

## PREPARATION OF MICRO AND NANOPARTICULATED SYSTEMS BASED IN DEGRADABLE POLYESTERS FOR ENCAPSULATION OF HIRUDIN AND DELIVERY

K. N. González<sup>ab\*</sup>, G. González V<sup>b,c</sup>, M. A. Sabino V<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Farmacia. Unidad de Química Medicinal. Caracas, Venezuela.

<sup>b</sup> Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Ingeniería de Materiales y Nanotecnología, Laboratorio de Materiales. Caracas 20632, Venezuela.

<sup>c</sup> Escuela de Física y Nanotecnología, Universidad Yachay Tech.

<sup>d</sup> Grupo de Investigación B5IDA. Dpto. de Química. Universidad Simón Bolívar USB. Valle de Sartenejas, Venezuela

\*Corresponding author, E-mail: karina.gonzalez@ucv.ve, +58 212 6052699.

Received: 18-08-2023

Accepted: 13-09-2023

Published: 27-09-2023

### ABSTRACT

In this research, were obtain and characterized polymeric and biocompatible particles in the micro and nano scale. The particulate systems is based on polyesters as vehicles for the controlled release of the drug hirudin (thrombin inhibitor, with anticoagulant properties). Three types of polymeric micro and nanoparticles were prepared, using: homopolymer PLLA poly(L-lactic acid), copolymer PLGA poly(lactic acid)glycolic, and polymer blend PLLA/PEG poly(L-lactic acid)/poly(ethylene glycol) in a 50:50 ratio; in order to obtain a support matrix for controlled release of hirudin. The preparation of the micro and nanoparticles was carried out following the microemulsification method. In order to know the morphology of the micro and nanoparticles obtained from PLLA, PLLA-PEG and PLGA, scanning electron microscopy was used, observing a symmetrical morphology of spherical particles. Subsequently, the micro and nanoparticles obtained with the hirudin drug were encapsulated by post-incubation and the effect of drug release was evaluated by coagulation assay. It was shown that these systems allow a controlled release of hirudin for up to 48 hours, under the experimental conditions of the trial.

**Keywords:** microparticles, nanoparticles, encapsulation, hirudin, drug delivery.

### PREPARACIÓN DE SISTEMAS MICRO Y NANOPARTICULADOS EN BASE A POLIESTERES BIODEGRADABLES PARA EL ENCAPSULAMIENTO Y LIBERACIÓN DE HIRUDINA

### RESUMEN

En esta investigación se realizó la preparación y caracterización de sistemas micro y nanoparticulados en base a poliésteres biodegradables usando el método de microemulsificación para estudiar el encapsulamiento y liberación del fármaco hirudina (inhibidor de trombina y con propiedades anticoagulantes). Fueron preparados tres tipos de micro y nanopartículas poliméricas: (1) PLLA poli(ácido L-láctico), (2) La polimezcla PLLA-PEG poli(ácido L-láctico): poli(etilenglicol) en proporción 50:50 y (3) el copolímero PLGA poli(ácido láctico: glicólico), con fines de obtener una matriz de soporte para la encapsulación por post-incubación del fármaco. Luego de la caracterización de las partículas, se procedió a la liberación de la hirudina mediante ensayo de coagulación. Para conocer la morfología de las partículas obtenidas de PLLA, PLLA-PEG y PLGA, se empleó microscopía electrónica de barrido observándose una morfología simétrica de partículas esféricas y con tamaños tanto en la escala micro como nanométrica. Se evidenció que estos sistemas permiten una liberación controlada de la hirudina de hasta por 48 horas, bajo las condiciones experimentales del ensayo de coagulación.

**Palabras claves:** micropartículas, nanopartículas, microemulsificación, encapsulamiento, hirudina, liberación controlada.

### INTRODUCCIÓN

El diseño y aplicación de sistemas de dosificación controlada de medicamentos y los sistemas de dirección

localizada de un determinado fármaco es actualmente, uno de los aspectos de mayor relevancia en el desarrollo de nuevas formas de medicación.

La encapsulación de los fármacos es una metodología versátil para controlar su liberación, debido a que un fármaco encapsulado presenta ventajas de dosificación con respecto a otras vías de administración y se incluye dentro de la tecnología de formas farmacéuticas de liberación modificada de fármacos[1].

Asimismo, la encapsulación en vehículos sintéticos se ha convertido en una alternativa útil para desarrollar sistemas novedosos de liberación de péptidos y proteínas, tales como anticoagulantes [2].

La química medicinal está en una búsqueda constante por mejorar la forma de transportar y liberar los principios activos (sea una biomolécula, un fármaco, etc.), para evitar los efectos secundarios y mejorar las propiedades terapéuticas. A medida que se comprende la fisiopatología de las enfermedades y sus mecanismos celulares, los sistemas de administración de fármacos se personalizan para conseguir una eficacia terapéutica óptima. Razón por la que surge la investigación de las partículas como sistemas portadores de compuestos con actividad biológica, además de que estos vehículos tienen capacidad de proteger al fármaco de la fotodegradación y cambios de pH [3]. El uso de estas estructuras que pueden estar dentro de la escala micro y/o nanométrica, permite la liberación controlada de dichos compuestos[3].

Entre los sistemas de soporte empleados para la liberación controlada de fármacos destacan los compuestos poliméricos y entre estos se han empleado polímeros sintéticos tales como: poli(ácido L-láctico) (PLLA)[4], poli(ácido D-láctico) (PDLA) [4], polietilenglicol (PEG)[5], poli-alquil cianoacrilato (PACA)[6], poli-ε-caprolactona (PCL)[7], poli (hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV)[8], [9], poli(metil metacrilato) (PMMA)[10], poli(metacrilato,PMA)[11], entre otros [12].

Un aspecto importante a resaltar en el uso de biomateriales para aplicaciones en biomedicina o en farmacología, es la propiedad de que sean biocompatibles, bioabsorbibles, metabolizables, etc., para lo cual su carácter biodegradable

es de suma relevancia. El PLA es un poliéster usado ampliamente en biomedicina, que tiene una cadena alifática razonablemente corta en el enlace éster lo cual le permite degradarse durante el tiempo requerido para la mayoría de las aplicaciones biomédicas, y esa degradación depende del pH del medio donde se realiza. Otra ventaja de emplear al PLA y sus derivados (como copolímeros y/o polimezclas) es que se descomponen en sub-productos no tóxicos a través de la hidrólisis simple de la cadena principal en ambiente hidrolítico. Esta degradación produce ácido láctico que puede ser metabolizado a través del ciclo de Krebs en agua y dióxido de carbono [13],[14], [15], [16].

Han sido desarrollados muchos métodos para la producción de las micro y nanopartículas y están basados en diferentes principios físico químicos, estos son: nanoprecipitación, emulsión-difusión, doble emulsificación, emulsión-coacervación, recubrimiento del polímero, capa por capa, entre otros[17], [18]. En base a la literatura los métodos de nanoprecipitación, emulsión-difusión y capa por capa dan los mejores resultados para la encapsulación de las micro y nanopartículas (80% o más) [17], [18]y es por ello que en el presente trabajo se aplicó el método de microemulsificación[19].

En el caso de la terapia anticoagulante, además de la terapia convencional, también se ha aplicado el uso de micro y nanopartículas con tales fines, y a este respecto, los esfuerzos recientes se centran en la prevención de la rápida degradación hemolítica mediante el revestimiento adecuado.

Las micro y nanopartículas también pueden ser diseñadas para transportar factores iniciadores de la coagulación, así como, para administrar medicamentos anticoagulantes que intervienen en otras condiciones patológicas en las que se debe prevenir activación de la coagulación[20] o para aumentar el tiempo de vida media de un anticoagulante.

Ha sido investigado el uso de nanocápsulas conjugadas con heparina, empleando poli(metil metacrilato) y ácido

poli(láctico-glicólico), PLGA. Los resultados demuestran una mejora en la actividad anticoagulante del fármaco[21]. De igual manera, se ha implementado el desarrollo de nanocápsulas de PLGA, empleando Pluronic F-127 (poli(óxido de etileno)-poli(óxido de polipropileno)-poli(óxido de etileno)) y funcionalizadas con heparina para aumentar el tiempo de vida media del anticoagulante[22]. Se han empleado microcápsulas a base de PLGA con recubrimiento de Pluronic F-127, lo cual conduce a una mejora en la actividad biológica[2].

La Comisión Europea recomendó la definición de nanomaterial en el año 2011 como aquel que contiene una distribución de tamaño del 50% de las partículas, menor a 100 nm, incluyendo constituyentes particulados en aglomerados y agregados[23]. La definición análoga de la Organización Internacional de Normalización (ISO), ISO/TS 80004-1, se basa bajo el mismo criterio pero no considera un número de porcentaje[24]. Sin embargo, es importante aclarar, que en el área de farmacia y específicamente cuando se trabaja con materiales poliméricos que tienen elevada masa molecular, se definen las nanopartículas poliméricas como partículas de tamaño comprendido entre 1-1000 nm, generalmente entre 10 y 500 nm[25]–[27].

En esta investigación se realizó la preparación y caracterización de sistemas micro y nanoparticulados poliméricos biocompatibles en base a PLA y derivados aplicados en la liberación controlada del fármaco hirudina, que es un inhibidor de trombina, con propiedades anticoagulantes.

Dado los resultados en cuanto al tamaño presentado por estos sistemas, los cuales se encuentran entre la escala micro y nanométrica, se les denominaran como: micro y nanopartículas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### *Materiales*

Se emplearon polímeros sintéticos a base de poli(ácido L-láctico), a saber: PLLA (39526 g/mol), PEG (664 g/mol) y PLGA (130000 g/mol).

### *Preparación de las micro y nanopartículas poliméricas*

La preparación se llevó a cabo siguiendo el método de microemulsificación patentado por Vanderhoff [19], que consiste en tomar una fase acuosa con un agente estabilizante previamente diluido, a la que se le agrega el polímero diluido en algún solvente orgánico apropiado, bajo agitación controlada. En base a este protocolo, se empleó como fase acuosa agua con una solución al 0,25% de polivinil alcohol (PVA) como agente surfactante/estabilizante; y para cada sistema, cada polímero (PLLA, PLLA-PEG y PLGA) fue disuelto separadamente en cloroformo manteniéndose bajo agitación controlada en un reactor de vidrio con aletas internas, introducido en un ultrasonido y empleando un ultramicrodispersor. El tiempo de goteo de la solución orgánica a la solución acuosa fue de 120 minutos. Una vez terminado el proceso de goteo, se dejó cada sistema bajo agitación magnética por 24 horas y a temperatura ambiente con el fin de evaporar el cloroformo y lograr la precipitación de todas las partículas formadas. Luego de esto, la solución fue centrifugada y las partículas sedimentadas fueron debidamente lavadas con agua desionizada, para su posterior liofilización. Este procedimiento estandarizado se realizó de forma repetida para preparar cada una de las partículas con los polímeros PLLA, PLLA-PEG y PLGA.

### *Caracterización de las micro y nanopartículas*

#### *Microscopia Electrónica de Barrido*

Las micro y nanopartículas poliméricas liofilizadas fueron colocadas en porta muestras y recubiertas con oro usando un equipo Sputter-coater marca Balzers-SCD-030 y para su análisis se utilizó un microscopio electrónico de barrido, marca JEOL modelo JSM6390.

En cuanto al procesamiento de las imágenes obtenidas, se utilizó el programa ImageJ a fin de realizar el conteo y medición de tamaño de las partículas.

*Carga a nivel de superficie de micro y nanopartículas poliméricas con el fármaco hirudina por el método de post-incubación.*

Se procedió a realizar la carga de las micro y nanopartículas poliméricas de PLLA, PLLA-PEG y PLGA con la hirudina, mediante el método de post-incubación, debido a que el fármaco es termosensible [22] y se degrada a las condiciones de incubación por el método de microemulsificación. Se procedió a colocar las micro y nanopartículas poliméricas en 0,5 mL de solución del fármaco que contenía 1 mg de hirudina junto con 2mL de agua destilada estéril para favorecer la agitación y colocadas en beaker de 50,0 mL. Se dejó en agitación magnética, en nevera, por 72 horas. Al culminar ese tiempo se procedió a congelar y posteriormente a liofilizar las muestras.

A fin de evaluar el efecto de la encapsulación en la actividad anticoagulante, se procedió a realizar el ensayo funcional de coagulación.

*Evaluación del efecto de la encapsulación mediante ensayo funcional de coagulación: Medición del Tiempo Parcial de Tromboplastina activada (aPTT)*

Se procedió a realizar el ensayo funcional de coagulación de las micro y nanopartículas cargadas con el anticoagulante hirudina mediante la medición de tiempo parcial de tromboplastina activada (aPTT)[28]. Las concentraciones de las muestras poliméricas empleadas en el ensayo fueron: 5 µg/mL y 8 µg/mL para las micro y nanopartículas de PLLA, 2 µg/mL y 8 µg/mL para las micro y nanopartículas de PLLA:PEG y 1 µg/mL y 5 µg/mL para las micro y nanopartículas de PLGA, realizándose cada medición por duplicado.

El procedimiento del ensayo funcional de coagulación fue el siguiente:

*Obtención de la muestra*

1. El plasma fue obtenido de la sangre anticoagulada de un donante sano y mezclada con solución de citrato de sodio 0.10 M, la proporción fue de nueve partes de sangre fresca, del mismo donante, con una parte de anticoagulante. Se centrifugó la muestra de sangre a 2500 rpm durante 15 minutos. Se extrajo la muestra utilizando una pipeta plástica.
2. Se reconstituyó el control y el plasma humano normal, de acuerdo con las instrucciones especificadas en el protocolo[28].
3. Se tomó el reactivo de aPTT y se estabilizó a temperatura ambiente una vez retirado de la nevera.
4. Se pre-calentó a 37°C el CaCl<sub>2</sub> durante 20 minutos.

*Procedimiento de medición de aPTT*

El ensayo de medición de aPTT se realizó en diferentes intervalos de tiempo con el fin de poder medir el tiempo de coagulación a medida que el anticoagulante se liberó de los sistemas de micro y nano partículas. Para ello se procedió de la siguiente manera:

1. Se prepararon dispersiones de los sistemas de micro y nanopartículas, a diferentes concentraciones (en un rango entre 1-8 µg/mL), se colocaron en un tubo eppendorf (1 mL) sobre un baño térmico a 37°C.
2. Se tomaron volúmenes constantes a diferentes intervalos de tiempo (horas): 0,1,8, 24 y 48.
3. Se determinó el tiempo de coagulación de acuerdo al método de medición de aPTT.

*Controles:*

Se realizó la medición de Tiempo de Trombina (control del plasma). De igual manera se realizó control de la hirudina, control de aPTT y de las micro y nanopartículas sin encapsular y de solución salina.

*Análisis estadístico*

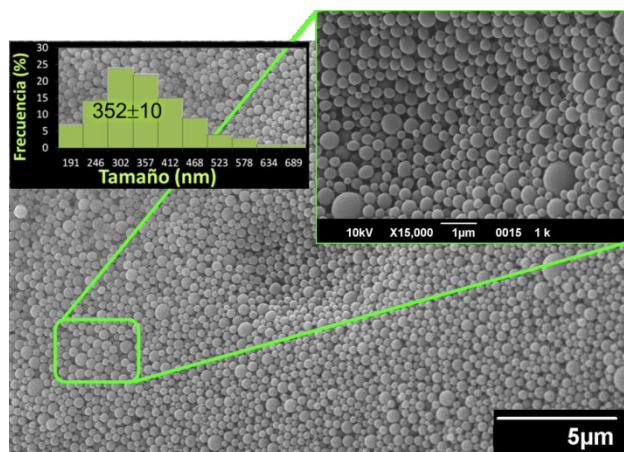
Los resultados se presentan como la media ± el error estándar de la media ( $X \pm E.E.M.$ ). Los datos se analizaron

con el programa Prism 5 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) mediante una prueba de t de Student. Los resultados con valores de  $p < 0,05$  se consideraron como estadísticamente significativos.

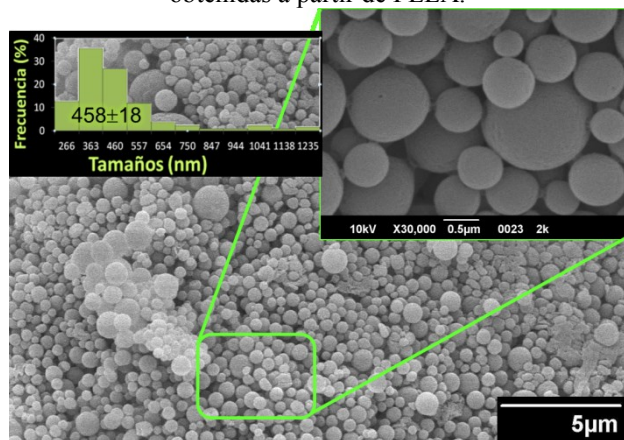
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización por Microscopía electrónica de Barrido

En las Fig. 1, 2 y 3 se muestran las imágenes de MEB de las micro y nanopartículas obtenidas, de PLLA (Fig. 1), PLLA-PEG (Fig.2) y PLGA (Fig.3).



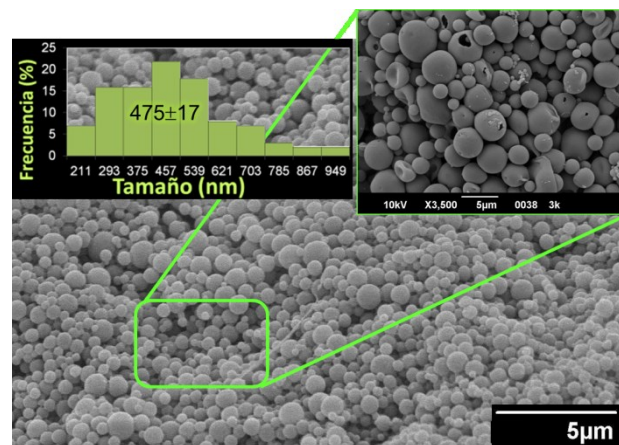
**Fig 1.** Imágenes de MEB de las micro y nanopartículas obtenidas a partir de PLLA.



**Fig 2.** Imágenes de MEB de las micro y nanopartículas obtenidas a partir de la polimezcla PLLA-PEG (50:50).

En base a los resultados de microscopía se obtuvo el siguiente valor promedio de distribución de tamaños de partículas:  $X = 352 \pm 10$  nm para PLLA,  $X = 458 \pm 18$  nm para PLLA-PEG,  $X = 475 \pm 17$  nm para PLGA, siendo más

uniforme el tamaño en el caso de las micro y nanopartículas de PLLA y PLGA. Para los casos de las partículas obtenidas a partir de los polímeros PLLA y PLGA todas se encontraron en la escala nanométrica, para las partículas obtenidas a partir de la polimezcla PLLA:PEG se obtuvieron micropartículas (4,04%) y nanopartículas (95,96%).



**Fig 3.** Imágenes de MEB de las micro y nanopartículas obtenidas a partir de PLGA.

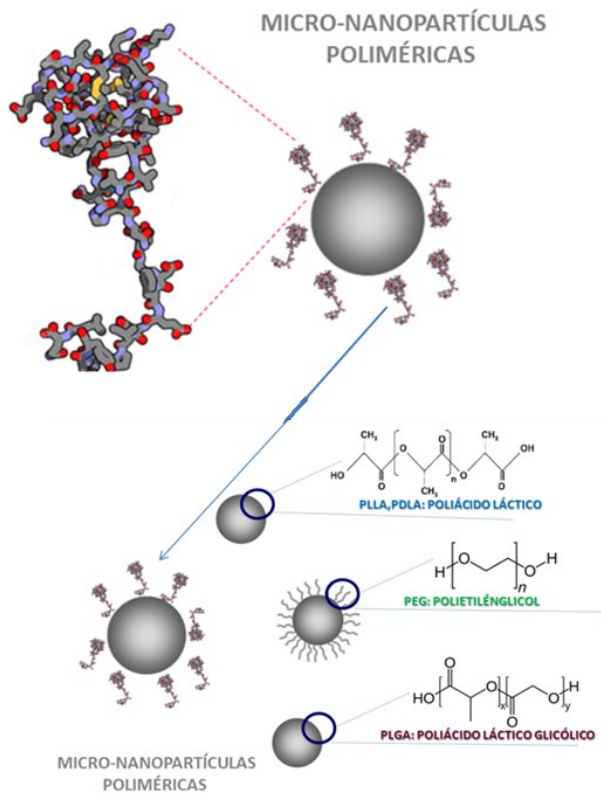
En todos los casos se observa una morfología simétrica de partículas esféricas, en el caso de PLGA se observa la presencia de microcavidades, desde el punto de vista físico, estas microcavidades pueden ser favorables para la retención de los anticoagulantes.

La inclusión de PEG con el PLLA influye en una mayor polidispersidad de las partículas, posiblemente por la formación de las cadenas pegiladas [29], [30].

En las micro-nanopartículas de PLLA se observó un tamaño menor de partículas con respecto a las demás y mayor uniformidad, como se puede observar en los histogramas que acompaña las micrografías MEB. Estos resultados indican que el método empleado permite obtener un tamaño de partículas en el rango micro y nanométrico y con adecuada dispersión de tamaño y morfología.

*Evaluación de las posibles interacciones a nivel de superficie entre la hirudina y las micro y nanopartículas poliméricas de PLLA, PLLA-PEG y PLGA.*

A fin de realizar un proceso de carga a nivel de superficie del anticoagulante hirudina mediante el método de post-incubación, se procedió a realizar la preparación de micro y nanopartículas poliméricas de los polímeros sintéticos PLLA, PLLA-PEG y PLGA y para ello es importante evaluar las posibles interacciones a nivel de superficie entre la hirudina y las micro y nanopartículas sintetizadas. Véase Fig. 4.



**Fig 4.** Posibles interacciones a nivel de superficie entre la hirudina y las micro y nanopartículas poliméricas de PLLA, PLLA-PEG y PLGA

En base a la estructura y la naturaleza de la hirudina, así como los datos reportados en la literatura, establecimos como hipótesis que esta proteína pudiera establecer interacciones del tipo hidrofóbicas entre los residuos hidrofóbicos que se encuentran próximos al extremo N-terminal y los grupos metílicos de las cadenas poliméricas[19].

De igual manera, ha sido reportado que la porción C-terminal de la hirudina forma interacciones electrostáticas y enlaces de Van der Waals con su receptor, en este caso

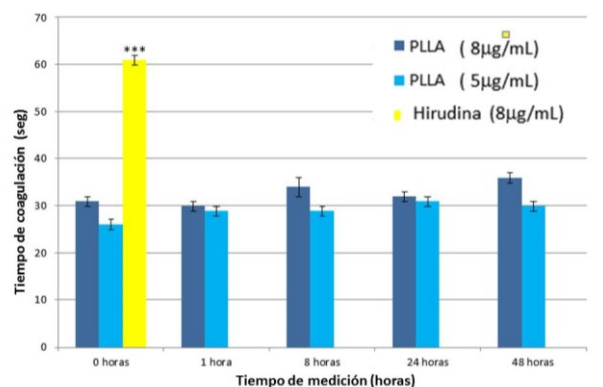
podieran ser sitios de interacción con extremos de la cadena polimérica; finalmente, destaca la posibilidad de interacciones del tipo puente de hidrógeno entre residuos de Tyr de la hirudina con los grupos hidroxilo, carboxilo y/o carbonilo de las cadenas poliméricas. En base a la estructura química de cada sistema polimérico, se tienen por ejemplo grupos –COOH finales de cadena o grupos –OH en el caso del PEG disponibles para esa interacción con la Tyr[21],[31].

Otros autores han empleado esta metodología [21] con el fin de promover la conjugación de fármacos en la superficie de nanopartículas.

*Ensayo funcional de coagulación de las micro y nanopartículas poliméricas biocompatibles de PLLA, PLLA-PEG, PLGA con la hirudina*

A continuación, se muestran los resultados de la medición del tiempo de coagulación de la hirudina que ha sido funcionalizada en las micro y nanopartículas poliméricas y liberada a diferentes intervalos de tiempo.

En la Fig. 5 se indican los valores obtenidos de la medición del tiempo de coagulación de la hirudina funcionalizada en micro-nanopartículas de PLLA y liberada a diferentes intervalos de tiempo (0 - 48 horas).



\*\*\*p<0,001 con respecto a PLLA-PEG 8µg/mL y 5µg/mL de todas las horas de experimentación

**Fig 5.** Medición del Tiempo de Coagulación (en segundos) de la Hirudina funcionalizada en muestras poliméricas de PLLA

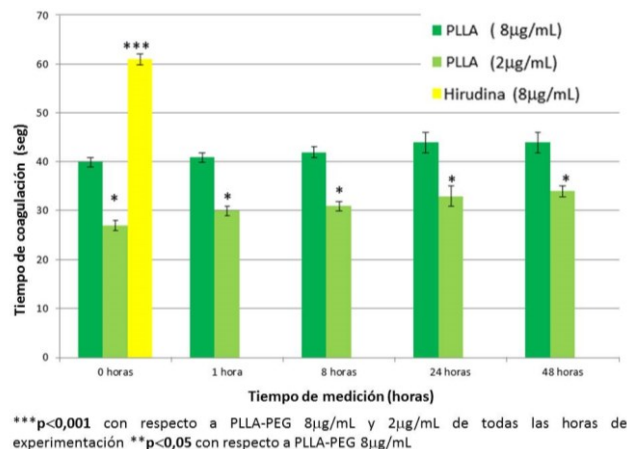
El control de las micro y nanopartículas PLLA sin la hirudina no indujeron coagulación y se midió el tiempo de coagulación de la hirudina sin funcionalizar, a una

concentración de 8 µg/mL, que se tomó como referencia para todas las demás muestras.

Se puede observar que al tiempo 0 existe un tiempo de coagulación, posiblemente la hirudina que no llegó a funcionalizarse y quedó a nivel de la superficie luego del proceso de liofilización, se observa que este comportamiento ocurre para ambas concentraciones, sin embargo, se observa que para la concentración de 8 µg/mL de las micro y nanopartículas hay un aumento de la liberación de la hirudina en el tiempo, partiendo de 31 segundos y llegando hasta 36 segundos; para la concentración de 5 µg/mL se observaron ciertas variaciones, pero en general se observa también un aumento en el tiempo de coagulación en el tiempo. El tiempo de coagulación de la hirudina aumenta a una mayor concentración de las micro y nanopartículas, lo cual es congruente. En ambos casos se observa que estos sistemas permiten una liberación controlada de la hirudina por 48 horas, bajo las condiciones experimentales del ensayo. Este comportamiento es favorable, justamente la combinación de nanopartículas y anticoagulantes, conjugados a nivel de superficie, es de gran interés debido a las propiedades sinérgicas de esta combinación, uno de los objetivos es lograr aumentar la biodisponibilidad y el tiempo de vida media del anticoagulante[21]. En el caso de la hirudina se ha observado que presenta como limitaciones: la necesidad de altas dosis para lograr el régimen de dosificación con los consecuentes efectos adversos, el limitado paso a través de la barrera hematoencefálica y una rápida eliminación renal[32]. En este caso, se observa que se logra un aumento del tiempo de vida media de la hirudina en comparación con la administración convencional. Las propiedades farmacocinéticas de la hirudina tras su administración intravenosa se describen bien por un modelo bicompartimental[33]. La distribución se limita básicamente a los líquidos extracelulares y se caracteriza por una semivida inicial de aproximadamente 10 minutos. La eliminación sigue un proceso de primer orden y se

caracteriza por una semivida terminal de unas 1,3 horas en voluntarios jóvenes sanos[34].

En la Figura 6 se indican los valores obtenidos de la medición del tiempo de coagulación de la hirudina funcionalizada en micro y nanopartículas de PLLA-PEG y liberada a diferentes intervalos de tiempo (0 - 48 horas). El control de las micro y nanopartículas PLLA-PEG sin la hirudina no indujeron coagulación y se midió el tiempo de coagulación de la hirudina sin funcionalizar, a una concentración de 8 µg/mL, que se tomó como referencia para todas las demás muestras.



**Fig. 6.** Medición del Tiempo de Coagulación de la Hirudina funcionalizada en muestras poliméricas de PLLA-PEG.

Se puede observar que al tiempo 0 existe un tiempo de coagulación, similar que en el ensayo anterior realizado con micro y nanopartículas de PLLA, lo cual se atribuye al mismo efecto, posiblemente la hirudina que no llegó a funcionalizarse y quedó a nivel de la superficie en el proceso de la liofilización. Se observa para la concentración de 2 µg/mL de las micro y nanopartículas hay un aumento de la liberación de la hirudina en el tiempo, partiendo de 27 s y llegando hasta 34 s, para la concentración de 8 µg/mL también se observa un aumento en el tiempo hasta las 24 horas, siendo de 44 s y luego se mantiene constante. El tiempo de coagulación para la hirudina aumenta a una mayor concentración de las micro y nanopartículas, similares que en el ensayo de PLLA. En ambos casos se observa que estos sistemas permiten una

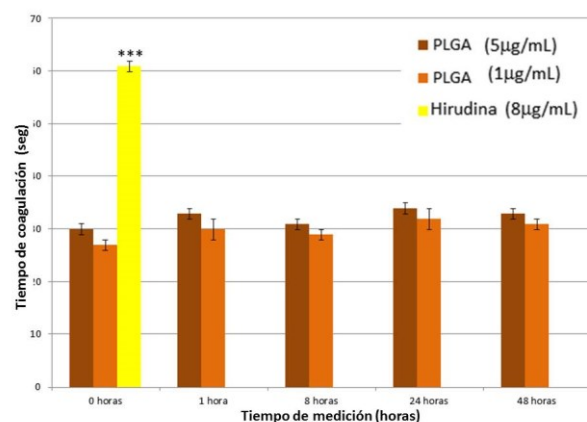
liberación controlada de la hirudina por 48 horas, bajo las condiciones experimentales del ensayo. Estos resultados son bastante deseables para la aplicación que se desea llevar a cabo de estos sistemas.

Si se compara los tiempos de coagulación promedios, obtenidos a los diferentes tiempos, de las micro y nanopartículas de PLLA-PEG versus las de PLLA, se observa que a las mismas concentraciones del ensayo hay un aumento en los valores del tiempo de coagulación y en base al valor de  $p < 0.05$  para las concentraciones de  $2 \mu\text{g/mL}$  de las micro y nanopartículas de PLLA-PEG se observa que hay una relación concentración-dependiente, es decir, a mayor concentración de la hirudina en las micro y nanopartículas mayor es el efecto anticoagulante, posiblemente la interacción de la hirudina con las cadenas del polietilenglicol puede estar influyendo. Se ha reportado que las micro y nanopartículas pegiladas utilizando copolímeros como el PEG-PLA permiten mejorar las propiedades del sistema y aumentar el tiempo de vida media del fármaco [33], [34].

En la Fig. 7 se indican los valores obtenidos de la medición del tiempo de coagulación de la hirudina funcionalizada en micro y nanopartículas de PLGA y liberada a diferentes intervalos de tiempo (0 - 48 horas). El control de las micro y nanopartículas PLGA sin la hirudina no indujeron coagulación y se midió el tiempo de coagulación de la hirudina sin funcionalizar, a una concentración de  $8 \mu\text{g/mL}$ , que se tomó como referencia para todas las demás muestras.

Similar a los casos anteriores, se puede observar que al tiempo 0 existe un tiempo de coagulación. Se observan para ambas concentraciones ciertas oscilaciones en el tiempo de coagulación a lo largo del tiempo, sin embargo, en ambos casos se observa que estos sistemas permiten una liberación controlada de la hirudina por 48 horas, bajo las condiciones experimentales del ensayo. En la literatura ha sido reportado el uso de microesferas a base de PLGA con recubrimiento de Pluronic F-127 lo cual permitió la liberación de los anticoagulantes heparina e hirudina hasta

por 48 horas[2], nuestros resultados son congruentes con los reportados en la literatura.



\*\*\* $p < 0.001$  con respecto a PLLA-PEG  $5 \mu\text{g/mL}$  y  $1 \mu\text{g/mL}$  de todas las horas de experimentación

**Fig. 7.** Medición del Tiempo de Coagulación de la Hirudina funcionalizada en muestras poliméricas de PLGA.

En este caso se observa que los valores de tiempo de coagulación promedios obtenidos para la hirudina que ha sido conjugada en las micro y nanopartículas de PLGA, son parecidos (aunque menores) que los obtenidos en el primer caso, con las micro y nanopartículas de PLLA y aunque no podemos establecer una comparación real porque las concentraciones ensayadas difieren, es interesante señalar que para estas últimas se emplearon unas concentraciones menores del anticoagulante y sin embargo, se obtienen resultados similares.

Se puede recordar los resultados obtenidos en MEB, la presencia de cavidades en las micro y nanopartículas de PLGA puede estar favoreciendo a una mejor conjugación de estos sistemas y considerando que una de las limitaciones de la administración convencional de la hirudina es la necesidad de altos regímenes de dosificación y la rápida eliminación renal[32], un sistema de micro y nanopartículas que permita disminuir la dosis empleada y aumentar el tiempo de vida media de la hirudina resulta bastante atractivo y prometedor.

## CONCLUSIONES

El método de microemulsificación empleado para la preparación de las micro y nanopartículas poliméricas biocompatibles de PLLA, PLLA-PEG y PLGA, permitió



obtener una morfología simétrica de partículas esféricas con valores promedios de distribución de tamaños de partículas entre 300 y 475 nm.

La evaluación de la liberación de la hirudina en micro y nanopartículas poliméricas biocompatibles de PLLA, PLLA-PEG y PLGA, a través de un ensayo funcional de coagulación, evidenció que estos sistemas permiten una liberación controlada de la hirudina hasta por 48 horas, bajo las condiciones experimentales del ensayo.

### AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Eugenia Pineda y el Farmacéutico Miguel Tovar del Centro de Biotecnología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela por la realización del ensayo funcional de coagulación. Al Licenciado Gleen Rodríguez del Lab de Superficies del Lab E de la USB y a la Licenciada Lisbeth Lozada del Centro de Ing. de Materiales y Nanotecnología del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), ambos por la preparación y observación de las muestras por microscopia electrónica de barrido. El Dr. Sabino quiere agradecer al Vicerrectorado Académico de la USB por su permiso sabático, y a FAPESP (SP, Brasil) proceso 2021/13949-5 por el soporte financiero durante su año sabático en el CTI Renato Archer (Campinas, SP).

### REFERENCIAS

[1] P. Gálvez, A. Ruiz, and B. Clares, "The future of new therapies in clinical medicine," *Med. Clin. (Barc.)*, vol. 137, no. 14, pp. 645–649, 2011.

[2] D. L. Sellers, T. H. Kim, C. W. Mount, S. H. Pun, and P. J. Horner, "Poly(lactic-co-glycolic) acid microspheres encapsulated in Pluronic F-127 prolong hirudin delivery and improve functional recovery from a demyelination lesion," *Biomaterials*, vol. 35, no. 31, pp. 8895–8902, 2014.

[3] L. Villafuerte-Robles, "Nanotecnología Farmacéutica," *Razón y Palabra*, vol. 68, no. 01, pp. 1–20, 2009.

[4] C. Thauvin, B. Schwarz, F. Delie, and E. Allémann, "Functionalized PLA polymers to control loading and/or release properties of drug-loaded nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, vol. 548, no. 2, pp. 771–777, 2018.

[5] J. Y. Lee, K. H. Bae, J. S. Kim, Y. S. Nam, and T. G. Park, "Intracellular delivery of paclitaxel using oil-free, shell cross-linked HSA - Multi-armed PEG nanocapsules," *Biomaterials*, vol. 32, no. 33, pp. 8635–8644, 2011.

[6] K. Alhareth, C. Vauthier, C. Gueutin, G. Ponchel, and F. Moussa, "HPLC quantification of doxorubicin in plasma and tissues of rats treated with doxorubicin loaded poly(alkylcyanoacrylate) nanoparticles," *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 887–888, pp. 128–132, 2012.

[7] C. L. Oliveira et al., "Characterization of polymeric nanoparticles for intravenous delivery: Focus on stability," *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, vol. 150, pp. 326–333, 2017.

[8] D. Puppi, S. Braccini, A. Ranaudo, and F. Chiellini, "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds with tunable macro- and microstructural features by additive manufacturing," *J. Biotechnol.*, vol. 308, pp. 96–107, 2020.

[9] H. M. Chang et al., "Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)- based scaffolds for tissue engineering," *Brazilian J. Med. Biol. Res.*, vol. 47, no. 7, pp. 533–539, 2014.

[10] A. Bettencourt and A. J. Almeida, "Poly(methyl methacrylate) particulate carriers in drug delivery," *J. Microencapsul.*, vol. 29, no. 4, pp. 353–367, 2012.

[11] M. E. Favretto, A. Krieg, S. Schubert, U. S. Schubert, and R. Brock, "Multifunctional poly(methacrylate) polyplex libraries: A platform for gene delivery inspired by nature," *J. Control. Release*, vol. 209, pp. 1–11, 2015.

[12] J. Karlsson, H. J. Vaughan, and J. J. Green, "Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Therapeutic

Cancer Treatments,” *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.*, vol. 9, no. 1, pp. 105–127, 2018.

[13] C. Wei *et al.*, “Biomaterials in skin tissue engineering,” *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.*, vol. 71, no. 13, pp. 993–1011, 2022.

[14] M. Roussaki *et al.*, “Encapsulation of the natural antioxidant aureusidin in biodegradable PLA nanoparticles,” *Polym. Degrad. Stab.*, vol. 108, pp. 182–187, 2014.

[15] A. Wang and B. J. Edwards, “Modeling controlled release from hollow porous nanospheres,” *Int. J. Heat Mass Transf.*, vol. 103, pp. 997–1007, 2016.

[16] T. Yasukawa, Y. Tabata, H. Kimura, and Y. Ogura, “Recent Advances in Intraocular Drug Delivery Systems,” *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 5, no. 1, pp. 1–10, 2011.

[17] C. E. Mora-Huertas, H. Fessi, and A. Elaissari, “Polymer-based nanocapsules for drug delivery,” *Int. J. Pharm.*, vol. 385, no. 1–2, pp. 113–142, 2010.

[18] C. I. C. Crucho and M. T. Barros, “Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods,” *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 80, pp. 771–784, 2017.

[19] J. Vanderhoff, S. Mohamed, and J. Ugelstad, “Polymer Emulsification Process,” 4,177,177.

[20] A. N. Ilinskaya and M. A. Dobrovolskaia, “Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns,” *Nanomedicine (Lond.)*, vol. 8, no. 6, pp. 969–81, 2013.

[21] M. M. Kemp and R. J. Linhardt, “Heparin-based nanoparticles,” vol. 2, pp. 77–87, 2010.

[22] M. Lee *et al.*, “Size control of self-assembled nanoparticles by an emulsion/solvent evaporation method,” *Colloid Polym. Sci.*, vol. 284, no. 5, pp. 506–512, 2006.

[23] European Commission, “Definition of Nanomaterials,” 2011.

[24] F. Babick, J. Mielke, W. Wohlleben, and S. Weigel, *How reliably can a material be classified as a*

*nanomaterial? Available particle-sizing techniques at work*, vol. 18, no. 6. Springer Netherlands, 2016.

[25] P. R. Lockman, R. J. Mumper, M. A. Khan, and D. D. Allen, “Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier,” *Drug Dev. Ind. Pharm.*, vol. 28, no. 1, pp. 1–13, 2002.

[26] I. Brigger, C. Dubernet, and P. Couvreur, “Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis,” *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 54, pp. 631–651, 2002.

[27] E. Palma, A. Pasqua, A. Gagliardi, D. Britti, M. Fresta, and D. Cosco, “Antileishmanial activity of amphotericin B-loaded-PLGA nanoparticles: An overview,” *Materials (Basel)*, vol. 11, no. 7, 2018.

[28] ISO, “Certificated ISO 13485 - Md Qms,” 13485, 2016.

[29] V. C. F. Mosqueira *et al.*, “Biodistribution of long-circulating PEG-grafted nanocapsules in mice: Effects of PEG chain length and density,” *Pharm. Res.*, vol. 18, no. 10, pp. 1411–1419, 2001.

[30] M. L. Graham, “Pegaspargase: A review of clinical studies,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 55, no. 10, pp. 1293–1302, 2003.

[31] M. A. Masuelli, “Mark-Houwink Parameters for Aqueous-Soluble Polymers and Biopolymers at Various Temperatures,” *J. Polym. Biopolym. Phys. Chem.*, vol. 2, no. 2, pp. 37–43, 2014.

[32] A. A. Date, M. D. Joshi, and V. B. Patravale, “Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles,” *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 6, pp. 505–521, 2007.

[33] M. López and G. Nowak, “Special pharmacokinetics of dipetarudin suggests a potential antitumor activity of this thrombin inhibitor,” *Anticancer. Drugs*, vol. 15, no. 2, pp. 145–149, 2004.

[34] *Vademecum, Monografias ATC*. 2008, pp. 1–3.