40% para la de 0,5 y la de 0,25 empieza con una liberación del 100% para la de 0,25.
- Existe una disminución de la lisozima del medio a medida que transcurre el tiempo.

Lo observado en los perfiles de liberación puede ser analizado desde dos puntos de vista. Uno, es la propiedad de superficie que genera la razón de cargas de ambos polímeros y el segundo, es analizar las propiedades de superficie de la proteína modelo, o sea, la lisozima. A medida que nos acercamos a la razón de carga 0,5; va disminuyendo la cantidad de alginato y aumentando la cantidad de polímero EE, el cual posee (Ilustración 3) 2 monómeros hidrofóbicos además del monómero solubilizante, que es una amina terciaria. Su solubilidad se debe principalmente a la ionización de esta amina terciaria a pH inferiores a 5 [33], pero nuestro estudio de liberación se hace a pH 7,4; por lo que nuestro polímero EE ya no está ionizado y por tanto, es insoluble. Al estar no ionizado, este sistema poco soluble tratará de alejarse del medio acuoso y por tanto, existe una posibilidad de que use la lisozima para generar una barrera fisicoquímica para aislarse del

medio acuoso, ya que la lisozima presenta en su superficie sitios hidrofóbicos e hidrofílicos, de tal manera, que podría orientar estos sitios hidrofóbicos hacia el polímero hidrofóbico y los hidrofílicos hacia el medio acuoso, lo que generará, una mayor eficiencia de asociación (como se ve en el tiempo 0). No solo las nanopartículas presentan fenómenos de superficie, también la lisozima los presenta. La lisozima presenta una mayor capacidad de adsorción a medida que nos acercamos al pH 7 [69] y esta capacidad de adsorción es sobre un 95% a partir de 6,5 [70]; aumentando hasta llegar al 100% a pH 9,6. La explicación que da el equipo de Vinu [70] y Su [69] a este último punto, es que a estos pHs disminuye la carga positiva de la lisozima, lo que facilita la generación de multicapas de lisozima en una superficie, ya que disminuye la repulsión entre lisozimas. A nivel experimental, observé que a pH 4,6 en el estudio de estabilidad de proteína se obtenía una mayor cantidad de masa de proteína comparado a la masa de proteína obtenida en este estudio, lo que apoya este punto. Kubiak-Ossowska [50] comentan en su estudio de superficie de silicas hidrofóbicas que la lisozima a medida que nos acercamos a pH 7, disminuye sus interacciones electrostáticas, lo que hace la adsorción de la proteína sea más dependiente de las interacciones hidrofóbicas. Cai et al [71] apoya estos cuatro trabajos, ya que ellos estudiaron nanopartículas de PLGA cargadas con lisozima y en una de sus conclusiones, estipularon que a medida que se neutralizaba la carga de la lisozima, la nanopartícula requería mayor masa de lisozima para poder adsorber en su superficie. De tal manera, que tenemos un polímero que tratará de interactuar físicamente menos con el solvente y por otro lado, una proteína que está en su máximo de adsorción. Por tanto, a mayor proporción del polímero EE, se esperaría mayor eficiencia de asociación, lo que se observa en el Gráfico 11 para la formulación de 0,5 y una menor eficiencia de asociación para la de 0,25 al tener menos polímero EE. Conjuntamente, estas mismas propiedades de superficie explican el por va disminuyendo la cantidad de lisozima, ya que una vez que liberó hasta la hora, empieza a disminuir hasta que alcance llegar a un equilibrio termodinámico entre la adsorción y la desorción de esta.

Además de la argumentación basada en estos dos puntos, este tipo de liberación ha sido antes descrito por Jiang y su equipo [72], quienes concluyeron que el perfil anómalo (Ilustración 11) observado en su trabajo se debía una alta adsorción por parte de la proteína al exponer residuos hidrofóbicos a pH 7,4 en la solución buffer fosfato, lo que generaría una mayor adsorción en la superficie de las nanopartículas.

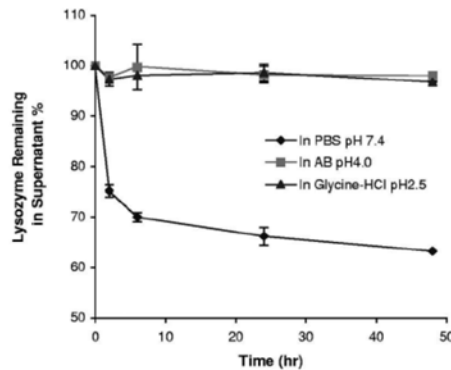


Ilustración 11. Perfil de liberación extraído del trabajo de Jiang et al, en donde se observan distintos medios de liberación. Es relevante para nosotros notar a pH 7,4, en donde se observa una caída en la cantidad liberada (desde un 100% a 50% en 2 días y fracción) a pH 7,4.

De tal forma, que tanto ellos (que trabajaron con PLGA), como nosotros, observamos un comportamiento anómalo en el perfil de liberación y creemos, que se debe a una adsorción de la proteína en su superficie.

- 4) Además de estudiar el comportamiento de la actividad en función de la concentración se
 - i. Estudió la relación concentración/actividad a pH óptimo.
 - ii. Evaluó la actividad de la lisozima en pH óptimo, pH de encapsulación y el efecto de la presencia de glicerina en el medio.
 - iii. Determinó la actividad de la lisozima asociada a la nanopartícula.

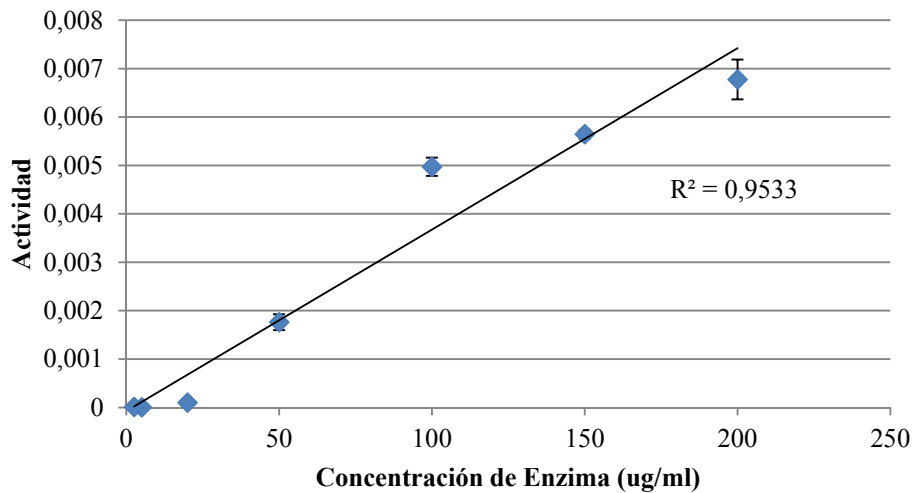


Gráfico 12. Relación entre actividad enzimática y concentración de lisozima. (N=3; A modo de observación, desviaciones estándares inferiores al 1% no son posibles observarlas en el gráfico.)

Se observa una tendencia a la linealidad (Gráfico 12) entre la concentración de enzima y la actividad de esta. Se observó que en los primeros puntos (bajas concentraciones), los puntos son muy cercanos entre sí. Smoelis [73] et al, también presentaron una curva de esta clase y como acotación, se recomendaba trabajar con concentraciones que saltaran estos puntos inferiores, ya que aparecía una cinética sigmoidea y era posible ver una línea muy pronunciada, en donde este rango, es lineal. En esta tesis, las concentraciones de lisozima fueron superiores a los 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e inferiores a los 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para el trabajo de actividad, por lo que la determinación es en el rango lineal de la actividad versus concentración.

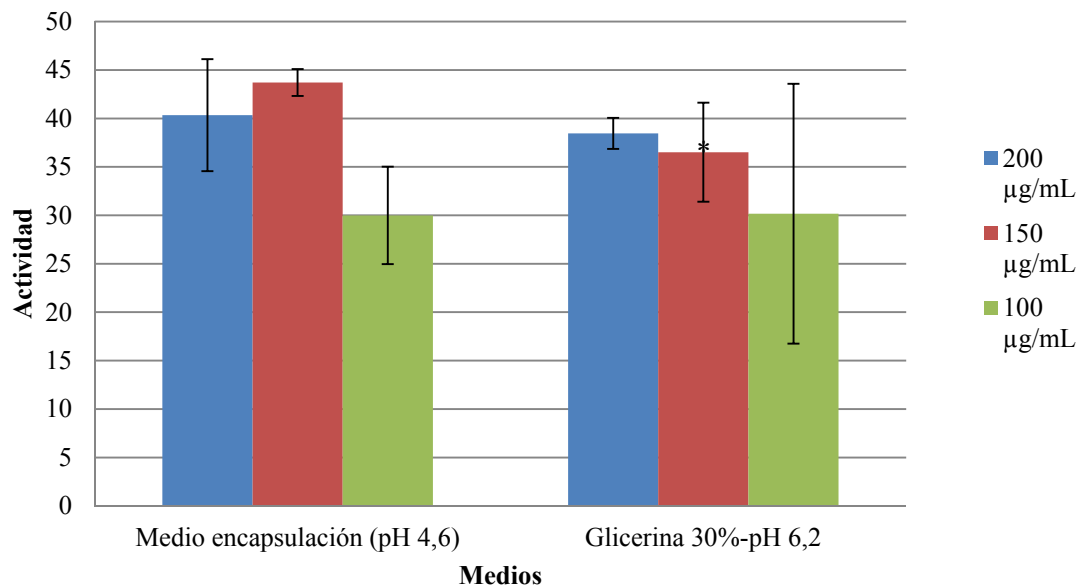


Gráfico 13. Caída de actividad en dos medios. El primero, buffer acetato 4.6 (100mM) y sin glicerina. El segundo, buffer fosfato 6.2 (100mM) pero con un 30% de glicerina. (N=3; P<0.050). * corresponde a que es estadísticamente diferente.

En el Gráfico 13, se observa que tanto a pH 4,6 como por efecto de la glicerina, disminuye más de un 60% la actividad de la lisozima. El pH de máxima actividad para la lisozima está definido [51] en 6,2 a 25 °C, siendo nulo a pH inferior a 3,0 y superior a 9,2. Además, este pH de máxima actividad es aplicable en un amplio rango de fuerzas iónicas, de tal manera, que nuestro buffer (acetato y fosfato) están comprendidos en este rango con su concentración de 100 mM, de tal manera, que la fuerza iónica representa un inconveniente

en este caso. La lisozima posee 2 aminoácidos importantes para el proceso de lisis del éter de la pared celular:

- El ácido glutámico 35 (Glu35), pKa 5,5-6,1 [74]
- El ácido aspártico 52 (Asp72), pKa 3,9 [75]

El mecanismo convencional es el mecanismo de Vernon [49], en donde, el Glu35 protona el éter, el Asp52 estabiliza el catión que se forma y luego el resto de la estructura de la lisozima tuerce el poliaminosacarido en 180°, rompiendo el enlace éter.

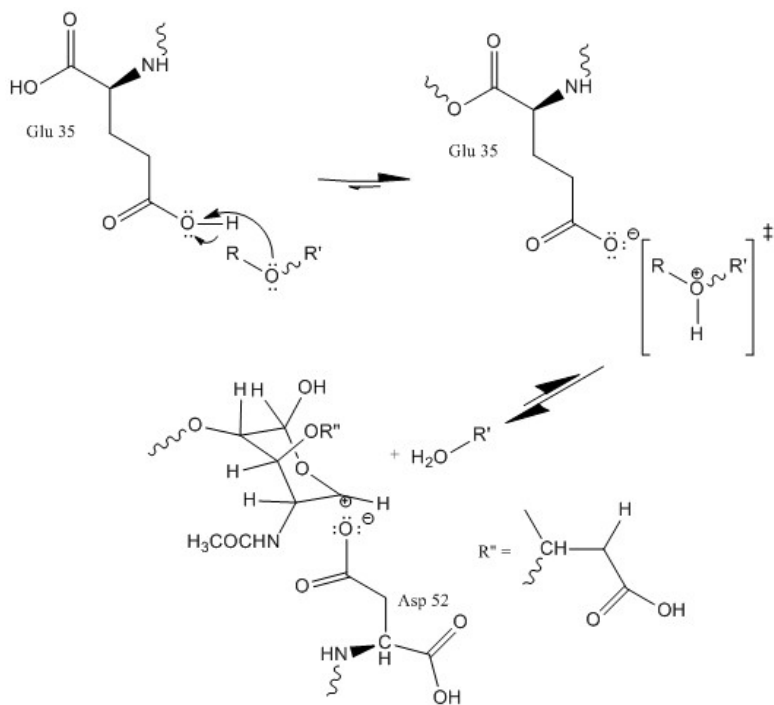


Ilustración 12. Mecanismo de Vernon [47] que explica cómo se lisan los poliaminosacaridos por efecto de la lisozima

Como mencioné anteriormente, hubo una caída de la actividad por el pH. Los aminoácidos Glu35 y Asp52 son críticos por lo que se explicó en el párrafo anterior, de tal forma que cualquier perturbación en su estructura afectará de manera importante la función lítica de nuestra proteína. A pH 4,6; el Asp52 está menos ionizado (Ecuación 6) que a pH 6,2 (Ecuación 8) por lo que su capacidad de estabilización de carbocatión es mucho menor a pH 4,6 y por tanto, la torsión del anillo es más difícil. Por otro lado, el Glu35 a pH 4,6 esta menos ionizado (Ecuación 5) y por tanto, su labilidad para acidificar el éter es mucho menor comparado a pH 6,2 (Ecuación 7). En base a estos dos puntos, se puede explicar el por qué existe una caída de la actividad a pH 4,6.

$$\alpha_{Glu35} = \frac{1}{1 + 10^{5.5-4.6}}$$

$$\alpha_{Glu35} = \frac{1}{1 + 10^{0.9}} = \frac{1}{1 + 7.94} = \frac{1}{8.94} \times 100 = 11,2\%$$

Ecuación 5. Porcentaje de ionización para el Glu35 a pH 4,6

$$\alpha_{Asp52} = \frac{1}{1 + 10^{3.9-4.6}}$$

$$\alpha_{Asp52} = \frac{1}{1 + 10^{-0.7}} = \frac{1}{1 + 0,199} = \frac{1}{1,199} \times 100 = 83\%$$

Ecuación 6. Porcentaje de ionización para el Asp52 a pH 4,6

$$\alpha_{Glu35} = \frac{1}{1 + 10^{5.5-6.2}}$$

$$\alpha_{Glu35} = \frac{1}{1 + 10^{-0.7}} = \frac{1}{1 + 5,02} = \frac{1}{6,02} \times 100 = 16,6\%$$

Ecuación 7. Porcentaje de ionización del Glu35 a pH 6,2

$$\alpha_{Asp52} = \frac{1}{1 + 10^{3.9-6.2}}$$

$$\alpha_{Asp52} = \frac{1}{1 + 10^{-2.3}} = \frac{1}{1 + 0,005} = \frac{1}{1,005} \times 100 = 99,5\%$$

Ecuación 8. Porcentaje de ionización del Asp52 a pH 6,2

Además de la caída de actividad a pH 4,6; existe una caída de la actividad por efecto de la glicerina como se mencionó al inicio de la discusión. La glicerina es un conocido agente desnaturante de proteínas [76], pero no se sabe el mecanismo exacto de como lo hace. En general se han hecho estudios cristalográficos para entender esta desnaturación, por ejemplo, el trabajo de Huang et al [76] observaron cambios en la configuración de las láminas β de la lisozima y se debía, a través de espectroscopía IR, a alteración de las interacciones en la lisozima. Tomizawa et al [77] confirman ese punto, ya que si se rompen todas las interacciones de la lisozima, la glicerina no tiene efecto en su estructura cuando es vista por cristalografía de rayos X. Pero no solo las láminas β se ven afectadas, si no, que también las α -hélices [76], las cuales componen el 46% de la estructura de la lisozima y de acuerdo al trabajo de Phillips [49], el sitio catalítico se soporta sobre un conjunto de α -hélices, lo que genera distanciamiento entre sus residuos si se ven alteradas. En el mismo trabajo de Huang, se ve que los ángulos de enlace del agua se ven afectados por la presencia de puentes de hidrogeno entre el agua y la glicerina, lo que podría dificultar la adhesión de agua al carbocatión y por tanto, ralentizando la salida de los productos del sitio catalítico. Sinibaldi et al [78] apoyan este punto, ya que han observado la infiltración de la glicerina hacia el interior de la lisozima. Y no menos interesante, es que con una

proporción 30% glicerina/70% agua era suficiente para desnaturalizar la lisozima [76], ya que Huang et al trabajaron con 10%, 20% y 30% glicerina, observándose la mayor alteración de la estructura a medida que aumentaba la proporción de glicerina. En base a toda la revisión mostrada, es posible entender distintos factores fisicoquímicos que podrían explicar esta caída de más del 60% de la actividad de la lisozima. Ahora, el problema de la glicerina podría ser solucionado con facilidad. La función de la glicerina en nuestro sistema es generar viscosidad para evitar la elución a través de los poros del cartridge y por tanto, perder el contenido de este. Afortunadamente, en el mercado existen distintos tipos de viscosantes, como por ejemplo:

- Polímeros sintéticos [79]
- Celulosas [80]
- Azúcares [81]
- Polioles [82]

Siendo la última descartada, por los resultados de esta tesis y por tanto, podemos optar a celulosas y azúcares. Pero, nos podemos inclinar más por los azúcares, ya que la literatura reporta un efecto interesante, el cual es “estabilizante de proteínas”.

La glucosa, lactosa y dextrosa han demostrado ser una suerte de “buffer termodinámicos”, en donde, pueden cambiar patrones termodinámicos [83] para desviar el ΔG hacia la estructura nativa de las proteínas. De tal manera, que aunque se aumente la temperatura de una solución de proteínas, las azúcares pueden reordenar el sistema y cambiar patrones fisicoquímicos para evitar que la temperatura desnaturalice la proteína. Y aún más importante, estos azúcares no desnaturalizan la proteína, ya que su tamaño no les permite ingresar al interior de esta.

A modo de ejemplo [84], se ha visto que la trehalosa y sucrosa (sacarosa antiguamente) es usada por varios seres vivos como agente estabilizante de sus proteínas y lípidos. Se ha propuesto que:

- Se comportan como osmolitos, preservando la osmolaridad interna de la proteína.
- Como agentes termoplásticos, ya que su T_g les permite cambiar su estructura de cristal líquido a gel, de tal forma, que pueden distribuir la energía del sistema en su estructura interna, evitando que las proteínas se vean afectadas por esta energía.
- Aumenta la robustez de la proteína, ya que pueden excluir el agua de su superficie, disminuyendo el radio hidrodinámico de la proteína y compactándola, haciéndola más estable.

Uno de los argumentos que da Arakawa et al (1982) para elegir el azúcar, es el optar por glúcidos oxidados, ya que varios glúcidos funcionan como agentes reductores, lo que puede alterar la estructura nativa de la proteína.

De esta manera, tenemos varias estrategias posibles para proteger la proteína de la denaturación producida por la glicerina y por tanto, mejorar la preservación de la estructura de la proteína en el proceso de resuspensión.

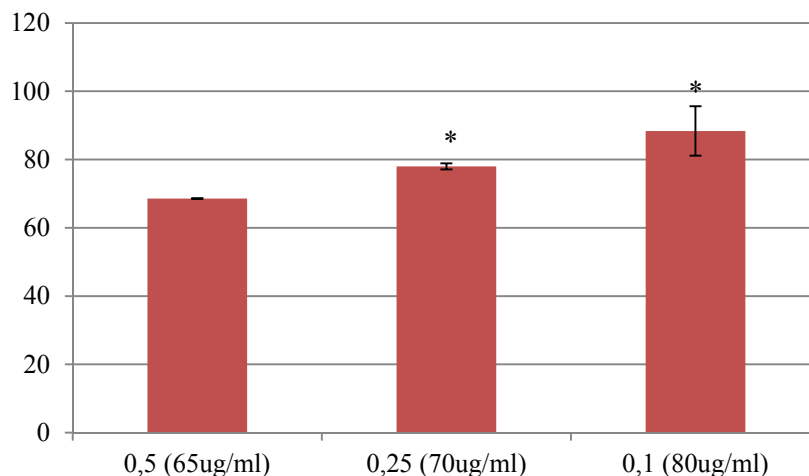


Gráfico 14. Actividad de la lisozima en tres formulaciones. En eje X corresponde a la razón de carga y su respectiva concentración liberada en 1 hora (y por tanto, es la concentración del estándar generado que equivale al 100% de la actividad) mientras que el Y corresponde al porcentaje de actividad. (N=2, P>0.050), donde * es estadísticamente distinto de otro.

En este gráfico, es posible observar una clara tendencia, en donde a menor cantidad de polímero EE, es menor la caída de la actividad enzimática de la lisozima.

Una de las posibles explicaciones es que no se “separa” todo el polímero del sistema por centrifugación y por tanto, existe polímero en solución (ya que la centrifuga separa el polímero en suspensión y las nanopartículas). Las bases de la centrifugación califican nuestra centrifuga como una de mediana velocidad, pero por la fragilidad de los tubos de centrifuga, trabajamos con 10.000 RPM (11.510 RCF), de tal manera, que se comporta como una de baja velocidad. De acuerdo a esto, es posible separar ciertos precipitados [85], pero no es posible separar macromoléculas. Para poder separar la lisozima, se tendría que llevar a una ultracentrífuga (100.000 RPM o 115.100 RCF) ya que es un elipsoide con un diámetro de 9 nm [86], por lo que requiere una gran fuerza para generar una separación eficiente. Además, el Zetasizer a veces reporta una pequeña población (entre 1 a 5%) de nanopartículas de 45-65nm, de tal forma, que podría ser un pequeño agregado de polímeros-lisozima que se encuentra en solución.

Si tenemos polímeros en solución, la lisozima podría interactuar con ellos y por tanto, presentar perturbaciones en su actividad. Trabajos con superficies hidrofóbicas [87] han mostrado que la lisozima al estar frente a éstas superficies, orienta sus α -hélices hacia el exterior en función de la intensidad de la hidrofobicidad de la superficie. De tal forma, que la deformación del sitio catalítico genera una pérdida gradual de la actividad de la lisozima. Mientras más intensa sea la hidrofobicidad, más es la denaturación que sufre esta ya que existe una mayor alteración en la conformación de las α -hélices y este último punto es apoyado por otro trabajo, ya que se ha observado con nanopartículas de sílice [88] que una mayor modificación en las α -hélices genera una alteración exponencial en la actividad de esta. De acuerdo estos dos puntos, una pequeña alteración en la superficie de la lisozima por efecto de la hidrofobicidad del polímero podría generar una alteración importante en la estructura de la lisozima, lo que explicaría por qué al aumentar el polímero EE (y por tanto, la hidrofobicidad sobre la lisozima), disminuye su actividad.

5) Estudiar la estabilidad de las nanopartículas

- i. Síntesis de tintas nanoestructuradas y caracterización en el día 0 desde su preparación.
- ii. Conservación de las muestras a 2 temperaturas (25° y 40°). Caracterización de la eficiencia de asociación después de un mes de conservación.

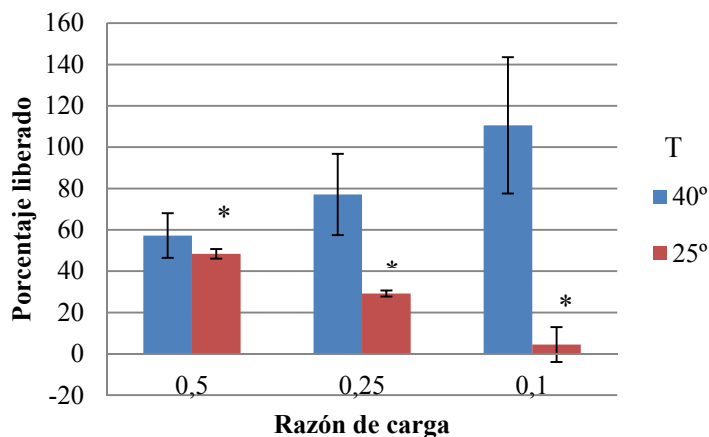


Gráfico 15. Eficiencia de asociación en el día 30 de tres formulaciones con nanopartículas. Se definió como el 100% la masa interna dada por la eficiencia de asociación en el día 0 de estas mismas tres formulaciones. (P>0.050, N=3)

Se observa que la estabilidad de las nanopartículas es mayor a menor a temperatura, lo cual tiene sentido, ya que existe un componente cinético de por medio. La cinética de liberación de fármacos poseen múltiples modelos y en general, siempre existe una

constante k que se obtiene de manera experimental [89]. Esta constante k , depende de distintos factores fisicoquímicos, siendo uno de estos, la temperatura la cual es directamente proporcional a este valor k . Cuando la temperatura es mayor, aumenta la energía interna de las moléculas y estas se empiezan a agitar cada vez más, por lo que aumenta su movimiento browniano. Por esta razón, estas tienden a migrar con mayor facilidad y por tanto, a escapar de la superficie de la nanopartícula (lo que se puede ver en ambas formulaciones a 40 °C).

Las interacciones hidrofílicas están dadas por una diversidad de interacciones, como las dipolo-dipolo, ión-dipolo, puente de hidrogeno e interacción iónica en algunos casos. Estos dos últimos, son las de mayor energía (y a la vez, las de mayor distancia). La formulación de 0,1 presenta mayor cantidad de alginato y por tanto, su superficie expresa mayor cantidad de las interacciones antes descrita en el trabajo de Avella. Por tanto, tiene más sitios en donde generar un radio de interacción sobre la lisozima y por tanto la lisozima que migra al seno de la solución es menor para esta formulación ya que puede volver a adsorberse en la superficie de la nanopartícula. En cambio, a medida que disminuimos la cantidad de alginato, también disminuimos la cantidad de posibles interacciones hidrofílicas. Como resultado, el radio disminuye y es más fácil para la lisozima migrar al seno de la suspensión como sucede en la formulación de 0,5 a 25 °C. Pero a 40 °C, podemos observar que la formulación de 0,1 es la que más ha liberado en un mes. Podría ser que como la formulación de 0,1 tiene menor capacidad de adsorción como se observó en el punto de eficiencia de asociación, la lisozima que vuelve a la superficie de lisozima no se adsorba y como aumenta la temperatura, aumentará el movimiento browniano de la lisozima por lo que podría superar el radio de interacción de la nanopartícula. En este análisis, solo hemos hablado de las interacciones hidrofílicas, pero no de las hidrofóbicas las cuales podrían jugar un rol importante en la formulación de 0,5 a 40°. Si bien el alcance de estas interacciones es menor, tanto el polímero EE como la lisozima son ricos en grupos funcionales hidrofóbicos, lo que aumenta la cantidad de estas interacciones. Por tanto, es posible que tanto la lisozima que sale de la nanopartícula como la que está en la superficie adsorbida, tiendan a mantenerse sobre la superficie y sea poco la que está en el radio de interacción a diferencia de la nanopartícula con alginato, que ha de tener la lisozima principalmente en su radio de acción. De tal manera, que estas interacciones hidrofóbicas limitarían la fuga de fármaco desde la superficie nanopartícula y como se observó anteriormente en el perfil de liberación, es lo que se observa en las curvas.

Conclusiones

Los objetivos generales plantean lo siguiente:

1. **Obtener nanovehículos para su posterior inmovilización en film inerte a través del proceso de impresión:**

Este objetivo se cumplió, ya que es posible obtener nanovehículos imprimibles y que en general, sus propiedades fisicoquímicas están dadas por la razón de ambos polímeros.

La resuspensión con glicerina no altera el tamaño, polidispersión y potencial Z de forma importante.

La impresión presenta un efecto sobre las nanopartículas que es bajo o nulo en cuanto a la diferencia del tamaño y potencial Z antes y después de imprimir.

Se puede optar a la formulación de 0,5 ya que es la única que presenta un perfil de liberación apropiado al retener durante 8 horas su contenido. Las formulaciones de 0,25 y 0,1 presentan un perfil de liberación desfavorable.

Proteger a la proteína modelo por medio de estos nanovehículos.

Este objetivo también se cumple. Existen condiciones de acuerdo a la hidrofobicidad del polímero y la razón de cargas de los polímeros, en las que es posible proteger la proteína.

Por tanto, como se cumplen los objetivos 1 y 2, la hipótesis es válida y como consecuencia, es viable el uso de impresión de nanopartículas como técnica de manufactura *films* poliméricos cargados con fármacos biomacromoleculares.

Limitaciones experimentales

Esta tesis presentó las siguientes limitaciones experimentales:

- Determinación de la eficiencia de asociación para nanopartículas positivas, ya que tanto por HPLC como por microBCA, se veían interferidos por efecto del polímero EE.
- No se determinó la eficiencia de asociación post-impresión, ya que como se comentó en el punto de “Impresión y caracterización”, la solución obtenida por reflujo está muy diluida, lo que hace inviable la estimación de la concentración de lisozima.
- No se trabajó con razones de carga 0,75; 0 y 1, ya que estas precipitaban. Probablemente, porque el potencial zeta era muy bajo al tener cantidades de ambos polímeros parecidas, lo que facilita la agregación de las nanopartículas.

Perspectivas

Personalmente creo que sería interesante estudiar los siguientes fenómenos:

- La estabilidad de péptidos inferiores a 10 kDa como la insulina o la calcitonina. Un gran número de fármacos biotecnológicos tienen estos pesos moleculares y por su estructura poco robusta, son muy susceptibles a la inactivación en el proceso de incorporación en nanopartículas.
- Estudiar una proteína con carga superficial negativa como la lactoferrina [90] y su estabilidad con estos vehículos.
- El efecto corona en estas formulaciones y por tanto, la adsorción de proteínas/péptidos y su cinética de adsorción en la superficie en función de la proporción de polímeros.
- El efecto que tiene en este sistema la incorporación de otro viscosante como es la sacarosa o trehalosa, ya que anteriormente en la discusión del efecto de la glicerina en la lisozima se mencionaron beneficios descritos en la literatura asociado al uso de estos glúcidos como estabilizantes de proteínas.

Referencias

- [1] Ruiz S, Sulleiro E, Calvo G. Medicamentos biotecnológicos; from dream to reality. *Farm Aten Primaria* 2011;9:85–8. doi:10.1016/S2172-3761(11)70040-1.
- [2] Voet D, Voet JG, Pratt CW. *Fundamentos De Bioquímica/ Fundamental of Biochemistry*. Ed. Médica Panamericana; 2007.
- [3] Subdepartamento de Registro: Biotecnológicos | Instituto de Salud Pública de Chile n.d.
http://www.ispch.cl/anamed/subdeptoregistro/seccion_productos_nuevos/biotecnologicos (accessed February 21, 2016).
- [4] Kroon DJ, Baldwin-Ferro A, Lalan P. Identification of Sites of Degradation in a Therapeutic Monoclonal Antibody by Peptide Mapping. *Pharm Res* 1992;9:1386–93. doi:10.1023/A:1015894409623.
- [5] Wang W, Wang E, Balthasar J. Monoclonal Antibody Pharmacokinetics and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Ther* 2008;84:548–58. doi:10.1038/clpt.2008.170.
- [6] Keizer RJ, Huitema ADR, Schellens JHM, Beijnen JH. Clinical pharmacokinetics of therapeutic monoclonal antibodies. *Clin Pharmacokinet* 2010;49:493–507. doi:10.2165/11531280-000000000-00000.
- [7] Leader B, Baca QJ, Golan DE. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nat Rev Drug Discov* 2008;7:21–39. doi:10.1038/nrd2399.
- [8] Gennaro AR (DRT). Remington Farmacia. Ed. Médica Panamericana; 2003.
- [9] NEHA NARANG1, JYOTI SHARMA2. SUBLINGUAL MUCOSA AS A ROUTE FOR SYSTEMIC DRUG DELIVERY 2011; Volumen 3:22.
- [10] Patel VF, Liu F, Brown MB. Advances in oral transmucosal drug delivery. *J Controlled Release* 2011;153:106–16. doi:10.1016/j.jconrel.2011.01.027.
- [11] Homer KA, Whiley R a., Beighton D. Proteolytic activity of oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett* 1990;67:257–60. doi:10.1111/j.1574-6968.1990.tb04029.x.
- [12] Liong M, Lu J, Kovochich M, Xia T, Ruehm SG, Nel AE, et al. Multifunctional Inorganic Nanoparticles for Imaging, Targeting, and Drug Delivery. *ACS Nano* 2008;2:889–96. doi:10.1021/nn800072t.
- [13] Prego C, García M, Torres D, Alonso MJ. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J Controlled Release* 2005;101:151–62. doi:10.1016/j.jconrel.2004.07.030.
- [14] Morishita M, Peppas NA. Is the oral route possible for peptide and protein drug delivery? *Drug Discov Today* 2006;11:905–10. doi:10.1016/j.drudis.2006.08.005.
- [15] Florence AT. The Oral Absorption of Micro- and Nanoparticulates: Neither Exceptional Nor Unusual. *Pharm Res* 1997;14:259–66. doi:10.1023/A:1012029517394.

- [16] Orive G, Hernández RM, Gascón AR, Domínguez-Gil A, Pedraz JL. Drug delivery in biotechnology: present and future. *Curr Opin Biotechnol* 2003;14:659–64. doi:10.1016/j.copbio.2003.10.007.
- [17] Tsuchida K, Murakami T. Recent Advances in Inorganic Nanoparticle-Based Drug Delivery Systems. *Mini Rev Med Chem* 2008;8:175–83. doi:10.2174/138955708783498078.
- [18] Neuberger T, Schöpf B, Hofmann H, Hofmann M, von Rechenberg B. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications: Possibilities and limitations of a new drug delivery system. *J Magn Magn Mater* 2005;293:483–96. doi:10.1016/j.jmmm.2005.01.064.
- [19] He C, Hu Y, Yin L, Tang C, Yin C. Effects of particle size and surface charge on cellular uptake and biodistribution of polymeric nanoparticles. *Biomaterials* 2010;31:3657–66. doi:10.1016/j.biomaterials.2010.01.065.
- [20] Pinto Reis C, Neufeld RJ, Ribeiro António J, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2006;2:8–21. doi:10.1016/j.nano.2005.12.003.
- [21] Yin Win K, Feng S-S. Effects of particle size and surface coating on cellular uptake of polymeric nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. *Biomaterials* 2005;26:2713–22. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.07.050.
- [22] Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao JX, Kissel T. Biodegradable nanoparticles for oral delivery of peptides: is there a role for polymers to affect mucosal uptake? *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50:147–60. doi:10.1016/S0939-6411(00)00084-9.
- [23] Pan Y, Li Y, Zhao H, Zheng J, Xu H, Wei G, et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo. *Int J Pharm* 2002;249:139–47. doi:10.1016/S0378-5173(02)00486-6.
- [24] Alexis F, Pridgen E, Molnar LK, Farokhzad OC. Factors Affecting the Clearance and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles. *Mol Pharm* 2008;5:505–15. doi:10.1021/mp800051m.
- [25] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 2010;385:113–42. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018.
- [26] Nagpal K, Singh SK, Mishra DN. Chitosan Nanoparticles: A Promising System in Novel Drug Delivery. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2010;58:1423–30. doi:10.1248/cpb.58.1423.
- [27] Arvizu-Higuera DL, Hernández-Carmona G, Rodríguez-Montesinos YE, de Ciencias Marinas CI. Parámetros que afectan la conversión del ácido alginico en alginato de sodio Parameters affecting the conversion of alginic acid to sodium alginate. *Cienc Mar* 2002;28:27–36.
- [28] Vroman I, Tighzert L. Biodegradable Polymers. *Materials* 2009;2:307–44. doi:10.3390/ma2020307.
- [29] Vimal Kumar Yadav ABG. Mucoadhesive Polymers: Means of Improving the Mucoadhesive Properties of Drug Delivery System. *J Chem Pharm Res* 2010;2:418–32.

- [30] Takeuchi H, Yamamoto H, Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;47:39–54. doi:10.1016/S0169-409X(00)00120-4.
- [31] Andrews GP, Lavery TP, Jones DS. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;71:505–18. doi:10.1016/j.ejpb.2008.09.028.
- [32] Draget KI, Taylor C. Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocoll* 2011;25:251–6. doi:10.1016/j.foodhyd.2009.10.007.
- [33] EUDRAGIT® E PO - EUDRAGIT® - Targeted Drug Release and Tailored Service n.d. <http://eudragit.evonik.com/product/eudragit/en/products-services/eudragit-products/protective-formulations/e-po/Pages/default.aspx> (accessed June 25, 2015).
- [34] Kreuter J, Täuber U, Illi V. Distribution and elimination of poly(methyl-2-14C-methacrylate) nanoparticle radioactivity after injection in rats and mice. *J Pharm Sci* 1979;68:1443–7. doi:10.1002/jps.2600681129.
- [35] Dhana lekshmi UM, Poovi G, Kishore N, Reddy PN. In vitro characterization and in vivo toxicity study of repaglinide loaded poly (methyl methacrylate) nanoparticles. *Int J Pharm* 2010;396:194–203. doi:10.1016/j.ijpharm.2010.06.023.
- [36] Azarmi S, Roa WH, Löbenberg R. Targeted delivery of nanoparticles for the treatment of lung diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2008;60:863–75. doi:10.1016/j.addr.2007.11.006.
- [37] Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;47:65–81. doi:10.1016/S0169-409X(00)00122-8.
- [38] Bioadhesive extruded film for intra-oral drug delivery and process, n.d.
- [39] He C, Cui F, Yin L, Qian F, Tang C, Yin C. A polymeric composite carrier for oral delivery of peptide drugs: Bilaminated hydrogel film loaded with nanoparticles. *Eur Polym J* 2009;45:368–76. doi:10.1016/j.eurpolymj.2008.11.004.
- [40] Boehm RD, Miller PR, Daniels J, Stafslie S, Narayan RJ. Inkjet printing for pharmaceutical applications. *Mater Today* 2014;17:247–52. doi:10.1016/j.mattod.2014.04.027.
- [41] Delaney JT, Smith PJ, Schubert US. Inkjet printing of proteins. *Soft Matter* 2009;5:4866–77. doi:10.1039/B909878J.
- [42] Singh M, Haverinen HM, Dhagat P, Jabbour GE. Inkjet printing-process and its applications. *Adv Mater Deerfield Beach Fla* 2010;22:673–85. doi:10.1002/adma.200901141.
- [43] Ilkhanizadeh S, Teixeira AI, Hermanson O. Inkjet printing of macromolecules on hydrogels to steer neural stem cell differentiation. *Biomaterials* 2007;28:3936–43. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.05.018.
- [44] Derby B. Bioprinting: inkjet printing proteins and hybrid cell-containing materials and structures. *J Mater Chem* 2008;18:5717–21. doi:10.1039/B807560C.
- [45] Wu BM, Borland SW, Giordano RA, Cima LG, Sachs EM, Cima MJ. Solid free-form fabrication of drug delivery devices. *J Controlled Release* 1996;40:77–87. doi:10.1016/0168-3659(95)00173-5.

- [46] Montenegro-Nicolini, M, Javier O. Morales. Overview and future potential of buccal mucoadhesive films as drug delivery systems for biologics. AAPS PharmSciTech 2016 2016;In Press.
- [47] Multimechanism oral dosage forms fabricated by three dimensional printing™ n.d. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365999002242> (accessed April 3, 2016).
- [48] Radulescu D, Schwade N, Wawro D. Uniform Paclitaxel-Loaded Biodegradable Microspheres Manufactured by Ink-Jet Technology. ResearchGate 2003.
- [49] Phillips DC. The Hen Egg-White Lysozyme Molecule. Proc Natl Acad Sci U S A 1967;57:483–95.
- [50] Kubiak-Ossowska K, Cwieka M, Kaczynska A, Jachimaska B, Mulheran PA. Lysozyme adsorption at a silica surface using simulation and experiment: effects of pH on protein layer structure. Phys Chem Chem Phys 2015;17:24070–7. doi:10.1039/C5CP03910J.
- [51] Lysozyme from chicken egg white lyophilized powder, protein $\geq 90\%$, $\geq 40,000$ units/mg protein | Sigma-Aldrich n.d. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l6876?lang=es®ion=CL> (accessed April 9, 2015).
- [52] Estructura Y Funcion de Biomoleculas: Con Los Conceptos de Quimica Necesarios Para Una Mejor Comprension de la Bioquimica. Universidad del Rosario; 2010.
- [53] De Feijter JA, Benjamins J, Tamboer M. Adsorption displacement of proteins by surfactants in oil-in-water emulsions. Colloids Surf 1987;27:243–66. doi:10.1016/0166-6622(87)80145-2.
- [54] Levy Y, Onuchic JN. Water Mediation in Protein Folding and Molecular Recognition. Annu Rev Biophys Biomol Struct 2006;35:389–415. doi:10.1146/annurev.biophys.35.040405.102134.
- [55] Li Z, Lazaridis T. The Effect of Water Displacement on Binding Thermodynamics: Concanavalin A. J Phys Chem B 2005;109:662–70. doi:10.1021/jp0477912.
- [56] Spolar RS, Ha JH, Record MT. Hydrophobic effect in protein folding and other noncovalent processes involving proteins. Proc Natl Acad Sci 1989;86:8382–5.
- [57] Chen C-H, Lee W-C. Affinity chromatography of proteins on non-porous copolymerized particles of styrene, methyl methacrylate and glycidyl methacrylate. J Chromatogr A 2001;921:31–7. doi:10.1016/S0021-9673(01)00712-9.
- [58] Malvern. Zetasizer Nanoseries User Manual. n.d.
- [59] Glycerine Producers' Association. Physical Properties of Glycerine and Its Solutions 1963.
- [60] Li J, Li Z, Wang B. Experimental viscosity measurements for copper oxide nanoparticle suspensions. Tsinghua Sci Technol 2002;7:198–201.
- [61] H M, A E, K T. ALTERATION OF THERMAL CONDUCTIVITY AND VISCOSITY OF LIQUID BY DISPERSING ULTRA-FINE PARTICLES. DISPERSION OF AL₂O₃, SiO₂ AND TiO₂ ULTRA-FINE PARTICLES 1993;7:227–33.

- [62] Boal AK, Ilhan F, DeRouchey JE, Thurn-Albrecht T, Russell TP, Rotello VM. Self-assembly of nanoparticles into structured spherical and network aggregates. *Nature* 2000;404:746–8. doi:10.1038/35008037.
- [63] Szymanski C, Wu C, Hooper J, Salazar MA, Perdomo A, Dukes A, et al. Single Molecule Nanoparticles of the Conjugated Polymer MEH–PPV, Preparation and Characterization by Near-Field Scanning Optical Microscopy. *J Phys Chem B* 2005;109:8543–6. doi:10.1021/jp051062k.
- [64] von Werne T, Patten TE. Preparation of Structurally Well-Defined Polymer–Nanoparticle Hybrids with Controlled/Living Radical Polymerizations. *J Am Chem Soc* 1999;121:7409–10. doi:10.1021/ja991108l.
- [65] Akerlof G. DIELECTRIC CONSTANTS OF SOME ORGANIC SOLVENT-WATER MIXTURES AT VARIOUS TEMPERATURES. *J Am Chem Soc* 1932;54:4125–39. doi:10.1021/ja01350a001.
- [66] Avella M, Pace ED, Immirzi B, Impallomeni G, Malinconico M, Santagata G. Addition of glycerol plasticizer to seaweeds derived alginates: Influence of microstructure on chemical–physical properties. *Carbohydr Polym* 2007;69:503–11. doi:10.1016/j.carbpol.2007.01.011.
- [67] Mangelsdorf CS, White LR. Effects of stern-layer conductance on electrokinetic transport properties of colloidal particles. *J Chem Soc Faraday Trans* 1990;86:2859–70. doi:10.1039/FT9908602859.
- [68] Amit O, Bentor YK. pH-dilution curves of saline waters. *Chem Geol* 1971;7:307–13. doi:10.1016/0009-2541(71)90015-5.
- [69] Su TJ, Lu JR, Thomas RK, Cui ZF, Penfold J. The Adsorption of Lysozyme at the Silica–Water Interface: A Neutron Reflection Study. *J Colloid Interface Sci* 1998;203:419–29. doi:10.1006/jcis.1998.5545.
- [70] Vinu A, Murugesan V, Hartmann M. Adsorption of Lysozyme over Mesoporous Molecular Sieves MCM-41 and SBA-15: Influence of pH and Aluminum Incorporation. *J Phys Chem B* 2004;108:7323–30. doi:10.1021/jp037303a.
- [71] Cai C, Bakowsky U, Rytting E, Schaper AK, Kissel T. Charged nanoparticles as protein delivery systems: A feasibility study using lysozyme as model protein. *Eur J Pharm Biopharm* 2008;69:31–42. doi:10.1016/j.ejpb.2007.10.005.
- [72] Jiang G, Woo BH, Kang F, Singh J, DeLuca PP. Assessment of protein release kinetics, stability and protein polymer interaction of lysozyme encapsulated poly(d,l-lactide-co-glycolide) microspheres. *J Controlled Release* 2002;79:137–45. doi:10.1016/S0168-3659(01)00533-8.
- [73] Smolelis AN, Hartsell SE. THE DETERMINATION OF LYSOZYME I. *J Bacteriol* 1949;58:731–6.
- [74] Inoue M, Yamada H, Yasukochi T, Kuroki R, Miki T, Horiuchi T, et al. Multiple role of hydrophobicity of tryptophan-108 in chicken lysozyme: structural stability, saccharide binding ability, and abnormal pKa of glutamic acid-35. *Biochemistry (Mosc)* 1992;31:5545–53. doi:10.1021/bi00139a017.
- [75] Tabla de valores de pKa para aminoácidos n.d. <http://www.calvo.qb.fcen.uba.ar/Tabla%20pKa.html> (accessed February 17, 2016).

- [76] Huang P, Dong A, Caughey WS. Effects of dimethyl sulfoxide, glycerol, and ethylene glycol on secondary structures of cytochrome c and lysozyme as observed by infrared spectroscopy. *J Pharm Sci* 1995;84:387–92. doi:10.1002/jps.2600840402.
- [77] Tomizawa H, Yamada H, Tanigawa K, Imoto T. Effects of Additives on Irreversible Inactivation of Lysozyme at Neutral pH and 100° C. *J Biochem (Tokyo)* 1995;117:369–73. doi:10.1093/jb/117.2.369.
- [78] Sinibaldi R, Ortore MG, Spinozzi F, Carsughi F, Frielinghaus H, Cinelli S, et al. Preferential hydration of lysozyme in water/glycerol mixtures: A small-angle neutron scattering study. *J Chem Phys* 2007;126:235101. doi:10.1063/1.2735620.
- [79] Compositions containing copolymers as a thickening agent, n.d.
- [80] Kamel S. Pharmaceutical significance of cellulose: A review. *EXPRESS Polym Lett* 2008;2:758–78. doi:10.3144/expresspolymlett.2008.90.
- [81] Rheological properties of some starch-water-sugar systems - Sikora - 2001 - International Journal of Food Science & Technology - Wiley Online Library n.d. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2621.1999.00283.x/abstract?userIsAuthenticated=false&deniedAccessCustomisedMessage=> (accessed March 17, 2016).
- [82] Nishinari K, Watase M. Effects of Polyhydric Alcohols on Thermal and Rheological Properties of Polysaccharide Gels. *Agric Biol Chem* 1987;51:3231–8. doi:10.1271/abb1961.51.3231.
- [83] Arakawa T, Timasheff SN. Stabilization of protein structure by sugars. *Biochemistry (Mosc)* 1982;21:6536–44. doi:10.1021/bi00268a033.
- [84] Jain NK, Roy I. Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci* 2009;18:24–36. doi:10.1002/pro.3.
- [85] Basics of Centrifugation from Cole-Parmer Canada n.d. <http://www.coleparmer.ca/TechLibraryArticle/30> (accessed February 18, 2016).
- [86] Colvin JR. The Size and Shape of Lysozyme. *Can J Chem* 1952;30:831–4. doi:10.1139/v52-100.
- [87] Raffaini G, Ganazzoli F. Protein Adsorption on a Hydrophobic Surface: A Molecular Dynamics Study of Lysozyme on Graphite. *Langmuir* 2010;26:5679–89. doi:10.1021/la903769c.
- [88] Vertegel AA, Siegel RW, Dordick JS. Silica Nanoparticle Size Influences the Structure and Enzymatic Activity of Adsorbed Lysozyme. *Langmuir* 2004;20:6800–7. doi:10.1021/la0497200.
- [89] Barzegar-Jalali M, Adibkia K, Valizadeh H, Shadbad MRS, Nokhodchi A, Omidi Y, et al. Kinetic analysis of drug release from nanoparticles. *J Pharm Pharm Sci* 2008;11:167–77.
- [90] Fig. 2. Charge distribution on the surface of (A) bovine lactoferrin... n.d. https://www.researchgate.net/figure/224864622_fig2_Fig-2-Charge-distribution-on-the-surface-of-A-bovine-lactoferrin-compared-with-B (accessed April 4, 2016).