

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**MICELAS DE NÚCLEO LIPÍDICO (LCMs) PARA LA LIBERACIÓN
BUCAL DE UN PÉPTIDO MODELO DE FARMACO
ANTIHIPERTENSIVO A TRAVÉS DE UN FILM POLIMÉRICO
OBTENIDO POR INYECCIÓN DE TINTA**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Ciencias Farmacéuticas y Memoria para optar al
Título de Química Farmacéutica por:**

FERNANDA ANDREA SOTOMAYOR ESCANILLA

Director de Tesis: Dr. Javier O. Morales M.

Santiago-CHILE

ENERO 2024

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por la candidata

FERNANDA ANDREA SOTOMAYOR ESCANILLA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias farmacéuticas Título de Química farmacéutica, en el examen público rendido el día : 31/01/2024

Director de Tesis:

Dr. Javier Morales Montecinos

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Lilian Abugoch

Dr. Marcelo Kogan

Dr. Alfredo Molina

DEDICATORIA

A Zafiro Tarantino y Samantha Harrington

A mi familia amada

A mi gran amor

Sin mí, esto no sería posible

Y sin ellos, yo no sería posible

¡GRACIAS!

AGRADECIMIENTOS

La gratitud habita profundamente en mí cuando pienso en todo el camino que he recorrido para llegar hasta aquí, quizás me faltarían hojas para escribir todos los nombres de todos los seres que queriendo o no, llenaron mi corazón para no desistir y persistir hasta lograrlo. Cuán importante fue estar acompañada y aconsejada durante este periodo, cuanto valoro y valoraré siempre a quienes se dieron el tiempo de escuchar mis dudas, mis quejas mis aventuras y desventuras en este largo andar. Sacar un proyecto adelante, requiere mucho más que el palpitar de un solo corazón, requiere escucha, requiere fuerzas, requiere abrazos y para los días más desesperanzadores, requiere calor y mucho amor. Este trabajo es el resultado de la suma de todos quienes estuvieron ahí, pero por sobre todo de quienes han sabido estar para mí.

Agradezco a mi Tutor Javier Morales Montecinos, por darme la oportunidad de trabajar en este gran proyecto, le agradeceré siempre entregarme la confianza para que yo también pudiera creen en mí y así sacar mi máximo potencial como investigadora, gracias por inspirarme a ser mejor. Agradezco a mis compañeres de Drug Delivery Lab, por ser un soporte importante a la hora de enfrentarme a los diferentes desafíos en la realización de los experimentos, y también ser una compañía importante para la realización de esta tesis.

Agradezco a mi familia por todo el apoyo, durante todos estos años que he tenido que estar lejos de casa, les agradezco por siempre creer en mí, en mis capacidades y talentos. Agradezco a mi mamá porque es mi fan número uno, con su fortaleza me recuerda todos los días que salir adelante siempre es la mejor opción.

Agradezco a mis amigas de la universidad y la vida, sin las risas y el amor que me han entregado durante todos estos años, nada podría ser posible, son tan fundamental como el aire que respiro, y espero seguir viéndolas crecer como solo ustedes lo saben hacer.

Por último y no menos importante, le agradezco a mi gran amor Catalina, por acompañarme y sostenerme durante este duro proceso, agradezco su comprensión, empatía y tolerancia, pero por sobre todo agradezco su cálido amor que me acobijó día tras días, convirtiéndome en lo que soy hoy, ¡una mujer tremendamente agradecida!

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABLAS.....	X
ÍNDICE DE ECUACIONES.....	XI
GLOSARIO	XII
RESUMEN.....	XV
ABSTRACT	XVI
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Hipertensión Arterial	1
1.2. Formulaciones Antihipertensivas Actuales	2
1.3. Angiotensina 1-9 péptido efector del RAS.....	3
1.4. Nanotecnología en Medicina.....	4
1.4.1. Micelas de Núcleo Lipídico (LCMs).....	6
1.5. Administración bucal para la entrega de péptidos.....	8
1.6 Film polimérico impreso por inyección de tinta, como forma farmacéutica bucal 11	
1.7 Propuesta de investigación	12
1.8 Hipótesis.....	13
1.9 Objetivos de la investigación.....	13
1.9.1 Objetivo General.....	13
1.9.2 Objetivos específicos.....	13
2 METODOLOGÍA.....	14

2.1.	Reactivos y materiales	14
2.2	Objetivo Específico 1	14
2.1.1.	Síntesis de LCMs asociadas con Ang II	14
2.1.2.	Caracterización: Propiedades fisicoquímicas de las LCMs.....	15
2.1.3.	Caracterización: Eficiencia de asociación y porcentaje de carga del péptido 16	
2.2.4	Desarrollo de la metodología analítica para cuantificación.....	16
2.2.5	Estudio de estabilidad de las LCMs en suspensión	17
2.3	Objetivo Específico 2	18
2.3.1	Fabricación de films bucales de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)	18
2.3.2	Impresión del péptido por inyección de tinta térmica	18
2.3.3	Caracterización de los films bucales de HPMC	19
2.4	Objetivo específico 3	22
2.4.1	Perfil liberación de Ang II desde las micelas	22
2.4.2	Perfil de liberación in vitro de las LCMs impresas	22
2.5	Análisis estadístico	23
3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
3.1	OE 1. Sintetizar y caracterizar micelas de núcleo lipídico cargadas con el péptido Ang II 25	
3.1.1	Síntesis y Caracterización: Propiedades fisicoquímicas de las LCMs	25
3.1.2	Síntesis y Caracterización: Eficiencia de encapsulación y % de carga	29
2.1.4.	Estudio de estabilidad de las LCMs	30
3.2	OE 2. Desarrollar y caracterizar film poliméricos impresos con LCM por inyección de tinta	36
3.2.1	Fabricación de películas bucales de HPMC	36
3.2.2	Impresión del péptido por inyección de tinta térmica	37

3.2.3	Caracterización de los films bucales de HPMC	40
3.3	OE 3. Evaluar y comparar los perfiles de liberación in vitro de LCMs en suspensión y LCMs impresas sobre el film polimérico.	47
3.3.1	Estudio de Liberación de LCMs impresas sobre film polimérico	47
4	CONCLUSIÓN	53
5	REFERENCIAS	55

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de la activación de las vías involucradas en el eje RAS. modificado de (7).	1
Figura 2: Formación espontánea de Micelas de núcleo (LCMs) A. Síntesis con un fármaco hidrofóbico B. Síntesis con un fármaco hidrofílico tomado de (46).	7
Figura 3: Anatomía mucosa bucal, tomada de (58).	9
Figura 4: Estructura química del polímero HPMC(66).	10
Figura 5: Esquema de propuesta de investigación.	12
Figura 6: Esquema del proceso de manufactura de films de HPMC	18
Figura 7: Ilustración del experimento de mucoadhesión, modificado de (73).	21
Figura 8: Esquema resumen de la metodología propuesta para la investigación de acuerdo con los objetivos específicos trazados.	24
Figura 9: Propiedades fisicoquímicas: HD y PDI de las formulaciones de LCMs en suspensión en 3 condiciones de concentración diferentes.	26
Figura 10: Propiedades fisicoquímicas en términos de potencial Z, de las formulaciones de LCMs en suspensión en 3 condiciones de concentración diferente.	27
Figura 11: Ilustración de los dos tipos de estabilización en suspensiones coloidales A. Estabilización electrostática y B. Estabilización Estérica, modificado de (80).	28
Figura 12: Micrografías LCMs vacías(A) y LCMs asociadas con Ang II (B). La barra indica 500 nm.	29
Figura 13: Estabilidad cinética a 48 h de LCMs en suspensión vacías (A) y asociadas con Ang II (B), Se compararon HD, PDI, y ZP, a las temperaturas 4, 25 y 37 °C (n = 3).	32
Figura 14: Mecanismos de inestabilidad que operan en los sistemas micelares, modificado de (87).	34

Figura 15: 15a. Características macroscópicas del film tras el proceso de secado. 15b. Área de impresión cuantificada para evaluar la distribución de microgotas en el proceso de impresión.	38
Figura 16: Caracterización de propiedades mecánicas y mucoadhesivas de las formulaciones de micelas impresas sobre film de HPMC.....	40
Figura 17: Propiedades mecánicas del film de HPMC. Resistencia a la tracción(TS) (MPa) y Elongación al quiebre(%)(EB) vs tiempo.....	41
Figura 18 : Propiedades mecánicas del film: Módulo elástico o Módulo de Young.	42
Figura 19: Parámetros de las propiedades mucoadhesivas. Fig. 19a muestra la fuerza de desprendimiento (FD) y Fig. 19b muestra el trabajo de adhesión (WoA) en las diferentes muestras evaluadas. Se utilizó como control mucoadhesivo films de policarbófilo (PCB) y como control negativo a film de etilcelulosa (EC).....	44
Figura 20: Micrografías SEM de la superficie de los films sin imprimir (A), films impresos con LCMs vacías (B) y LCMs asociadas a Ang II (C). La barra indica 20 um.	46
Figura 21: Perfiles de liberación acumulada in vitro y modelado cinético de las micelas de núcleo lipídico asociadas con el péptido hasta el punto de 60 min, realizado a 37 °C, en condiciones fisiológicas bucales simuladas con PBS pH 6,8. Los valores se representan como media \pm desviación estándar de tres lotes diferentes (n = 3).	47

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Componentes sólidos de las formulaciones de LCMs.....	15
Tabla 2: Método analítico desarrollado para cuantificar el péptido en solución acuosa. La fase móvil consistió en una gradiente compuesta de disolvente B (0,1% v/v de TFA en 100 % ACN) y disolvente C (0,1 % de TFA en 100 % agua Milli-Q).....	17
Tabla 3: Eficiencia de encapsulación (EE) y porcentaje de carga (DL) mediante método de cuantificación indirecto. (n = 3)	29
Tabla 4: Porcentaje de humedad en base seca de los films tras 3 días de secado a temperatura ambiente y bajo campana.	36
Tabla 5: Concentración por cm ² film impreso con LCMs asociadas a Ang II tras 4 multi-impresiones. La tinta utilizada está a una concentración de 0,02 mg/mL.	38
Tabla 6: Tabla resumen de los parámetros de las propiedades mecánicas para films de HPMC, no impresos e impresos con LCMs vacías y asociadas con Ang II. Los valores se presentan como media ± Desviación Estándar.	43
Tabla 7: Parámetros de modelado cinético y coeficiente de correlación ajustado (R ²) para perfiles de liberación in vitro LCMs asociadas a Ang II en suspensión e impresas.....	50

ÍNDICE DE ECUACIONES

Ecuación 1. Cálculo de eficiencia de asociación (EE).	16
Ecuación 2. Cálculo de carga del fármaco (DL).....	16
Ecuación 3. Fórmula % de humedad tras el proceso de secado de los films de HPMC.	19
Ecuación 4: Resistencia a la tracción (TS).....	20
Ecuación 5: Elongación al Quiebre (EB)	20
Ecuación 6: Fórmula para obtener el factor de similitud (f2).	23

GLOSARIO

HTA: Hipertensión Arterial

RAS: Eje renina-angiotensina

ECV: Enfermedades cardiovasculares

ECA: Enzima convertidora de Angiotensina

AT1: Receptor de Angiotensina tipo 1

AT2: Receptor de Angiotensina tipo 2

Ang II: Angiotensina 1-8

Ang 1-9: Angiotensina 1-9

iECA: Inhibidores de la enzima convertidora de Angiotensina

ARA II: Antagonistas del receptor AT1

NPs: Nanopartículas

LCMs: Micelas de núcleo lipídico

PEG: Polietilenglicol

HPMC: Hidroxipropilmetilcelulosa

EC: Etilcelulosa

PB: Policarbófilo

DLS: Dispersión dinámica de la luz

HD: Diámetro hidrodinámico

PdI: Índice de polidispersión

LDV: Electroforesis laser dopler

ZP: Potencial Zeta

STEM: Microscopía electrónica de barrido por transmisión

EE: Eficiencia de encapsulación %

DL: Porcentaje de carga del fármaco

HPLC-DaD: Cromatografía líquida de alto rendimiento con un detector de arreglo de diodos

HILIC: Cromatografía líquida de interacción hidrofílica

ACN: Acetonitrilo

TFA: Ácido trifluoroacético

MilliQ: Agua ultrapura

TS: Resistencia a la tracción

EB: Elongación al quiebre

EM: Módulo de Young

FD: Fuerza de desprendimiento

WoA: Trabajo de adhesión

PBS: Buffer fosfato salino

F2: Factor de similitud

ANOVA: Análisis de varianza

NLC: nanopartículas lipídicas sólidas

RES: Sistema reticuloendotelial

EPR: Efecto de permeación y retención mejorada

CMC: Concentración micelas crítica

FDA: Agencia regulatoria de administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos

ODF: Films orodispersables

CH: Quitosano

PLC: Policaprolactona

R²: Coeficiente de correlación ajustado

RESUMEN

La hipertensión arterial es una de las enfermedades crónicas no transmisibles más prevalente en el mundo y está dada principalmente por una hiperactividad del eje renina angiotensina. Es un factor de riesgo para el desarrollo de múltiples enfermedades cardiovasculares, pudiendo producir crecimiento de la estructura cardíaca y cambios vasculares intrínsecos importantes. Estudios recientes han caracterizado la actividad farmacológica de un péptido involucrado con el brazo vasodilatador del RAS, Ang 1-9, que ha demostrado a partir de estudios *in vitro e in vivo*, propiedades antihipertensivas y anti hipertróficas. Con los avances de la nanotecnología y los sistemas portadores de administración dirigidos encontramos a las micelas de núcleo lipídico (LCMs) que son sistemas coloidales, con muy baja toxicidad, que han presentado resultados importantes en la administración de otros fármacos biológicos. En este proyecto de tesis, se sintetizaron LCMs asociadas con un péptido modelo, las cuales fueron impresas por inyección de tinta, sobre un film polimérico de HPMC. Las LCMs sintetizadas demostraron poseen un tamaño menor a 20 nm, y en micrografías STEM mostraron su tamaño y forma esférica. Además, el PDI de las formulaciones fue menor a 0,3 demostrando ser formulaciones con baja dispersión, posicionándose como un sistema reproducible y homogéneo. Se evaluó la estabilidad cinética de las LCMs en suspensión, demostrando que al igual que otros sistemas coloidales, la temperatura afecta el comportamiento de los componentes lipídicos, desencadenando mecanismos de inestabilidad asociado a los sistemas micelares. Se evaluaron las propiedades mecánicas y mucoadhesivas de los films, demostrando un aumento en la elasticidad del material tras el proceso de impresión. Además, mostraron conservar mucoadhesión suficiente como para mantenerse unidos por un tiempo definido. Se dilucidaron los perfiles de liberación realizados en membrana de diálisis y a 37 °C. Se evaluó LCMs en suspensión y LCMs impresas. Ambas formulaciones se ajustaron al modelo cinético Korsmeyer-Peppas. Las LCMs en suspensión presentaron una liberación abrupta en los primeros 15 min. Por otra parte, la liberación de LCMs impresas fue la mitad que la de LCMs en suspensión, presentando una liberación prolongada relacionada con la presencia del polímero hidrofílico en la formulación. Estos resultados muestran que la formulación de LCMs impresas sobre un film bucal, son una muy posible formulación capaz de administrar péptidos por la vía de administración bucal.

ABSTRACT

Arterial hypertension is one of the most prevalent non-communicable chronic diseases worldwide, primarily driven by hyperactivity of the renin-angiotensin axis. It constitutes a risk factor for the development of multiple cardiovascular diseases, potentially leading to cardiac structural growth and significant intrinsic vascular changes. Recent studies have characterized the pharmacological activity of a peptide associated with the vasodilator arm of the RAS, Ang 1-9. Through in vitro and in vivo studies, it has demonstrated anti-hypertensive and anti-hypertrophic pharmacological properties.

With advancements in nanotechnology and targeted drug delivery systems, lipid core micelles (LCMs) have emerged as colloidal systems with very low toxicity, showing significant results in the administration of other biological drugs. In this thesis project, LCMs associated with the model peptide for an antihypertensive drug were synthesized and inkjet-printed onto an HPMC polymeric film. The synthesized LCMs demonstrated a size smaller than 20 nm, and STEM micrographs revealed their spherical size and shape. Moreover, the formulations' PDI was less than 0.3, indicating formulations with low dispersion, positioning them as a reproducible and homogeneous system.

The kinetic stability of the LCMs in suspension was evaluated, demonstrating that, like other colloidal systems, temperature affects the behavior of lipid components, triggering instability mechanisms associated with micellar systems. The mechanical and mucoadhesive properties of the films were assessed, showing an increase in material elasticity after the printing process. Additionally, they maintained sufficient mucoadhesion to remain attached for a defined period.

Release profiles were elucidated using dialysis membrane at 37°C. Both suspension and printed LCMs adhered to the Korsmeyer-Peppas kinetic model. Suspension LCMs exhibited an abrupt release within the first 15 minutes. Conversely, the release of printed LCMs was half that of suspension LCMs, displaying a prolonged release associated with the presence of hydrophilic polymer in the formulation. These results indicate that the formulation of printed LCMs on an oral film is a highly plausible formulation capable of administering peptides via the oral route.

1 INTRODUCCIÓN

1.1. Hipertensión Arterial

La hipertensión arterial (HTA) es una enfermedad crónica no transmisible que tiene alta prevalencia a nivel mundial (1). Está dada principalmente por la activación crónica del eje renina-angiotensina (RAS) (2,3). Esta hiperactividad ha sido referida como factor de riesgo cardiovascular en pacientes con hipertensión (2), ya que desencadena una serie de enfermedades de carácter prohipertroficadas (3), proinflamatorias, protrombóticas y aterogénicas que tienen asociados daños cardiovasculares importantes (3,4), induciendo cambios hemodinámicos, cambios vasculares intrínsecos y alteraciones en la estructura cardíaca (4), lo que se traduce en un alto riesgo para la salud cardiovascular(5), Según la Organización mundial de la salud (6) las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen una de las principales causas de muerte en todo el mundo, por lo que es relevante seguir investigando y desarrollando terapias farmacológicas dirigidas a estas patologías.

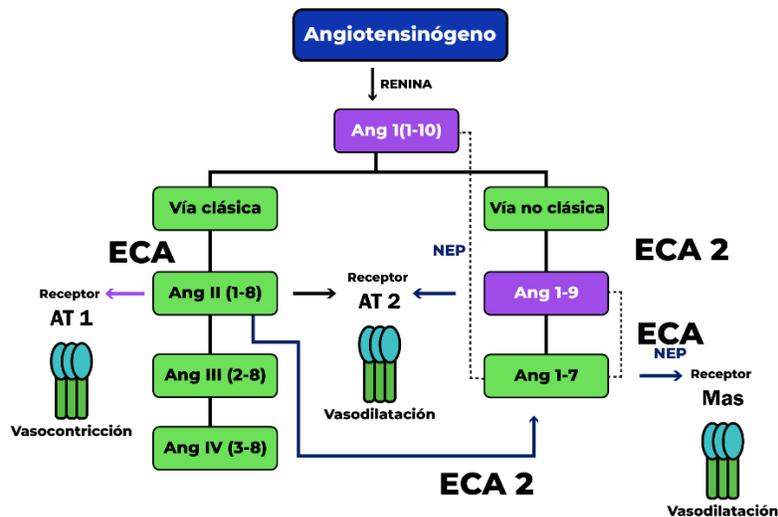


Figura 1: Esquema de la activación de las vías involucradas en el eje RAS. modificado de (7).

La regulación homeostática de la presión arterial y del sistema cardiovascular está dada por el eje RAS, su vía clásica es descrita ampliamente (3,5,7) y su producto efector es el octapéptido Ang II. Su origen está mediado por la enzima convertidora de angiotensina (ECA) que convierte Ang I en Ang II, siendo involucrada directamente con las complicaciones inherentes de la hipertensión arterial (2). Ang II se une a sus receptores de superficie celular de tipo acoplados a proteína G, receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2), teniendo mayor afinidad por AT1 que por AT2 (5). El receptor AT1, se localiza principalmente en la pared vascular, en pulmón, hígado, cerebro y riñón (3,8). La unión con este receptor desencadena vasoconstricción, estimulación de la síntesis y liberación de aldosterona, produciendo un incremento en el volumen del líquido extracelular, y con ello el aumento de la resistencia vascular (8), a nivel cardiovascular se observa el crecimiento cardíaco, proliferación de músculo liso vascular, entre otras (2,5,7). Con menor afinidad, Ang II se une al receptor AT2, que está acoplado a proteína G inhibitoria por lo que provoca efectos contrarios a los producidos por AT1 lo que incluye vasodilatación, diuresis, y anti-inflamación (2,9).

1.2. Formulaciones Antihipertensivas Actuales

Los agentes farmacológicos antihipertensivos utilizados actualmente se basan en bloquear el eje RAS. Los primeros en ser desarrollados fueron los inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (iECA), cuyo mecanismo de acción se basa en inhibir la ECA para evitar que ocurra la conversión de Ang I a Ang II, por lo que disminuyen la presión sanguínea, mejoran la función endotelial y parcialmente la regresión de la hipertrofia cardíaca; pero no son capaces de inhibir la Ang II producida independiente de la ECA (10). Por otro lado, están los Antagonistas del receptor AT1 de Ang II (ARA II), los cuales compiten con la Ang II por el receptor AT1, inhibiendo su activación, por lo que la Ang II se desplaza y se une al AT2, activando la rama vasodilatadora del eje RAS (2,10). Estos han demostrado ser eficaces y seguros en el control de la presión arterial. Sin embargo, los factores de riesgo concomitantes siguen sin controlarse en la mayoría de los pacientes (2,11), por lo que no hay reducción de la enfermedad en el órgano objetivo, ni prevención de eventos cardiovasculares mayores asociados (10,11). Estas aristas generan que el tratamiento actual para la hipertensión sea

paliativo, ya que no previene ni reduce la progresión de la enfermedad en el órgano objetivo, ni detienen el deterioro global causado por la HTA (9,11).

Tras investigaciones sobre la fisiopatología de la hipertensión, se descubrió un eje contrarregulador endógeno del RAS, que se centra en las acciones de la enzima convertidora de Ang II (ECA2) la cual es una proteasa que da como producto Ang 1-7 a partir de Ang II y Ang 1-9 a partir de Ang I (4,12,13) (Fig. 1). Esta constituye una nueva vía RAS no canónica que induce la vasodilatación, previene la hipertrofia e hiperplasia cardiovascular, siendo un nuevo blanco de interés farmacológico para un posible desarrollo de una formulación que actúe a nivel de esta vía. Existen diversos estudios centrados en ECA2, Ang 1-7 y el receptor Mas (4,7,12), por sus propiedades de contrarrestar la acción de la Ang II en el receptor AT1. Sin embargo, estudios experimentales más actuales posicionan a la Ang 1-9 como la responsable de disminuir la presión arterial, proteger el corazón y los vasos sanguíneos, interactuando a nivel de AT2 (13,14). Esta se expresa en la aorta y las arterias coronarias (4) contrarrestando la vía ACE/ANGII/AT1, es decir, el principal mecanismo de vasoconstricción arterial.

1.3. Angiotensina 1-9 péptido efector del RAS

Ang 1-9 es un péptido de 9 aminoácidos (Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His) (15) que ha sido blanco de interés en los últimos años, ya que se ha demostrado que previene la hipertensión arterial, genera un retroceso y evita el progreso de múltiples enfermedades cardiovasculares asociadas (5,7,16,17). En estudios *in vivo* en animales este péptido ha demostrado que disminuye la presión arterial y el grosor de la aorta media en ratas espontáneamente hipertensas (7), reduce significativamente la hipertrofia cardíaca, la fibrosis cardíaca y mejora la función ventricular en ratas diabéticas (18), mejora la remodelación vascular pulmonar en ratas hipertensas, además, desencadena una respuesta anti-inflamatoria (19). Se cree que la Ang 1-9 reduce los niveles de Ang II porque compite con la angiotensina I en el sitio activo de la ECA y aumenta la Ang 1-7 (20). Además, se ha demostrado recientemente que Ang 1-9 es capaz de competir con la unión de Ang II en el AT2. La interacción de Ang 1-9/AT2 es la responsable de la vasodilatación endotelial, ya que induce

la producción de óxido nítrico y desencadena la liberación de otros vasodilatadores como el ácido araquidónico (13,18). Ha demostrado ser capaz de suprimir la actividad de la NADPH oxidasa cardíaca, al disminuir la formación de especies reactivas de oxígeno (18), lo cual explica el retroceso patológico de enfermedades asociadas a la hipertensión. La evidencia acumulada, posiciona a la Ang 1-9 como el bio péptido efector del brazo vasodilatador del eje RAS (8,15,17–21).

Actualmente, la Ang 1-9 promete ser un potencial nuevo fármaco que viene a cambiar por completo el tratamiento y manejo de la hipertensión y sus comorbilidades, ya que ha demostrado ser un péptido con eficacia terapéutica significativa, especificidad, baja interacción con otros fármacos y baja toxicidad (20–22). Sin embargo, existen ciertas limitaciones para la entrega del péptido en el sitio efector, debido a su estructura y naturaleza hidrófila/hidrófoba, tiene una vida media en plasma muy reducida ya que sufre degradación por enzimas y proteasas (20), por lo que el desafío está en el desarrollo de un vehículo adecuado para su entrega. Se ha estudiado que invertir la secuencia aminoacídica, es decir utilizar el retro inverso del péptido Ang 1-9(Re-Ang 1-9) (22) presenta una mayor estabilidad a la degradación enzimática y el péptido conserva su actividad anti-hipertrofica (20,22). Sin embargo, en esta investigación se propone utilizar un péptido diferente como modelo antihipertensivo, ya que no se encuentra disponible un método analítico óptimo para cuantificar Re-Ang 1-9 en plasma.

1.4. Nanotecnología en Medicina

El desarrollo de la nanotecnología ha ido en aumento estas últimas décadas, en los diferentes tópicos de nanomateriales y sus aplicaciones (23). En el sector de las Ciencias Farmacéuticas, el desarrollo de nano portadores farmacéuticos para mejorar la eficacia *in vivo* de muchos fármacos ha generado un alto impacto en la medicina moderna (24), al estudiar las nanopartículas (NPs) como sistemas de vehiculización, direccionalización o vectorización, protección y liberación controlada de moléculas con actividad terapéutica relevante (25). Las NPs son estructuras tridimensionales complejas, cuyo tamaño fluctúa dentro de la escala nanométrica es decir, entre uno o pocos nanómetros hasta cientos de nanómetros (26). Según

la European Commission, se considera nanomaterial aquel que al menos uno de sus componentes, ya sea en estado libre o como un agregado, se encuentre en el rango de tamaño de 1 a 100 nm para $\geq 50\%$ de la población total de partículas. Adicionalmente, si el área superficial del total de partículas es mayor a $60 \text{ m}^2/\text{cm}^3$, también serían consideradas como nanomateriales (27). En nanomedicina, la disminución del tamaño de partícula, ofrece grandes ventajas ya que al disminuir el tamaño, aumenta drásticamente la superficie de contacto, proporcionando una mayor interacción de las NPs con el entorno biológico (28), produciendo una mayor velocidad de internalización celular en comparación con partículas de mayor tamaño (29). Las NPs presentan mayor posibilidad de permeación a través de las barreras biológicas logrando una biodisponibilidad mejorada de fármaco, lo que permite usar concentraciones mucho más bajas del activo, reduciendo la toxicidad sistémica y los efectos secundarios asociados (30,31).

El desarrollo de NPs ofrece posibilidades únicas para superar las barreras celulares con el fin de mejorar la administración de fármacos y moléculas candidatas a fármacos (32). Entre sus aplicaciones se han explorado sus usos para el desarrollo de nuevas herramientas para prevención, diagnóstico, detección y tratamiento de enfermedades (23–25,33,34). Las NPs tienen relevante aplicación como sistemas para la administración de moléculas de origen biotecnológico, como péptidos, proteínas, oligonucleótidos anti sentido, plásmidos, etc. (35) Estas moléculas activas son muy sensibles a la degradación fisicoquímica y enzimática, no superan los desafíos de la administración oral, se muestran incapaces de atravesar barreras biológicas (mucosas) y, además, en algunos casos deben alcanzar compartimentos celulares muy precisos para poder ejercer su acción. Por ello, su inclusión en NPs mejora los desafíos asociados a la administración de fármacos biológicos, ofreciendo posibilidades interesantes para su administración de forma eficaz y segura (32,35).

Las NPs se clasifican según la naturaleza del material que las componen y en ámbitos generales estas se pueden clasificar en tres categorías principales. Las NPs Poliméricas son aquellas que están compuestas por polímeros o copolímeros que protegen el fármaco, ya sea encapsulados, adsorbidos en la superficie o unidos químicamente a la superficie de manera eficiente, son biocompatibles y biodegradables (31). Otras NPs son las Inorgánicas, compuestas principalmente por metales como el oro, plata y cobre, o de óxidos de hierro, de

titanio o de silicio, se utilizan bastante para el diagnóstico y detección de enfermedades debido a las propiedades plasmónicas, fluorescentes, ópticas, magnéticas y electrónicas de las partículas (36,37). Además, pueden ser utilizadas en técnicas de diagnóstico e imagenología (36). Por otra parte, están las NPs Lipídicas, las cuales tienen la capacidad de encapsular alto contenido de fármaco en comparación a las formulaciones poliméricas. En general estas NPs lipídicas son biodegradables, biocompatibles, no tóxicas con un amplio espectro de vías de administración disponibles (38). Dentro de las NPs Lipídicas, se encuentran estructuras con y sin fosfolípidos, contemplando que las que poseen fosfolípidos son los liposomas y vesículas (39). Las NPs sólidas (SLN), los transportadores lipídicos nanoestructurados (NLC) y micelas de núcleo lipídico (LCMs), no contienen fosfolípidos en sus estructuras (39–41).

1.4.1. Micelas de Núcleo Lipídico (LCMs)

Las LCMs son partículas híbridas polímero-lípido compuestas por un núcleo hidrofóbico y una capa hidrófila (23,24), por lo que al contacto con el agua estos copolímeros tienden a auto ensamblarse formando un núcleo lipídico estable rodeado por el segmento hidrófilo, el cual está en contacto directo con el medio acuoso. Estas micelas vehiculizan el activo, el cual es incorporado en la síntesis mediante el proceso de emulsificación de fusión en caliente, a través de un método de baja energía (44). Estas micelas tienen forma esférica, son de tamaño pequeño 5 a 100 nm, con baja poli-dispersidad en tamaño, y con alta eficiencia de atrapamiento (42,44). La disminución de tamaño permite un incremento de la relación volumen/tamaño (45,46), lo cual permite mayor interacción con la mucosa bucal, permite un mayor control de la liberación y brinda protección al fármaco.

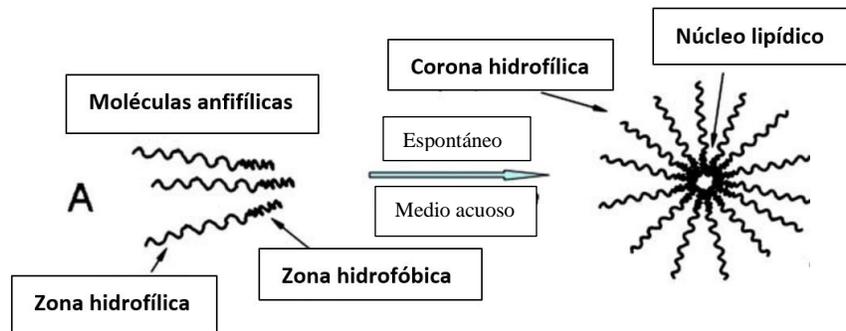


Figura 2: Formación espontánea de Micelas de núcleo (LCMs) A. Síntesis con un fármaco hidrofóbico B. Síntesis con un fármaco hidrofílico tomado de (46).

Las LCMs están compuestas principalmente Gelucire 44/14, un material híbrido (44,45) y una mezcla de tensoactivos Tween 20 y Span 80 en menores proporciones (42). Estos además se comportan como potenciadores de la permeación bucal (45), mejorando la permeabilidad paracelular de varios compuestos mediante la perturbación de los lípidos intercelulares y la integridad de los dominios proteicos (43,47).

El Gelucire 44/14, es un polímero que ha sido reportado como material para la elaboración de sistemas de liberación de fármacos con liberación modificada (42), debido a la hidrofobicidad de la composición de este polímero, basado en una mezcla de glicéridos y ésteres de polietilenglicol (PEG). En la síntesis de LCMs al auto ensamblarse los fragmentos PEG hidrofílicos queda en la superficie, produciendo el fenómeno de PEGilación (42,44,48). La corona de PEG representa el segmento hidrofílico donde se podría incorporar el péptido modelo antihipertensivo, debido a su afinidad por el medio acuoso (42). Además, estos fragmentos contribuyen a la barrera estérica mediante la extensión de su estructura dispersa, en solución acuosa. Esta estabilización estérica permite la protección de las LCMs al evitar su degradación y le confiere estabilidad a la formulación (42,45).

Se le atribuyen varias ventajas a las LCMs como, permitir mayor permeación a través de barreras biológicas (44) permitir la liberación controlada de fármacos atrapados (41), viabilidad de conjugar con moléculas direccionales activas en la superficie de la partícula y reducir la toxicidad del fármaco vehiculizado (41,49).

1.5. Administración bucal para la entrega de péptidos

La principal vía de administración de fármacos es la vía oral. Esta vía ha sido la más desarrollada ya que permite una administración más cómoda para los pacientes, es indolora y permite la automedicación, sin la necesidad de agujas u otros sistemas (50). Sin embargo, esta vía presenta retos que se deben superar para una entrega exitosa de farmacología peptídica, como las variaciones de pH en todo el tracto gastrointestinal, la carga enzimática y la existencia del metabolismo de primer paso hepático (50–52). Todas estas barreras dejan fuera un gran número de moléculas y péptidos como los fármacos biológicos que tienen una estabilidad limitada a través del tracto gastrointestinal y problemas asociados con la solubilidad. Es por esta razón que se han estado estudiando vías de administración alternativas para la entrega de fármacos biológicos, siendo una de ellas la vía de administración a través de la mucosa bucal (47,50,51). Dentro de la cavidad oral, se han descrito dos zonas para la administración de fármacos: (1) en la mucosa sublingual la absorción ocurre a través de las membranas mucosas que recubren el piso de la boca; y en la (2) mucosa bucal la absorción ocurre a través de las membranas mucosas y el epitelio que recubren las mejillas (47,52), esta vía facilita la administración de medicamentos de acción local como sistémica (53). El epitelio bucal se compone por tejido no queratinizado y tejidos conectivos altos, que se denomina lámina propia, consisten en fibras de colágeno, adicional una capa de soporte de tejidos conectivos, vasos sanguíneos y músculos lisos (54,55) (Fig. 2).

La principal ventaja de utilizar la vía bucal es el acceso directo de fármacos (54) a la circulación sistémica por la vena yugular interna (56), evitando el metabolismo de primer paso hepático y mitigando posibles efectos secundarios asociados al paso por el tracto gastrointestinal. Esta vía es más permeable que otras vías alternativas como la piel, por lo que podría ser una potencia vía por donde administrar péptidos (43,56,57). La actividad enzimática en la mucosa bucal es relativamente baja en comparación con otras vías mucosales, lo que evita una posible degradación de fármaco al momento de absorberse por el epitelio bucal (56).

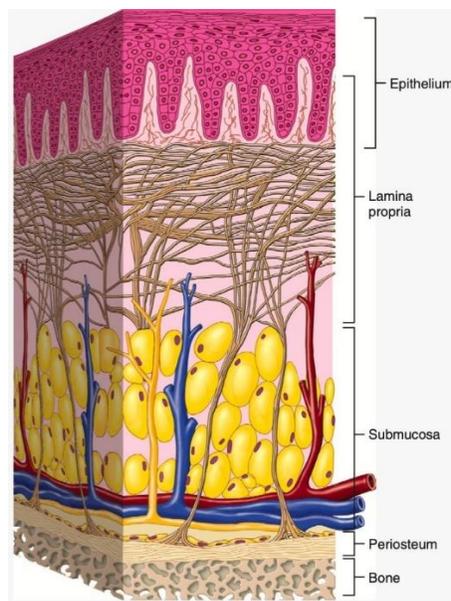


Figura 3: Anatomía mucosa bucal, tomada de (58).

Las formas farmacéuticas convencionales para el tratamiento local de la cavidad bucal suelen ser semisólidas o líquidas, ya que se caracterizan por su fácil administración y alta aceptabilidad por parte del paciente. Sin embargo, la principal desventaja de estos sistemas convencionales es la mala retención en la cavidad bucal, lo que conduce a un efecto terapéutico subóptimo (58). Se han estudiado diversos sistemas de entrega para esta vía, siendo los más estudiados durante la última década los films bucales mucoadhesivos, ya que han demostrado poseer características prometedoras para administrar varias clases terapéuticas, como péptidos, vacunas y nanopartículas (50,51,59). Los films mucoadhesivos son formas de dosificación retentivas que liberan el fármaco directamente en el epitelio donde ocurre la absorción (50), se adhieren al lugar de administración y se hidratan en presencia de la mucosa, produciéndose los fenómenos de hinchazón y disolución (60) debido a la interacción que tienen estos sistemas con la glicoproteína mucina, que es el constituyente principal de la saliva. Los films han demostrado promover la adhesión al moco, favoreciendo la interacción entre los fármacos y la capa absorbente, lo que conduce a un perfil de permeación mejorado (51,57). Se han examinado muchos polímeros mucoadhesivos en formas de dosificación bucal mucoadhesivas, como tabletas, parches, geles, ungüentos y películas (61), para determinar su capacidad para prolongar el tiempo de residencia en las membranas adhesivas y aumentar la biodisponibilidad (62,63). A grandes rasgos, los

polímeros se pueden clasificar según: (a) Origen: natural o sintético; (b) Tipo de mucosa aplicada: ocular, bucal y vaginal, entre otras; (c) Estructura química: derivados de celulosa, entre otros; (d) Interacciones: covalentes o no covalentes; (e) Solubilidad: hidrófila o lipófila; y (f) Generación: primera o segunda generación (g) Carga superficial: aniónica, catiónica, no iónica y anfifílica (64).

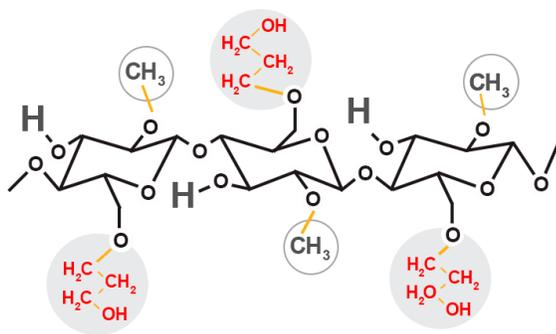


Figura 4: Estructura química del polímero HPMC(66)

En general, los polímeros no iónicos no poseen grupos ionizables en su superficie, como es el caso de la hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC, Fig. 4) por lo que poseen menor fuerza mucoadhesión al compararlo con polímeros catiónicos o aniónicos (64). La HPMC es un polímero soluble en agua con un módulo elástico más bajo y un porcentaje de alargamiento más alto en comparación con la molécula de celulosa original (47,65). Dentro de las ventajas principales del HPMC, es que es biodegradable y biocompatible, además, que a pesar de tener mucoadhesión reducida al compararlo con otros polímeros, de igual forma conserva mucoadhesión suficiente para lograr la absorción de activos (61,62).

Dentro de los desafíos de la administración bucal está la absorción del activo por la mucosa bucal, que en general resulta en una baja permeación, no logrando ser suficiente para obtener el efecto terapéutico deseado (55). Esto ocurre principalmente por el recambio salival, es decir la secreción e ingesta continua de saliva (0,5-2 l/día), los movimientos linguales y masticatorios, la fonación, la degradación enzimática y la falta de permeación del epitelio (52,54). La absorción de productos biológicos a través de la mucosa bucal está restringida esencialmente por las propiedades de barrera del epitelio escamoso estratificado y el área de superficie total para la absorción (55), por lo cual en estos últimos años se han desarrollado

nuevas tecnologías que ayuden a mitigar estas dificultades, superando los retos de la administración bucal.

1.6 *Film polimérico impreso por inyección de tinta, como forma farmacéutica bucal*

Se ha estudiado el uso de impresión por inyección de tinta térmica, como novedosa tecnología potencial para fabricar formas de dosificación personalizadas y personalizables para administrar fármacos en films (50). El fármaco puede disolverse o dispersarse en el disolvente, constituyendo la tinta del sistema de impresión, y el sustrato de la impresión corresponde a films bucales (56,59). Al modificar la tinta para incluir el fármaco, ésta debe tener una fluidez, viscosidad y una tensión superficial, similar a la de una tinta de impresión, siendo este un parámetro crítico para el funcionamiento óptimo de la impresión por inyección de tinta (56,65). Este método es una técnica sin contacto que se basa en la deposición de gotas de tinta de 1 a 100 pL en un sustrato polimérico bidimensional (2D). Las ventajas de este sistema de impresión son principalmente los bajos costos de procesamiento, poca generación de desechos, y el desarrollo de dosificación personalizable (56). Dentro de las desventajas está el complejo sistema de secado y humectación para lograr un sistema uniforme. Este es un punto crítico de control, para asegurar un sistema de dosificación reproducible, por lo cual debe ser lo más homogéneo posible (43).

La administración de péptidos ha sido ampliamente estudiada en los últimos años, demostrado enormes potenciales pero grandes desafíos (43,57). Los péptidos son una alternativa terapéutica viable al poseer alta especificidad biológica, y un buen perfil de seguridad, pero poseen limitaciones como ser altamente degradados, estabilidad proteolítica pobre y una vida media corta (43,66). Se han estudiado modificaciones químicas para eludir los problemas de estabilidad en los péptidos, una de las modificaciones es utilizar el retro inverso del péptido, para evitar la rápida degradación *in vivo* (21,67), ya que al invertir la secuencia aminoacídica las proteasas se demoran más tiempo en reconocer la estructura, permitiéndole mayor vida media en circulación. Además, con el avance de la nanotecnología en este ámbito, se han desarrollado nanosistemas portadores de administración dirigida a péptidos, con el objetivo de mitigar las desventajas mencionadas. El desarrollo de partículas a nano escala ha permitido mejorar la solubilidad, la biodisponibilidad, la estabilidad, el

direccionamiento y efecto farmacológico de los activos que transportan mejorando así su perfil terapéutico (34,48,56). Los sistemas de nanopartículas basadas en lípidos tienen la ventaja de ser biocompatibles y tener baja toxicidad en las aplicaciones *in vivo*, eficiencia de carga y potencial liberación controlada de fármaco (68) además permiten una mayor permeación a través de barreras biológicas (42,68).

1.7 Propuesta de investigación

En base a esta investigación bibliográfica, este proyecto tuvo como objetivo desarrollar LCMs como vehículo para administración de péptidos (Fig. 5). Éstas se dispondrán sobre un film polimérico mucoadhesivo de HPMC, mediante un proceso inyección de tinta térmica, produciendo una posible forma farmacéutica bucal final. Se propone utilizar un péptido modelo para dilucidar el comportamiento del péptido antihipertensivo Ang 1-9, debido a que el péptido modelo (Ang 1-8) presenta mejor perfil para su detección y cuantificación en plasma por las técnicas analíticas disponibles, en comparación con la Ang 1-9 y su retro inverso. El estudio del sistema utilizando este péptido modelo de fármaco antihipertensivo permitirá modelar el comportamiento de Ang 1-9 obteniendo mayor acercamiento de su perfil de disolución desde estas nuevas formas farmacéuticas.

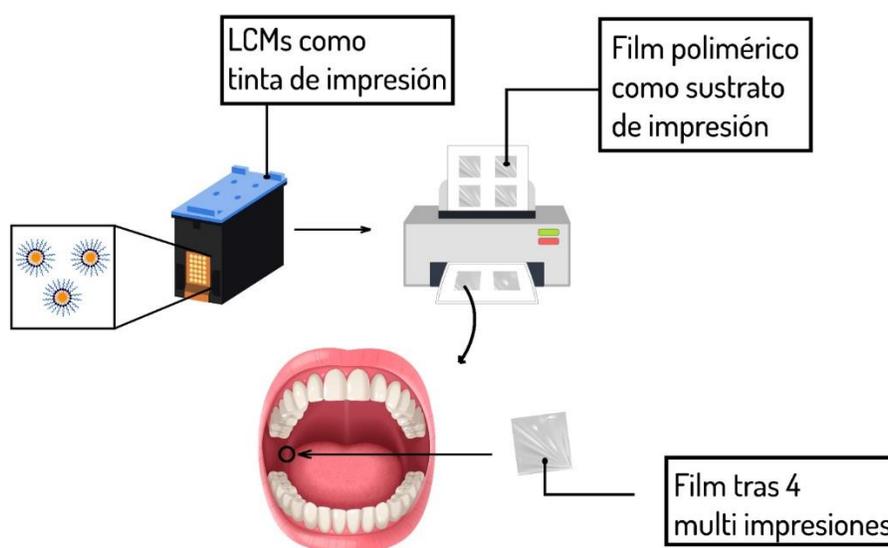


Figura 5: Esquema de propuesta de investigación.

1.8 Hipótesis

La administración bucal de micelas de núcleo lipídico cargadas con un péptido modelo bioactivo, impresas sobre films mucoadhesivas, logra controlar la liberación y la velocidad de disolución del péptido.

1.9 Objetivos de la investigación

1.9.1 Objetivo General

Desarrollar un sistema de entrega de un fármaco biológico a través de films bucales, impresas con una formulación de micelas de núcleo lípido (LCMs) que logre controlar la liberación in vitro del péptido modelo bioactivo.

1.9.2 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar micelas de núcleo lipídico y cargarlas con el péptido Ang II
2. Desarrollar y caracterizar film poliméricos impresos con LCMs por inyección de tinta
3. Evaluar y comparar los perfiles de liberación in vitro de LCMs en suspensión y LCMs impresas sobre el film polimérico.

2 METODOLOGÍA

2.1. Reactivos y materiales

Gelucire 44/14® fue donado por Gattefossé (Saint-Priest, Francia). Los tensoactivos Tween 20® y Span 80®, el activo angiotensina II (PM = 1046,18g/mol), ácido trifluoroacético (TFA), mucina de estómago porcino y bolsa de diálisis de membrana MWCO 10,000 kDa fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU.). El ácido fosfotúngstico, las sales de cloruro de sodio (NaCl), fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) e hidróxido de sodio (NaOH), etanol, ácido clorhídrico, glicerol al 85%, tubos de ultrafiltración Amicon® Ultra 15 mL de MWCO DE 10 kDa y el acetonitrilo (ACN) grado cromatográfico fueron adquiridos a través de Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). Se adquirió hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) K100 y etilcelulosa NF (EC) Estándar 10 de BASF (Ludwigshafen am Rhein, Alemania). Las tijeras y las hojas de acero al carbono de la cortadora de tejidos se adquirieron de Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.).

2.2 Objetivo Específico 1

2.1.1. **Síntesis de LCMs asociadas con Ang II**

Las micelas fueron sintetizadas mediante un proceso de emulsificación en caliente de baja energía descrito por Fritz, et al. (44) con ligeras modificaciones descritas por Chou WH et al., (42). Para el proceso se masaron los materiales descritos en la Tabla 1. Se mezclaron en un matraz en un baño con una temperatura controlada de 60 °C con agitación magnética suave durante 10 min. Luego se agregó el péptido Ang II previamente solubilizado en 2,56 mL de agua Milli-Q caliente a 60°C y se agitó por 5 minutos más. Posteriormente, la matriz se retiró del baño, y se incorporaron rápidamente 20 mL de agua fría Milli-Q, y se agitó durante 5 min más. Se realizaron 3 síntesis, en diferentes concentraciones m/m de Ang II (0, 0,08 y 0,4) %, con el objetivo de evaluar y caracterizar el comportamiento de las LCMs al variar la concentración de activo.

Tabla 1: Componentes sólidos de las formulaciones de LCMs

Formulaciones	Gelucire 44/14(mg)	Tween 20(mg)	Span 80(mg)	Ang II(mg)
F.0	1200	188	54	0
F.1	1200	188	54	1
F.2	1200	188	54	5,8

2.1.2. Caracterización: Propiedades fisicoquímicas de las LCMs

Se determinó el diámetro hidrodinámico (HD) y el índice de poli dispersión (PdI) de las NPs mediante la técnica de dispersión dinámica de la luz (DLS), utilizando Zetasizer marca Malvern Panalytical modelo Nano ZS (Malvern, Reino Unido). El potencial Z se midió mediante electroforesis láser Doppler (LDV) utilizando el mismo equipo (42,45). A partir de la síntesis, se obtuvieron LCMs en suspensión, se les realizó una dilución 1:10 en agua ultrapura, y se dispusieron en cubetas plásticas para su medición. Todas las mediciones se realizaron por triplicado a 25 °C, para cada una de las concentraciones a evaluar.

Por otra parte, la morfología y tamaño de las LCMs se determinaron a través de la microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para la preparación de las muestras se diluyeron 1:10 cada suspensión de LCMs en agua ultrapura. Se dispuso sobre una superficie, una gota de la muestra diluida, y se puso en contacto con una grilla de cobre por 2 minutos. Posteriormente, la grilla se lava sobre una gota de agua ultrapura por un minuto, y luego se repite el lavado sobre otra gota de agua ultrapura por un minuto más. Luego, la grilla se dispone sobre una gota de ácido fosfotúngstico al 1% por dos minutos, y se dejan secar a temperatura ambiente, para luego ser vistas en un STEM marca Inspect modelo F50 (Hillsboro, OR, Estados Unidos).

2.1.3. Caracterización: Eficiencia de asociación y porcentaje de carga del péptido

La eficiencia de asociación (EE) y porcentaje de carga (DL) de las LCMs se obtuvieron tras la cuantificación indirecta de Ang II (*Ver ecuaciones 1 y 2*), es decir se cuantificó todo el activo que no fue asociado a las LCMs. Esto se logró tras un proceso de ultrafiltración utilizando un tubo Amicon® con membrana de 10 KDa, en el cual se dispusieron 10 mL de la suspensión de LCMs, y posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm durante 20 min. Se recolectaron los ultrafiltrados y se cuantificaron por triplicado a través de cromatografía líquida de alto rendimiento con un detector de arreglo de diodos (HPLC-DaD). Los valores se interpolaron de una curva de calibración de Ang II realizada previamente, en el rango de concentraciones entre 5 a 120 µg/mL.

Ecuación 1. Cálculo de eficiencia de asociación (EE).

$$EE (\%) = \frac{M_{inicial} - M_{libre}}{M_{inicial}} * 100$$

Ecuación 2. Cálculo de carga del fármaco (DL).

$$DL(\%) = \frac{M_{inicial} - M_{libre}}{Lípido sólido + (M_{total} - M_{libre})} * 100$$

Donde $M_{inicial}$: Masa inicialmente incorporada de péptido y M_{libre} : Masa de Ang II en el ultrafiltrado.

2.2.4 Desarrollo de la metodología analítica para cuantificación

La técnica analítica que se escogió para la cuantificación del péptido fue a través de un método de HPLC de fase inversa (RPLC) validado en un HPLC (Flexar Perkin Elmer, EE.UU). Se utilizó una columna Ascentis Express RP-Amide (5 µm x 2,1mm x 5 cm, Sigma-Aldrich). Las fases de sílice unidas con amida propician la técnica HILIC (cromatografía líquida de interacción hidrófila) la cual se complementa con la técnica de RPLC. Debido a que la amida se une a la superficie de sílice a través de un enlazador de propilo, no es posible cargar en el rango de pH típico de las fases móviles HILIC. Por lo tanto, la retención se ve menos afectada por las interacciones de intercambio iónico, permitiendo lograr señales

cromatográficas en tiempos de retención menores en comparación a utilizar una columna sin funcionalizar RPLC(69).

Tabla 1: Método analítico desarrollado para cuantificar el péptido en solución acuosa. La fase móvil consistió en una gradiente compuesta de disolvente B (0,1% v/v de TFA en 100 % ACN) y disolvente C (0,1 % de TFA en 100 % agua Milli-Q).

Tiempo(min)	Porcentaje de fase B(%)	Porcentaje de fase C(%)
0 - 3 (equilibrio)	0	100
3 - 4	0	100
4 -14	95	5
14 - 16	0	100

El flujo se ajustó a 1 mL/min, la temperatura se mantuvo constante a 25 °C y el volumen de inyección fue de 50 µL. El límite de cuantificación se determinó en 8 µg/mL a 280 nm. El tiempo de retención fue de 4.8 min. Se estableció una curva de calibración de 5 – 120µg/mL. El método HPLC se validó respecto de la linealidad, la repetibilidad, el límite de cuantificación y el límite de detección.

2.2.5 Estudio de estabilidad de las LCMs en suspensión

El perfil de estabilidad cinética de las LCMs relaciona parámetros relevantes para el estudio de formulaciones farmacéuticas en base a nanopartículas, ya que evalúa el comportamiento de las partículas en el tiempo, cuando se ven expuestas a diferentes temperaturas.

Este estudio de estabilidad tuvo una duración de 48 h. Se evaluaron 2 formulaciones, micelas vacías y asociadas con el péptido en suspensión. La metodología para este experimento comienza posterior a una síntesis de LCMs (*Ver apartado 2.2.1*). Se tomaron 3 mL de cada muestra y se depositaron en 3 tubos diferentes debidamente etiquetados, utilizando un total de 9 mL de suspensión por muestra. Posteriormente, se llevó 1 tubo a una de las 3 condiciones de temperatura a evaluar: 4 °C, 25 °C y 37 °C. y se fueron muestreando en los tiempos: 0, 1, 3, 6, 24 y 48 h. En cada tiempo se tomaron 100 µL de muestra, y se fueron diluyendo en 900 µL de agua ultrapura que se encontraba a la misma temperatura que la

muestra. Los parámetros cinéticos de seguimiento para este estudio fueron mediciones de HD, PdI y ZP. El experimento completo se realizó en triplicado (n=3).

2.3 Objetivo Específico 2

2.3.1 *Fabricación de films bucales de hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC)*

Para la fabricación de los films bucales se utilizó el método de evaporación por solvente (50) y se produjeron films de HPMC Methocel K100. Se calentaron 130 mL de agua Milli-Q y se le adicionaron 4 gramos de polímero en agitación, cuando se homogenizó la suspensión, se le adicionaron 2 gramos de glicerina y 70 mL de agua Milli-Q fría. La mezcla se almacenó a 4 °C durante 24 h, para quitar las burbujas de aire formadas en la fabricación de la formulación (42). Posterior a este tiempo, se traspasaron 25 g de mezcla y se dispuso sobre una placa Petri de 100/20mm, y se dejó secar bajo campana por otras 24 h. Finalmente, se desmoldaron y se almacenaron hasta su uso (Fig. 6).

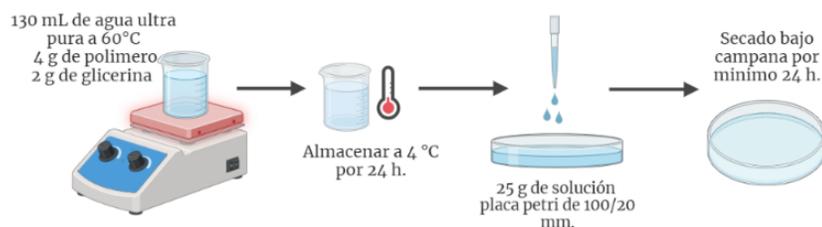


Figura 6: Esquema del proceso de manufactura de films de HPMC

2.3.2 *Impresión del péptido por inyección de tinta térmica*

En el proceso de impresión, el film polimérico es el sustrato y las LCMs asociadas con Ang II en suspensión son la tinta. La impresión es por chorro de tinta térmica, utilizando una impresora Hewlett Packard HP Deskjet 1000 previamente acondicionada, según lo informado por Montenegro et al., (65). En los cartuchos se utilizaron 1 mL de nanosuspensión final, que contiene 70% de LCMs asociadas con Ang II (51), y se le adicionó un 30% glicerina para simular la viscosidad y tensión superficial de la tinta (56,59). Posteriormente se traspasa a un cartucho acondicionado y se imprime sobre films de HPMC. Se ha

determinado que el film resiste íntegramente de 4 veces, con intervalos de secado de 30 minutos entre impresiones.

Para cuantificar la concentración de péptido impreso por cm² de film bucal, se realizaron 4 multi-impresiones en un área de 36 cm² de film, y se seleccionaron 3 áreas diferentes, para estudiar si la distribución de microgotas es homogénea en toda el área (42,65). Cada sección tenía un área 4cm². Posteriormente se disolvieron en 5 mL de agua ultrapura, y se sonicaron a 22 °C por 20 min. Luego las muestras fueron filtradas, con filtros hidrofílicos de 0,22 um y traspasadas a viales, para su posterior cuantificación. Para cuantificar la cantidad efectiva del péptido en la formulación, se utilizó la metodología descrita anteriormente (*Ver apartado 2.2.4*).

2.3.3 Caracterización de los films bucales de HPMC

Se determinaron las propiedades mecánicas y mucoadhesivas, y se observaron por microscopía electrónica de barrido para la caracterización de los films mucoadhesivos de HPMC K100, antes y después del proceso de impresión.

Se analizó el porcentaje de humedad de diferentes films tras 3 días de secado, para analizar la uniformidad en la fabricación de los films bucales (*Ver ecuación 3*).

Ecuación 3. Fórmula % de humedad tras el proceso de secado de los films de HPMC.

$$\%h = \frac{m_{shum} - m_{ssec}}{m_{ssec}} \times 100$$

2.3.3.1 Propiedades mecánicas de los films bucales

Se determinaron las propiedades mecánicas utilizando el analizador de textura TA1 (Lloyd Instruments Ltd., Bognor Regis, Reino Unido), para lo que se utilizó con una celda de carga de 50 N y se procesó la información con el software Nexygen Plus 3. Para la preparación de las muestras, se cortaron rectángulos de 6 x 1 cm² de films no impresos como control, y films impresos con LCMs vacías y asociadas con Ang II.

El equipo posee 2 abrazaderas, entre las cuales se ubicaron las muestras de films y se sostuvieron, exhibiendo un área de prueba eficaz de 3,5 cm². La abrazadera superior ejerció un movimiento de estiramiento hacia el extremo superior, a una velocidad de 0,5 mm/s hasta la ruptura del material. Las mediciones se realizaron en triplicado (n=3). En cada medición se obtuvo la extensión máxima (mm) de la muestra de film hasta justo antes de romperse, obteniéndose también la carga (N) asociada a ese estiramiento. Los datos se procesaron utilizando gráficas de tensión versus deformación. Los parámetros de resistencia a la tracción (TS) y alargamiento a la rotura (EB) se obtuvieron a partir de la tensión y la deformación máximas, y se calcularon mediante las siguientes ecuaciones:

Ecuación 4: Resistencia a la tracción (TS)

$$TS \text{ (MPA)} = \frac{\text{Carga máxima (N)}}{\text{Área sección transversal (mm)}}$$

Ecuación 5: Elongación al Quiebre (EB)

$$EB \text{ (\%)} = \frac{\text{Aumento Longitud en rotura (mm)}}{\text{Longitud inicial (mm)}} \times 100$$

Se evaluó el módulo elástico y la resistencia de la muestra a deformarse elásticamente después de la tensión, también llamado el módulo de Young (EM), este parámetro es definido como la pendiente de la gráfica de tensión versus deformación en la región de deformación elástica inicial. Adicionalmente, se evaluó el espesor de cada muestra utilizando un micrómetro electrónico IP54 Mitutoyo (Kawasaki, Japón) con un rango de medición de 0 a 25 mm ($\pm 0,001$ mm de precisión) y se tomaron 3 mediciones por film, en los extremos y el centro.

2.3.3.2 *Propiedades mucoadhesivas de los films bucales*

Se determinaron las propiedades mucoadhesivas como la fuerza de desprendimiento (DF) y trabajo de adhesión (WoA). Se utilizó el analizador de textura TA1 (Lloyd Instruments Ltd., Bognor Regis, Reino Unido) equipado con una celda de carga de 50 N y software Nexygen

Plus 3. Brevemente, se cortaron los films en cuadrados de 4 cm^2 y se dispusieron horizontalmente en contacto con una gota de $75 \mu\text{L}$ de mucina de estómago de cerdo al 2% fresca para humectar la superficie de contacto y simular la saliva promedio (70). En el equipo, perpendicularmente se encuentra un cilindro de acero inoxidable de 11 mm de diámetro, el cual baja para entrar en contacto con el film, a una velocidad de 0,05 mm/s. Al entrar en contacto la sonda se mantiene en contacto por 60 segundos, y luego es retirada utilizando la misma velocidad. Se analizaron exitosamente films sin imprimir, impresos con LCMs vacías y asociadas a Ang II, además de los controles de mucoadhesión positivo (policarbófilo, PB) y negativo (etilcelulosa, EC).

El trabajo de adhesión corresponde al área bajo la curva del gráfico fuerza (N) vs distancia (mm). El valor de fuerza de desprendimiento (FD) corresponde al valor de fuerza más alto de la curva (Fig. 7).

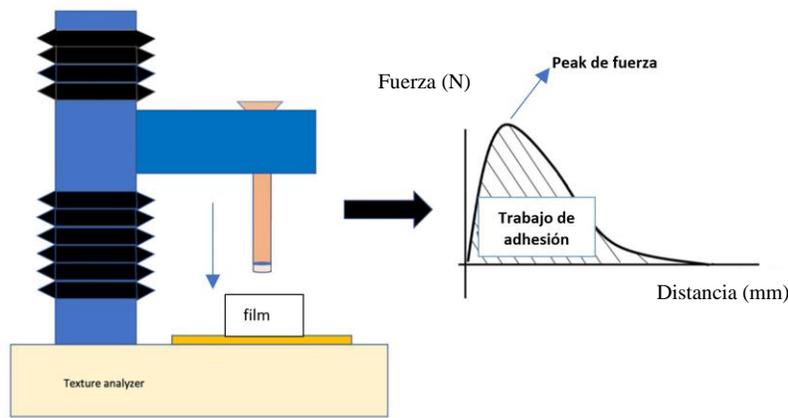


Figura 7: Ilustración del experimento de mucoadhesión, modificado de (73).

2.3.3.3 Microscopía electrónica de barrido

Se obtuvieron micrografías de la superficie de los films utilizando un microscopio electrónico de transmisión y barrido (STEM) en su modo de microscopía electrónica de barrido SEM (Inspect F50, FEI, Hillsboro, OR, EE. UU.). Brevemente, se prepararon las muestras y se cortaron los films en cuadrados de 1 cm^2 , y se inmovilizaron sobre talones de aluminio mediante cinta adhesiva de carbono conductora de doble cara. Posteriormente, todas las muestras se revistieron con oro hasta un espesor de 10 a 15 nm en un evaporador de alto vacío (MARCAR y origen) y se analizaron usando un haz de electrones acelerador de 5 kV.

2.4 Objetivo específico 3

El perfil de liberación in vitro de Ang II contenida en las micelas, y el perfil de liberación del péptido desde las LCMs se determinó mediante la técnica de diálisis, utilizando PBS a pH 6,8.

2.4.1 Perfil liberación de Ang II desde las micelas

Se tomó un volumen de 0,6 mL del sobrenadante, posterior a la ultrafiltración de las micelas. Este volumen se transfirió a una bolsa de diálisis con tamaño de 7KDa, y posteriormente se selló. Luego, esta bolsa se depositó dentro un tubo de vidrio, y se le adicionaron 8 mL de PBS diluido, a pH 6.8 para simular la liberación bucal. La membrana permite que el péptido se libere y difunda hacia la solución tampón. Cabe señalar que entre los parámetros que influyen en la difusión de cualquier compuesto, están la temperatura, la velocidad de agitación, el medio del compartimento receptor, el tipo y naturaleza de la membrana empleada en el ensayo (71,72). Se realizaron los estudios en triplicado. Se tomaron muestras en los tiempos: 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 min. En cada muestra se tomaron alícuotas de 2 mL con reposición en cada medición, utilizando PBS fresco. Las condiciones del estudio fueron 37 °C y agitación constante. Las muestras extraídas se analizaron por fluorescencia con λ de excitación de 229 nm y el slit width italic tanto para la excitación como para la emisión fue de 5 nm. Los datos se expresaron como el porcentaje de Ang II acumulado, versus el tiempo transcurrido. El análisis estadístico de los perfiles se realizó mediante el programa Excel- DDSolver (73), donde se determina si la cinética de disolución se ajusta a cualquiera de los siguientes modelos: ecuación de orden cero, ecuación de primer orden, Higuchi, Hixon-Crowel y Korsmeyer-Peppas.

2.4.2 Perfil de liberación in vitro de las LCMs impresas

Se determinó el perfil de liberación in vitro del péptido de las LCMs desde la impresión, utilizando la técnica de diálisis a pH 6.8. Se tomaron 24 cm² de films previo a 4 multi-impresiones utilizando una tinta con concentración de 22 µg/mL (*Ver apartado 2.3.2*). Se depositaron los films dentro de una membrana de diálisis de 7 kDa, y posteriormente se sellaron. Luego estos fueron suspendidos en 8 mL de buffer a pH 6,8. Todas las mediciones se realizaron en triplicado (n=3). Para la realización de este estudio, se tomaron muestras en

los tiempos: 5, 10, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420 min. En cada muestra se tomaron alícuotas de 2 mL y volumen se fue reponiendo en cada medición, utilizando PBS fresco. Las condiciones del estudio fueron 37 °C y agitación constante. Las muestras extraídas se analizaron por fluorescencia con λ de excitación de 229 nm y el slit width tanto para la excitación como para la emisión fue de 5 nm. Los datos se expresaron como el porcentaje de Ang II acumulado, versus el tiempo transcurrido. Para determinar la cinética de liberación del fármaco a partir de LCMs se evaluaron diferentes modelos cinéticos de cero y primer orden, y no lineales (Higuchi y Korsmeyer-Peppas) mediante la utilización del software DDSolver (Excel Add-In). Adicionalmente, se compararon los perfiles de liberación del péptido en solución, micelas en suspensión y LCMs impresas sobre el film, a través de cálculo del factor de similitud f_2 (Ecuación 6).

Ecuación 6: Fórmula para obtener f_2 . Considerando que: n = corresponde al número total de muestras estudiadas; R_t = corresponde al porcentaje de liberación de un perfil a tiempo t . y T_t = corresponde al porcentaje de liberación del otro perfil a tiempo t .

$$f_2 = 50 \log \left(\left[1 + \frac{1}{n} \sum_{t=1}^n (R_t - T_t)^2 \right]^{-0,5} \times 100 \right)$$

En la Fig. 8 se muestra el esquema de la metodología completa de este proyecto, abordando los tres objetivos específicos trazados.

2.5 Análisis estadístico

Todos los datos numéricos obtenidos en los experimentos realizaron se expresaron en términos de promedio, desviación estándar y coeficiente de variación. Además, para la comparación de resultados fueron utilizados los análisis estadísticos paramétricos de prueba t de Student para dos grupos, o análisis de varianza (ANOVA) de una vía con pruebas post-hoc de Tukey para comparación de tres o más grupos. Estos análisis estadísticos fueron realizados a través del programa GraphPad Prisma 10. Los análisis se realizaron considerando un nivel de significancia estadística $p < 0,05$.

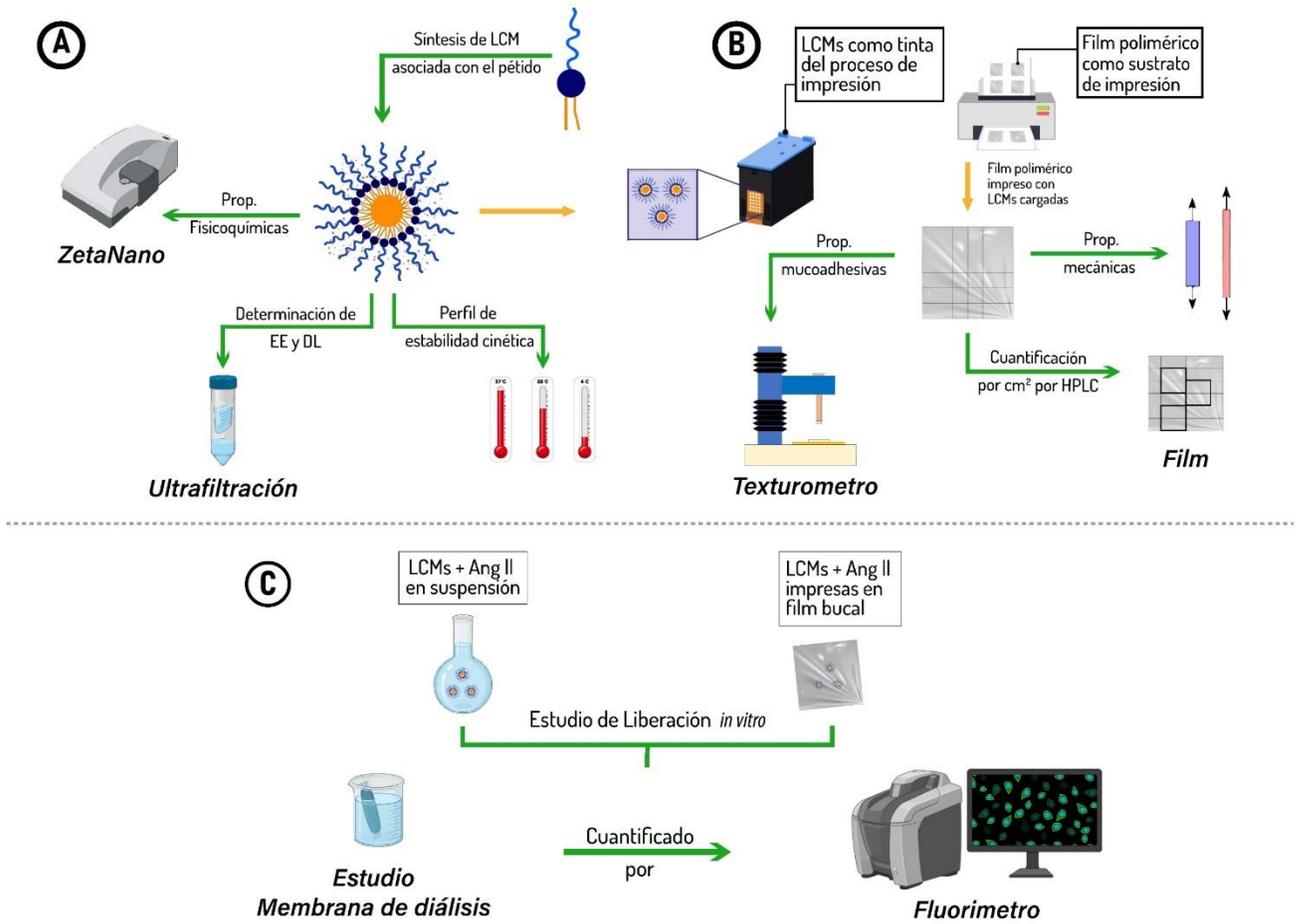


Figura 8: Esquema resumen de la metodología propuesta para la investigación de acuerdo con los objetivos específicos trazados.

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 OE 1. Sintetizar y caracterizar micelas de núcleo lipídico cargadas con el péptido Ang II

3.1.1 Síntesis y Caracterización: Propiedades fisicoquímicas de las LCMs

Las LCMs sintetizadas vacías y cargadas con Ang II fueron obtenidas exitosamente mediante un proceso de emulsificación en caliente de baja energía descrito por Fritz, et al. (44) con ligeras modificaciones (*Ver tabla 3*). Las LCMs constituyen moléculas anfifílicas esféricas que forman una dispersión coloidal, con un rango de tamaño entre 5 – 100 nm (49). Se sintetizaron LCMs-vacías (F.0) y LCMs-asociadas a Ang II al 0,08%(F.1) y 0,4%(F.2) m/m. Estas formulaciones fueron seleccionadas de 3 lotes de síntesis diferentes, y fueron cuantificadas por triplicado. Se analizaron las características fisicoquímicas de las micelas en términos de HD, PdI y ZP. Los resultados obtenidos del HD (F.0 = $15,82 \pm 1,06$ nm; F.1 = $15,58 \pm 1,95$ nm; F.2 = $14,97 \pm 1,13$ nm) estos son comparables con lo reportado en un estudio donde utilizan el mismo sistemas coloidal asociado con el péptido insulina ($16,6 \pm 1,0$ nm) (42). Respecto a la comparación con LCMs asociadas a activos lipofílicos como por ejemplo un estudio en donde analizan LCMs asociadas con rodamina ($26,2 \pm 2,5$ nm (42)), se puede apreciar un tamaño mayor en comparación a todas las LCMs obtenidas sobre los 20 nm, lo que puede deberse a que las micelas exhiben diferentes sitios de interacción con los activos, dependiendo de la naturaleza de estos (74,75). Si son lipofílicos, como la rodamina (Rho), tendrán mayor afinidad por el núcleo lipídico, por lo que la adición muestra un aumento en el HD; mientras que, con los activos hidrofílicos, como es el caso del péptido utilizado en esta investigación, no se observa un incremento notable en el tamaño. Los activos hidrofílicos interactúan con la corona de PEG que se forma en superficie de las LCMs, es decir, se posicionan en la zona externa, evitando así un aumento relevante al comparar formulaciones de micelas vacías y cargadas con el péptido a las concentraciones utilizadas.

Según lo reportado, las LCMs son de los vehículos lipídicos de menor tamaño, en comparación a otros lípidos nanoestructurados como las NLC que poseen un tamaño superior (~100 nm o mayor) (45). La implicancia del tamaño tiene relación con que a medida que este disminuye, el área superficial relativa de la partícula aumenta drásticamente, permitiéndole una mayor interacción con su entorno (28), confiriéndole mejoras significativas en el proceso de permeación a través de membranas biológicas (41,49,67). Además, se ha descrito que partículas menores a 200 nm, poseen mayor velocidad de internalización celular al compararlas con partículas más grandes, en modelos intestinales *in vitro* e *in vivo* (29). El tamaño también se relaciona con la distribución *in vivo*, la capacidad de direccionarse y la toxicidad de las nanopartículas, debido a que, a menor tamaño, se disminuye la posibilidad de reconocimiento y captura por parte de las células del sistema retículo endotelial (RES), lo que se traduce en un aumento significativo de la vida media en circulación (29,41,76). Estas características permiten posicionar a las LCMs como nanovehículos óptimos para el transporte de péptidos (40,42).

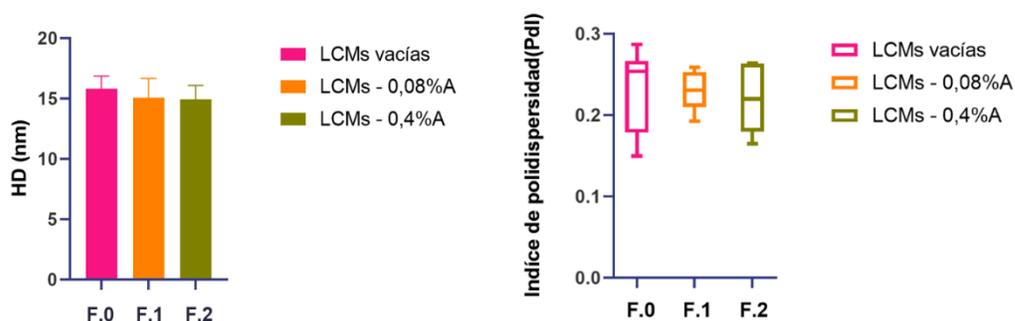


Figura 9: Propiedades fisicoquímicas: HD y PdI de las formulaciones de LCMs en suspensión en 3 condiciones de concentración diferentes.

El índice de polidispersidad (PdI) es otro parámetro importante que describe la heterogeneidad de una muestra en función del tamaño (28). La polidispersidad puede ocurrir debido a la distribución del tamaño en una muestra o a la aglomeración de la muestra durante el análisis (28,77). El valor del PdI puede variar de 0 a 1, y los resultados obtenidos (F.0= $0,227 \pm 0,05$; F.1= $0,210 \pm 0,06$; F.2= $0,222 \pm 0,04$) implican que las formulaciones son

homogéneas y estrechamente dispersas, debido a que los valores inferiores a 0,3 indican homogeneidad poblacional de partículas (78).

Con los valores obtenidos de HD y PdI, al igual que lo reportado en otros estudios (42,45) se demuestra que la técnica de emulsificación en caliente de baja energía forma micelas lipídicas esféricas de pequeño tamaño y baja dispersión (42,44,45) al compararla con otras técnicas de síntesis lipídicas como la homogenización de alta cizalla, en caliente de alta presión o en frío de alta presión (41).

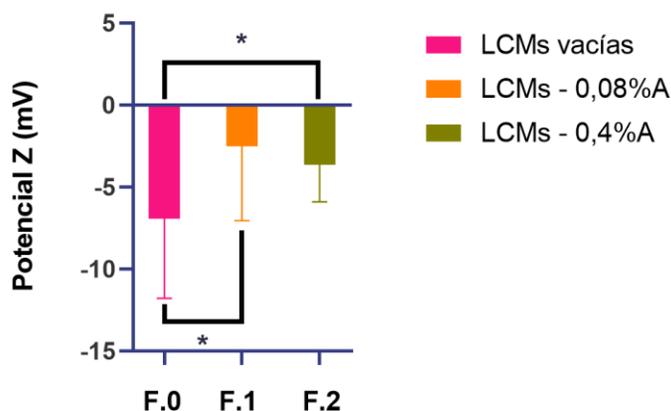


Figura 10: Propiedades fisicoquímicas en términos de potencial Z, de las formulaciones de LCMs en suspensión en 3 condiciones de concentración diferente.

El potencial zeta (PZ) es otro parámetro importante que se evaluó y está relacionado con el potencial eléctrico de la superficie de las partículas, el cual depende únicamente de su composición (77). Es un indicador útil ya que permite hacer predicciones sobre la estabilidad de almacenamiento de las dispersiones coloidales (79). Actualmente se consideran óptimos valores de PZ cuando se encuentra en los rangos numéricos mayores que $|30|$ mV, debido a que la diferencia de carga produce suficiente repulsión entre las partículas, evitando la agregación de las partículas y confiriéndole estabilización electrostática (Fig. 10) (79). Valores de PZ entre $|5|$ y $|15|$ mV se consideran en la región de floculación limitada; y entre $|5|$ y $|3|$ mV de floculación máxima (28,79,80).

Los valores obtenidos (F0= $-6,92 \pm 4,86$ mV; F.1= $-2,50 \pm 4,53$ mV; F.2= $-3,62 \pm 2,27$ mV) se encuentran en rangos cercanos a cero, esto se relacionan con la ausencia de grupos

ionizables en la corona hidrofílica de PEG, debido a que solo tienen alcoholes en sus cadenas terminales. Estos resultados podrían relacionarse con una mayor inestabilidad del sistema coloidal (28,79,80). Sin embargo, esta regla no puede aplicarse estrictamente a todas las formulaciones coloidales, como a aquellos coloides que contengan estabilizadores/protectores estéricos en su formulación. Los estabilizadores son indispensables en las formulaciones de nano suspensiones para prevenir la agregación y aglomeración (81) (Fig. 11) actúan por impedimento estérico, es decir, evitan que se agreguen las partículas debido al impedimento generado por la distribución espacial de las cadenas tridimensionales del estabilizador. Dentro de los tipos de estabilizadores más utilizados tenemos el PEG (48,81). Las cadenas de PEG forman la corona exterior hidrofílica en la superficie de las LCMs, y actúa como un eficiente protector estérico en la formulación. Además, proporciona estabilidad a la formulación en medios biológicos (82) debido a la PEGilación, mejorando la calidad de las micelas, confiriendo estabilidad coloidal y reduciendo la interacción con el entorno fisiológico. Otra ventaja relevante es que entrega el denominado efecto de permeación y retención mejorada (EPR) (83).

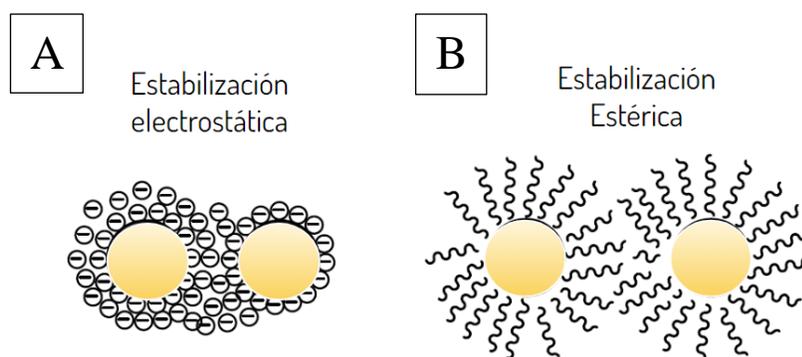


Figura 11: Ilustración de los dos tipos de estabilización en suspensiones coloidales A. Estabilización electrostática y B. Estabilización Estérica, modificado de (81).

Respecto al análisis morfológico, se observaron micrografías TEM (Fig. 12) para apreciar la forma y tamaño de LCMs vacías y asociadas con Ang II, presentando ambas formas esféricas. Respecto al tamaño, las mediciones obtenidas de HD por DLS pueden mostrar mediciones

sesgada por la existencia de partículas más grandes (84). Sin embargo, el tamaño observado en las micrografías es comparable al valor del HD obtenido en las formulaciones.

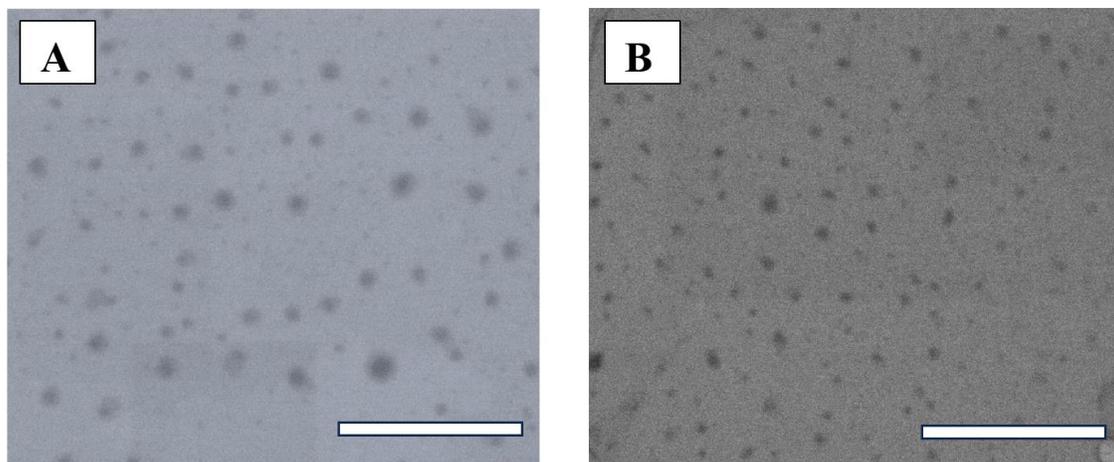


Figura 12: Micrografías LCMs vacías(A) y LCMs asociadas con el péptido (B). La barra indica 500 nm.

3.1.2 Síntesis y Caracterización: Eficiencia de encapsulación y % de carga

Tabla 3: Eficiencia de encapsulación (EE) y porcentaje de carga (DL) mediante método de cuantificación indirecto. (n = 3)

Formulación	EE (%)	DL(*10-3%)
F.1	91,24 ± 2,53	77,78 ± 10,71
F.2	90,53 ± 2,07	366,47 ± 8,14

Los resultados de EE y DL (Tabla 4), correspondientes al promedio de 3 replicados, fueron obtenidos por medio del método de cuantificación indirecta, es decir posterior a la síntesis. Para esto, se dispuso parte de la muestra en un tubo de ultrafiltración con membrana de 10 kDa, y se centrifugaron a 4000 rcf por 20 min. Posterior a eso, se recogieron los ultrafiltrados y se cuantificaron, obteniendo así la cantidad de activo que no se unió a las LCMs.

En términos de EE, ambas formulaciones (F.1 y F.2) presentaron una asociación promedio mayor al 90%. Los valores de encapsulación son similares a los reportados en un estudio donde se caracterizó una formulación de LCMs modificadas con el péptido RGD para

mejorar el efecto anticancerígeno del docetaxel en el cáncer de mama triple negativo ($96,52 \pm 0,43$) (85), en otro estudio también se reportó un alto porcentaje de encapsulación del péptido insulina ($94,3 \pm 3,8$) (42) lo que podría suponer que las LCMs no solo son óptimas para transportar activos con pobre solubilidad acuosa (42,44), si no también son buenos vehículos para el transporte de péptidos (40,42,85). Respecto a los valores obtenidos de DL, estos varían entre las formulaciones ($F1= 77,78 \times 10^{-3} \pm 10,71 \times 10^{-3}$; $F2= 366,47 \times 10^{-3} \% \pm 8,14 \times 10^{-3}$) de modo que F.2 permite una carga 5 veces mayor que F.1. Estos valores se obtienen a partir de considerar la masa total de los componentes sólidos de la formulación, por lo que tiene sentido que aumente el DL, con el activo adicional en F.2. Para efectos de esta investigación, se utilizó una concentración máxima correspondiente a F.2, para optimizar la capacidad de cuantificación en las caracterizaciones sucesivas.

2.1.4. Estudio de estabilidad de las LCMs

Para realizar este estudio, se almacenaron LCMs vacías y asociadas con Ang II por 48h a 3 temperaturas diferentes ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Se analizaron muestras en los tiempos: 0, 1, 3, 6, 24 y 48 h. Como parámetros de seguimiento se realizaron mediciones del HD, PdI y ZP. La figura 13, muestra los resultados obtenidos, con los cuales se realizaron análisis estadísticos, donde se comparó los grupos de temperaturas en el tiempo. La formulación de micelas vacías (Figura 12A) mostró diferencias significativas ($P < 0,05$) en todas las temperaturas al comparar el HD a las 0 h y las 24 h ($4\text{ }^{\circ}\text{C} = 28,263 \pm 2,43\text{ nm}$; $25\text{ }^{\circ}\text{C} = 31,567 \pm 4,37\text{ nm}$; $37\text{ }^{\circ}\text{C} = 36,063 \pm 4,74\text{ nm}$). En la formulación asociada a Ang II (Fig. 13) se presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) a partir de la 48h en las temperaturas de $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($29,401 \pm 6,94\text{ nm}$) y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($26,803 \pm 8,45\text{ nm}$). Sin embargo, la formulación de $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ presenta diferencias a partir de las 24 h ($36,180 \pm 5,72\text{ nm}$). Al comparar las formulaciones, F.1 muestra ser más estable en las temperaturas $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ a lo largo del tiempo en comparación con F.0. Esto podría tener relación con la adición de Ang II en la síntesis. Las LCMs se sintetizan a partir de un polímero anfifílico, por lo que hay dos zonas diferentes donde puede interactuar el activo (86). Se ha reportado que los activos poco solubles como la rodamina se encapsulan y solubilizan en el núcleo lipídico lo que se traduce en un aumento de tamaño (44,49); en cambio los activos solubles y polares podrían absorberse en la superficie micelar y activos con polaridad media podrían ser distribuidos a lo largo de las

moléculas de surfactantes en posiciones intermedias de la corona exterior (49), lo cual no interviene significativamente en el tamaño de las LCMs, pero las estabiliza, ya que permite que la concentración micelar crítica (CMC) de la suspensión disminuya (87). También se reportaron diferencias significativas ($P < 0,05$) a los 37 °C al comparar las 3h (F.0 = 22,205 ± 5,62 nm; F.1 = 20,894 ± 3,68 nm) con las 24 h de ambas formulaciones.

Respecto al PDI, en la formulación de micelas vacías, se observa que a partir de la 3 h hay diferencia significativa entre 4 °C (0,372 ± 0,07) y 37 °C (0,295 ± 0,09), y a partir de las 6 h hay diferencias en ambas formulaciones a esas temperaturas. A los 4 °C en la formulación asociada con Ang II hay un cambio entre la 1h (0,212 ± 0,09) y 3h (0,327 ± 0,07). Posteriormente, se mantienen sin diferencias significativas al igual que las formulaciones a 25 °C. Sin embargo, las formulaciones que estaban a 37 °C demostraron incrementar su PDI en el tiempo, manteniendo diferencias significativas desde 6 h, en ambas formulaciones. Estos resultados de HD y PDI apuntan a que las formulaciones a 37 °C tienden a ser más inestables en el tiempo, esto tiene relación con la naturaleza estructural de las micelas y los cambios que ocurren tras su síntesis, ya que las cadenas poliméricas permanecen dinámicas, es decir, se encuentran siempre en transición y en equilibrio entre los sistemas particulados y los suspendidos en el medio en forma monomérica (88), en el caso de las LCMs son compuestas principalmente por Gelucire® 44/14, el cual es un copolímero, que está compuesto por cadenas de polietilenglicol 33 (PEG 33), mono y diésteres de PEG de ácidos grasos, glicéridos y una pequeña cantidad de glicerol (86,89). Este material ha demostrado que forma una fase laminar que se funde a los 30 °C, implicando que a partir de esta temperatura las cadenas poliméricas se encontrarán más fluidas (86). Este comportamiento tiene relación con que la temperatura 37 °C es muy cercana a la temperatura de fusión del Gelucire 44/14 ($T_f = 44$ °C) (89). En ambos casos aplica que a mayor temperatura hay una mayor fluidez de las cadenas que componen la formulación (86) lo cual podría permitir que

ocurran agregaciones tempranamente, traducándose a un aumento del HD y variaciones en el Pdl.

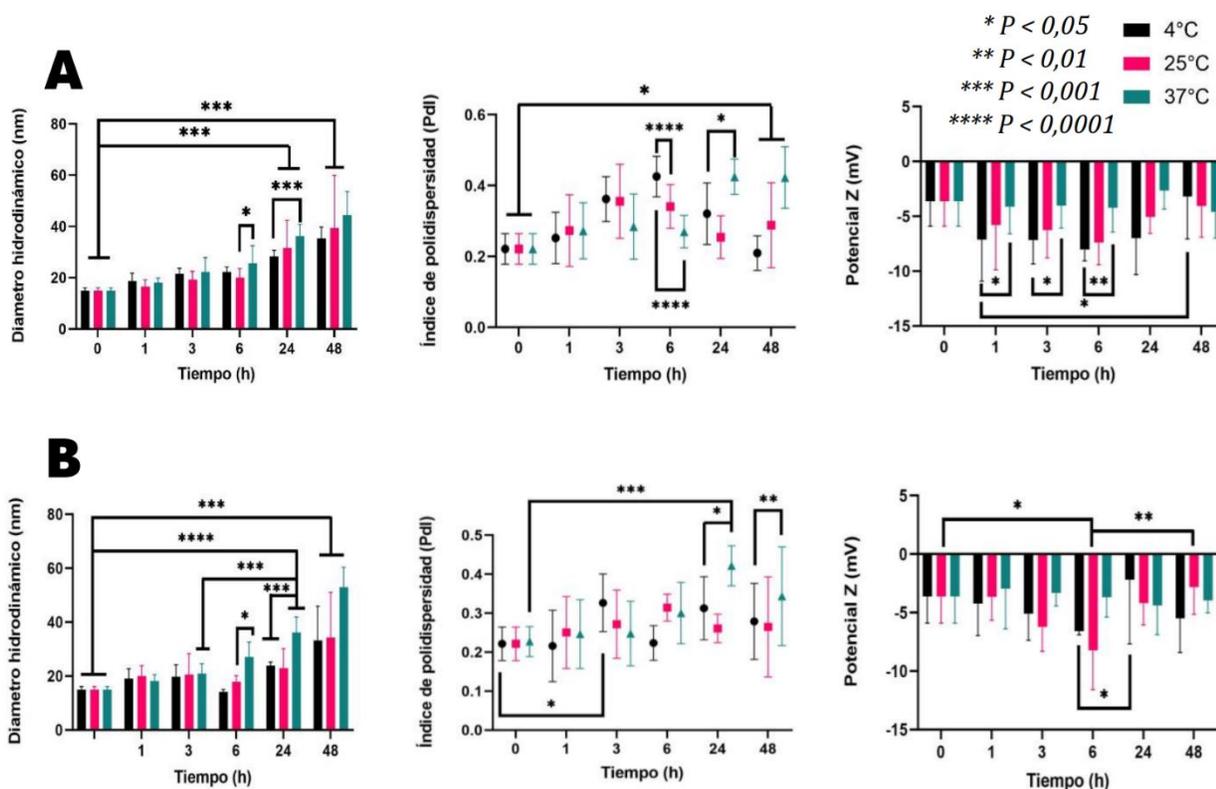


Figura 13: Estabilidad cinética a 48 h de LCMs en suspensión vacías (A) y asociadas con Ang II (B), Se compararon HD, Pdl, y ZP, a las temperaturas 4, 25 y 37 °C (n = 3).

Con respecto a los valores de PZ, en la formulación de micelas vacías existe diferencias significativas ($P < 0,05$) a los 4 °C entre 1 h ($-7,29 \pm 3,67$ mV) y 48 h ($-3,20 \pm 3,85$ mV), mientras que las muestras a 25 °C y 37 °C no demostraron diferencias significativas en el tiempo. Por otra parte, sí demostraron diferencias desde la 1 h entre las temperaturas, manteniendo diferencias entre los 4 °C y 37 °C. Las micelas asociadas con Ang II, mostraron más variación que las micelas vacías, ya que, a partir de las 6 h, tanto para 4 °C y 25 °C existe diferencias significativas; mientras que los 37°C no demuestran cambios relevantes en el tiempo.

En el estudio de estabilidad de micelas, es importante considerar que por utilizar materiales que se encuentran en escala nanométrica se encuentran en un estado no favorecido

termodinámicamente en comparación con los materiales en cantidades gruesas y en condiciones estándar de temperatura y presión ambiente. (90) Las fases de los nanomateriales pueden considerarse metaestables, es decir, en un estado energético de corta duración en relación con los materiales a macro escala. Como resultado, la definición de la estabilidad de las nanopartículas es dependientes de la composición, forma, tamaño y la química de superficie (88,90).

Una característica relevante para predecir la estabilidad cinética de los sistemas coloidales es la carga superficial, esta contribuye a la obtención y conservación de una suspensión estable en el tiempo (90) (*Ver apartado 3.1.1*). La estabilidad electrostática se basa en valores absolutos de PZ, donde se establece que valores superiores a $|30\text{mV}|$ muestra que hay fuerzas repulsivas dominantes en la suspensión, provocando una disminución en la probabilidad de colisión entre NPs, y, por tanto, se disminuye la formación de agregados (28,79). Los valores obtenidos de PZ no superan los $|10\text{mV}|$ lo que se condice con la falta de grupos ionizables en la corona de PEG en la superficie de las LCMs, por lo que electrostáticamente la formulación aparentemente no es estable. Sin embargo, como se mencionó en el *apartado 3.1.1*, y con los resultados en términos de HD y PdI en las primeras 6 horas del estudio, demuestran que la formulación de micelas presenta estabilidad en un rango de tiempo determinado, teniendo relación con los sistemas coloidales, los cuales presentan estabilidad estérica (Fig. 14). La estabilidad estérica se relaciona con la presencia de polímeros hidrofílicos de alto peso molecular en la superficie de las partículas, que en el caso de las LCMs se utiliza Gelucire 44/14® que presenta en su estructura PEG, tras la síntesis, se ubican cadenas de PEG sobre la superficie externa de las micelas, contribuyendo a mantener la estabilidad tras la formación de una barrera estérica por extensión y proyección de su estructura en el medio (91).

La temperatura de almacenamiento es otro parámetro que influye directamente en la estabilidad cinética de los nanosistemas particulados suspendidos en medio acuoso (79,81), esto también depende de la naturaleza de la matriz polimérica y del activo a vehiculizar (92). El aumento de temperatura contribuye a un aumento en la energía cinética de las NPs, favoreciendo el movimiento y la probabilidad de colisión entre partículas, pudiendo generar agregados floculados, o la separación de las fases, tras la precipitación del material suspendido. Para que se dé este segundo caso, debe haber una predominancia de las fuerzas

gravitacionales por sobre las fuerzas de difusión o brownianas, necesarias para mantener la estabilidad coloidal (90).

Otro factor para considerar en la estabilidad cinética de las LCMs, son las interacciones intramoleculares que dependen de la hidrofobicidad del polímero. Existe una relación directamente proporcional entre el largo de las cadenas hidrofóbicas del polímero y la estabilidad coloidal que presenta, lo que ocurre debido al aumento en la cohesión de los monómeros por interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals (88). Las cadenas que forman el núcleo lipídico de las LCMs de Gelucire 44/14® son principalmente derivados del ácido láurico, un ácido graso saturado con tan solo 12 carbonos en su estructura, lo cual lo posiciona dentro de los diferentes Gelucire (89), como un polímero más bien hidrofílico y no suficiente hidrófobo para mantener el núcleo lipídico, al compararlo con otras formulaciones que usan lípidos con cadenas de mayor extensión.

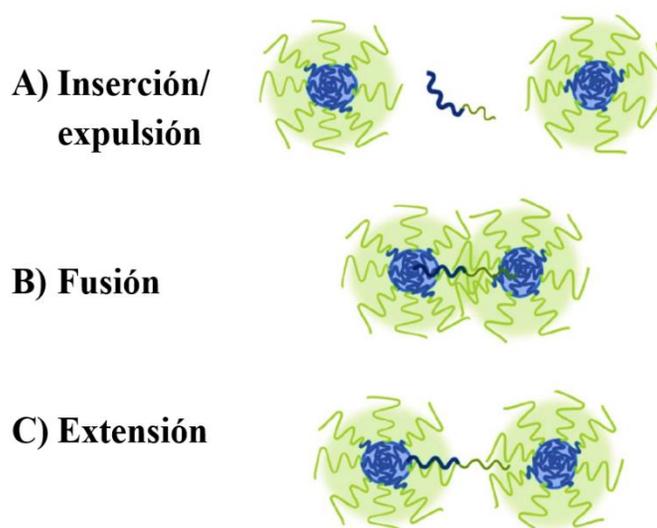


Figura 14: Mecanismos de inestabilidad que operan en los sistemas micelares, modificado de (88).

Tras discutir los diferentes factores que afectan la estabilidad de los sistemas micelares, en la literatura se encontró información acerca de tres mecanismos posible que favorecen a la inestabilidad de los sistemas coloidales, y tienen relación con la interacción monómero-monómero (Fig.14).

A) **Inserción/expulsión de monómeros:** las cadenas que forman el núcleo hidrofóbico de las micelas pueden sufrir la expulsión de un monómero de una micela y la inserción de este en otra.

B) **Fusión:** las micelas lipídicas pueden fusionarse temporalmente donde ambos núcleos lipídicos entran en contacto, favoreciendo la transferencia de unidades monoméricas entre ellas. También pueden fusionarse permanentemente con la formación de material floculado.

C) **Extensión:** las cadenas monoméricas pueden expulsarse parcialmente del núcleo hidrofóbico y unirse a un sistema micelar cercano, conectando ambas partículas mediante un “puente monomérico” sin lograr fusionar los núcleos.

Los resultados de este estudio evidenciaron que el incremento del HD de las NPs en suspensión sin cambios significativos a nivel de ZP, sugiriendo la aparición de agregados en el tiempo principalmente en las formulaciones expuestas a 37 °C y, en menor medida las formulaciones a 4°C, teniendo relación con los tres mecanismos de inestabilidad discutidos (inserción/expulsión de monómeros, fusión y extensión), que podrían ocurrir de forma independiente o en sinergia. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en un estudio donde se utilizaron las mismas micelas asociadas a rodamina e insulina (42), donde se concluyó que la inestabilidad también puede venir dada por inestabilidades propias del péptido, debido a que tanto los péptidos como las proteínas son susceptibles a cambios en su estructura secundaria, terciaria o cuaternaria. Este denominado proceso de desnaturalización también puede ser favorecido por la temperatura, cambios de pH y/o presencia de enzimas. La desnaturalización inducida por temperatura afecta las interacciones no covalentes más débiles, como los puentes de hidrógeno, las interacciones electrostáticas y fuerzas de van der Waals, mostrando mantener prácticamente intactos los enlaces peptídicos (93).

3.2 OE 2. Desarrollar y caracterizar films poliméricos impresos con LCM por inyección de tinta

3.2.1 Fabricación de películas bucales de HPMC

Para la fabricación de los films bucales se utilizó el método de moldeo por evaporación de solvente (65) utilizando HPMC Methocel K100. Los porcentajes de humedad de los films se muestran en la tabla N° 4. Con estos resultados, y en términos de “agua libre”, es decir, agua que se libera con facilidad por evaporación o secado, se eliminó un 88% aproximadamente en los films analizados. Tras el proceso de secado el %H en base seca es 12,3%, es decir, tras lograr peso constante, este porcentaje indica el agua que se queda enlazada en las cadenas poliméricas, siendo parte del film seco. En un estudio donde se prueba la capacidad de formar film en productos derivados del almidón, se demostró que los films que utilizaban plastificantes como la glicerina, tenían menor %H en base seca, en comparación a los films que no tenían plastificante, sin embargo, los films sin plastificantes se quebraron en el proceso de desmoldear, y aquellos que tenían glicerina, eran flexibles y resistentes (94), por lo que, la presencia del plastificante en la formulación, permite una disminución en la cantidad de agua que esta retenga, tras interactuar con la estructura polimérica.

Tabla 4: Porcentaje de humedad en base seca de los films tras 3 días de secado a temperatura ambiente y bajo campana.

Masa inicial(g)	Masa seca(g)	% humedad En base seca
24,996	2,949	11,797
25,033	3,033	12,116
25,113	3,201	12,746
25,040	3,202	12,787
25,127	3,073	12,229
	PROM	12,335

El material del film es HPMC este es inodoro, insípido, transparente, estable, resistente al aceite, no tóxico y comestible. Es además un polímero no iónico con una estructura lineal de moléculas de glucosa, en la que su matriz se estabiliza mediante enlaces de hidrógeno (95). Se encuentra aprobado por la FDA y es comúnmente utilizado como agente emulsionante, espesante y de suspensión en gotas para los ojos y sistemas de administración controlada en productos orales, además de poseer propiedades mucoadhesivas (96–98). Para la obtención del film se han investigado y establecido varias tecnologías de producción, como la evaporación por solvente, la extrusión por fusión en caliente, el laminado y los métodos de impresión 3D (65,99). Se utilizó el método de moldeo por evaporación de solvente, mediante el cual los ingredientes solubles en agua se disuelven para formar una solución viscosa transparente, siendo el más utilizado para la fabricación de films bucales mucoadhesivos (62). Dentro de las ventajas de este método está que presentan uniformidad de espesor y mejor claridad que las películas obtenidas por extrusión. Los films tienen un brillo fino y su superficie se encuentra libre de defectos como líneas de matriz (99) lo cual es un punto importante a la hora de escoger un sustrato adecuado para el proceso de impresión por inyección de tinta (59).

3.2.2 Impresión del péptido por inyección de tinta térmica

En el proceso de impresión, se realizaron 4 multi-impresiones por cada film, con secado entre impresiones de 30 minutos, y se cuantificaron por HPLC-DaD. *Ver apartado 2.2.4* Macroscópicamente, los films posteriores a la impresión tras el secado cambian el color de su superficie. En la figura 15a, se muestra un film seco y se le puede apreciar una fina capa opaca en su superficie. Esto ocurre debido a que, al secarse las micelas se solidifican sobre el film, produciendo esta fina capa opaca de color blanco, la cual tiene relación con el activo principal de la formulación, el Gelucire 44/14 ya que posee ese color cuando se encuentra en estado sólido.

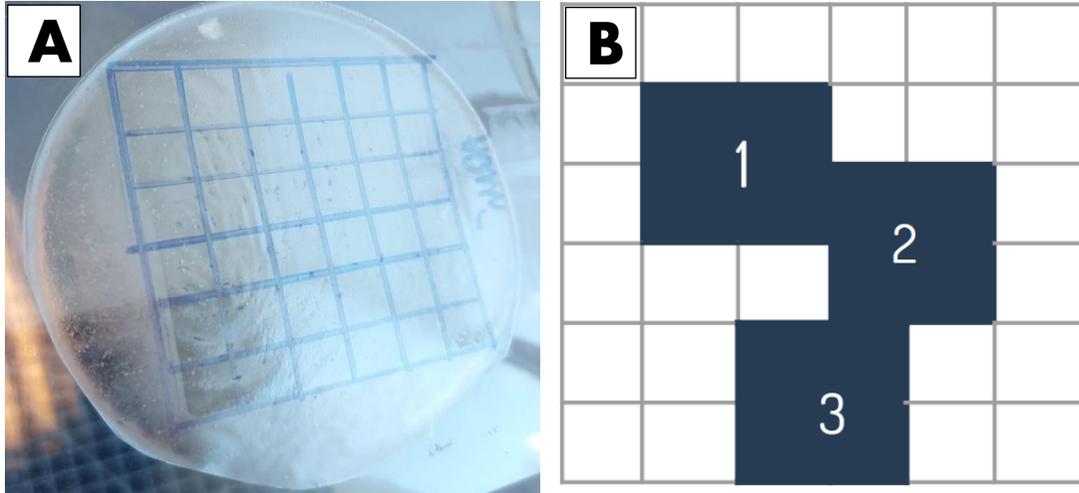


Figura 15: 15a. Características macroscópicas del film tras el proceso de secado. 15b. Área de impresión cuantificada para evaluar la distribución de microgotas en el proceso de impresión.

Para cuantificar los films, se disolvieron por triplicado, un área de 4 cm² de película en 5 mL de agua Milli-Q. Las áreas seleccionadas para realizar la cuantificación fueron 3 por films (Fig. 15b). Se utilizaron esas áreas para realizar una evaluación de la distribución de microgota en el área de impresión utilizada de 36 cm². Posteriormente, las muestras se sonicaron a 25 °C por 30 min hasta lograr disolución total del film polimérico. Luego las muestras se pasaron por un filtro hidrofílico de 0,45 µm, el cual permitió separar al activo del resto de los componentes lipofílicos de la formulación para posterior cuantificación por HPLC-DaD. Ver apartado 2.2.4

Tabla 5: Concentración por cm² film impreso con LCMs asociadas a Ang II tras 4 multi-impresiones. La tinta utilizada está a una concentración de 0,02 mg/mL.

Films	C (ug/cm ²)
Film 1	6,628 ± 0,253
Film 2	7,026 ± 0,281
Film 3	7,100 ± 0,502
Film 4	7,990 ± 0,729
PROM	7,186 ± 0,441

La tabla 5 muestra los resultados obtenidos tras imprimir 4 films, y seleccionar 3 partes diferentes de cada uno, cada replicado se analizó además por triplicado (n=3). Estos resultados muestran que la técnica de impresión de inyección de tinta es reproducible al demostrar que la distribución de la microgota es homogénea en toda el área de la impresión, lo cual ha sido reportado previamente(42,56).

La impresión por inyección de tinta se describe como un método de impresión sin contacto capaz de cargar materiales funcionales como tinta, sobre un área de impresión seleccionada y definida previamente, en el caso de esta investigación fue un área de 6 cm x 6 cm. El mecanismo se relaciona con la formación de microgotas tras un proceso de calentamiento que puede aumentar rápidamente a 300-400 °C con la finalidad de crear una burbuja de vapor que empuje pequeñas microgotas de tinta fuera de la boquilla (100). Actualmente se ha reportado que las microgotas se generan uniformemente con un volumen de 13,5 pL y un diámetro que varía de 20 a 50µm (100,101).

La impresión por inyección de tinta tiene como ventaja principal la rentabilidad del proceso, debido a que se utiliza una impresora convencional y se optimiza para que pueda imprimir materiales como nanopartículas sobre un sustrato polimérico (56,65,100) demostrando en estudios previos que se puede imprimir fármacos biológicos sobre films poliméricos para la administración por vía bucal. La relevancia de utilizar esta vía alternativa es que abre una ventana para explorar la posible administración de un grupo fármacos que tienen problemas para administrarse por vías convencionales, como fármacos biológicos, péptidos, proteínas y fármacos poco solubles en agua principalmente (42,56,65). Estas características posicionan a los film bucales, como una nueva forma farmacéutica bucal de liberación controlada (95).

Otra ventaja importante de la impresión por inyección de tinta es que es un método personalizable lo cual lo hace atractivo, ya que surge como una forma farmacéutica que permite dosificar medicamento según las diferentes necesidades que van cambiando pacientes a paciente (65) esto es posible debido a que se puede controlar la concentración de la tinta y el impreso. Por otra parte, podría servir para fraccionar dosis de medicamentos que no se encuentra disponible en el mercado para pacientes pediátricos y geriátricos principalmente (102).

3.2.3 Caracterización de los films bucales de HPMC

Se determinaron las propiedades mecánicas y mucoadhesivas de los films bucales utilizando el analizador de textura TA1 (Lloyd Instruments Ltd., Bognor Regis, Reino Unido) equipado con una celda de carga de 50 N y Nexygen Plus 3 software, según lo reportado previamente (42,56) (Fig. 16).

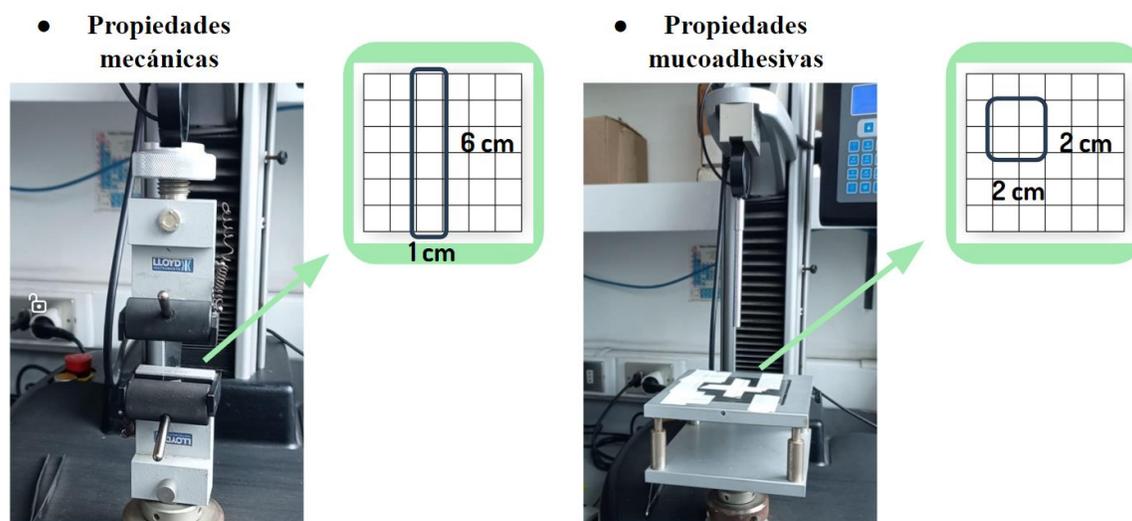


Figura 16: Caracterización de propiedades mecánicas y mucoadhesivas de las formulaciones de micelas impresas sobre film de HPMC.

3.2.3.1 Propiedades Mecánicas

El ensayo de tracción es la técnica más utilizada para evaluar las propiedades mecánicas de los film bucales (96), permitiendo evaluar varios parámetros a partir de los datos obtenidos. La resistencia a la tracción (TS) es la fuerza de tracción máxima aplicada hasta que la tira de film delgada se rompe (102). Se obtuvieron los valores de TS de los films sin inconvenientes (Fig. 17) . La formulación de films impresos con LCMs tanto vacías como con Ang II no muestran diferencias significativas entre sí (LCMs vacías = $17,03 \pm 4,64$ MPa; LCMs-Ang II = $17,07 \pm 4,54$ MPa). Sin embargo, al comparar estos films impresos con los films no impresos ($8,07 \pm 2,17$ MPa) se muestran diferencias significativas, Esto tiene relación directa con la composición de las LCMs impresas, como también con el proceso de impresión por inyección debido a la adición de plastificante en la composición de la tinta (103). Los

plastificantes más utilizados en el mercado son sorbitol, manitol, glicerina, ftalato de dietilo, citrato de trietilo, macrogol, y propilenglicol (102,104) y su uso en el desarrollo de films bucales ha demostrado que aumentan la resistencia a la tracción del material, debiendo cumplir los requisitos de ser compatibles con el fármaco, disolvente y polímeros utilizados (102).

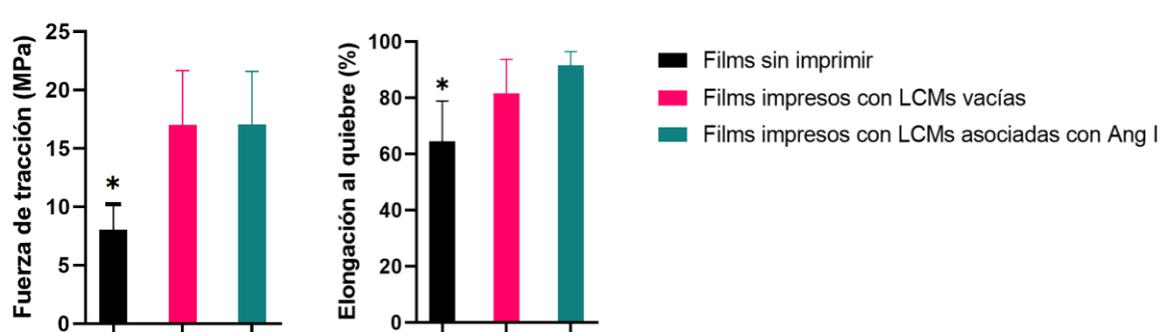


Figura 17: Propiedades mecánicas del film de HPMC. Resistencia a la tracción(TS) (MPa) y Elongación al quiebre(%)(EB) vs tiempo.

Por otro lado, la elongación al quiebre (EB) se obtiene a partir de aplicar una fuerza de tracción que vaya en aumento. Esta tracción continúa hasta que se deteriora la integridad de la forma del film. La EB se puede determinar midiendo el tamaño final de la película antes de que se deteriore su integridad. Esta tasa aumenta a medida que aumenta la cantidad de plastificante. Los resultados muestran que la EB fue menor en los films no impresos ($64,43 \pm 14,44$), al compararlos con las formulaciones impresas con micelas tanto vacías como asociadas con el péptido ($81,70 \pm 11,98$; $91,66 \pm 4,82$) respectivamente (Fig 17). Estos resultados podrían deberse a la presencia extra de glicerina, la cual se adiciona como plastificante en la fabricación de los films (95,105) y, además, se encuentra presente en la tinta de impresión, ya que se utiliza para simular la viscosidad de la tinta convencional y así evitar que se escape por goteos o no sea reconocida por la impresora (51,56). Por otra parte este resultado puede deberse a la presencia de agua, debido a que las micelas se encuentran suspendidas en ella al momento de la impresión, el agua residual en los films puede afectar sus propiedades mecánicas y conducir a un aumento de la elasticidad debido a que también aporta un efecto plastificante en la formulación (105,106). Los plastificantes ayudan a aumentar la flexibilidad y disminuir la temperatura de transición vítrea (T_g) de los polímeros, reduciendo la friabilidad del film. La glicerina en la formulación actúa reduciendo las fuerzas

intermoleculares entre las cadenas de polímeros proporcionando una estructura laminar, lo que lleva a un aumento en los valores de TS y EB (65,107).

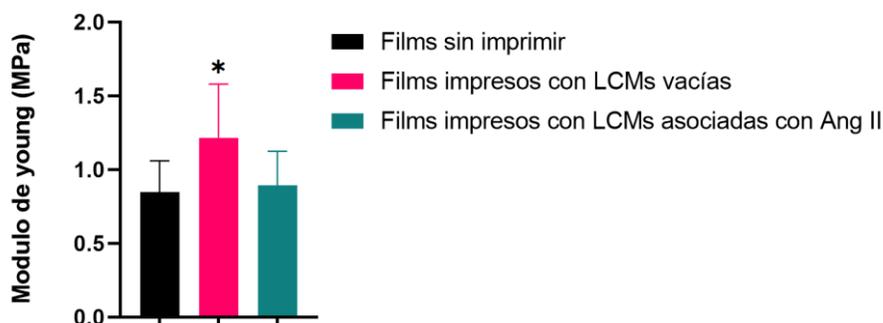


Figura 18 : *Propiedades mecánicas del film: Módulo elástico o Módulo de Young.*

El módulo elástico o módulo de Young mide la rigidez del material, cuanto más rígido es un material mayor es su módulo de elasticidad. Equivale a la tangente en cada punto de la zona elástica en la gráfica tensión-deformación, obtenida en los ensayos de tracción (99). Los valores obtenidos muestran que no hay diferencias significativas entre los films sin imprimir y los impresos con LCMs asociadas a Ang II. Lo cual podría significar que la impresión no ejerce un efecto sobre la elasticidad del material. Esto ha sido descrito en un estudio realizado en condiciones similares (42). Sin embargo, ambas formulaciones presentan diferencias significativas ($P < 0,05$) al compararlas con los films impresos con micelas vacías. Estos resultados tienen relación con los tensoactivos presente en la formulación, Tween 20 y Span 80 los cuales podrían estar más presente en las formulaciones de micelas vacías, al compararlas a aquellas que están asociadas con Ang II, permitiendo que haya menos tensoactivo disponible. En un estudio donde se fabrican film variando la concentración de tensoactivo, Span 80, Tween 20 y Lecitina (108) concluyen que la concentración de tensoactivo influye en las propiedades mecánicas de los films poliméricos, debido a que estos podrían afectar las interacciones entre las cadenas poliméricas de la región flexible del film. Por lo tanto, la presencia extra de estos en los impresos, disminuyen la rigidez, brindándole mayor elasticidad al material. Los resultados implican que la impresión de LCMs en la superficie de los films de HPMC no influyen en el módulo elástico propio del material, sino más bien son los tensoactivos presentes en las micelas vacías las que le confieren al material mayor elasticidad, sumado de la presencia de plastificantes en la formulación (107).

Por otra parte, evaluar el espesor de los films es otro parámetro importante ya que, se ha reportado que un alto porcentaje de plastificantes en la fabricación podría aumentar el espesor del film (107,109). En este estudio al comparar el espesor de los 3 tipos de films, sin imprimir, impresos con LCMs vacías e impresos con LCMs asociadas con Ang II ($0,099 \pm 0,01$; $0,093 \pm 0,01$; $0,089 \pm 0,01$) respectivamente. No muestran diferencias significativas, por lo que la impresión con LCMs no tendría un impacto sobre el espesor del film bucal, mismos resultados han sido reportados anteriormente (42).

Tabla 6: Tabla resumen de los parámetros de las propiedades mecánicas para films de HPMC, no impresos e impresos con LCMs vacías y asociadas con Ang II. Los valores se presentan como media \pm Desviación Estándar.

Tipos de films	Espesor (mm)	R. a la tracción (MPa)	E. al Quiebre (%)	Módulo de Young (MPa)
HPMC N/I	$0,099 \pm 0,01$	$8,07 \pm 2,17$	$64,43 \pm 14,44$	$0,85 \pm 0,21$
Impresos - LCM VACÍAS	$0,093 \pm 0,01$	$17,03 \pm 4,64$	$81,70 \pm 11,98$	$1,22 \pm 0,36$
Impresos - LCM + ANG II	$0,089 \pm 0,01$	$17,07 \pm 4,54$	$91,66 \pm 4,82$	$0,9 \pm 0,23$

Se han reportado estudios utilizando nanosistemas en base a Ag y TiO₂ que han sido incorporados en la fabricación de films de HPMC, los valores de TS de los films asociados con Ag-NPs y TiO₂-NPs fueron mayores que los obtenidos por en los films de HPMC sin nanopartículas (control). Los resultados de EB demostraron que los films de HPMC con Ag-NPs y TiO₂-NPs tiene mayor valor de alargamiento en comparación al control. Además, evaluaron el módulo elástico de Young, los resultados muestran que las películas de HPMC con Ag-NPs y TiO₂-NPs tienen valores más bajos en comparación con el control (95). Los valores obtenidos, son comparables a los resultados expuestos en esta investigación, por lo que existe una correlación con el uso de nanopartículas sobre la superficie de los films y el cambio en las propiedades mecánicas de estos. Se ha demostrado que el uso de nanomateriales pueden mejorar las propiedades de las matrices poliméricas al mejorar las

propiedades de barrera al oxígeno y al vapor de agua, aumentando la estabilidad y la resistencia mecánica de los films poliméricos (110). Por otra parte, el tamaño nanométrico de las formulaciones, permite que el activo pueda llenar los poros entre las estructuras internas de los films de HPMC (111). Lo cual brinda una ventaja al otorgarle mayor flexibilidad a la estructura polimérica.

3.2.3.2 Propiedades mucoadhesivas

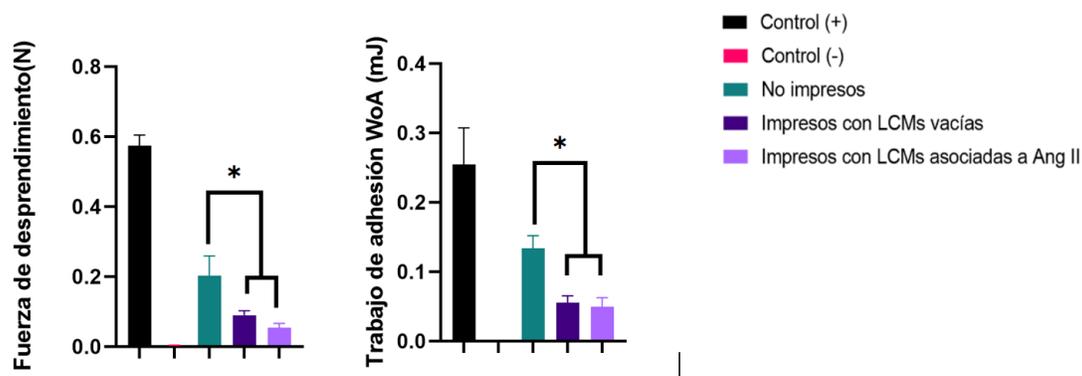


Figura 19: Parámetros de las propiedades mucoadhesivas. Fig. 19a muestra la fuerza de desprendimiento (FD) y Fig. 19b muestra el trabajo de adhesión (WoA) en las diferentes muestras evaluadas. Se utilizó como control mucoadhesivo films de policarbófilo (PCB) y como control negativo a film de etilcelulosa (EC)

Los parámetros mucoadhesivos se muestran en la figura 19. En relación con la fuerza de desprendimiento (FD) y trabajo de adhesión (WoA) existen diferencias significativas entre los films no impresos con los impresos, demostrando que el proceso de impresión afecta la mucoadhesión, lo cual ya ha sido reportado previamente (42). Sin embargo, la disminución de este parámetro de igual manera resulta en el desarrollo de mucoadhesión óptimo, así lo reporta Montenegro-Nicolini et al, 2018. El cual compara el comportamiento de diferentes films poliméricos antes y después del proceso de impresión por inyección de tinta. En este estudio, concluyen que los films de HPMC muestra mejores propiedades mucoadhesivas posterior a la impresión, en comparación a otras formulaciones a base de quitosano (CH) y policaprolactona (PCL) (65). Esto tiene relación con la formación de enlaces de puentes de hidrógenos con el componente acuoso (112), y la capacidad bajo tensiones moderadas de

permanecer de igual forma en contacto con la superficie mucosa, debido a la menor velocidad de hidratación.

Para comprender los mecanismos de mucoadhesión es necesario conocer la composición y propiedades del moco. Este moco es una sustancia viscosa que actúa como revestimiento de protección en contacto con el medio externo y permite la hidratación continua del epitelio (113). Está compuesto generalmente por glicoproteínas, lípidos, sales inorgánicas y, mayoritariamente por agua (104,114). Se ha descubierto que el moco cumple varias funciones, además del mantenimiento del epitelio hidratado, cumple funciones como la lubricación para el paso de objetos, una función de barrera con respecto a patógenos y sustancias nocivas (115) y como una capa de gel permeable que permite el intercambio con el entorno (116). Dentro de las glicoproteínas, la mucina es la más abundante en el moco, esta juega un papel crucial para que ocurra el proceso de mucoadhesión, ya que su estructura es altamente glicosilada y es secretada constantemente en el moco. La mucina mediante la unión no covalente con las distintas subunidades, da lugar a estructuras capaces de incorporar gran cantidad de agua, formando una capa viscoelástica que protege la capa mucosa (113,116).

El proceso de mucoadhesión que involucra el uso de una matriz polimérica para la administración de fármacos es un proceso complejo e incluye varios factores a considerar como la humectación, adsorción e interpenetración de cadenas de polímeros expuestas al moco (116). El éxito y el grado de unión de mucoadhesión, está influenciado por diversas propiedades basadas en los polímeros, como el grado de reticulación, la longitud de la cadena y la presencia de diversos grupos funcionales (116).

Respecto a las propiedades mucoadhesivas exhibidas por las formulaciones, los films de HPMC demostraron propiedades de adhesión más altas en lugar del film de EC como control negativo, lo que se traduce en mayores valores de DF y WoA. Esto ha sido reportado previamente por Bagul y col. quienes analizaron la capacidad de mucoadhesión de diferentes polímeros, entre ellos HPMC y EC, demostrando que HPMC provoca una mayor fuerza de adhesión en comparación con EC (117), lo cual tiene relación con la ausencia de grupos polares en la superficie de este último, no permitiendo la interacción con el medio acuoso.

La mucoadhesión de HPMC es atribuible a los grupos funcionales polares específicamente, a la gran cantidad de grupos hidroxilo libres y no sustituidos que posee, interactuando con la mucina a través de interacciones físico-químicas, principalmente enlaces de hidrógeno, permitiendo que ocurra el proceso de adhesión (112,118). Por otro lado, las propiedades viscoelásticas del HPMC, están relacionadas con los procesos de humectación, hidratación e hinchamiento del polímero (105). HPMC K100 tiene un contenido alto de sustituciones de metoxilo y bajo de sustituciones de hidroxipropilo, esto provoca un buen entrelazamiento de red y un estado de gel débil o similar a líquido que promueve la adhesión con el moco. (113) Estos resultados muestran, que utilizar HPMC como polímero para el transporte de nanosistemas para la administración bucal, puede ser posible tras demostrar conservar buenas propiedades de mucoadhesión suficientes para generar un efecto por un tiempo determinado (56). Además, el utilizar sistemas poliméricos mucoadhesivos permite la administración de fármacos biológicos (65) debido a que la degradación enzimática de péptidos y proteínas entre la forma de dosificación y la mucosa se reducen mediante la mayor intimidad con la membrana absorbente que les proporciona el uso de polímeros (119).

3.2.3.3 Microscopia electrónica de barrido sobre la superficie de los films

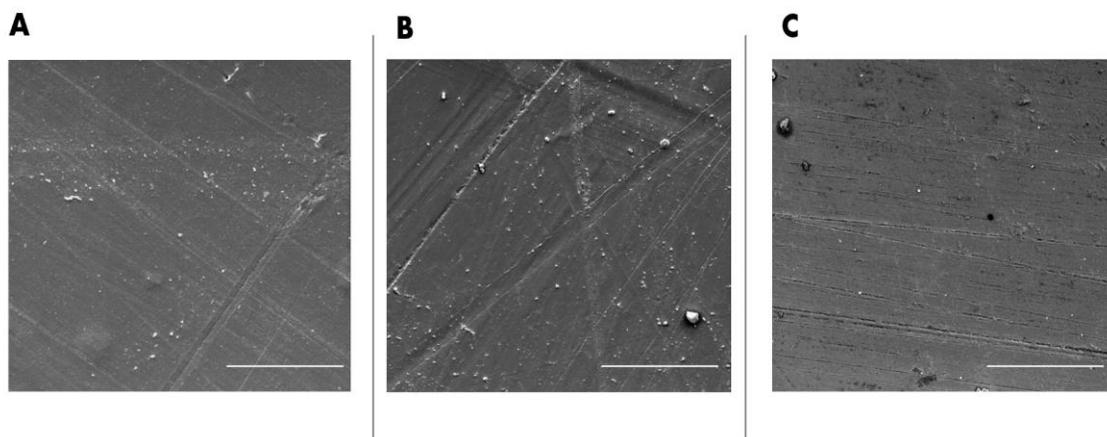


Figura 20: Micrografías SEM de la superficie de los films sin imprimir (A), films impresos con LCMs vacías (B) y LCMs asociadas al péptido (C). La barra indica 20 μ m.

Se obtuvieron micrografías SEM de la superficie de los films, con el objetivo de observar los cambios tras la impresión de las micelas sobre los films de HPMC. Según lo observado, los

films sin imprimir y los impresos con LCMs poseen una morfología similar (Fig. 20). No mostrando ningún cambio aparente tras el proceso de impresión.

3.3 OE 3. Evaluar y comparar los perfiles de liberación in vitro de LCMs en suspensión y LCMs impresas sobre el film polimérico.

3.3.1 *Estudio de Liberación de LCMs impresas sobre film polimérico*

Los perfiles de liberación de las LCMs asociadas con el péptido, en suspensión e impresas en los films bucales se muestran en la Figura 21. Durante los primeros 15 minutos del experimento, la cantidad acumulada liberada del péptido en suspensión es sobre el 40%, significativamente mayor a la formulación de LCMs impresas en el film bucal que fue aproximadamente el 20%. Es decir, la velocidad de liberación se reduce a la mitad al imprimir las LCMs sobre el sustrato polimérico. Los films alcanzan la mayor liberación a los 180 minutos, alcanzando un 50% de la cantidad inicial liberada, que corresponde a 24 cm² de film impreso.

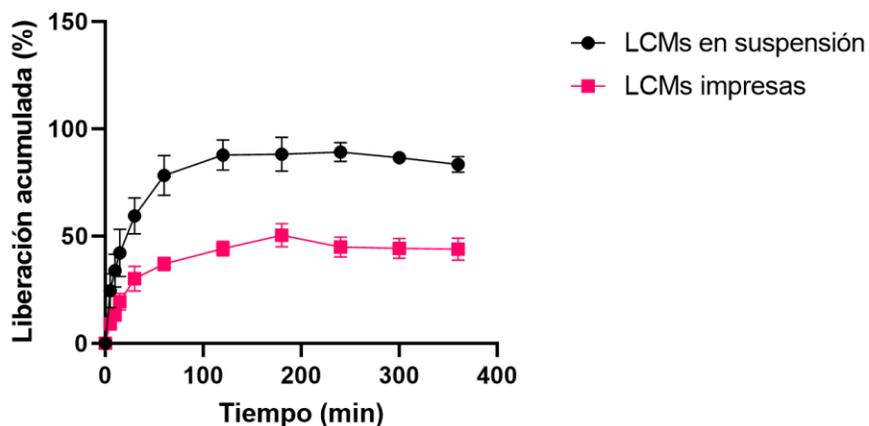


Figura 21: *Perfiles de liberación acumulada in vitro de las micelas de núcleo lipídico asociadas con el péptido. Los valores se representan como media \pm desviación estándar de tres lotes diferentes ($n = 3$).*

Estos perfiles muestran que durante el tiempo de estudio (60 min) no se logra una liberación completa del contenido de péptido modelo contenido en las NPs. Para comprender el patrón de liberación se deben considerar varios factores, como la cantidad de activo cargado y las propiedades de los polímeros utilizados (tamaño de la cadena del polímero, flexibilidad, movilidad, adsorción de agua), así como las interacciones entre los polímeros y el activo (120). Los perfiles de liberación pueden estar relacionados con los cambios en el estado de transición de los nanosistemas, los cuales fueron inducidos por temperatura (86) como se discutió en el Apartado 2.1.4 cuando se exponen a 37 °C, se pueden observar cambios físico-químicos en los sistemas coloidales. Estos cambios podrían estar relacionados con el movimiento de un estado más compacto a uno más laxo y fluido de los componentes lipídicos y, por tanto, desencadenan una liberación más rápida (89).

El perfil de liberación de las LCMs asociadas con el péptido modelo bioactivo en suspensión muestran una liberación abrupta durante los 5 primeros minutos para luego demostrar un régimen de liberación sostenida. Durante el tiempo que duró el experimento (6 horas) se logró liberar más del 85%. En un estudio donde también se propone vehiculizar activos péptidos a través de una formulación a base de NPs inorgánicas de oro (Au-NPs) obtuvieron también una liberación abrupta del péptido en los primeros minutos. Sin embargo, tras 48h no se logró liberar más del 60% del péptido utilizado, lo que está relacionado con otra característica importante para el proceso de liberación, que es la carga superficial que poseen los componentes de las formulaciones. En el caso de esta investigación tanto el polímero HPMC como el copolímero Gelucire 44/14 son de carácter neutro, lo cual permite que no haya fuertes uniones con el activo (89,95), permitiendo que este se libere mostrando una liberación rápida a los 5 minutos, y luego una pendiente de liberación sostenida. En contraste, la investigación de las Au-NPs los componentes se unen a través de cargas electrostáticas (20), esto tiene relación principalmente con la carga superficial de las moléculas que componen la formulación, el polímero y el activo. En el caso de este estudio, la posible razón de que el sistema no libere toda la dosis es porque existen relaciones electrostáticas importantes que no permiten la difusión y liberación del activo desde la matriz. Esta observación también es similar a lo reportado por Balmert et al., 2015 (121) quienes muestran que se establecen interacciones electrostáticas entre un péptido cargado positivamente y un

polímero cargado negativamente, restringiendo la difusión del péptido a través de la matriz polimérica, lo que desencadenaría una cinética de liberación lenta a partir de las NPs.

Otra consideración importante para evaluar la liberación *in vitro* es la naturaleza del activo, en este caso el péptido modelo es de carácter hidrofílico, por lo que en general este asociado a las LCMs uniéndose entre las cadenas de PEG que se encuentra anclado la superficie de las NPs, por lo tanto, no sorprende esta liberación mayor que cuando las mismas LCMs se asocian a activos de carácter lipofílico, como es el caso de la rodamina (Rho). Chou WH et al., 2020 evaluaron la liberación desde LCMs de 2 activos, uno lipofílico Rho y otro hidrofílico de carácter péptido como la Insulina (Ins) para evaluar el comportamiento y diferencias entre ellos. Principalmente, se describe que las moléculas de Ins pueden interactuar en las cadenas de PEG en la parte exterior, y las moléculas de Rho se pueden ubicar en el núcleo debido a su afinidad lipídica (42). Tras los experimentos de liberación, los resultados muestran que la Ins tiene una liberación casi 18 veces mayor que la liberación que se logró en el ensayo con Rho (42). Debido a que las interacciones de Rho por el núcleo son mucho mayores a las interacciones de la Ins con las cadenas de PEG, esta liberación mayor es esperable, y esto sería el caso de la liberación del péptido que se presentan en esta sección, al ser una molécula hidrofílica que posee afinidad por generar interacciones acuosas y por ende liberarse del sistema. El estudio mencionado concluyó que la liberación de fármacos hidrófilos, como Ins, de las micelas es un proceso rápido, debido a la rápida eliminación del fármaco del medio que crea una diferencia de concentración acuosa aumentada y, por lo tanto, mejora la migración de moléculas. No obstante, en el caso de fármacos poco solubles en agua, como Rho, la liberación de las micelas es más lenta, debido a la alta afinidad por los constituyentes lipídicos y, por tanto, la migración y transferencia de fármacos al agua se ve mucho menos favorecida (122).

Tabla 7: Parámetros de modelado cinético y coeficiente de correlación ajustado (R^2) para perfiles de liberación in vitro LCMs asociadas con el péptido en suspensión e impresas

MODELOS CINÉTICOS	LCMs en suspensión	LCMs impresas
Orden cero $Q(t)=-kt+Q_0$	$R^2= 0,25670$	$R^2= 0,52972$
Primer orden $Q(t)=Q_0 \cdot e^{-kt}$	$R^2= 0,82023$	$R^2= 0,71007$
Korsmeyer-Peppas $Q(t)=k \cdot t^n$	$R^2= 0,99628$ n = 0,4736 kr = 11,530	$R^2= 0,96170$ n=0,5891 kr = 3,655
Higuchi $Q(t)=k \cdot t^{0,5}$	$R^2= 0,99094$	$R^2= 0,95360$
Hixson-Crowell $Q(t) = \left(\frac{D_0^{1/3} - D_t^{1/3}}{D_0^{1/3}} \right) \cdot Q_0$	$R^2= 0,70508$	$R^2= 0,65770$

Los parámetros de modelado cinético y la R^2 se muestran en la tabla 7. Los perfiles de liberación de las LCMs en suspensión como impresas se ajustan mejor al modelo de Korsmeyer-Peppas ($R^2 = 0,99628$ y $R^2= 0,96170$, respectivamente). Además, se calculó el factor de similitud de ambos perfiles ($F2 = 30,14952$) demostrando que ambos son estadísticamente diferentes. Al comparar los perfiles de liberación de las LCMs suspendidas y LCMs impresas, se demuestra que son perfiles claramente diferentes, pero que se ajustan al mismo modelo cinético de Korsmeyer-Peppas que explica la liberación del fármaco mediante dos mecanismos diferentes: la difusión y el transporte del caso II (123).

El modelo Korsmeyer-Peppas se basa en la ley de Fick, y es útil cuando el mecanismo de liberación es controlado por la relajación de las cadenas de polímeros (120). Según este modelo, el valor que toma el exponente 'n' en la fórmula, identifica el mecanismo específico de liberación. Cuando n es menor que 0.5 puede relacionarse con la ley de difusión de Fick,

donde el movimiento de las partículas depende únicamente de la gradiente de concentración. Si n toma valores entre este intervalo $0,5 < n < 0,89$, el perfil de transporte muestra un comportamiento anómalo no Fickiano; donde el activo a difundir puede causar una relajación y deformación del sistema induciendo erosión, hinchamiento y tensión en el material y promoviendo el proceso de difusión, este modelo se aplica principalmente para el análisis del perfil de liberación de fármacos en sistemas poliméricos (124). Por otra parte, si n es igual a $0,89$ ($n = 0,89$), el transporte no Fickiano está relacionado con el mecanismo del caso II; y si el exponente es mayor que $0,89$ ($n > 0,89$), el transporte del fármaco sigue un proceso de difusión no Fickiano conocido como transporte super caso II (125).

La liberación del péptido bioactivo desde la nano suspensión depende de la difusión regida por la ley de Fick ($n = 0,4736$). Esto tiene relación con la inestabilidad de los sistemas micelares a altas temperaturas, induciendo la adsorción de agua a través de los componentes hidrófilos de Gelucire 44/14®. Al transcurrir el tiempo se atraviesan los núcleos lipídicos, lo que permite la difusión de moléculas al medio. Como se discutió anteriormente, las moléculas del péptido modelo están ubicadas en el exterior de la partícula, entre medio las cadenas PEG de la superficie por enlace de hidrógeno y, por lo tanto, son propensas al contacto con el abundante medio acuoso, el cual fuerza una liberación rápida al medio, lo que respondería a la liberación abrupta que mantiene en los primeros 5 minutos, mostrando posteriormente una liberación sostenida en el tiempo.

Por otra parte, al comparar los perfiles de liberación, las LCMs impresas presentan un menor porcentaje de liberación acumulada, y un valor de $n=,5891$. Es decir, presenta un perfil de liberación anómalo no fickiano de transferencia de masa, donde la liberación del activo ocurre mediante un proceso controlado por hinchamiento del polímero. La matriz polimérica que inicialmente se encuentra en estado cristalino, sufre una transición vítrea y forma un hidrogel al contacto con el agua. Este proceso está relacionado con la difusión del péptido desde y a través del polímero HPMC, bajo difusión a contracorriente de agua hacia el interior del este (126). El HPMC es un polímero hidrofílico el cual en contacto con medio acuoso comienza su proceso de gelificación, mediante el cual retiene agua dando paso al proceso de hinchazón, la difusión prolongada del péptido podría relacionarse con la interacción del péptido y el polímero interactuando con sus grupos polares, lo que resulte en una liberación

retardada al compararla con las LCMs en suspensión, mostrando un comportamiento de liberación más controlado en el tiempo (86). En ambos casos los perfiles de liberación de estos sistemas se caracterizan por presentar una disminución de la velocidad de liberación con el tiempo, que se relaciona con la mayor distancia que tiene que recorrer el fármaco dentro de la matriz para difundir. Los resultados obtenidos muestran que ambas formulaciones son diferentes entre sí ($f_2 = 30,149$).

Un resultado similar se obtuvo en el estudio de LCMs con Ins, donde se reportó que el perfil de LCMs impresas era muy diferentes a LCMs en suspensión (42), lo que tiene relación con la presencia de la matriz polimérica en el caso de los films, que funciona como una barrera para la liberación rápida, manteniendo un control en la liberación y produciendo una liberación prolongada (116). En las LCMs el mecanismo de liberación del fármaco está relacionado con la naturaleza del fármaco, del polímero, la proporción de formulación, la interacciones físico-químicas entre los componentes y el proceso de elaboración (127) En ese sentido, Gelucire 44/14® actúa como un tensioactivo dispersable en agua y mejora la humectabilidad al reducir la tensión superficial entre las LCMs (86).

4 CONCLUSIÓN

Las micelas de núcleo lipídico surgen como una alternativa para el desarrollo de una formulación capaz de lograr la administración de un péptido modelo de fármaco antihipertensivo, el cual ha presentado potente actividad anti hipertrófica y antihipertensiva en estudios *in vitro* e *in vivo*, pero que posee grandes desafíos que superar para su administración exitosa. Las LCMs constituyen un sistema de vehiculización y entrega de fármacos biológicos como los fármacos péptidos, con potencial para ser administrados a través de la vía de administración bucal como vía alternativa, y que brinda ventajas relevantes a este grupo de fármacos, como la aplicación directa en el sitio de absorción, evitar el primer paso hepático, y menor complejidad en términos de pH y presencia de enzimas. En esta investigación se logró desarrollar un sistema de entrega de fármaco peptídico a través de films bucales de HPMC, que fueron impresos por la técnica de inyección de tinta, con una formulación de LCMs asociadas al péptido modelo de fármaco bioactivo con éxito.

Se sintetizaron LCMs y se asociaron al péptido, mediante un proceso de emulsificación en caliente de baja energía descrito por Fritz, et al. (44) Se caracterizaron LCMs vacías y asociadas con el péptido en 2 concentraciones (F1=0,08% y F2=0,4% m/m) las que fueron caracterizadas fisicoquímicamente por DLS. Se realizaron micrografías SEM, las cuales demostraron que las LCMs presentan forma esférica, con una eficiencia de asociación mayor al 90%. Se realizó un estudio de estabilidad de almacenamiento de las LCMs en suspensión, demostrando que la temperatura afecta los sistemas coloidales, e indicando que las formulaciones a 37 °C tendieron a ser más susceptibles a los mecánicos de inestabilidad de aquellas a 4 °C.

Se desarrollaron films poliméricos de HPMC, los que fueron impresos con las LCMs por inyección de tinta, y fueron cuantificados por HPLC, mostrando una distribución de microgota homogénea en el área de impresión utilizada, y las impresiones se realizaron con éxito. La evaluación de las propiedades mecánicas y mucoadhesivas demuestran que la formulación propuesta aumenta su elasticidad tras el proceso de la impresión, debido a la adición de plastificantes, como la glicerina que se encuentra tanto en la fabricación del film

de HPMC, como en la tinta, ya que permite simular la viscosidad y la tensión superficial de una tinta convencional para poder ser reconocido por la impresora. Además, el agua también actúa como plastificante, confiriéndole aún más elasticidad. En otra arista, las propiedades mucoadhesivas demostraron verse modificadas tras el proceso de impresión del film de HPMC, sin embargo, este sustrato sigue siendo óptimo ya que conserva de igual forma mucoadhesión, al compararlo con otros polímeros derivados de la celulosa como EC.

Por otra parte, Se realizó con éxito el estudio de liberación *in vitro* del péptido desde las LCMs en suspensión e impresas sobre el film de HPMC, demostrando que se produce una mayor liberación del péptido en suspensión, al compararlo a cuando se encuentra sobre el film polimérico de HPMC, conduciendo a una liberación controlada al compararlas con las LCMs en suspensión. Ambas formulaciones se ajustaron al modelo cinético Kormeyer-Peppas, el cual está relacionado con la liberación desde sistemas poliméricos.

A la luz de los resultados obtenidos, la formulación de micelas de núcleo lipídico impresas demostró controlar la liberación *in vitro*, mostrando características prometedoras para la administración bucal de péptidos.

5 REFERENCIAS

1. Informe_HTA_ENS_2016_2017.pdf [Internet]. [citado 25 de noviembre de 2023]. Disponible en: http://epi.minsal.cl/wp-content/uploads/2021/05/Informe_HTA_ENS_2016_2017.pdf
2. Contreras F, Terán L, Barreto N, de la Parte M, Simonovis N, Velasco M. Aspectos Funcionales del Sistema Renina Angiotensina Aldosterona y Bloqueantes de los Receptores ATI de Angiotensina II en Hipertensión Arterial. Arch Venez Farmacol Ter. julio de 2000;19(2):121-8.
3. Dielis AWJH, Smid M, Spronk HMH, Hamulyak K, Kroon AA, ten Cate H, et al. The Prothrombotic Paradox of Hypertension. Hypertension. diciembre de 2005;46(6):1236-42.
4. Ocaranza MP, Michea L, Chiong M, Lagos CF, Lavandero S, Jalil JE. Recent insights and therapeutic perspectives of angiotensin-(1–9) in the cardiovascular system. Clin Sci. 1 de noviembre de 2014;127(9):549-57.
5. Angiotensin-(1–7) and angiotensin-(1–9): function in cardiac and vascular remodelling | Clinical Science | Portland Press [Internet]. [citado 25 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://portlandpress.com/clinsci/article-abstract/126/12/815/69167/Angiotensin-1-7-and-angiotensin-1-9-function-in?redirectedFrom=fulltext>
6. Mishra S, Ling H, Grimm M, Zhang T, Bers DM, Brown JH. Cardiac Hypertrophy and Heart Failure Development Through Gq and CaM Kinase II Signaling. J Cardiovasc Pharmacol. diciembre de 2010;56(6):598-603.
7. Norambuena Soto I, Ocaranza MP, Cancino Arenas N, Sanhueza Olivares F, Villar Fincheira P, Leiva Navarrete S, et al. Angiotensin-(1-9) prevents vascular remodeling by decreasing vascular smooth muscle cell dedifferentiation through a FoxO1-dependent mechanism. Biochem Pharmacol [Internet]. 2020 [citado 25 de noviembre de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/178678>
8. González MAB, Rosado-Bosque A, Escalante-Acosta B. Sistema renina angiotensina y enfermedad isquémica del corazón. 18(2).
9. Barber Fox MO, Barber Gutiérrez E. El sistema renina-angiotensina y el riñón en la fisiopatología de la hipertensión arterial esencial. Rev Cuba Investig Bioméd. septiembre de 2003;22(3):192-8.
10. Expósito N, Eugenio J. Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas de receptores de angiotensina II en insuficiencia cardíaca. Rev Cuba Med. febrero de 2004;43(1):0-0.

11. Staessen JA, Wang J, Bianchi G, Birkenhäger WH. Essential hypertension. *The Lancet*. 10 de mayo de 2003;361(9369):1629-41.
12. José Soler M, Lloveras J, Batlle D. Enzima conversiva de la angiotensina 2 y su papel emergente en la regulación del sistema renina-angiotensina. *Med Clínica*. 1 de julio de 2008;131(6):230-6.
13. Mendoza-Torres E, Riquelme JA, Vielma A, Sagredo AR, Gabrielli L, Bravo-Sagua R, et al. Protection of the myocardium against ischemia/reperfusion injury by angiotensin-(1-9) through an AT2R and Akt-dependent mechanism. *Pharmacol Res*. 1 de septiembre de 2018;135:112-21.
14. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system--an endocrine and paracrine system. *Endocrinology*. junio de 2003;144(6):2179-83.
15. Ocaranza MP, Moya J, Barrientos V, Alzamora R, Hevia D, Morales C, et al. Angiotensin-(1-9) reverses experimental hypertension and cardiovascular damage by inhibition of the angiotensin converting enzyme/Ang II axis. *J Hypertens*. abril de 2014;32(4):771-83.
16. Gonzalez L, Novoa U, Moya J, Gabrielli L, Jalil JE, García L, et al. Angiotensin-(1-9) reduces cardiovascular and renal inflammation in experimental renin-independent hypertension. *Biochem Pharmacol*. octubre de 2018;156:357-70.
17. Norambuena-Soto I, Lopez-Crisosto C, Martinez-Bilbao J, Hernandez-Fuentes C, Parra V, Lavandero S, et al. Angiotensin-(1-9) in hypertension. *Biochem Pharmacol*. septiembre de 2022;203:115183.
18. Zheng H, Pu SY, Fan XF, Li XS, Zhang Y, Yuan J, et al. Treatment with angiotensin-(1-9) alleviates the cardiomyopathy in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biochem Pharmacol*. 1 de mayo de 2015;95(1):38-45.
19. Cha SA, Park BM, Kim SH. Angiotensin-(1-9) ameliorates pulmonary arterial hypertension via angiotensin type II receptor. *Korean J Physiol Pharmacol Off J Korean Physiol Soc Korean Soc Pharmacol*. julio de 2018;22(4):447-56.
20. Sepúlveda-Rivas S, Leal MS, Pedrozo Z, Kogan MJ, Ocaranza MP, Morales JO. Nanoparticle-Mediated Angiotensin-(1-9) Drug Delivery for the Treatment of Cardiac Hypertrophy. *Pharmaceutics*. 1 de junio de 2021;13(6):822.
21. Flores-Munoz M, Work LM, Douglas K, Denby L, Dominiczak AF, Graham D, et al. Angiotensin-(1-9) attenuates cardiac fibrosis in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat via the angiotensin type 2 receptor. *Hypertens Dallas Tex* 1979. febrero de 2012;59(2):300-7.
22. Núñez Aliste AA. Evaluación de estabilidad y bioactividad del péptido retro-enantio análogo de angiotensina-(1-9). 2019 [citado 25 de noviembre de 2023]; Disponible en: <https://repositorio.uchile.cl/handle/2250/181604>

23. HCWH Europe Nanoreport.pdf [Internet]. [citado 25 de noviembre de 2023]. Disponible en: <https://noharm-europe.org/sites/default/files/documents-files/2462/HCWH%20Europe%20Nanoreport.pdf>
24. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: The state of the art. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 de febrero de 2015;126:631-48.
25. Rawal M, Singh A, Amiji MM. Quality-by-Design Concepts to Improve Nanotechnology-Based Drug Development. *Pharm Res*. 3 de septiembre de 2019;36(11):153.
26. Park AH Kinam, editor. *Drug Delivery: Fundamentals and Applications*, Second Edition. 2.^a ed. Boca Raton: CRC Press; 2016. 632 p.
27. Soares S, Sousa J, Pais A, Vitorino C. Nanomedicine: Principles, Properties, and Regulatory Issues. *Front Chem*. 20 de agosto de 2018;6:360.
28. Raval N, Maheshwari R, Kalyane D, Youngren-Ortiz SR, Chougule MB, Tekade RK. Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. En: *Basic Fundamentals of Drug Delivery* [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 22 de noviembre de 2023]. p. 369-400. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128179093000108>
29. Banerjee A, Qi J, Gogoi R, Wong J, Mitragotri S. Role of nanoparticle size, shape and surface chemistry in oral drug delivery. *J Control Release Off J Control Release Soc*. 28 de septiembre de 2016;238:176-85.
30. McDowell G, Slevin M, Krupinski J. Nanotechnology for the treatment of coronary in stent restenosis: a clinical perspective. *Vasc Cell*. 18 de abril de 2011;3:8.
31. Ahlawat J, Henriquez G, Narayan M. Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles. *Molecules*. septiembre de 2018;23(9):2157.
32. Hillaireau H, Couvreur P. Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci*. 1 de septiembre de 2009;66(17):2873-96.
33. Vélez-Reséndiz JM, Vélez-Arvízu JJ. Nanodispositivos para la prevención y tratamiento de enfermedades cardiovasculares. *Gac Med Mex*. 2018;154(3):358-67.
34. Irache JM. Nanomedicine: nanoparticles with medical applications. *An Sist Sanit Navar*. abril de 2008;31(1):7-10.
35. Wei C, Wei W, Morris M, Kondo E, Gorbounov M, Tomalia DA. Nanomedicine and drug delivery. *Med Clin North Am*. septiembre de 2007;91(5):863-70.
36. Núñez C, Estévez SV, del Pilar Chantada M. Inorganic nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *JBIC J Biol Inorg Chem*. 1 de mayo de 2018;23(3):331-45.

37. Ma X, Luan Z, Li J. Inorganic Nanoparticles-Based Systems in Biomedical Applications of Stem Cells: Opportunities and Challenges. *Int J Nanomedicine*. 2023;18:143-82.
38. Rozo AJ, Cox MH, Devitt A, Rothnie AJ, Goddard AD. Biophysical analysis of lipidic nanoparticles. *Methods*. 1 de agosto de 2020;180:45-55.
39. Zhao YQ, Li LJ, Zhou EF, Wang JY, Wang Y, Guo LM, et al. Lipid-Based Nanocarrier Systems for Drug Delivery: Advances and Applications. *Pharm Fronts*. junio de 2022;04(02):e43-60.
40. Banerjee A, Onyuksel H. Peptide delivery using phospholipid micelles. *WIREs Nanomedicine Nanobiotechnology*. septiembre de 2012;4(5):562-74.
41. Ganesan P, Narayanasamy D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. *Sustain Chem Pharm*. diciembre de 2017;6:37-56.
42. Chou WH, Galaz A, Jara MO, Gamboa A, Morales JO. Drug-Loaded Lipid-Core Micelles in Mucoadhesive Films as a Novel Dosage Form for Buccal Administration of Poorly Water-Soluble and Biological Drugs. *Pharmaceutics*. 30 de noviembre de 2020;12(12):1168.
43. Al Musaimi O, Lombardi L, Williams DR, Albericio F. Strategies for Improving Peptide Stability and Delivery. *Pharmaceutics*. octubre de 2022;15(10):1283.
44. Fritz HF, Ortiz AC, Velaga SP, Morales JO. Preparation of a novel lipid-core micelle using a low-energy emulsification method. *Drug Deliv Transl Res*. diciembre de 2018;8(6):1807-14.
45. Ortiz AC, Yañez O, Salas-Huenuleo E, Morales JO. Development of a Nanostructured Lipid Carrier (NLC) by a Low-Energy Method, Comparison of Release Kinetics and Molecular Dynamics Simulation. *Pharmaceutics*. 10 de abril de 2021;13(4):531.
46. Urrejola MC, Soto LV, Zumarán CC, Peñaloza JP, Álvarez B, Fuentesvilla I, et al. Sistemas de Nanopartículas Poliméricas II: Estructura, Métodos de Elaboración, Características, Propiedades, Biofuncionalización y Tecnologías de Auto-Ensamblaje Capa por Capa (Layer-by-Layer Self-Assembly). *Int J Morphol*. diciembre de 2018;36(4):1463-71.
47. Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. Buccal penetration enhancers--how do they really work? *J Control Release Off J Control Release Soc*. 20 de junio de 2005;105(1-2):1-15.
48. Otsuka H, Nagasaki Y, Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv Drug Deliv Rev*. febrero de 2003;55(3):403-19.

49. Torchilin V. Lipid-Core Micelles for Targeted Drug Delivery. *Curr Drug Deliv.* 1 de octubre de 2005;2(4):319-27.
50. Morales JO, McConville JT. Manufacture and characterization of mucoadhesive buccal films. *Eur J Pharm Biopharm.* febrero de 2011;77(2):187-99.
51. Montenegro-Nicolini M, Morales JO. Overview and Future Potential of Buccal Mucoadhesive Films as Drug Delivery Systems for Biologics. *AAPS PharmSciTech.* enero de 2017;18(1):3-14.
52. Gilhotra RM, Ikram M, Srivastava S, Gilhotra N. A clinical perspective on mucoadhesive buccal drug delivery systems. *J Biomed Res.* marzo de 2014;28(2):81-97.
53. Jacob S, Nair AB, Boddu SHS, Gorain B, Sreeharsha N, Shah J. An Updated Overview of the Emerging Role of Patch and Film-Based Buccal Delivery Systems. *Pharmaceutics.* 5 de agosto de 2021;13(8):1206.
54. Salamatmiller N, Chittchang M, Johnston T. The use of mucoadhesive polymers in buccal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 3 de noviembre de 2005;57(11):1666-91.
55. Macedo AS, Castro PM, Roque L, Thomé NG, Reis CP, Pintado ME, et al. Novel and revisited approaches in nanoparticle systems for buccal drug delivery. *J Controlled Release.* 10 de abril de 2020;320:125-41.
56. Chou WH, Gamboa A, Morales JO. Inkjet printing of small molecules, biologics, and nanoparticles. *Int J Pharm.* mayo de 2021;600:120462.
57. Zhao S, Li J, Zhou Y, Huang L, Li Y, Xu J, et al. Lipid Nanoparticles-Encapsulated YF4: A Potential Therapeutic Oral Peptide Delivery System for Hypertension Treatment. *Front Pharmacol.* 19 de febrero de 2019;10:102.
58. Nguyen S, Hiorth M. Advanced drug delivery systems for local treatment of the oral cavity. *Ther Deliv.* 2015;6(5):595-608.
59. Leung DH. Development of Nanosuspension Formulations Compatible with Inkjet Printing for the Convenient and Precise Dispensing of Poorly Soluble Drugs. *Pharmaceutics.* febrero de 2022;14(2):449.
60. Safhi AY, Siddique W, Zaman M, Sarfraz RM, Shafeeq Ur Rahman M, Mahmood A, et al. Statistically Optimized Polymeric Buccal Films of Eletriptan Hydrobromide and Itopride Hydrochloride: An In Vivo Pharmacokinetic Study. *Pharmaceutics.* noviembre de 2023;16(11):1551.
61. Kundu J, Patra C, Kundu SC. Design, fabrication and characterization of silk fibroin-HPMC-PEG blended films as vehicle for transmucosal delivery. *Mater Sci Eng C.* 1 de diciembre de 2008;28(8):1376-80.

62. Kraisit P, Limmatvapirat S, Luangtana-Anan M, Sriamornsak P. Buccal administration of mucoadhesive blend films saturated with propranolol loaded nanoparticles. *Asian J Pharm Sci.* 1 de enero de 2018;13(1):34-43.
63. Shipp L, Liu F, Kerai-Varsani L, Okwuosa TC. Buccal films: A review of therapeutic opportunities, formulations & relevant evaluation approaches. *J Controlled Release.* 1 de diciembre de 2022;352:1071-92.
64. de Carvalho ACW, Paiva NF, Demonari IK, Duarte MPF, do Couto RO, de Freitas O, et al. The Potential of Films as Transmucosal Drug Delivery Systems. *Pharmaceutics.* noviembre de 2023;15(11):2583.
65. Montenegro-Nicolini M, Reyes PE, Jara MO, Vuddanda PR, Neira-Carrillo A, Butto N, et al. The Effect of Inkjet Printing over Polymeric Films as Potential Buccal Biologics Delivery Systems. *AAPS PharmSciTech.* noviembre de 2018;19(8):3376-87.
66. Hamley IW. Lipopeptides for Vaccine Development. *Bioconjug Chem.* 18 de agosto de 2021;32(8):1472-90.
67. Narayanaswamy R, Wang T, Torchilin VP. Improving Peptide Applications Using Nanotechnology. *Curr Top Med Chem.* 2016;16(3):253-70.
68. Puri A, Loomis K, Smith B, Lee JH, Yavlovich A, Heldman E, et al. Lipid-based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2009;26(6):523-80.
69. tn-90710-HILIC-TG-tn90710-es.pdf [Internet]. [citado 13 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CMD/Technical-Notes/tn-90710-HILIC-TG-tn90710-es.pdf>
70. Castro P, Madureira R, Sarmiento B, Pintado M. Tissue-based in vitro and ex vivo models for buccal permeability studies. En: *Concepts and Models for Drug Permeability Studies* [Internet]. Elsevier; 2016 [citado 22 de noviembre de 2023]. p. 189-202. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081000946000122>
71. Pinto S, Pintado ME, Sarmiento B. *In vivo, ex vivo* and *in vitro* assessment of buccal permeation of drugs from delivery systems. *Expert Opin Drug Deliv.* 2 de enero de 2020;17(1):33-48.
72. Nicolazzo JA, Reed BL, Finnin BC. The Effect of Various In Vitro Conditions on the Permeability Characteristics of the Buccal Mucosa. *J Pharm Sci.* diciembre de 2003;92(12):2399-410.
73. Zhang Y, Huo M, Zhou J, Zou A, Li W, Yao C, et al. DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *AAPS J.* 6 de abril de 2010;12(3):263-71.

74. Sutton D, Nasongkla N, Blanco E, Gao J. Functionalized Micellar Systems for Cancer Targeted Drug Delivery. *Pharm Res.* 18 de mayo de 2007;24(6):1029-46.
75. Sawant RR, Sawant RM, Torchilin VP. Mixed PEG-PE/vitamin E tumor-targeted immunomicelles as carriers for poorly soluble anti-cancer drugs: improved drug solubilization and enhanced in vitro cytotoxicity. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* septiembre de 2008;70(1):51-7.
76. Ravazzolo E, Salmaso S, Mastrotto F, Bersani S, Gallon E, Caliceti P. pH-responsive lipid core micelles for tumour targeting. *Eur J Pharm Biopharm.* abril de 2013;83(3):346-57.
77. Mudalige T, Qu H, Van Haute D, Ansar SM, Paredes A, Ingle T. Characterization of Nanomaterials. En: *Nanomaterials for Food Applications [Internet]. Elsevier; 2019 [citado 22 de noviembre de 2023].* p. 313-53. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128141304000117>
78. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, Hasanzadeh Davarani F, Javanmard R, Dokhani A, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics.* 18 de mayo de 2018;10(2):57.
79. Heurtault B. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials.* octubre de 2003;24(23):4283-300.
80. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 1). *Trop J Pharm Res.* 9 de mayo de 2013;12(2):255-64.
81. Wang Y, Zheng Y, Zhang L, Wang Q, Zhang D. Stability of nanosuspensions in drug delivery. *J Controlled Release.* 28 de diciembre de 2013;172(3):1126-41.
82. Sawant RR, Torchilin VP. Multifunctionality of lipid-core micelles for drug delivery and tumour targeting. *Mol Membr Biol.* octubre de 2010;27(7):232-46.
83. Al-Amili M, Jin Z, Wang Z, Guo S. Self-Assembled Micelles of Amphiphilic PEGylated Drugs for Cancer Treatment. *Curr Drug Targets.* 2021;22(8):870-81.
84. Gallego-Urrea JA, Tuoriniemi J, Hassellöv M. Applications of particle-tracking analysis to the determination of size distributions and concentrations of nanoparticles in environmental, biological and food samples. *TrAC Trends Anal Chem.* marzo de 2011;30(3):473-83.
85. Chen R, Ni S, Chen W, Liu M, Feng J, Hu K. Improved Anti-Triple Negative Breast Cancer Effects of Docetaxel by RGD-Modified Lipid-Core Micelles. *Int J Nanomedicine.* 2021;16:5265-79.
86. Svensson A, Neves C, Cabane B. Hydration of an amphiphilic excipient, Gelucire® 44/14. *Int J Pharm.* 20 de agosto de 2004;281(1):107-18.

87. Kulthe SS, Inamdar NN, Choudhari YM, Shirolikar SM, Borde LC, Mourya VK. Mixed micelle formation with hydrophobic and hydrophilic Pluronic block copolymers: Implications for controlled and targeted drug delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 1 de diciembre de 2011;88(2):691-6.
88. Owen SC, Chan DPY, Shoichet MS. Polymeric micelle stability. *Nano Today*. 1 de febrero de 2012;7(1):53-65.
89. Chambin O, Jannin V. Interest of Multifunctional Lipid Excipients: Case of Gelucire® 44/14. *Drug Dev Ind Pharm*. enero de 2005;31(6):527-34.
90. Phan HT, Haes AJ. What Does Nanoparticle Stability Mean? *J Phys Chem C Nanomater Interfaces*. 11 de julio de 2019;123(27):16495-507.
91. Liz-Marzán LM, Correa-Duarte MA, Pastoriza-Santos I, Mulvaney P, Ung T, Giersig M, et al. Chapter 5 - CORE-SHELL NANOPARTICLES AND ASSEMBLIES THEREOF. En: Nalwa HS, editor. *Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials* [Internet]. Burlington: Academic Press; 2001 [citado 2 de enero de 2024]. p. 189-237. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780125139106500384>
92. Abdelwahed W, Degobert G, Stainmesse S, Fessi H. Freeze-drying of nanoparticles: Formulation, process and storage considerations. *Adv Drug Deliv Rev*. 30 de diciembre de 2006;58(15):1688-713.
93. Nelson DL. *Lehninger: principles of biochemistry*. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company; 2005. 71 p.
94. Vázquez-Luna A, Santiago M, Rivadeneyra-Domínguez E, Díaz-Sobac R. Películas comestibles a base de almidón nanoestructurado como material de barrera a la humedad. *CienciaUAT*. 2019;13(2):152-64.
95. Khater ES, Bahnasawy A, Gabal BA, Abbas W, Morsy O. Effect of adding nano-materials on the properties of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) edible films. *Sci Rep*. 28 de marzo de 2023;13:5063.
96. Kittipongpatana OS, Trisopon K, Wattanaarsakit P, Kittipongpatana N. Fabrication and Characterization of Orodispersible Composite Film from Hydroxypropylmethyl Cellulose-Crosslinked Carboxymethyl Rice Starch. *Membranes*. 4 de junio de 2022;12(6):594.
97. Kondaveeti S, Damato TC, Carmona-Ribeiro AM, Sierakowski MR, Petri DFS. Sustainable hydroxypropyl methylcellulose/xyloglucan/gentamicin films with antimicrobial properties. *Carbohydr Polym*. 1 de junio de 2017;165:285-93.
98. Ouda GI, Dahmash EZ, Alyami H, Iyire A. A Novel Technique to Improve Drug Loading Capacity of Fast/Extended Release Orally Dissolving Films with Potential for

- Paediatric and Geriatric Drug Delivery. *AAPS PharmSciTech*. 7 de mayo de 2020;21(4):126.
99. Siddiqui M, Garg G, Sharma P. A Short Review on «A Novel Approach in Oral Fast Dissolving Drug Delivery System and Their Patents». *Adv Biol Res*. 30 de noviembre de 2010;5.
100. Izdebska-Podsiadły J, Thomas S. *Printing on Polymers: Fundamentals and Applications*. William Andrew; 2015. 446 p.
101. Vuddanda PR, Alomari M, Dodoo CC, Trenfield SJ, Velaga S, Basit AW, et al. Personalisation of warfarin therapy using thermal ink-jet printing. *Eur J Pharm Sci*. 30 de mayo de 2018;117:80-7.
102. SEVİNÇ ÖZAKAR R, ÖZAKAR E. Current Overview of Oral Thin Films. *Turk J Pharm Sci*. febrero de 2021;18(1):111-21.
103. Karlsson A, Singh S. Thermal and Mechanical Characterization of Cellulose Acetate Phthalate Films for Pharmaceutical Tablet Coating: Effect of Humidity During Measurements. *Drug Dev Ind Pharm*. 1 de octubre de 1998;24:827-34.
104. Wasilewska K, Winnicka K. How to assess orodispersible film quality? A review of applied methods and their modifications. *Acta Pharm Zagreb Croat*. 1 de junio de 2019;69(2):155-76.
105. Design and Characterization of Agarose/HPMC Buccal Films Bearing Ondansetron HCl In Vitro and In Vivo: Enhancement Using Iontophoretic and Chemical Approaches [Internet]. [citado 27 de diciembre de 2023]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2022/1662194/>
106. Buanz ABM, Belaunde CC, Soutari N, Tuleu C, Gul MO, Gaisford S. Ink-jet printing versus solvent casting to prepare oral films: Effect on mechanical properties and physical stability. *Int J Pharm*. 30 de octubre de 2015;494(2):611-8.
107. Ghadermazi R, Hamdipour S, Sadeghi K, Ghadermazi R, Khosrowshahi Asl A. Effect of various additives on the properties of the films and coatings derived from hydroxypropyl methylcellulose-A review. *Food Sci Nutr*. noviembre de 2019;7(11):3363-77.
108. Li X, Tu Z, Sha X, Ye Y, Li Z. Flavor, antimicrobial activity, and physical properties of composite film prepared with different surfactants. *Food Sci Nutr*. 4 de junio de 2020;8(7):3099-109.
109. Akhtar MJ, Jacquot M, Jasniewski J, Jacquot C, Imran M, Jamshidian M, et al. Antioxidant capacity and light-aging study of HPMC films functionalized with natural plant extract. *Carbohydr Polym*. 1 de agosto de 2012;89(4):1150-8.

110. V. A, Badwaik LS. Recent advancement in improvement of properties of polysaccharides and proteins based packaging film with added nanoparticles: A review. *Int J Biol Macromol.* 1 de abril de 2022;203:515-25.
111. Jiménez A, Fabra MJ, Talens P, Chiralt A. Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. *Carbohydr Polym.* 15 de octubre de 2010;82(3):585-93.
112. Agarwal S, Murthy RSR. Effect of Different Polymer Concentration on Drug Release Rate and Physicochemical Properties of Mucoadhesive Gastroretentive Tablets. *Indian J Pharm Sci.* 2015;77(6):705-14.
113. Boddupalli BM, Mohammed ZNK, Nath RA, Banji D. Mucoadhesive drug delivery system: An overview. *J Adv Pharm Technol Res.* 2010;1(4):381-7.
114. Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through mucus. *Adv Drug Deliv Rev.* 11 de junio de 2001;48(2):173-93.
115. Bansil R, Turner BS. Mucin structure, aggregation, physiological functions and biomedical applications. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 1 de junio de 2006;11(2):164-70.
116. Andrews GP, Lavery TP, Jones DS. Mucoadhesive polymeric platforms for controlled drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV.* marzo de 2009;71(3):505-18.
117. Bagul U, Gujar K, Dhat S, Aphale S, Bhavsar M. In vitro study of mucoadhesive strength of polymers for mucoadhesive drug delivery systems. *Int J Curr Pharm Res.* 1 de enero de 2009;1:42-6.
118. Majithiya RJ, Raval AJ, Umrethia M, Ghosh PK, Rayasa M. Enhancement of Mucoadhesion by Blending Anionic, Cationic and Nonionic Polymers. *Drug Deliv Technol.* 1 de enero de 2008;8:40-5.
119. Bernkop-Schnürch A, Humenberger C, Valenta C. Basic studies on bioadhesive delivery systems for peptide and protein drugs. *Int J Pharm.* 14 de mayo de 1998;165(2):217-25.
120. Korsmeyer RW, Gurny R, Doelker E, Buri P, Peppas NA. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers. *Int J Pharm.* 1 de mayo de 1983;15(1):25-35.
121. Balmert SC, Zmolek AC, Glowacki AJ, Knab TD, Rothstein SN, Wokpetah JM, et al. Positive charge of “sticky” peptides and proteins impedes release from negatively charged PLGA matrices. *J Mater Chem B.* 3 de junio de 2015;3(23):4723-34.
122. Dungan S. Interfacial science and the creation of nanoparticles. En: *Nanotechnology and Functional Foods: Effective Delivery of Bioactive Ingredients.* 2015. p. 52-68.

123. Bruschi ML, editor. 5 - Mathematical models of drug release. En: Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems [Internet]. Woodhead Publishing; 2015 [citado 3 de enero de 2024]. p. 63-86. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081000922000059>
124. Gurny R, Doelker E, Peppas NA. Modelling of sustained release of water-soluble drugs from porous, hydrophobic polymers. *Biomaterials*. 1 de enero de 1982;3(1):27-32.
125. Gao Y, Zuo J, Bou-Chacra N, Pinto T de JA, Clas SD, Walker RB, et al. *In Vitro* Release Kinetics of Antituberculosis Drugs from Nanoparticles Assessed Using a Modified Dissolution Apparatus. *BioMed Res Int*. 10 de julio de 2013;2013:e136590.
126. Grenier L, González R. Sistemas biomaterial-droga para la liberación controlada de antibióticos. *Biomédica*. 1994;14(1):30-8.
127. Son GH, Lee BJ, Cho CW. Mechanisms of drug release from advanced drug formulations such as polymeric-based drug-delivery systems and lipid nanoparticles. *J Pharm Investig*. 1 de julio de 2017;47(4):287-96.

