



Departamento de Ciencias y Tecnología Farmacéuticas
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**Optimización de formulaciones de nanovehículos para
biomacromoléculas y análisis de su rendimiento y desempeño**

PATROCINANTE

Prof. Javier O. Morales M.
Laboratorio de *Drug Delivery*

DIRECTOR DE MEMORIA

Prof. Javier O. Morales M.
Laboratorio de *Drug Delivery*

Proyecto de Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico

Víctor Alí De Armas Cáceres

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo, gracias a mi profe guía Javier Morales por tanta paciencia mostrada y tantos consejos dados, gracias por la gran guía que brindó.

Gracias a cada miembro del laboratorio Drug Delivery por hacer de los arduos días de trabajo mucho más agradables.

Gracias a los miembros del Laboratorio de Nanotoxicología por su buena voluntad al momento de prestar y facilitar diversos instrumentos.

Muy especial agradecimiento a Mariela, Hans, Víctor, Miguel Montenegro y Jara por ayudarme tanto en tantas partes de la tesis, cambiar mi punto de vista, ayudarme con procedimientos, etc.

DEDICATORIA

Dedicado a mi familia principalmente, mi mamá y papá por apañarme tanto, por no dejarme caer aun cuando ni yo me creía capaz.

A mi hermana, por a pesar de una lejanía relativa, siempre siento tu apoyo y cariño.

A Mónica por darme tantos consejos, tantas ayudas, tanto ánimo.

A Gabriel y Miguel por ser dos nuevas razones para seguir adelante, para hacer las cosas bien.

A todo el equipo de handball que tanto alegraron mis días, por ese compañerismo incondicional. Al profe Mati que tantas cosas me enseñó que puedo ocupar tanto fuera como dentro de la cancha.

A los amigos que estuvieron siempre Chalo, Hans, Katu, Pau, León, Gabo y Karla gracias por hacer de estos casi 7 años los mejores.

Y obvio, no me iba a olvidar de ti, especialmente esto es para ti, por aguantarme, levantarme, guiarme, enseñarme en resumen... ser la mejor compañera de vida, Javi gracias por estos más de 6 años.

Finalmente, a ti weli... Siempre pensé que estarías en ese momento, y creo que así será.

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|--|-----|
| Tabla de contenidos | iv |
| Índice de Tablas | vi |
| Índice de Figuras..... | vii |
| Resumen..... | x |
| Abstract | xi |
| Introducción | 1 |
| Hipótesis..... | 8 |
| Objetivo general..... | 8 |
| Objetivos específicos | 8 |
| Materiales..... | 10 |
| Métodos..... | 11 |
| Diseño de formulaciones por medio del uso de un diagrama ternario | 11 |
| Caracterización por dispersión dinámica de la luz (DLS) y velocimetría láser Doppler | 13 |
| Cinética de liberación | 16 |
| Actividad enzimática | 16 |
| Estudio de la estructura secundaria de la enzima por medio de dicroísmo circular..... | 17 |
| Resultados y Discusión | 19 |
| Exploración de formulaciones por medio de diagrama ternario.. | 19 |

| | |
|--|----|
| Caracterización fisicoquímica..... | 23 |
| Estudio de estabilidad | 29 |
| Incorporación de enzima modelo en nanoestructuras seleccionadas | 32 |
| Eficiencia de encapsulación | 37 |
| Estudio de liberación..... | 39 |
| Actividad enzimática | 41 |
| Dicroísmo circular | 43 |
| Conclusiones | 46 |
| Proyecciones | 47 |
| Limitaciones..... | 47 |
| Referencias..... | 49 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Primeras formulaciones a realizar, donde se muestra la distribución en % de los tres ingredientes, REF es a partir de una formulación descrita anteriormente | 20 |
| Tabla 2. Nuevas formulaciones estudiadas, se estableció como ingrediente principal el agua, y se probaron formulaciones con proporciones más parecidas a REF | 22 |
| Tabla 3 Formulaciones de NE seleccionadas para agregar la biomacromolécula y porcentaje agregado, este porcentaje es de acuerdo a la masa de migliol y lecitina. | 33 |
| Tabla 4 Formulaciones de NC seleccionadas para agregar la biomacromolécula porcentaje agregado, este porcentaje es de acuerdo a la masa de migliol y lecitina. Todas con una concentración de 1% del polímero. | 34 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 Diagrama ternario, se muestran los porcentajes de cada ingrediente del mismo color..... | 12 |
| Figura 2. En puntos negros se representan las proporciones nombradas en la tabla 1 de las primeras formulaciones analizadas | 20 |
| Figura 3 Zona negra señala las formulaciones que posiblemente dieron emulsiones W/O, con grandes tamaños y PDI..... | 21 |
| Figura 4 Zona de mayor concentración de agua en el diagrama ternario, muestra las formulaciones presentadas en la tabla 2 | 22 |
| Figura 5 Nueva zona (amarilla) muestra las formulaciones con gran tamaño y PDI aun elevadas. | 23 |
| Figura 6. Tamaño (barras azules) de las formulaciones de NE y su polidispersidad (puntos rojos). La primera formulación (T80L60M20) sobrepasa los 1900 nm. | 24 |
| Figura 7 Potencial Zeta de las formulaciones de NE..... | 25 |
| Figura 8 Tamaño (barras celestes) y PDI (Puntos naranjas) de las formulaciones de NC..... | 26 |
| Figura 9 Potencial Zeta de las formulaciones de NC | 27 |
| Figura 10 Diferentes zonas del diagrama con distintos resultados de vehículos donde morado es NE y NC con buen tamaño y PDI, amarillo se muestran vehículos con mayor tamaño y PDI, zona negra son formulaciones que no dieron tamaños dentro del rango buscado y PDI excesivamente grandes (≈ 1)..... | 28 |
| Figura 11 Cambio de tamaño promedio de formulaciones de NE sometidas a condiciones de refrigeración (barra naranja) y temperatura | |

| | |
|---|----|
| ambiente (barra gris). Las formulaciones REF y T20L10M10 superan los 1000 nm bajo temperatura ambiente..... | 30 |
| Figura 12 Cambios en el Potencial Zeta de formulaciones de NE bajo condiciones de refrigeración (barra naranja) y a temperatura ambiente (barra gris)..... | 30 |
| Figura 13 Cambio en tamaño promedio de formulaciones de NC sometidas a condiciones de refrigeración (barra gris) y temperatura ambiente (barra naranja). T4L1M3 en condiciones de refrigeración supera los 900 nm. | 31 |
| Figura 14 Cambios de tamaño promedio (barras celestes) y PDI (puntos naranjas) a distintas concentraciones de lisozima..... | 35 |
| Figura 15 Cambio en el potencial Zeta de las formulaciones de NE a diferentes concentraciones de lisozima..... | 36 |
| Figura 16 Eficiencia de encapsulación de las formulaciones seleccionadas de NE a distintas concentraciones de lisozima. | 37 |
| Figura 17 Eficiencia de encapsulación de formulaciones seleccionadas de NC a distintas concentraciones de lisozima. | 38 |
| Figura 18 Porcentaje liberado de lisozima de distintas formulaciones (NE y NC) a diferentes tiempos. | 41 |
| Figura 19 Porcentaje de actividad enzimática de la lisozima liberada de los nanovehículos versus una lisozima disuelta en buffer. | 42 |
| Figura 20 Espectro de dicroísmo circular de lisozima fresca disuelta en una concentración de 0,2 mg/ml | 43 |

Figura 21 Espectro de dicroísmo circular de las formulaciones de NE,
los espectros STD son liozima disuelta a igual concentración que la
formulación44

Figura 22 Espectro de dicroísmo circular de las formulaciones de NC,
los espectros STD son liozima disuelta a igual concentración que la
formulación45

RESUMEN

La administración de biomacromoléculas ha tomado gran importancia en el último tiempo, haciendo necesaria nuevas formas de administración. Como vehículos para estas nuevas estrategias, nanoemulsiones y nanocapsulas han dado resultados prometedores, pudiendo entregar y proteger diversas biomacromoléculas. Sin embargo, aún falta un estudio sistemático de formulaciones para comprender los efectos de las distintas variables de formulación.

En esta tesis se han estudiado diferentes formulaciones en cuanto a sus características fisicoquímicas, estabilidad y capacidad de carga de una enzima modelo (lisozima). Formulaciones seleccionadas fueron caracterizadas en cuanto a sus propiedades de liberación de la enzima, y su actividad e integridad posterior a la liberación fue caracterizada

Condiciones para la obtención de formulaciones estables, con tamaño de partícula y polidispersidad aceptables fueron definidas. En formulaciones seleccionadas, se pudo aumentar la capacidad de carga con alta eficiencia de encapsulación y con una variedad de perfiles de liberación. Sólo algunas formulaciones lograron mantener niveles de actividad y configuración secundaria adecuados.

Finalmente, se identificaron la cantidad de lecitina y la presencia del recubrimiento polimérico como los factores más importantes dentro de las variables de formulación que permitieron una formulación optimizada.

ABSTRACT

Biomacromolecule administration has gained importance over past years raising the need for new administration strategies. As such, nanoemulsions and nanocapsules have given promising results, being able to carry and protect diverse biomacromolecules. However, the field still lacks a systematic study of formulations in order to optimize their use.

In this thesis, a variety of formulations have been studied in terms of physicochemical properties, stability and loading capacity of a model enzyme. Selected formulations were then characterized for their lysozyme release properties, activity and enzyme integrity was also characterized after release.

Conditions for achieving stable formulations with adequate size and polydispersity properties were determined. Lysozyme loading was enhanced with high encapsulation efficiency and a variety of release profiles. Only some formulations were able to maintain their activity and secondary structure after release.

Finally, the amount of lecithin and the use of a polymeric coating were identified as the most important formulation variables leading to an optimized formulation.

INTRODUCCIÓN

El avance de las ciencias médicas y farmacéuticas hacia nuevos tratamientos ha llevado al desarrollo de nuevas biomacromoléculas de difícil síntesis u obtención, lo que resulta, entre otros, a que tengan un alto costo. Las biomacromoléculas son convencionalmente conocidas como unidades estructurales y funcionales fundamentales para la célula, dentro de los cuales se incluyen ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y péptidos, entre otros [1]. Dentro de estas biomacromoléculas existen varias con una alta utilidad terapéutica como por ejemplo péptidos y proteínas endógenas como la insulina o la hormona del crecimiento [2].

Normalmente, las biomacromoléculas son administradas por vía intravenosa, siendo así posible controlar con exactitud la dosis a administrar y alcanzar un efecto prácticamente inmediato o sostenido en caso de administraciones subcutáneas, por ejemplo. Debido a su baja biodisponibilidad debido a su gran tamaño y solubilidad, eso sumado a su estabilidad en medio ácido del estómago, es que la ruta parenteral tiene una importante aplicabilidad a la formulación de fármacos biomacromoleculares [3]. Sin embargo, los inyectables también presentan ciertas desventajas, como

es la, necesidad de que sea administrado por un profesional capacitado, la imposibilidad de remover el fármaco una vez administrado en caso de errores con la dosis o identidad del fármaco, incomodidad del paciente a la hora de la inyección. Esto es claramente visto en pacientes con fobia a las agujas y en algunos pacientes con diabetes se ha visto una hipoglicemia por hiperinsulinemia después de la administración de la insulina debido a que una administración parenteral no es análoga al funcionamiento normal del páncreas [4]. Además que el proceso de asegurar la esterilidad de la formulación encarece el proceso [5].

Tomando en cuenta dichas desventajas, se requiere una búsqueda de rutas alternativas, siendo la más aceptada por el paciente la ruta oral. Sin embargo, estos fármacos pueden ser degradados por el pH ácido estomacal, enzimas en ambos intestinos, bacterias en el intestino grueso, y baja absorción [6,7]. Por esto, es de vital importancia poder encontrar nuevas tecnologías para vehiculizar estas biomacromoléculas para que así lleguen de forma eficaz a los tejidos blancos de las distintas patologías. Otra estrategia para la administración efectiva de biomacromoléculas es la evaluación de otras rutas, como la nasal, ocular, bucal y pulmonar entre otras. Con esta estrategia se busca un correcto vehículo que permita una óptima

permeabilidad epitelial, sin afectar la estabilidad de la molécula ni su eficacia [8].

Acá es donde la nanotecnología ha tomado gran relevancia, existiendo diversas revisiones bibliográficas, como es el caso del descrito por Bakhru *et al.* (2013) donde describen características que pueden llevar a una buena absorción oral [9], o también el realizado por Zhu y Liao (2015) que reúnen nanopartículas con aplicación en terapias oncológicas [10]. Algunos ejemplos de nanoestructuras utilizadas en medicina incluye el primer nanofármaco aprobado por la FDA para el tratamiento del sarcoma de Kaposi en pacientes con SIDA: la doxorubicina liposomal (Doxil) [11]. Adicionalmente, nanopartículas metálicas han sido parte del arsenal de nanomedicinas desarrolladas. Dentro de estas, las nanopartículas de oro son potenciales agentes terapéuticos y de diagnóstico (término acuñado como teranóstica) ya que han sido utilizados como agentes de contraste y potenciadores de radiación [9,10]. Otros vehículos de tamaño nanométrico utilizado han sido nanovarillas, nanotubos, nanopartículas inorgánicas, ciclodextrinas, dendrímeros entre otros [14,15].

Esta investigación está centrada en el desarrollo de nanoemulsiones (NE) y nanocápsulas (NC) como vehículos de biomacromoléculas. Una NE está constituida por un núcleo oleoso de tamaño nanométrico disperso en una fase acuosa y estabilizado por surfactantes [16]. Por otro lado, las NC a utilizar en esta investigación son esencialmente una NE como la antes mencionada, con un recubrimiento polimérico adicional [17]. Cabe destacar que tomando en cuenta el método de fabricación y las características fisicoquímicas de los materiales, el activo también puede estar contenido en el recubrimiento polimérico.

NE han demostrado ser buenos vehículos para la administración de fármacos con pobre solubilidad, es decir, clase II y IV según el sistema de clasificación biofarmacéutica debido a su núcleo oleoso, aumentando la concentración de estos en el plasma de forma significativa [18,19]. Pero en la interfase hidrofílica también puede permitir la vehiculización de biomacromoléculas [20] donde se ha demostrado que han aumentado su biodisponibilidad, debido a la gran encapsulación que otorgan [21].

Por su parte, formulaciones de nanocápsulas (NC) con carga superficial negativa, debido al polímero usado, han permitido la administración ocular

de ciclosporina A [8] y de metipranolol [22]. Posteriormente se incorporó un doble recubrimiento por medio de quitosano para conseguir NC de carga positiva que interactuaran mayormente con las membranas celulares [23]. La incorporación de diazepam resultó en una liberación del fármaco más controlada. Una investigación de NC más alineado al objetivo de esta investigación involucró el uso de insulina. Para esta investigación, NC de quitosano incorporadas con insulina fueron desarrolladas para la vía nasal utilizando. Esta investigación demostró que estas formulaciones, con un tamaño alrededor de 250 nm, lograban una correcta vehiculización de insulina resultando en una disminución de los niveles de glicemia en sangre [24]. Esta investigación además describe la eficacia de administrar calcitonina de salmón mediante estas NC por vía oral. El efecto de esta formulación fue evidenciado a través de una disminución en los niveles de calcemia en ratas [25]. Así existen numerosos trabajos de estos nanoestructuras que son utilizadas para vehiculizar diferentes biomacromoléculas con resultados prometedores [6].

Previas investigaciones han identificado la importancia de variables individuales, como el polímero usado en el recubrimiento o los diferentes procedimientos para lograr los nanovehículos [26]. Cambios en algunas de

estas variables pueden afectar el rendimiento de las nanoestructuras con consecuencias sustanciales además en la estabilidad en distintos medios, perfil de liberación y rango de tamaño, lo que resulta en una diferencia en la eficacia de estos vehículos [25].

Sin embargo, no existen estudios sistemáticos sobre cómo los materiales afectan en las diversas características de las nanoestructuras. Además, es de vital importancia comprender la relación entre las variables de formulación y la estabilidad tanto del vehículo como del activo a encapsular. Es por esto que el objetivo de este estudio es primeramente optimizar las formulaciones de NE y NC, haciendo un estudio sistemático mediante utilizando un diagrama ternario.

Posteriormente, se incorporará un modelo de fármaco biomacromolécula a las formulaciones seleccionadas para determinar el comportamiento de estas al ser cargadas con el activo.

Así, el activo biomacromolecular que se añadirá para estudiar diferentes características de las formulaciones seleccionadas será lisozima, una enzima modelo. Esta enzima es resistente a cambios de pH y temperatura [27] y tiene metodologías de análisis bien descritas e implementadas en el grupo de investigación [28,29], por lo tanto, constituye un adecuado modelo para la evaluación de nanovehículos para biomacromoléculas.

HIPÓTESIS

La optimización de la formulación de nanoemulsiones y nanocápsulas cargadas con una biomacromolécula (lisozima) permite la mejora de la estabilidad y mantiene la actividad de la enzima.

OBJETIVO GENERAL

Determinar las variables más importantes en el proceso de fabricación de nanoemulsiones y nanocápsulas para optimizar formulaciones en cuanto a su capacidad de carga y estabilidad, sin alterar la actividad de la lisozima.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.** Analizar mediante un diagrama ternario, las variables de formulación de los nanovehículos y caracterizarlos en cuanto a tamaño, polidispersidad y potencial zeta.

2. Determinar las formulaciones que presentan mayor estabilidad coloidal en el tiempo en cuanto a cambios en sus características fisicoquímicas tales como tamaño, polidispersidad y potencial zeta.

3. En nanovehículos seleccionados, incorporar lisozima y evaluar sus propiedades fisicoquímicas junto con su capacidad de encapsulación del fármaco modelo.

4. Determinar, en formulaciones seleccionadas, el perfil de liberación, actividad y configuración de la enzima luego de todos los procesos que de formulación del nanovehículo.

MATERIALES

- Lecitina de soya (Sigma Aldrich, USA)
- Migliol 812 (Nisshin Oillio, Japan)
- Lisozima de huevo de pollo (Sigma Aldrich, USA)
- Polímero EE Polvo oral (Eudragit® E PO, Evonik, USA)
- Pared de *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma Aldrich, USA)
- MicroBCA Protein Assay Kit (ThermoFisher, USA)
- Solventes y agua miliQ

MÉTODOS

Objetivo 1

Diseño de formulaciones por medio del uso de un diagrama ternario

Se realizó un diagrama ternario (Figura 1), el cual es un método para analizar las proporciones de una formulación que contiene tres ingredientes (fase acuosa, oleosa y surfactante). Cada vértice del triángulo representa que 100% de la formulación contiene el ingrediente que está representado en dicho vértice, bajando gradualmente, en los niveles o líneas paralelas, hasta el lado contrario que representa el 0% del ingrediente en la formulación. La combinación de las líneas de representan un mapa de proporción de ingredientes donde cada punto corresponde a formulaciones individuales con distintos porcentajes de agua, migliol y lecitina.

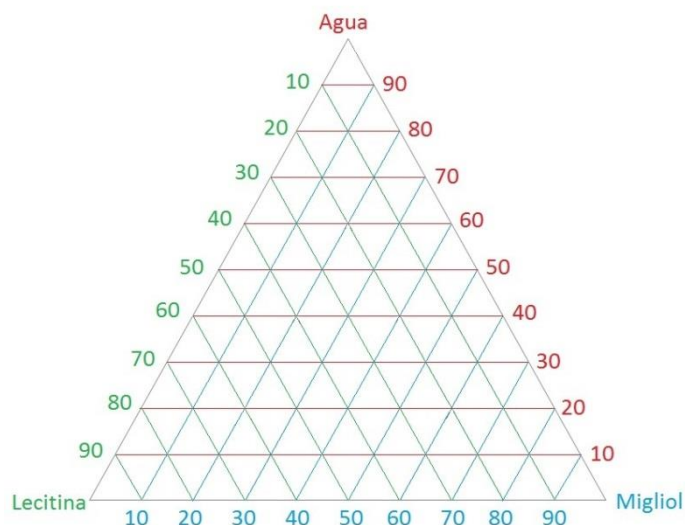


Figura 1 Diagrama ternario, se muestran los porcentajes de cada ingrediente del mismo color.

La síntesis de NE y NC está basada en un protocolo descrito previamente por medio de desplazamiento de solvente [30]. El proceso consiste en disolver una masa determinada de surfactante (lecitina) en 500 μL de etanol con ayuda de un vortex, agregar la cantidad establecida de aceite (migliol), homogenizar, para luego agregar 9.5 mL de un solvente orgánico miscible con agua (acetona) y rápidamente verter esta mezcla en agua (que contiene el polímero disuelto en caso de las NC) que se encuentra en agitación. Luego los solventes (etanol y acetona) son eliminados mediante rotaevaporación hasta llegar a un volumen final de 5 mL.

Caracterización por dispersión dinámica de la luz (DLS) y velocimetría láser Doppler

Tamaño de partícula e índice de polidispersidad fue determinada por dispersión dinámica de la luz (DLS por su nombre en inglés). Esta técnica establece una relación entre el movimiento browniano de la partícula y su diámetro hidrodinámico, permitiendo así conocer el tamaño promedio de las partículas y además su polidispersidad. Para esto se tomaron 10 μL del nanovehículo, y se llevó a 1 mL con agua miliQ. Luego de homogenizar, la dispersión fue incorporada en una celda DTS 1060, previamente lavada 3 veces con etanol absoluto y agua miliQ, para proceder con la medición en un Zetasizer ZS (Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido). Entre mediciones, la celda es lavada tres veces con etanol absoluto y agua miliQ.

Potencial zeta, una característica física que presentan las partículas en suspensión debido a la carga que presentan en su superficie, se determinó por medio de velocimetría láser Doppler. Esta técnica (realizada en el mismo instrumento Zetasizer ZS) consiste en aplicar un voltaje reducido y, mediante dispersión de la luz, determinar la movilidad electroforética de dichas partículas y relacionándola con su carga superficial. El potencial zeta es importante conocer ya que afecta de manera importante a la estabilidad de las partículas en suspensión [31]. La fuerza de repulsión ejercida por la carga

superficial a la que estarán sometidas las partículas permite la estabilización coloidal. Gracias a que el instrumento permite realizar las mediciones de tamaño y potencial zeta en una misma muestra en rutinas continuadas, las mismas condiciones de preparación de muestra fueron utilizadas aquí.

Objetivo 2

La estabilidad se analizará a través de los cambios en los parámetros de tamaño, polidispersión y potencial zeta después de un mes sometido a condiciones de almacenamiento ambientales (25°C y 60% HR) y refrigeradas (entre 2 y 8°C). Para la determinación de estos parámetros se utilizarán las metodologías detalladas anteriormente.

Objetivo 3

A partir de formulaciones seleccionadas, se incorporará una enzima modelo, lisozima, en la fase orgánica de los nanovehículos, en concentraciones del 1, 5 y 10% p/p en relación a la cantidad de sólido o parte

oleosa en la formulación. Además, se analizará el cambio de las propiedades fisicoquímicas de los vehículos para inferir su estabilidad.

La capacidad de encapsulación se determinará indirectamente a través de la técnica de microBCA previa separación del sobrenadante por ultrafiltración. Esta técnica consiste en una determinación colorimétrica de la lisozima libre, y por diferencia se conocerá lo que fue efectivamente encapsulado. La metodología de separación consiste en una separación del sobrenadante, agregando 2 mL del vehículo a un tubo Vivaspin 2 de con filtro de 100 kDa, el cual fue sometido a centrifugación de 6000 RPM por 1 hora. En este sobrenadante es determinada la cantidad de lisozima no encapsulada mediante microBCA [32]. Para esto se incubó (duplicado las muestras y triplicado la curva de calibración) las soluciones con el reactivo de trabajo en una microplaca de 96 pocillos durante 2 horas a 37°C, luego medir su absorbancia a 562 nm.

Objetivo 4

Cinética de liberación

La cinética de liberación fue determinada por la cuantificación de lisozima liberada en 50 mL de buffer fosfato a pH 7,4, 37°C y en agitación orbital de 100 rpm [33]. Para separar lo liberado de lo aún en las NE/NC, membranas de diálisis se utilizaron para contener las dispersiones, y lisozima liberada se cuantificó en el medio de liberación. Se sacó una alícuota de 1 mL cada hora hasta las 7 horas y luego a las 24 horas. La cantidad de enzima en solución fue determinada también mediante la técnica de microBCA detallada arriba.

Actividad enzimática

La actividad enzimática, un indicativo de la integridad de la biomacromolécula en los procesos a los que es sometida, se analizó mediante la determinación de lisis de la pared celular de *Micrococcus lysodeikticus*. Esto se determina mediante ensayos turbidimétricos donde la actividad de la lisozima es evidenciada a través del aclaramiento de la dispersión bacteriana debido a su efecto lítico. Por medio de espectrofotometría UV visible a una longitud de onda de 450 nm y durante 5 minutos se observa la cinética de aclaramiento. La actividad está determinada por la pendiente de los primeros

puntos de absorbancia versus tiempo. La lisozima evaluada fue liberada de los nanovehículos mediante el mismo método del objetivo anterior, conociendo la concentración de lisozima liberada se comparó su actividad con lisozima disuelta en las mismas concentraciones.

Estudio de la estructura secundaria de la enzima por medio de dicroísmo circular

Dicroísmo circular, es un método espectroscópico que provee información de la estructura de péptidos y proteínas. Para evaluar la integridad de la estructura de la lisozima, se hizo una comparación entre el espectro de una lisozima que pasó por todos los procesos de síntesis y liberación, y otra solución en concentración similar que se preparó fresca sin someterse a estos procesos. Los ensayos de dicroísmo circular fueron realizados usando un espectrómetro Jasco J-1500 (Jasco, Easton, USA) equipado con un controlador de temperatura tipo Peltier. Se midió los espectros de 200 a 260 nm a 25°C usando una celda de cuarzo de 0,1 cm de ancho en donde se analizó la proteína luego de los procesos de síntesis del vehículo y su liberación desde estos. Tres mediciones consecutivas fueron realizadas y se observó el espectro promedio, los que fueron comparados con

espectros de lisozima que solamente fue disuelta en el medio de liberación.

Las elipticidades fueron transformadas a elipticidades molares $[\theta]$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Objetivo 1

Exploración de formulaciones por medio de diagrama ternario

Como manera de poner en correcto orden cronológico, es necesario señalar que la parte de reconocimiento general y todas las primeras determinaciones fisicoquímicas fueron realizadas en NE. Aquellas formulaciones que mostraron los mejores resultados se formularon en NC.

Para dar un formato al nombre de las NE y NC desarrolladas en este trabajo, la codificación fue la siguiente: primero se señala el % Total de la fase discontinua, luego se señala el % de lecitina, y por último el % de migliol. Para NC, se agrega una E para indicar el % del polímero E (Eudragit E). Es necesario destacar que la formulación llamada T2,9L0,6M2,3 (2,9% total de fase discontinua, 0,6% de lecitina, y 2,3 % de migliol) es la formulación considerada como referencia a partir de la literatura [6].

Como una manera de hacer un reconocimiento general de toda la zona del diagrama ternario, se realizó una batería de formulaciones que cubrieran una gran cantidad del espacio de diseño (Tabla 1 y Figura 2).

Tabla 1. Primeras formulaciones a realizar, donde se muestra la distribución en % de los tres ingredientes, REF es a partir de una formulación descrita anteriormente

| Nombre | % Lecitina | % Migliol | % Agua |
|---------------------------|------------|-----------|--------|
| T80L60M20 | 60 | 20 | 20 |
| T80L20M60 | 20 | 60 | 20 |
| T60L40M20 | 40 | 20 | 40 |
| T60L20M40 | 20 | 40 | 40 |
| T40L20M20 | 20 | 20 | 60 |
| T2,9L0,6M2,3 (REF) | 0,6 | 2,3 | 97,1 |

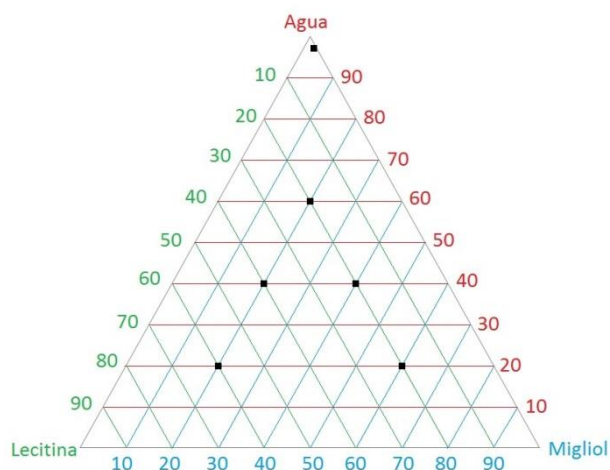


Figura 2. En puntos negros se representan las proporciones nombradas en la tabla 1 de las primeras formulaciones analizadas

Luego de conocer a grandes rasgos las zonas del diagrama (Figura 2), donde a medida que crecen las concentraciones de migliol y lecitina presenta sistemas poco estables con gran tamaño y alta PDI (ver caracterización fisicoquímica más abajo). En esta zona (Figura 3) es donde se encuentran

posiblemente sistemas w/o debido a que el ingrediente predominante es el surfactante, además el aceite también está en altas cantidades (T80L60M20 por ejemplo). También es posible que nuestro método de emulsificación (de baja energía) no permita la síntesis de NE con alto grado de aceite, necesitando métodos donde la energía ocupada es mayor [34].

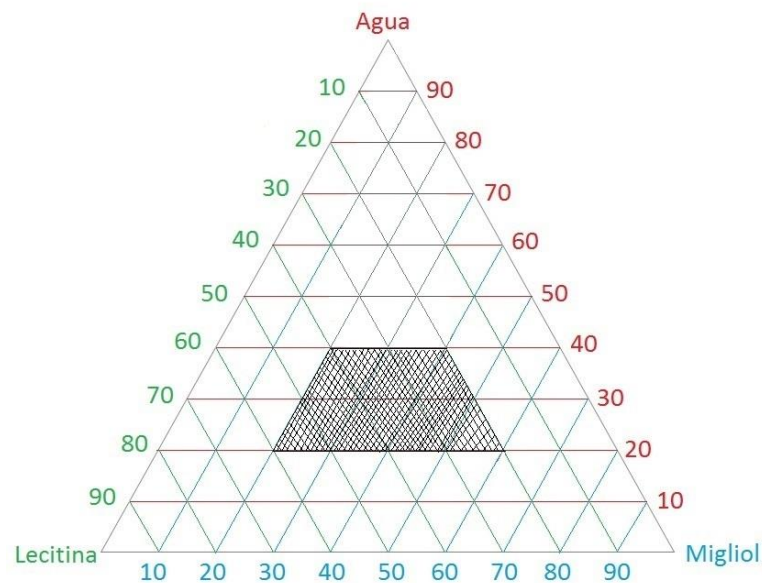


Figura 3 Zona negra señala las formulaciones que posiblemente dieron emulsiones W/O, con grandes tamaños y PDI.

Ahora se evalúa de forma más exhaustiva las zonas donde los sistemas dieron buenos tamaños y PDI, acercándonos a la zona del diagrama donde la cantidad de agua en la formulación es mucho mayor, los nanovehículos deberían formarse más espontáneamente y ser más estable por el aumento de agua en el sistema. Esta evaluación consiste en ir probando nuevas

proporciones de migliol y lecitina pero manteniendo los niveles de agua en muchos casos (Tabla 2 y Figura 4).

Tabla 2. Nuevas formulaciones estudiadas, se estableció como ingrediente principal el agua, y se probaron formulaciones con proporciones más parecidas a REF

| Nombre | % Lecitina | % Migliol | % Agua |
|------------|------------|-----------|--------|
| T20L15M5 | 15 | 5 | 80 |
| T20L10M10 | 10 | 10 | 80 |
| T20L5M15 | 5 | 15 | 80 |
| T15L10M5 | 10 | 5 | 85 |
| T15L5M10 | 5 | 10 | 85 |
| T10L7M3 | 7 | 3 | 90 |
| T10L3M7 | 3 | 7 | 90 |
| T4L3M1 | 3 | 1 | 96 |
| T4L2M2 | 2 | 2 | 96 |
| T4L1M3 | 1 | 3 | 96 |
| T2L1M1 | 1 | 1 | 98 |
| T1,1L0,1M1 | 0.1 | 1 | 98.9 |

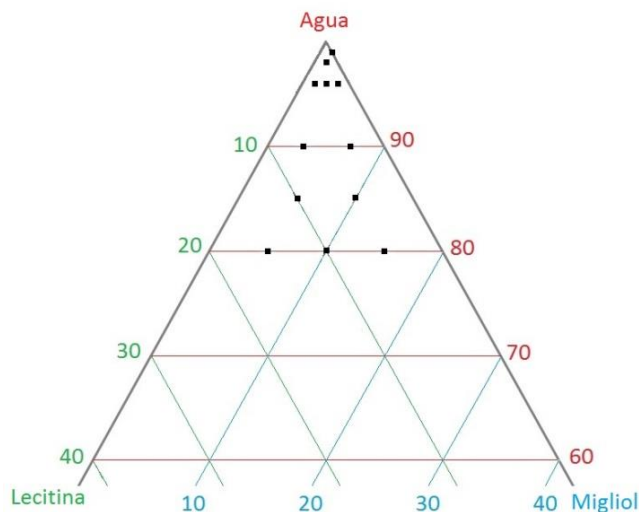


Figura 4 Zona de mayor concentración de agua en el diagrama ternario, muestra las formulaciones presentadas en la tabla 2

Las siguientes formulaciones mostraron un tamaño y PDI indicativo de que la metodología utilizada para la síntesis de nanosistemas no aporta la energía necesaria [34].

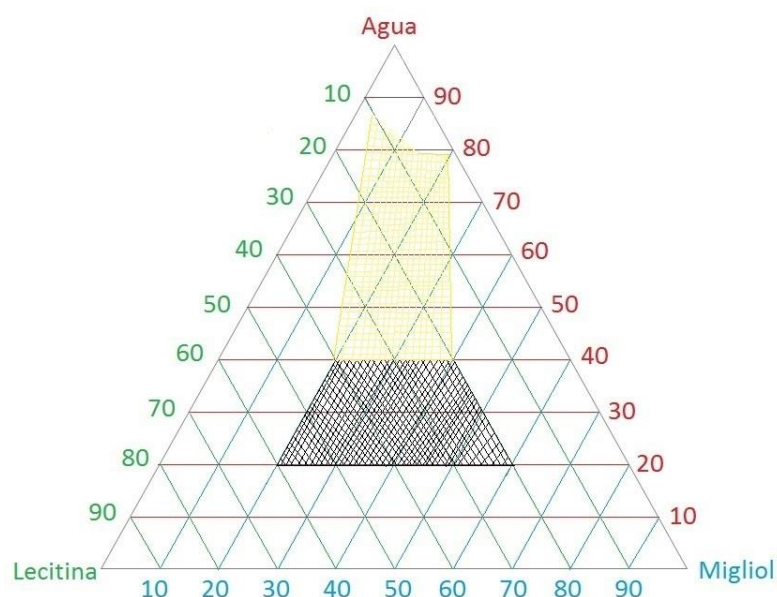


Figura 5 Nueva zona (amarilla) muestra las formulaciones con gran tamaño y PDI aun elevadas.

Caracterización fisicoquímica

Como se muestra en la Figura 6, en el mapeo inicial o reconocimiento general, se notó una clara tendencia al aumento de tamaño cuando se aumenta la fase discontinua, en especial el migliol, componente principal del núcleo de las NE. Por otro lado, la polidispersidad (PDI) pareciera estar mayormente determinada por la cantidad de lecitina, la cual juega un rol de surfactante o estabilizador de la NE (Figura 6).

Para explicar este fenómeno es necesario entender que al momento de agregar acetona, por el flujo turbulento de esta, se forman diversos núcleos de la fase orgánica, los cuales crecen al momento de agregarlos en agua, estabilizándose con el surfactante [17]. Al aumentar la lecitina y migliol, aumenta la viscosidad haciendo más lento el flujo del solvente, creando menos núcleos, que son más grandes y con una mayor PDI [35].

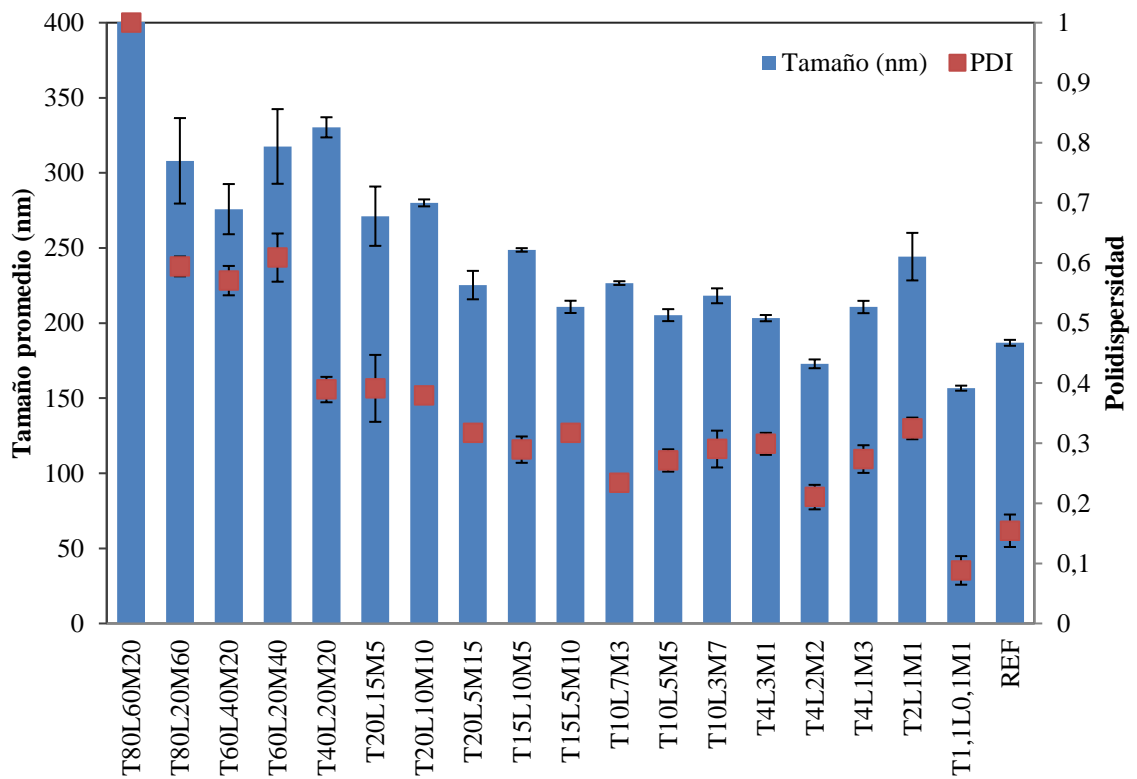


Figura 6. Tamaño (barras) de las formulaciones de NE y su polidispersidad (puntos). La primera formulación (T80L60M20) sobrepasa los 1900 nm.

En NC se observa un aumento en el tamaño de la partícula cuando se baja la concentración del polímero agregado (Eudragit® E) de 1% a un 0,5%

(Figura 8). Esto puede deberse a que debido a la baja concentración de polímero agregado no se alcanza una fuerza de repulsión necesaria, produciéndose agregados [36]. Esta observación puede ser respaldada con el hecho de que son las NC con mayor cantidad de lecitina y migliol, es decir, las que se podrían agregar con mayor facilidad, las más afectadas

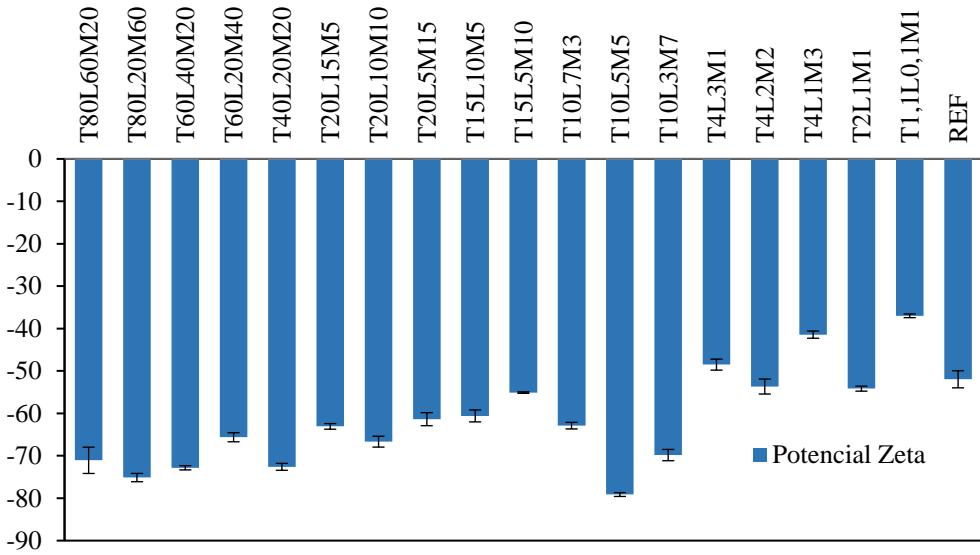


Figura 7 Potencial Zeta de las formulaciones de NE

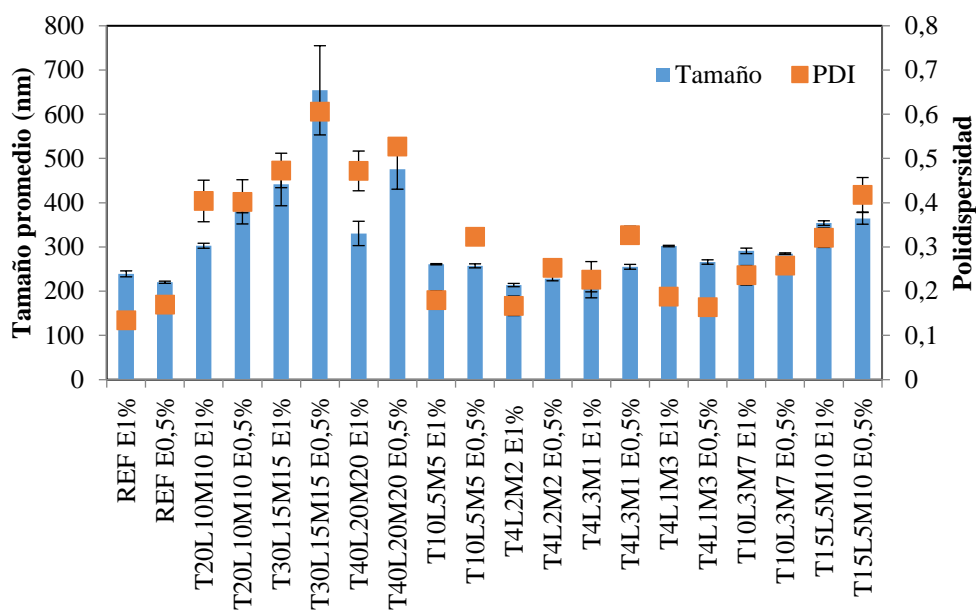


Figura 8 Tamaño (barras) y PDI (puntos) de las formulaciones de NC

El Potencial zeta, como se espera, es negativo en NE y positivo en NC (Figura 7 y Figura 8 respectivamente), esto es por la identidad de los componentes que con mayor probabilidad se ubican en la superficie de la partícula. En NE, el surfactante (lecitina) es una combinación de ácidos grasos, presentando así un carácter negativo en el ambiente trabajado. Por otro lado, el polímero que recubre el núcleo oleoso de las NC tiene una identidad catiónica por la presencia de un grupo amino terciario, el cual está cargado en pH bajo 5.

Es importante destacar la importancia de la identidad del potencial zeta en la interacción de nanosistemas con sistemas biológicos y su posible toxicidad. Así, partículas con potenciales negativos son altamente menos tóxicos que una partícula cuyo potencial zeta es positivo [37] pero esta última interactúa de mucha mejor manera con las células que partículas con carga negativa [38].

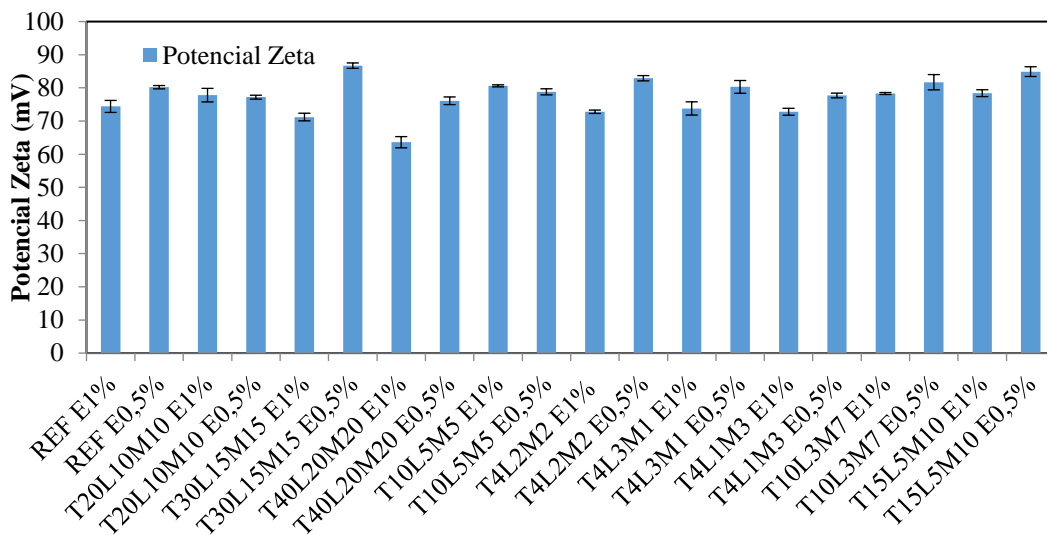


Figura 9 Potencial Zeta de las formulaciones de NC

A modo de resumen, la Figura 8 las zonas donde resultan de buena manera los nanovehículos, siendo las zonas de mayor concentración de agua (morado). (Figura 10). Se puede observar que en la zona morada, es más amplia hacia la zona donde hay mayor proporción de migliol. Luego, en la zona media del diagrama dan vehículos de gran tamaño y PDI, pudiendo ser

una zona donde es necesaria una mayor energía al momento de la síntesis de las estructuras (amarillo). En la parte donde lecitina y migliol tienen mayor proporción, es posible que se formen emulsiones W/O no pudiendo ser estudiadas a fondo ya que no era el fin de este trabajo (negro) [39].

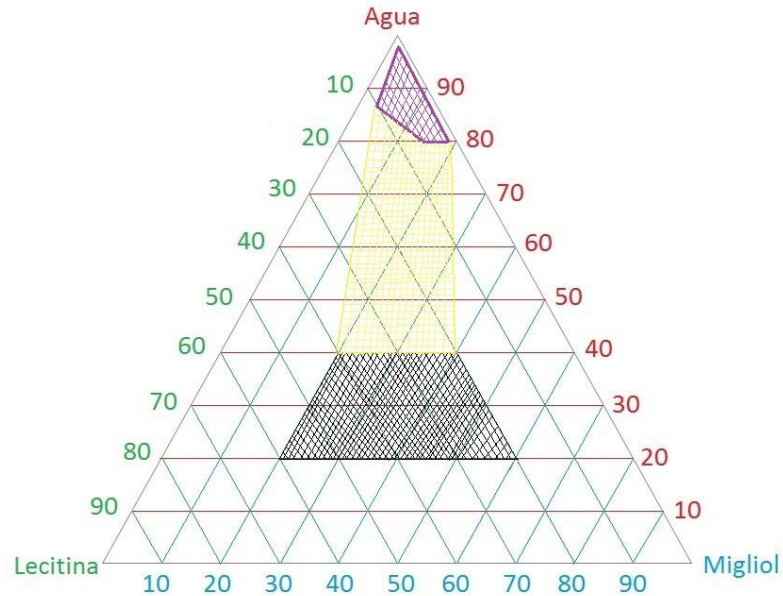


Figura 10 Diferentes zonas del diagrama con distintos resultados de vehículos donde morado es NE y NC con buen tamaño y PDI, amarillo se muestran vehículos con mayor tamaño y PDI, zona negra son formulaciones que no dieron tamaños dentro del rango buscado y PDI excesivamente grandes (≈ 1)

Objetivo 2

Estudio de estabilidad

NE en general fueron más estables en refrigeración. Claro es el ejemplo de REF donde a bajas temperaturas mantuvo tamaño y PDI (Figura 11) pero a temperatura ambiente no se pudo mantener las características fisicoquímicas. Además, las formulaciones más al extremo en la cantidad de fase interna, es decir, la que contenía más y la de menos cantidad, también presentaron inestabilidad: T1,1L0,1M1 presentó inestabilidad tanto en refrigerado como en ambiente, dejando en evidencia la necesidad de una cantidad mínima de surfactante en el nanovehículo [16]. Por otro lado, T20L10M10 que presentó desde el inicio tamaños y PDI altas, no pudo mantenerlos aumentando considerablemente, dejando claro que formulaciones con una cantidad de fase interna alta no son estables en el tiempo. Esto es esperable ya que normalmente las partículas más grandes tienden a aglomerarse con mayor facilidad [40].

También es recomendable destacar la formulación T10L5M5 que, si bien no presenta un gran cambio de tamaño, si presenta una constante baja en el potencial zeta (Figura 12), lo que puede derivar en una inestabilidad tiempo más adelante que un mes [31].

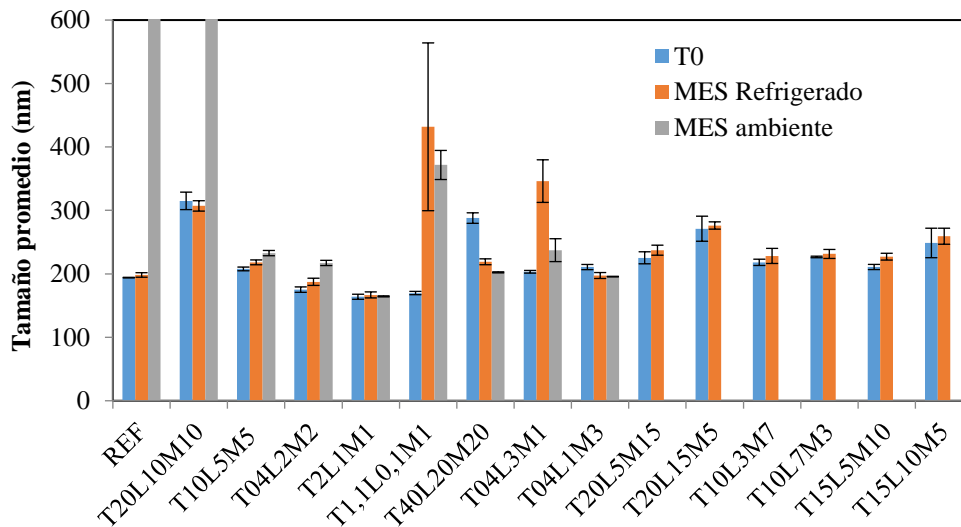


Figura 11 Cambio de tamaño promedio de formulaciones de NE sometidas a condiciones de refrigeración (barra naranja) y temperatura ambiente (barra gris). Las formulaciones REF y T20L10M10 superan los 1000 nm bajo temperatura ambiente.

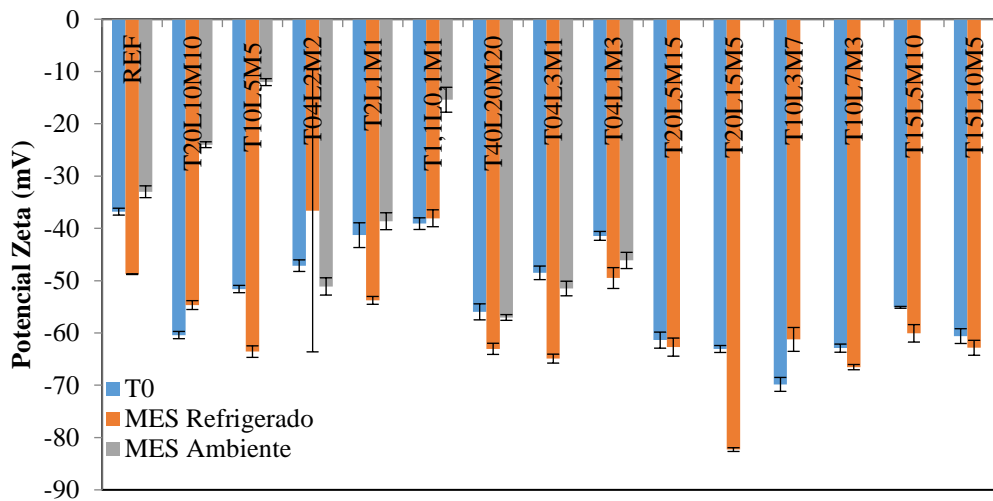


Figura 12 Cambios en el Potencial Zeta de formulaciones de NE bajo condiciones de refrigeración (barra naranja) y a temperatura ambiente (barra gris)

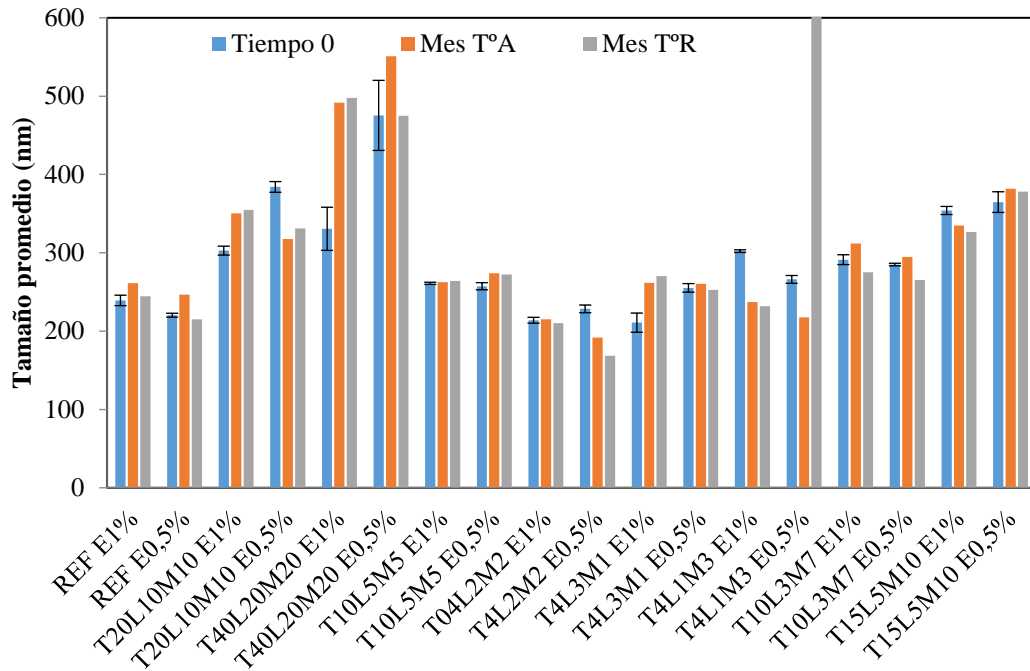


Figura 13 Cambio en tamaño promedio de formulaciones de NC sometidas a condiciones de refrigeración (barra gris) y temperatura ambiente (barra naranja). T4L1M3 en condiciones de refrigeración supera los 900 nm.

A grandes rasgos, las NC presentaron menos casos de inestabilidad (Figura 13) evidente que las NE. Sólo T04L01M03 E0,5% en refrigeración presentó un gran aumento tanto en tamaño como en PDI, pero en el resto no hubo un cambio significativo de ninguna de las características fisicoquímicas, dejando en evidencia que es probable que el recubrimiento polimérico de las NC ayude a la estabilidad de estos vehículos en el tiempo. Esto también fue observado por Calvo et al. quienes evaluaron la habilidad del recubrimiento polimérico de evitar la aglomeración después de exponer los nanovehículos a soluciones de calcio (polímero quitosano como encapsulante) [23]. Después

de 72 horas las NC recubiertas de quitosano no sufrieron cambios mientras que las NE se aglomeraron. También se puede observar la tendencia que a menor concentración de polímero mayor tamaño.

Objetivo 3

Incorporación de enzima modelo en nanoestructuras seleccionadas

La nomenclatura de las formulaciones cargadas con lisozima consiste en agregar “Ly” al final del nombre acompañado del número que representa el % con que fue cargada dicha formulación.

La selección de formulaciones se realizó de manera independiente tanto para NE como para NC. Las NE fueron escogidas de acuerdo a los resultados del estudio de estabilidad, es decir, las que sufrieron menos cambios ya sea en tamaño, PDI y potencial zeta. Las NC por su parte solo se evaluó el tamaño inicial de las partículas además de que su fase interna fuera mayor a la de formulación REF y algunas que mantuvieran las razones de masas entre lecitina y migliol.

Tabla 3 Formulaciones de NE seleccionadas para agregar la biomacromolécula y porcentaje agregado, este porcentaje es de acuerdo a la masa de migliol y lecitina.

| Nombre | %Lecitina | %Migliol | %Agua | %Lisozima |
|----------------------|------------------|-----------------|--------------|------------------|
| T4L3M1 Ly0 | 4 | 1 | 96 | 0 |
| T4L3M1 Ly1 | 4 | 1 | 96 | 1 |
| T4L3M1 Ly5 | 4 | 1 | 96 | 5 |
| T4L3M1 Ly10 | 4 | 1 | 96 | 10 |
| T15L5L10 Ly0 | 5 | 10 | 85 | 0 |
| T15L5L10 Ly1 | 5 | 10 | 85 | 1 |
| T15L5L10 Ly5 | 5 | 10 | 85 | 5 |
| T15L5L10 Ly10 | 5 | 10 | 85 | 10 |
| T10L7M3 Ly0 | 7 | 3 | 90 | 0 |
| T10L7M3 Ly1 | 7 | 3 | 90 | 1 |
| T10L7M3 Ly5 | 7 | 3 | 90 | 5 |
| T10L7M3 Ly10 | 7 | 3 | 90 | 10 |
| T10L3M7 Ly0 | 3 | 7 | 90 | 0 |
| T10L3M7 Ly1 | 3 | 7 | 90 | 1 |
| T10L3M7 Ly5 | 3 | 7 | 90 | 5 |
| T10L3M7 Ly10 | 3 | 7 | 90 | 10 |

Tabla 4 Formulaciones de NC seleccionadas para agregar la biomacromolécula porcentaje agregado, este porcentaje es de acuerdo a la masa de migliol y lecitina. Todas con una concentración de 1% del polímero.

| Nombre | %Lecitina | %Migliol | %Agua | %Lisozima |
|---------------------|------------------|-----------------|--------------|------------------|
| T10L5M5 Ly0 | 5 | 5 | 90 | 0 |
| T10L5M5 Ly1 | 5 | 5 | 90 | 1 |
| T10L5M5 Ly5 | 5 | 5 | 90 | 5 |
| T10L5M5 Ly10 | 5 | 5 | 90 | 10 |
| T10L3M7 Ly0 | 3 | 7 | 90 | 0 |
| T10L3M7 Ly1 | 3 | 7 | 90 | 1 |
| T10L3M7 Ly5 | 3 | 7 | 90 | 5 |
| T10L3M7 Ly10 | 3 | 7 | 90 | 10 |
| T4L2M2 Ly0 | 2 | 2 | 96 | 0 |
| T4L2M2 Ly1 | 2 | 2 | 96 | 1 |
| T4L2M2 Ly5 | 2 | 2 | 96 | 5 |
| T4L2M2 Ly10 | 2 | 2 | 96 | 10 |
| T4L1M3 Ly0 | 1 | 3 | 96 | 0 |
| T4L1M3 Ly1 | 1 | 3 | 96 | 1 |
| T4L1M3 Ly5 | 1 | 3 | 96 | 5 |
| T4L1M3 Ly10 | 1 | 3 | 96 | 10 |

Al agregar dichas cantidades de lisozima a las formulaciones de NE, lo primero que ocurre es que algunas de ellas no son capaces de soportar la cantidad de enzima agregadas (Figura 14). Es por eso que algunas

formulaciones con 10% de lisozima se desestabilizan rápidamente. Esto podría ser explicado gracias a la identidad fuertemente catiónica de la lisozima, debido a su elevado punto isoeléctrico [41]. Esta característica de la enzima puede llevar a un alza en el potencial zeta de las NE (Figura 15), llegando a un punto en donde la fuerza de repulsión entre partículas no es suficiente para evitar la aglomeración de esta, desestabilizándose el nanovehículo.

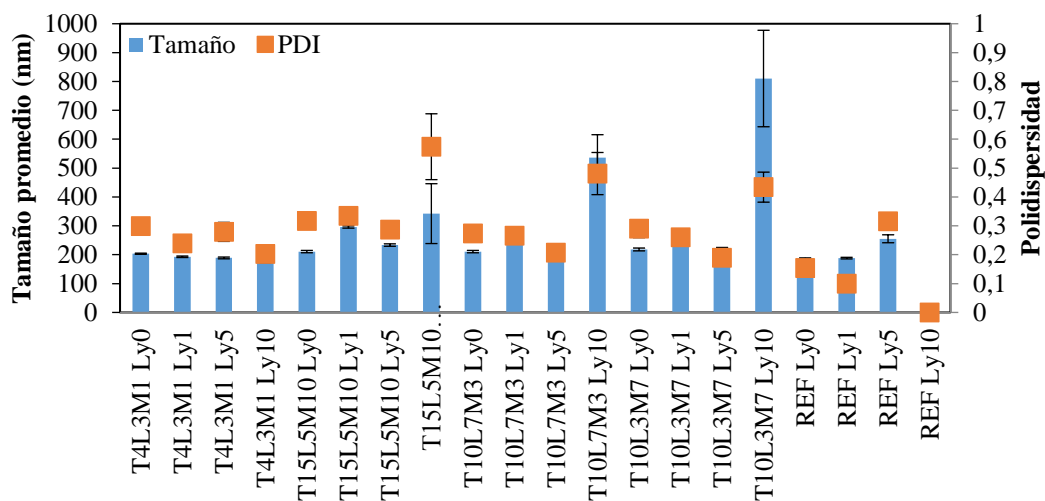


Figura 14 Cambios de tamaño promedio (barras) y PDI (puntos) a distintas concentraciones de lisozima.

La incorporación de la enzima, altamente hidrofílica, a un núcleo oleoso puede ser explicada por una interacción eléctrica que puede ocurrir entre la lisozima, catiónica, y el núcleo oleoso que posee un potencial zeta negativo [25] favoreciendo así la incorporación de esta a la nanoestructura.

El único caso que presenta una baja sustancial en el potencial zeta pero mantiene su tamaño y PDI es T15L05M10 Ly5 Pero esto podría llevar a una aglomeración de partículas en un corto plazo de tiempo.

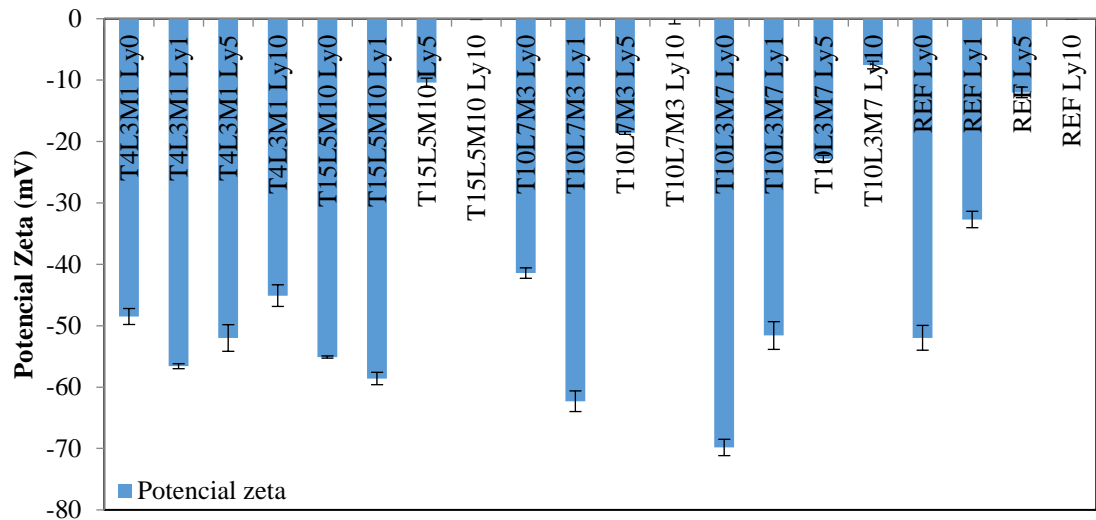


Figura 15 Cambio en el potencial Zeta de las formulaciones de NE a diferentes concentraciones de lisozima.

En general las NE con 1 y 5% de lisozima mantuvieron todas las características fisicoquímicas que cuando no tienen lisozima en su formulación, a excepción del potencial zeta que tiende a la baja. Esto es esperado debido a la identidad de la lisozima previamente analizada.

NC por su parte solo fueron cargadas hasta el 5% debido a los problemas presentados por las NE con cargas de 10%. No hubo grandes cambios en las características de las NC al agregar la carga de lisozima, pudiendo concluir

que en esas concentraciones la lisozima no debería afectar las propiedades de las NC.

Eficiencia de encapsulación

En general, todas las NE presentaron una muy buena eficiencia de carga (>90%) solo presentando los resultados más bajos en las formulaciones de 10% de lisozima (Figura 16). Los más altos % de encapsulación se presentaron en las formulaciones cargadas al 5%, todas superando el 97% de rendimiento.

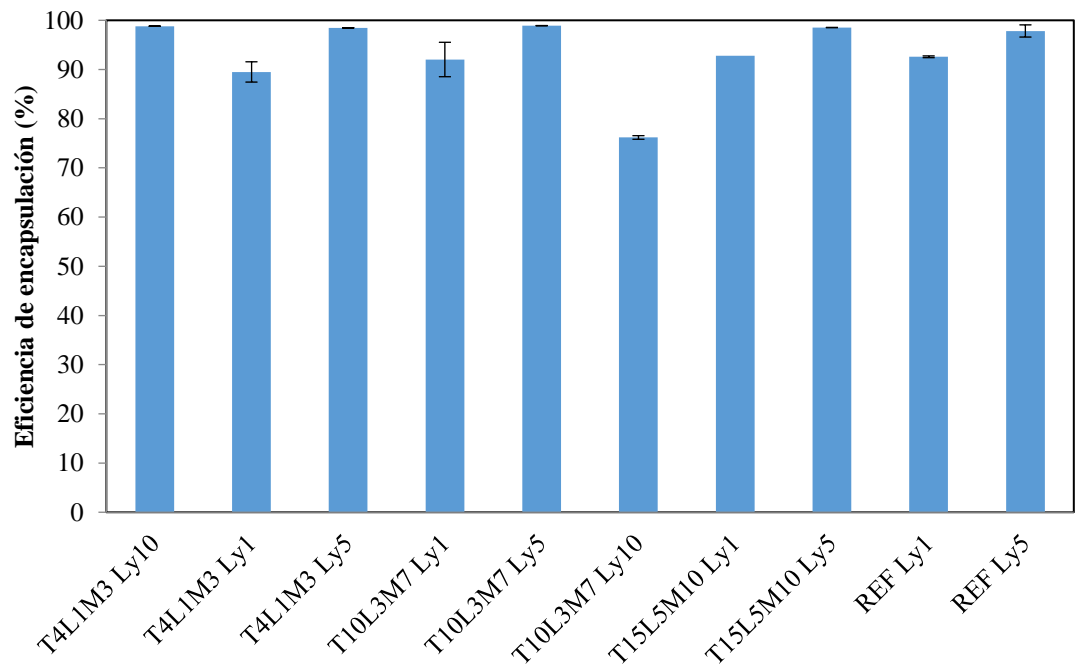


Figura 16 Eficiencia de encapsulación de las formulaciones seleccionadas de NE a distintas concentraciones de lisozima.

Por su parte, las NC presentaron % de alrededor del 90% (Figura 17), teniendo también las mayores cifras las formulaciones que fueron cargadas con 5% de lisozima. Además, es destacable la baja en el % de encapsulación de las NC cargadas solamente con un 1% de lisozima T10L3M7 y T4L1M3 (26,7 y 1,8% respectivamente).

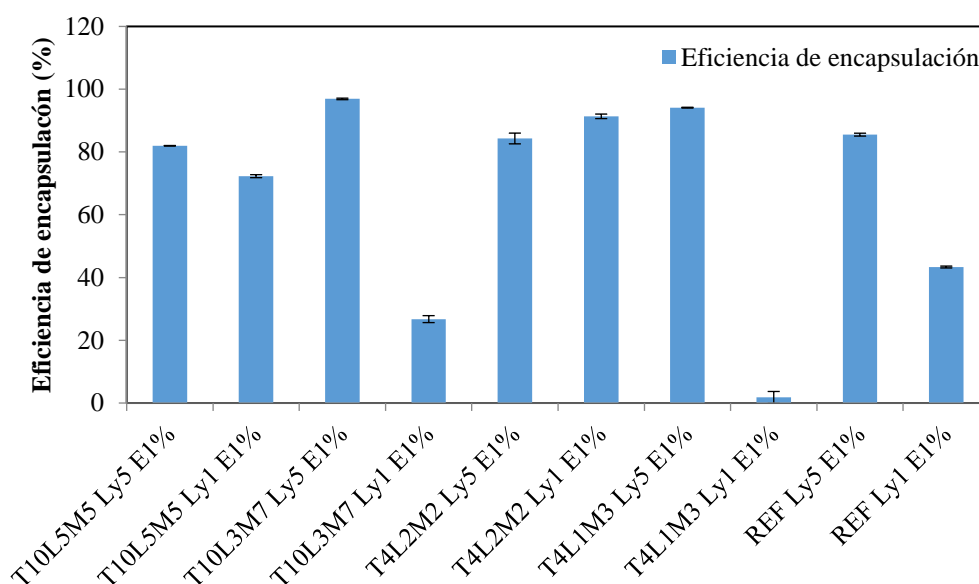


Figura 17 Eficiencia de encapsulación de formulaciones seleccionadas de NC a distintas concentraciones de lisozima.

La alta asociación de la lisozima en el nanovehículo puede deberse a la contraposición de cargas entre la enzima, que gracias a su alto punto isoeléctrico presenta identidad catiónica, y al núcleo oleoso de carácter aniónico por la presencia de ácidos grasos del surfactante [42]. Por otro lado, el polímero que recubre las NC presenta carga positiva al igual que la enzima

pudiendo dificultar la asociación de esta con la NC al existir una competencia por los unión aniónicos [36,43], sin embargo a pesar de esta competencia, los resultados de eficiencia de encapsulación de las NC siguen siendo muy prometedores, en el caso de las formulaciones cargadas con 5% de lisozima.

Para el siguiente paso fueron escogidos T10L03M07 en concentraciones de 1 y 5% además de T04L01M03 por su rendimiento en ambos tipos de vehículos.

Objetivo 4

Estudio de liberación

Ambas formulaciones de T10L03M07 Ly1% (NE y NC) alcanzaron una liberación a las 24 horas de más del 55% del contenido encapsulado (Figura 18), siendo las formulaciones que más contenido liberaron en el tiempo establecido. En general se ve que las liberaciones de las NC son mayores que su símil NE, argumentando la idea que el recubrimiento polimérico puede afectar a los perfiles de liberación. Esto puede deberse a que gracias a la competencia que existe entre la proteína y el recubrimiento polimérico, la enzima se encuentra más disponible, pudiendo liberarse con mayor facilidad del nanosistema [36].

Al observar la liberación neta, es decir en miligramos, se puede concluir que al ir bajando la fase discontinua la liberación a las 24 horas también va bajando. Esto es observado principalmente en las NC, esto puede deberse a complejos formados entre la lecitina y el recubrimiento polimérico donde cierta cantidad de la enzima puede ser parte de estos complejos [43]. En NE no se ve esta tendencia porque no existe la interacción surfactante-polímero.

La liberación pareciera estar dividida en dos fases, la primera en una liberación rápida seguida de una liberación más lenta y continua en el tiempo. Esto puede deberse a que primeramente se libera lo que está en la superficie, seguido de una liberación más lenta debido a la fuerte interacción eléctrica de la lisozima con los ácidos grasos de la lecitina [37].

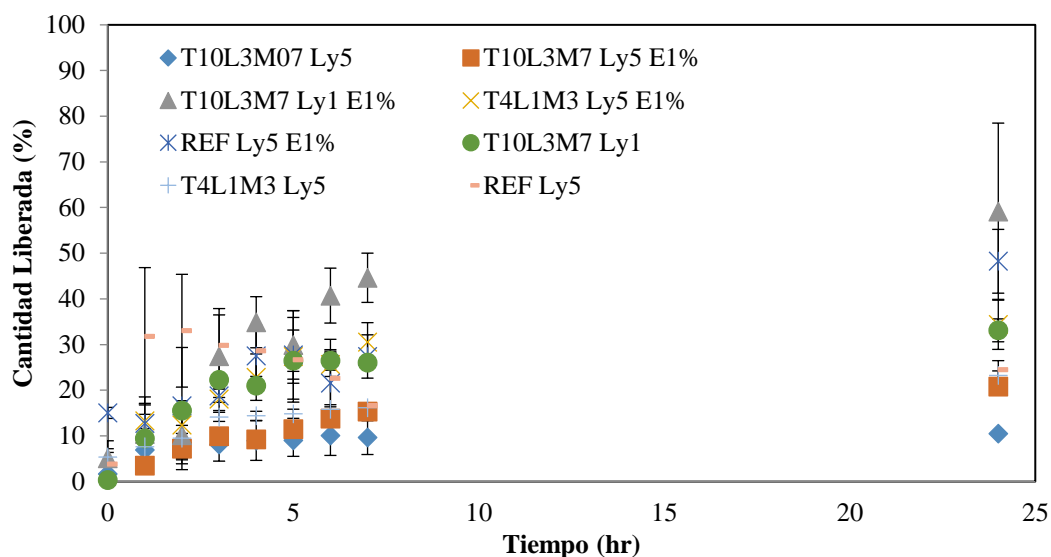


Figura 18 Porcentaje liberado de lisozima de distintas formulaciones (NE y NC) a diferentes tiempos.

Actividad enzimática

Al hacer una comparación de la velocidad con que la suspensión de pared bacteriana se aclara entre la enzima que sufre todo el proceso de formación de los nanovehículos, y la posterior liberación, con una lisozima que solo esta disuelta en el medio de liberación, se puede ver que en general existe una baja en la actividad posterior a su incorporación en los nanovehículos (Figura 19). La formulación que mejor mantuvo la actividad de la enzima (99%) fue la formulación T10L03M07 cargada con un 1% de lisozima, mientras que la enzima más dañada fue la de T04M01L03 con una concentración de lisozima del 5% que sólo mantuvo la actividad en un 2% aproximadamente.

La baja general en la actividad de la lisozima pudo deberse a que, al someter la enzima a una interfase oleosa/acuosa, podría ocurrir un cambio conformacional al exponer las zonas hidrofílicas e hidrofóbicas a la interfase [44], provocando una reubicación de estas. Puede ser por esto que las formulaciones de NC fueron las que más protegieron la actividad de la enzima, debido a la posible influencia del recubrimiento polimérico frente a la interfase.

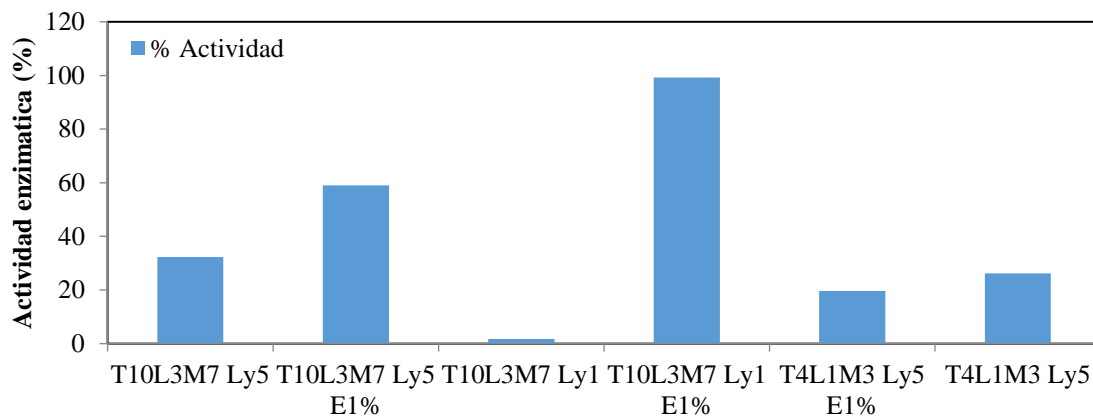


Figura 19 Porcentaje de actividad enzimática de la lisozima liberada de los nanovehículos versus una lisozima disuelta en buffer.

Dicroísmo circular

La estructura secundaria de la lisozima liberada desde formulaciones seleccionadas fue evaluada mediante dicroísmo circular. La forma del espectro de una solución de lisozima fresca (sin ser sometida a los procesos de fabricación de las formulaciones) (Figura 20) es similar a la mayoría de los espectros de lisozimas liberadas desde formulaciones.

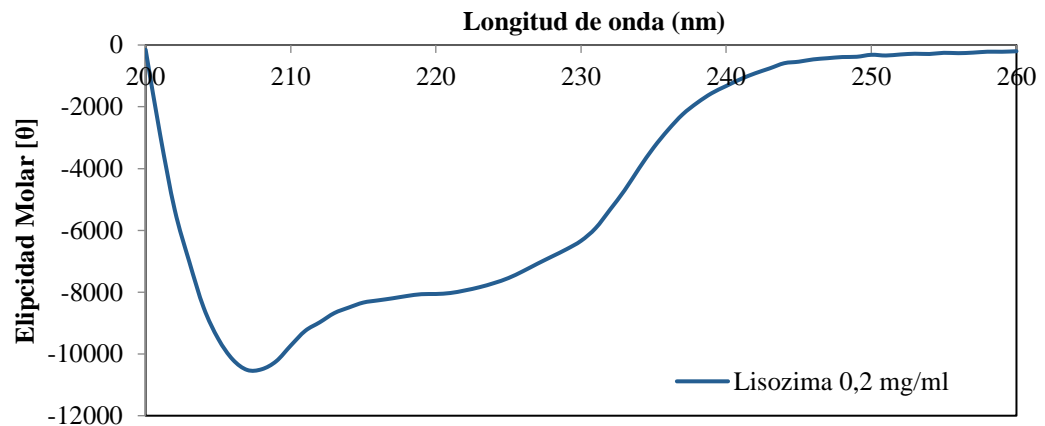


Figura 20 Espectro de dicroísmo circular de lisozima fresca disuelta en una concentración de 0,2 mg/ml

Esto indica que la estructura secundaria en general permanece parcialmente intacta [45]. La absorbancia mínima en alrededor de 208 nm, claramente visible en el espectro de lisozima estándar, es indicativo de un α hélice [46], apreciable parcialmente en las formulaciones T4L1M3 Ly5, T10L3M7 Ly5 E1% y T10L3M7 Ly1 E1% dando a entender que las configuraciones secundarias de las 3 formulaciones se mantienen en cierta medida (Figura 21) [45]. Estos resultados se condicen con las actividades

mostradas, especialmente con la actividad de la lisozima liberada desde la formulación T10L3M7 (Figura 19).

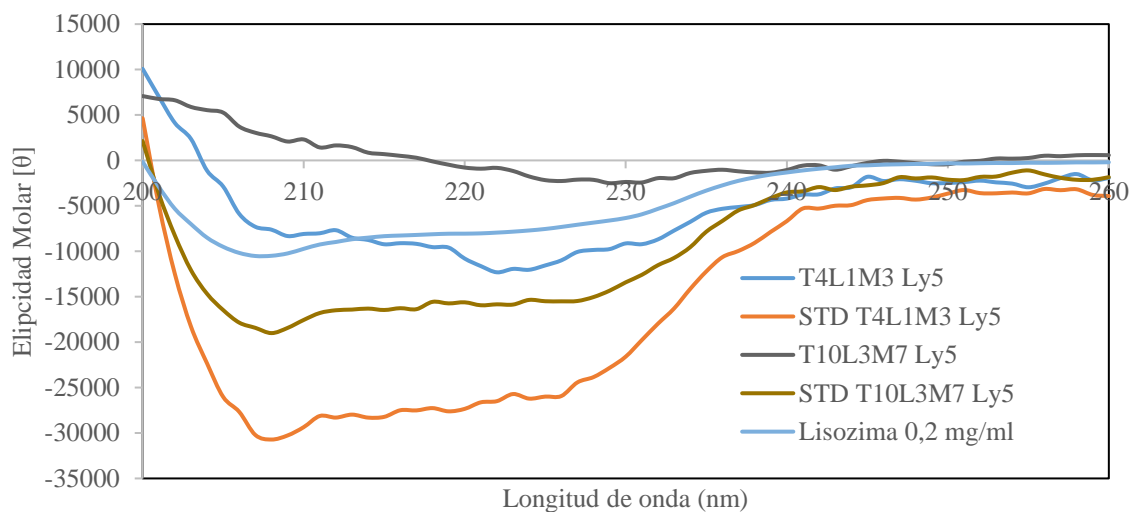


Figura 21 Espectro de dicroísmo circular de las formulaciones de NE, los espectros STD son lisozima disuelta a igual concentración que la formulación

Por otro lado, las formulaciones T4L1M3 Ly5% E1% y T10L3M7 Ly5 muestran un espectro que indica que la enzima se encuentra absolutamente plegada, argumentando así la baja en su actividad (Figura 22). El espectro de la formulación T10L3M7 Ly1 (datos no mostrados) pierde absolutamente la forma, respaldando así su radical reducción de actividad.

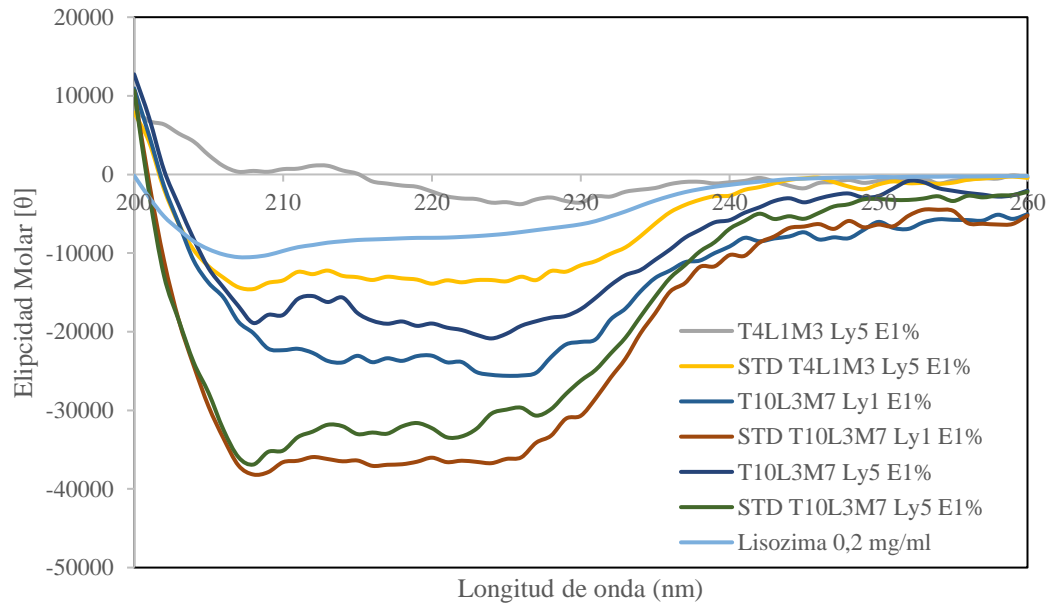


Figura 22 Espectro de dicroísmo circular de las formulaciones de NC, los espectros STD son lisozima disuelta a igual concentración que la formulación

Las diferencias en las magnitudes de los espectros, es decir, su ubicación en el plano son normalmente atribuibles a diferencias de concentración. En este caso, los numerosos potenciales interferentes (polímeros libres o la presencia de material oleoso) podrían estar disminuyendo la intensidad relativa de los espectros.

CONCLUSIONES

A lo largo de la investigación de diferentes formulaciones, fue posible encontrar condiciones que proporcionaron mayor estabilidad coloidal en el tiempo a la mostrada por la formulación REF, incrementando la eficiencia de encapsulación tanto porcentualmente como en peso neto.

Los perfiles de liberación fueron modificados parcialmente a partir de la formulación REF, encontrando así que las NC liberan en mayor medida que las NE. Además, no se observó una liberación completa de la cantidad de la enzima en el tiempo observado.

NE mostraron mayor eficiencia de encapsulación de lisozima que sus análogos NC, pero protegen menos la actividad y configuración secundaria de la enzima.

Se determinó que la fase discontinua, y en mayor medida la lecitina, tiene gran importancia en la PDI y tamaño del vehículo. Además, la presencia de recubrimiento polimérico baja la eficiencia de encapsulación pero mantiene la actividad de la enzima en comparación a vehículos sin la presencia de polímero.

Finalmente, se logró una formulación que presenta tamaño y PDI dentro del rango aceptable, estable coloidalmente en el tiempo, que mantiene la actividad y configuración secundaria de la enzima.

PROYECCIONES

Este trabajo servirá como una guía para futuras investigaciones, ayudando a detectar las zonas donde es posible realizar formulaciones estables y con características fisicoquímicas determinadas. Estas formulaciones podrían ser usadas tanto para encapsular otras biomacromoléculas como fármacos clase II y IV, considerando modificaciones necesarias.

LIMITACIONES

En general, las conclusiones de este trabajo solo podrían ser aplicadas a formulaciones que presenten los mismos ingredientes utilizados acá. Los resultados mostrados por la lisozima, deben ser estudiados caso a caso al momento de cambiar la enzima, ya que las diversas estabilidades de otras proteínas hacen difícil la predicción de su comportamiento en estas formulaciones.

La estabilidad de los vehículos cargados con lisozima no fue determinada. Además, no fue determinada la capacidad de la enzima de permanecer dentro del vehículo no estando en medio de liberación (en un potencial escenario de almacenamiento).

REFERENCIAS

- [1] Tsai CS. Biomacromolecules: Introduction to Structure, Function and Informatics. John Wiley & Sons; 2007.
- [2] Bladon C. Pharmaceutical Chemistry: Therapeutic Aspects of Biomacromolecules. John Wiley & Sons; 2002.
- [3] Goldberg M, Gomez-Orellana I. Challenges for the oral delivery of macromolecules. *Nat Rev Drug Discov* 2003;2:289–95. doi:10.1038/nrd1067.
- [4] Maher S, Ryan B, Duffy A, Brayden DJ. Formulation strategies to improve oral peptide delivery. *Pharm Pat Anal* 2014;3:313–36. doi:10.4155/ppa.14.15.
- [5] Salama N, Eddington N, Fasano A. Tight junction modulation and its relationship to drug delivery☆. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:15–28. doi:10.1016/j.addr.2006.01.003.
- [6] Prego C, García M, Torres D, Alonso MJ. Transmucosal macromolecular drug delivery. *J Controlled Release* 2005;101:151–62. doi:10.1016/j.jconrel.2004.07.030.

- [7] Ikesue K, Kopečková P, Kopeček J. Degradation of proteins by guinea pig intestinal enzymes. *Int J Pharm* 1993;95:171–9. doi:10.1016/0378-5173(93)90404-4.
- [8] Calvo P, Sánchez A, Martínez J, López MI, Calonge M, Pastor JC, et al. Polyester Nanocapsules as New Topical Ocular Delivery Systems for Cyclosporin A. *Pharm Res* 1996;13:311–5. doi:10.1023/A:1016015803611.
- [9] Bakhru SH, Furtado S, Morello AP, Mathiowitz E. Oral delivery of proteins by biodegradable nanoparticles. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:811–21. doi:10.1016/j.addr.2013.04.006.
- [10] Zhu Y, Liao L. Applications of Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery: A Review. *J Nanosci Nanotechnol* 2015;15:4753–73. doi:10.1166/jnn.2015.10298.
- [11] James ND, Coker RJ, Tomlinson D, Harris JRW, Gompels M, Pinching AJ, et al. Liposomal doxorubicin (Doxil): an effective new treatment for Kaposi's sarcoma in AIDS. *Clin Oncol* 1994;6:294–296.
- [12] Black KC, Kirkpatrick ND, Troutman TS, Xu L, Vagner J, Gillies RJ, et al. Gold nanorods targeted to delta opioid receptor: plasmon-resonant contrast and photothermal agents. *Mol Imaging* 2008;7:50.

- [13] Hainfeld JF, Dilmanian FA, Zhong Z, Slatkin DN, Kalef-Ezra JA, Smilowitz HM. Gold nanoparticles enhance the radiation therapy of a murine squamous cell carcinoma. *Phys Med Biol* 2010;55:3045–59. doi:10.1088/0031-9155/55/11/004.
- [14] Sivasubramanian M, Thambi T, Deepagan VG, Saravanakumar G, Ko H, Kang YM, et al. Carboxymethyl Dextran-Cyclodextrin Conjugate as the Carrier of Doxorubicin. *J Nanosci Nanotechnol* 2013;13:7271–8. doi:10.1166/jnn.2013.8091.
- [15] Lee CC, MacKay JA, Fréchet JMJ, Szoka FC. Designing dendrimers for biological applications. *Nat Biotechnol* 2005;23:1517–26. doi:10.1038/nbt1171.
- [16] McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft Matter* 2012;8:1719–29. doi:10.1039/C2SM06903B.
- [17] Fessi H, Puisieux F, Devissaguet JP, Ammoury N, Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int J Pharm* 1989;55:R1–4. doi:10.1016/0378-5173(89)90281-0.

- [18] Gao F, Zhang Z, Bu H, Huang Y, Gao Z, Shen J, et al. Nanoemulsion improves the oral absorption of candesartan cilexetil in rats: Performance and mechanism. *J Controlled Release* 2011;149:168–74. doi:10.1016/j.jconrel.2010.10.013.
- [19] Gué E, Since M, Ropars S, Herbinet R, Le Pluart L, Malzert-Fréon A. Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation. *Int J Pharm* 2016;498:49–65. doi:10.1016/j.ijpharm.2015.12.010.
- [20] Fraga M, de Carvalho TG, da Silva Diel D, Bruxel F, Filho NAK, Teixeira HF, et al. Cationic Nanoemulsions as a Gene Delivery System: Proof of Concept in the Mucopolysaccharidosis I Murine Model. *J Nanosci Nanotechnol* 2015;15:810–6. doi:10.1166/jnn.2015.9179.
- [21] Pachioni-Vasconcelos J de A, Lopes AM, Apolinário AC, Valenzuela-Oses JK, Costa JSR, Nascimento L de O, et al. Nanostructures for protein drug delivery. *Biomater Sci* 2016;4:205–18. doi:10.1039/C5BM00360A.
- [22] Losa C, Marchal-Heussler L, Orallo F, Jato JLV, Alonso MJ. Design of New Formulations for Topical Ocular Administration: Polymeric Nanocapsules Containing Metipranolol. *Pharm Res* n.d.;10:80–7. doi:10.1023/A:1018977130559.

- [23] Calvo P, Remuñán-López C, Vila-Jato JL, Alonso MJ. Development of positively charged colloidal drug carriers: Chitosan-coated polyester nanocapsules and submicron-emulsions. *Colloid Polym Sci* n.d.;275:46–53. doi:10.1007/s003960050050.
- [24] Yun Y, Cho YW, Park K. Nanoparticles for oral delivery: Targeted nanoparticles with peptidic ligands for oral protein delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:822–32. doi:10.1016/j.addr.2012.10.007.
- [25] Prego C, Torres D, Fernandez-Megia E, Novoa-Carballal R, Quiñoá E, Alonso MJ. Chitosan–PEG nanocapsules as new carriers for oral peptide delivery. *J Controlled Release* 2006;111:299–308. doi:10.1016/j.jconrel.2005.12.015.
- [26] Mora-Huertas CE, Fessi H, Elaissari A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int J Pharm* 2010;385:113–42. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.10.018.
- [27] Schomburg D, Schomburg I. *Springer Handbook of Enzymes*. Springer; 2001.
- [28] Morales JO, Joks GM, Lamprecht A, Ross AC, McConville JT. A design of experiments to optimize a new manufacturing process for high

- activity protein-containing submicron particles. *Drug Dev Ind Pharm* 2013;39:1793–801. doi:10.3109/03639045.2012.737332.
- [29] Morales JO, Ross AC, McConville JT. Protein-coated nanoparticles embedded in films as delivery platforms: PCNP-loaded films as delivery platforms. *J Pharm Pharmacol* 2013;65:827–38. doi:10.1111/jphp.12046.
- [30] Prego C, Fabre M, Torres D, Alonso MJ. Efficacy and Mechanism of Action of Chitosan Nanocapsules for Oral Peptide Delivery. *Pharm Res* 2006;23:549–56. doi:10.1007/s11095-006-9570-8.
- [31] Hunter RJ. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Academic Press; 2013.
- [32] Pierce BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific n.d. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/23225> (accessed October 24, 2016).
- [33] Elnaggar YSR, El-Massik MA, Abdallah OY. Self-nanoemulsifying drug delivery systems of tamoxifen citrate: Design and optimization. *Int J Pharm* 2009;380:133–41. doi:10.1016/j.ijpharm.2009.07.015.
- [34] Yang Y, Marshall-Breton C, Leser ME, Sher AA, McClements DJ. Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and

- low-energy homogenization methods. *Food Hydrocoll* 2012;29:398–406. doi:10.1016/j.foodhyd.2012.04.009.
- [35] Quintanar-Guerrero D, Allémann E, Doelker E, Fessi H. A mechanistic study of the formation of polymer nanoparticles by the emulsification-diffusion technique. *Colloid Polym Sci* 1997;275:640–647.
- [36] Garcia-Fuentes M, Torres D, Alonso M. New surface-modified lipid nanoparticles as delivery vehicles for salmon calcitonin. *Int J Pharm* 2005;296:122–32. doi:10.1016/j.ijpharm.2004.12.030.
- [37] Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EMV, Somasundaran P, et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nat Mater* 2009;8:543–57. doi:10.1038/nmat2442.
- [38] Goodman CM, McCusker CD, Yilmaz T, Rotello VM. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. *Bioconjug Chem* 2004;15:897–900. doi:10.1021/bc049951i.
- [39] Venkata Ramana Rao S, Shao J. Self-nanoemulsifying drug delivery systems (SNEDDS) for oral delivery of protein drugs. *Int J Pharm* 2008;362:2–9. doi:10.1016/j.ijpharm.2008.05.018.
- [40] McClements DJ. *Food Emulsions: Principles, Practices, and Techniques*, Third Edition. CRC Press; 2015.

- [41] Lysozyme from chicken egg white lyophilized powder, protein ≥ 90 %, $\geq 40,000$ units/mg protein | Sigma-Aldrich n.d.
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/l6876?lang=es®ion=CL> (accessed October 25, 2016).
- [42] Patil S, Sandberg A, Heckert E, Self W, Seal S. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential. *Biomaterials* 2007;28:4600–7. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.029.
- [43] Prego Rodríguez C. Nanocápsulas de quitosano: nuevos vehículos para el transporte de péptidos a través de la mucosa nasal e intestinal 2005.
- [44] Jorgensen L, Martins S, van de Weert M. Analysis of Protein Physical Stability in Lipid Based Delivery Systems—The Challenges of Lipid Drug Delivery Systems. *J Biomed Nanotechnol* 2009;5:401–8. doi:10.1166/jbn.2009.1049.
- [45] Park J-H, Allen MG, Prausnitz MR. Polymer Microneedles for Controlled-Release Drug Delivery. *Pharm Res* 2006;23:1008–19. doi:10.1007/s11095-006-0028-9.

[46] Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. Nat Protoc 2007;1:2876–90. doi:10.1038/nprot.2006.202.