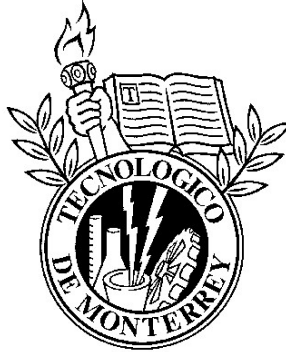


INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
MONTERREY
CAMPUS ESTADO DE MÉXICO



DISEÑO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN DE FARMACOS A BASE
DE PHA

POR

ARTURO ELÍAS AGUILAR RABIELA

UNA TESIS
SOMETIDA ANTE EL PROGRAMA DE POSGRADO EN INGENIERÍA Y CIENCIA
Y EL COMITÉ DE ESTUDIOS DE
POSGRADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE MONTERREY
EN EL CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS
PARA EL GRADO DE

DOCTOR EN FILOSOFÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

ATIZAPÁN, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO, MARZO 2020

© *Copyrights* por Arturo Elías Aguilar Rabiela, 2020
Todos los derechos reservados.

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE
MONTERREY
CAMPUS ESTADO DE MÉXICO

LOS MIEMBROS DEL COMITÉ RECOMIENDAN LAS TESIS PRESENTADA POR
ARTURO ELÍAS AGUILAR RABIELA
PARA ACEPTARSE COMO UN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS PARA LA
OBTENCIÓN DEL GRADO DE
DOCTOR DE FILOSOFÍA EN CIENCIAS DE LA INGENIERÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ

DRA. BERENICE VERGARA PORRAS

DIRECTORA DE TEIS
ITESM, CAMPUS ESTADO DE MÉXICO

DR. JACQUELINE LISZETH OLIVA
RAMÍREZ

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA
ITESM, CAMPUS CIUDAD DE MÉXICO

DR. MARÍA DEL ROCIO LÓPEZ
CUELLAR

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS EN
AGRICULTURA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE
HIDALGO

DR. JOSÉ ANTONIO OTERO
HERNÁNDEZ

DEPARTAMENTO DE MATEMATICAS
ITESM, CAMPUS ESTADO DE MÉXICO

DR. ERNESTO MANUEL HERNÁNDEZ
COOPER

DEPARTAMENTO DE MATEMATICAS
ITESM, CAMPUS ESTADO DE MÉXICO

DR. MARTÍN ROGELIO BUSTAMANTE BELLO
DIRECTOR DEL PROGRAMA DE POSGRADOS EN
INGENIERÍA
ITESM, CAMPUS ESTADO DE MÉXICO

ATIZAPÁN, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO, MARZO DE 2020

Agradecimientos

Me gustaría agradecer al Tecnológico de Monterrey por abrirme las puertas a esta gran institución y así poder realizar mi doctorado, especialmente al Dr. Jaime Mora Vargas quien jugó un papel importante en darme el último empujón para decidirme a comenzar este proceso.

Agradezco a la Dra. Berenice Vergara Porras y al Dr. José Antonio Otero Hernández por el apoyo y guía a través de este proceso. Así mismo a los demás miembros de mi comité por la revisión y retroalimentación a este trabajo.

También agradezco al Ing. Ramón Eduardo Rivero Aranda, el Ing. Roberto Delgado Durán, el Ing. Christian Zaragoza Pérez, la Ing. Paola Andrea Mora Gazano y al Ing. José Antonio García Macedo por todo el apoyo y enseñanzas que me brindaron durante mi trabajo experimental en CEM.

Me gustaría agradecer especialmente al Dr. Rodrigo Balam Muñoz Soto, por los meses de intenso trabajo experimental en CCM, gracias por todo el conocimiento que compartió conmigo, la guía y el asesoramiento brindado me brindaron la seguridad para enfrentarme a los retos en distintos laboratorios de nivel internacional. También gracias por compartir tanta música y el apoyo que brindo a mis proyectos musicales.

Finalmente me gustaría agradecer a mi familia, mis amigos, mis colegas y todas las personas que de manera directa o indirecta me apoyaron durante la realización de mi trabajo de doctorado, especialmente al apoyo brindado por el CONACyT.

Asesores externos (External Acknowledgments)

I would like to thank to Prof. Dr.-Ing. habil. Aldo R. Boccaccini for the invitation to collaborate in his chair at Biomaterials Institute of Friedrich Alexander Universität. Thank you for all the support, guidance, advice and feedback during and after my work at FAU.

I would like to thank to Dr. rer. nat. Aldo Leal Egana for his orientation during the cell culture assays and confocal microscopy, and for all the help and feedback.

I would like to thank to Dr. Harald Unterweger and M. Sc. Qaisar Nawaz for the collaboration and support, thanks for the feedback and the facilities for the access to the labs.

I would like to thank to Dr. Gerhard Frank and Alina Grünwald for the safety inductions, the trainings and all the help during my experimental work at *Lehrstuhls Biomaterialien*.

I would like to thank to Dr. Eduin Ivan González Castillo, Dr. Kai Zheng, M. Sc. Irem Ünalán, M. Sc. Emine Karakaya, M. Sc. Marcela Arango Ospina and all FAU colleagues and bachelor students for all help and friendship during my stay in Erlangen. Special thanks to M. Sc. Susanne Heid for all the support and inspiration, “*du bringst die sonne mit*”.

Dedicación

Al Dr. Rodrigo Balam Muñoz Soto (1980-2019),
Investigador del departamento de biotecnología
del Tecnológico de Monterrey campus ciudad de
México, quien en vida fue un excelente profesor,
mentor y amigo, a pesar de haber colaborado solo
unos meses con él. Gracias por su guía y su
asesoramiento, gracias por brindarme los
elementos necesarios para comenzar el trabajo en
la FAU con seguridad. Sin su colaboración y
apoyo esta tesis no habría sido posible.

A mis padres y mi familia, gracias por todo el
apoyo brindado durante este tiempo, sin su ayuda
definitivamente no hubiera podido sortear todos
los retos que se presentaron tanto en México
como en el Extranjero.

A ti, “Cosha”, gracias por aguantar toda esta
travesía, gracias por estar en las buenas y en las
malas, por todo el apoyo brindado, este logro
también es tuyo.

Resumen

Los micro y nano dispositivos liberadores de fármacos (DDS, por sus siglas en inglés) han ganado atención en la última década debido a la posibilidad que brindan para permitir nuevas vías de administración, así como otras propiedades novedosas como la liberación controlada y prolongada, liberación localizada, bioactividad entre otras. Los polihidroxicanoatos (PHAs), que son una familia de poliésteres producidos por diferentes organismos, han sido estudiados ampliamente en años recientes debido a sus interesantes propiedades como: termoplasticidad, biocompatibilidad y biodegradabilidad. Estas propiedades los vuelven materiales prometedores para aplicaciones médicas y biomédicas tales como la fabricación de: materiales quirúrgicos, entramados para ingeniería de tejidos, varillas liberadoras, fibras y perlas, así como dispositivos de liberación controlada. El siguiente trabajo de tesis presenta el diseño, fabricación y caracterización de microsferas a base de PHA como DDS. Además, los resultados de diversos ensayos de liberación en ambientes abióticos y bióticos. A lo largo del trabajo se muestran: las diferentes técnicas de caracterización empleadas, los experimentos diseñados en ambientes simulados y en cultivo celular y la discusión de los resultados, en donde se encontró evidencia de biocompatibilidad y liberación controlada.

Como resultado de los experimentos se obtuvo la cinética de liberación en medios abióticos, evaluándose el comportamiento de dos sustancias (curcumina y riboflavina) empleados como fármaco modelo. También se estudió el comportamiento de liberación de uno de los fármacos modelo (curcumina) en cultivo celular. Se generó un modelado matemático de la liberación por difusión de curcumina, desde el DDS hacia un fluido biológico simulado. Los resultados de este modelo se compararon con los resultados experimentales, mostrando una mejor aproximación en comparación con los modelos analíticos previamente reportados. Posteriormente, los ensayos de liberación de curcumina en cultivo celular mostraron evidencia de un retardo en el efecto del fármaco liberado en las células, lo cual se puede traducir en un efecto retardado y un primer paso hacia una liberación controlada. Finalmente, se realizaron ensayos de liberación de un biomarcador celular, para visualizar por primera vez de forma directa la liberación por difusión que los fármacos modelo, incorporados a las microsferas de PHA, podrían seguir hacia las células.

Aunque para su aplicación final en la industria farmacéutica se requiere de estudios adicionales, los resultados presentados en este trabajo muestran el potencial que tienen este tipo de DDSs para ser aplicados en el desarrollo de nuevas terapias, las cuales serán más eficientes y tendrán ventajas sobre los métodos convencionales que actualmente se utilizan.

Contenido

Agradecimientos	iv
Asesores externos (External Acknowledgments).....	v
Dedicación.....	vi
Resumen	vii
Lista de Tablas	xi
Lista de Figuras	xii
Introducción	14
1.1 Motivación	14
1.2 Descripción del problema.....	14
1.3 Preguntas de Investigación.....	15
1.4 Hipótesis.....	15
1.5 Objetivos	15
1.6 Alcance y limitaciones	16
1.7. Contribuciones	16
Marco Teórico	18
2.1 Antecedentes	18
2.2 Microencapsulación	21
2.3 Extractos naturales como fármacos modelo.....	23
2.4 Partículas como DDS	22
Diseño de un sistema de liberación de fármacos.....	25
3.1 Introducción	25
3.2 Metodología Experimental.....	26
3.3 Resultados y Discusión	35
Conclusiones	60
Trabajos publicados	62
Trabajo futuro.....	63
Apéndice I.....	64
Apéndice II.....	82
Apéndice III	87

Referencias.....	90
<i>Curriculum Vitae</i>	97

Lista de Tablas

Tabla 1 - Diámetros de microesferas basadas en PHB.....	37
Tabla 2 - Eficiencia de atrapamiento de microesferas a base de PHB.....	38
Tabla 3 - Valores experimentales de la masa de liberada M a través de microesferas con diferentes concentraciones de curcumina cargada (p/p) y desviación estándar.	49
Tabla 4 - Susceptibilidad magnética de microesferas de PHBV con diferentes concentraciones de SPIONs.	74
Tabla 5 - Degradación aeróbica de varias películas de PHAs por una mezcla de bacterias [126].	84
Tabla 6 - Propiedades de las PHA depolimerasas producidas por la <i>P. lemoignei</i> purificada de la <i>E. Coli</i> recombinante [3].	85
Tabla 7 - Tasa de degradación de diferentes biopolímeros por diferentes cepas bacterianas [123].	89

Lista de Figuras

Figura 1 – Estructura general de un polihidroxialcanoato (x =número de grupos metilo en la estructura vertebral; $n=1000-10000$; R =grupos alquilo, C1-C13). [2]	19
Figura 2 - Diagrama esquemático de la técnica de emulsión de aceite en agua.	23
Figura 3 - Equipo Polytron PT-MR 2100 para homogenizar la emulsión de dos fases.	27
Figura 4 - Microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-6360LV.	28
Figura 5 - Espectrofotómetro de luz visible Libra S80PC Biochrom.	29
Figura 6 - Cultivo de células A549 en frascos de cultivo con DMEM.	33
Figura 7 - Placas de cultivo de 12 pocillos con células A549 tratadas con microesferas y puestas en incubación.	34
Figura 8 - Micrografías SEM de microesferas de PHB cargadas con riboflavina.	35
Figura 9 - Micrografías SEM de microesferas de PHB con curcumina cargada.	36
Figura 10 - Liberación acumulativa de curcumina en SBF de 5 mg de muestra de microesferas cargadas a diferentes concentraciones de 5, 10 y 15% (p/p).	39
Figura 11 - Liberación acumulativa de riboflavina en SBF de diferentes cantidades de microesferas con riboflavina cargada al 10% (p/p).	41
Figura 12 - Liberación acumulativa en H_3PO_4 de 5 mg de microesferas cargadas con curcumina a concentraciones de 5, 10 y 15% (p/p).	42
Figura 13 - Liberación acumulativa en H_3PO_4 de diferentes cantidades de muestra de microesferas con riboflavina cargada a 10% de concentración (p/p).	43
Figura 14 – Erosión superficial de microesferas de PHB con curcumina cargada después de a) 24, b) 36, c) 48, d) 60, e) 80 and f) 120 h de inmersión en H_3PO_4	44
Figura 15 - a) Perfil en tiempo de la masa de fármaco derivada del modelo matemático (líneas) comparada con los valores experimentales. b) Perfil en tiempo de la penetración $\zeta(t)$ obtenido de la solución semi-analítica al modelo propuesto para las curvas cinéticas	50
Figura 16 - Viabilidad celular por MTT de células A549 con a) 20 mg de microesferas con diferentes concentraciones de curcumina cargada y b) diferentes concentraciones de curcumina libre, a las de 24 h de incubación.	52
Figura 17 - Microesferas de PHB con curcumina cargada, depositadas de forma semi-homogénea en células A549.	53
Figura 18 - Viabilidad celular por medio de MTT de células A549 en todas las condiciones después de a) 6 y b) 24 horas de incubación. Los asteriscos indican una diferencia significativa, * $p < 0.05$, de acuerdo con análisis ANOVA de una vía (se utilizó la prueba de Tukey).	55
Figura 19 - Comparativa de viabilidad celular por Annexin V y PI de células A549 después de 6 h (columna izquierda) y 24 h (columna derecha) de incubación.	57
Figura 20 - Comparación de oblacones celulares de citometría de flujo después de a) 6 h y b) 24 h de incubación. Los asteriscos indican una diferencia significativa, * $p < 0.05$, de acuerdo con análisis ANOVA de una vía (se utilizó la prueba de Tukey)	58
Figura 21 - Publicaciones en revistas indexadas (Q1) durante la realización del doctorado.	62
Figura 22 - Homogeneizador T18 IKA utilizado en la fabricación de microesferas.	66
Figura 23 - SEM Auriga-Zeiss utilizado para el análisis de morfología de las microesferas fabricadas, a) tablero de control, b) cámara de análisis.	67
Figura 24 - Lector fotométrico de microplacas PHOmo Autobio, utilizado para el análisis del ensayo WST-8.	69

Figura 25 - Micrografías SEM de microesferas de PHBV con SPIONs y curcumina incorporados.....	71
Figura 26 - Eficiencia de atrapamiento de curcumina en microesferas de PHBV con distintas concentraciones de SPIONs incorporados.....	72
Figura 27 - Eficiencia de atrapamiento de SPIONs en microesferas de PHBV fabricadas con diferentes cargas de SPIONs incorporados.....	73
Figura 28 - Viabilidad celular por WST-8 de microesferas de PHBV cargadas del 10 al 50% de SPIONs después de a) 24 h y b) 7 días de incubación.....	75
Figura 29 – Microesferas de PHBV/SPIONs/curcumina (blanco) en células MG-63 después de 24 h. (los núcleos celulares fueron modificados a verde para su mejor análisis).	77
Figura 30 – Células MG-63 tratadas con a) SPIONs libres y b) microesferas de PHBV/SPIONs/curcumina (en blanco) después de 7 días. (los núcleos fueron modificados a verde para su mejor análisis).....	78
Figura 31 - Microesferas de PHBV a) sin carga y b) con carga de DAPI al 10%.	79
Figura 32 - Reconstrucciones 3D de dos secciones de una microesfera de PHBV/DAPI rodeadas de células MG-63 a través de microscopía confocal.	80

Introducción

1.1 Motivación

En los últimos años, el uso de micro y nano dispositivos ha permitido vislumbrar la administración de fármacos en el organismo de una forma más efectiva y eficiente. Además de brindar otras ventajas como: la reducción de los efectos secundarios, liberación localizada, mejor interacción biológica con el dispositivo y la degradación de este, entre otras. En esta área, algunos biopolímeros como los polihidroxialcanoatos (PHAs) juegan un papel importante debido a sus propiedades como biocompatibilidad y biodegradabilidad. Por otra parte, al ser biopolímeros sintetizados a partir de microorganismos y mediante medios renovables, los PHAs son también materiales sustentables [1]. De modo que nuevas soluciones para los problemas actuales en la administración de fármacos, pueden ser desarrolladas a partir de la implementación de los PHAs en la fabricación de micro dispositivos como sistemas liberadores de fármacos.

1.2 Descripción del problema

Algunos de los retos, en cuanto a administración de fármacos se refieren, consisten en lograr la administración controlada y prolongada dentro del organismo, la posibilidad de dirigir los fármacos hacia áreas definidas, tejidos u órganos específicos. Así como mejorar la interacción entre los dispositivos y el entorno biológico en el que se aplican, además de reducir los efectos secundarios. De modo que el problema abordado en este trabajo se centra en lograr la liberación controlada de fármaco a través de un dispositivo fabricado a base de PHAs.

1.3 Preguntas de Investigación

¿Cuál es la capacidad de las microesferas de PHA como vehículos de liberación controlada de extractos naturales como curcumina y riboflavina?

¿Cuál es la cinética de liberación del fármaco por medio de microesferas de PHA en un ambiente simulado?

¿Cómo se puede modelar de forma diferente la cinética de liberación en ambiente simulado?

¿De que forma se modifica la liberación de un fármaco en cultivo celular a partir de su administración por microesferas de PHA?

1.4 Hipótesis

“Microesferas de PHA permiten la liberación gradual de sustancias como la curcumina en cultivo celular y el modelado de su liberación en ambientes simulados se mejora al incluir el balance de masa.”

1.5 Objetivos

General

- Desarrollar microesferas de PHA para liberar de forma gradual un fármaco modelo y estudiar el comportamiento de liberación en ambientes simulados y ambientes biológicos como el cultivo celular.

Particulares

- Incorporar sustancias como curcumina y riboflavina en microesferas de PHB y hacer su caracterización.
- Estudiar el comportamiento de liberación en ambientes simulados como el fluido biológico simulado.
- Construir un modelado matemático que describa la cinética de liberación en fluido simulado, incluyendo el balance de masa.
- Estudiar el comportamiento de liberación en cultivo celular.

1.6 Alcance y limitaciones

El alcance de este trabajo de tesis aporta elementos nuevos en la modelación de la liberación de fármacos por medio de DDS a base de PHAs. Esto a través del estudio de las cinéticas de liberación de dos fármacos modelo en ambientes simulados y la modelación matemática incorporando un elemento nuevo como es el balance de masa. El cual no se había considerado en modelos anteriores. Además, de mostrar el comportamiento de liberación de un fármaco modelo (curcumina) en cultivo celular. Con el enfoque hacia encontrar evidencia de liberación gradual o controlada desde el DDS y como esta liberación representa una ventaja sobre el método convencional de administración directa.

Este trabajo se encuentra acotado por su estudio en ambientes simulados y controlados como lo son: el fluido biológico simulado y el cultivo celular. A pesar de que para su aplicación *in vivo* diversos factores pueden influenciar el comportamiento de liberación de un fármaco, los resultados presentados en este trabajo de tesis aportan información importante hacia ese objetivo. Por otra parte, el modelo matemático se encuentra acotado a la liberación por difusión de la curcumina en ambientes simulados. Por último, los estudios biológicos están acotados a las condiciones de cultivo celular, mostraron evidencia de liberación gradual en términos de un efecto retardado del fármaco en las células.

1.7. Contribuciones científicas

Se realizó un modelo matemático nuevo para la descripción de la liberación de un fármaco modelo en SBF, esto a través de incorporar un elemento nuevo (balance de masa). Lo anterior permite una descripción más precisa en términos del desplazamiento de masa del fármaco en el SBF. Lo cual se comprobó mediante la comparación de los resultados del modelo con los resultados experimentales. Este modelo también puede utilizarse para estimar cinéticas de liberación en SBF con distintas condiciones iniciales.

Por primera vez se realiza la comparación entre el comportamiento de liberación por un método convencional (administración directa) y la liberación por medio de microesferas. Comprobada a través de dos métodos distintos y medida en dos lapsos de tiempo de liberación distintos. Los resultados mostraron que hay diferencia importante entre el efecto del fármaco liberado desde las microesferas como DDS, en comparación con una administración convencional directa. Se observó que se puede retardar el efecto de un fármaco sobre las células, debido a una liberación gradual del fármaco a través de la liberación por microesferas. Este resultado representa un avance importante hacia una liberación controlada.

Marco Teórico

2.1 Antecedentes

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una familia de poliésteres los cuales son sintetizados a partir de una variedad de microorganismos, principalmente bacterias, a través de la fermentación de: azúcares, lípidos, alcanos, alquenos y ácidos alcanóicos; para posteriormente usarlos como reservas de carbono y como fuente de energía [1-5]. Estas reservas son acumuladas como gránulos dentro del citoplasma de las bacterias, los cuales pueden ocupar hasta el 80% de su masa. Diferentes cepas bacterianas pueden acumular PHAs con diferentes grados de eficiencia, esta eficiencia puede ser mejorada a partir de diversos métodos, como por ejemplo la modificación genética [6-9].

Existen varios tipos de PHA, dependiendo de las fuentes de carbón disponibles en el medio y los procesos metabólicos que utilice el microorganismo que los produce; por ejemplo, el poli-R-3-hidroxibutirato es el primer PHA descubierto y es el más común encontrado en la naturaleza [10]. Después de ser extraído de los microorganismos, el PHA muestra la propiedad de termoplaticidad, lo que permite su procesamiento mediante técnicas utilizadas en polímeros convencionales. Las propiedades de los PHAs pueden ser modificadas por diversos mecanismos, dependiendo de a que aplicación se dirijan. Algunos están dados por las condiciones de temperatura empleadas durante su fabricación y otros se basan en su mezclado con otros materiales, entre otros mecanismos [1, 11-16].

Otra característica importante de los PHAs, es que pueden ser fácilmente biodegradables en comparación con los polímeros de origen petroquímico. Además, pueden ser completamente mineralizables, obteniendo como subproductos dióxido de carbono y agua. Esta característica también los vuelve materiales candidatos para reemplazar a los plásticos convencionales derivados del petróleo, lo podría ayudar a reducir el impacto ambiental causado por el uso de plásticos convencionales [1, 10, 17-19].

La biodegradación de los PHAs ocurre a través de hidrólisis, bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Los PHAs son degradados por medio de una depolimerasa específica producida principalmente por algunas bacterias. Sin embargo, esta depolimerasa tiene una estructura similar a las lipasas y esterases producidas por organismos más complejos como los

mamíferos [17, 20-24]. Mayores detalles sobre las características de la PHA depolimerasa se muestran en el [Apéndice II](#).

La cinética de degradación de los PHAs depende de diferentes factores como: la cristalinidad la morfología superficial, la porosidad, la superficie de contacto y la hidrofobicidad superficial, entre otros [12, 13, 15, 25, 26]. La forma de la estructura molecular de los PHAs (Figura 1), puede cambiar a partir de la inclusión de grupos de carbono (R), lo que también modifica algunas propiedades del PHA. La posibilidad de modificar estas propiedades físicas y mecánicas ha vuelto a estos materiales interesantes para la industria; por ejemplo, el material “PHA latex” puede ser usado para cubrir papel o cartón, volviendo la superficie resistente al agua. Esto podría reemplazar los recubrimientos de aluminio en los empaques de cartón, método que se utiliza actualmente y que no biodegradables. Esta y otras aplicaciones podrían surgir de la capacidad del PHA para formar laminas, películas y diafragmas [17].

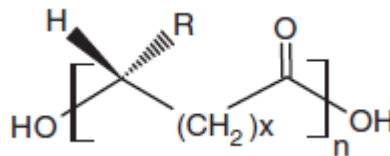


Figura 1 – Estructura general de un polihidroxialcanoato (x=número de grupos metilo en la estructura vertebral; n=1000-10000; R=grupos alquilo, C1-C13). [2]

Otro ejemplo, es la producción de PHB a gran escala, a partir de *Alcaligenes latus*, por la empresa “Biomer” en Alemania, la cual produce y transforma diferentes artículos a base de PHB como peines, bolígrafos y cartuchos [17]. También la industria de empaque ha encontrado en los PHAs un material con potencial para sustituir los plásticos basados en petróleo. En este rubro hay una gran variedad de productos en desarrollo actualmente como: el Nodax™ de P&G Chemicals y el Mirel de la compañía Metabolix, entre otros.

Los PHAs aparentemente también han presentado potencial aplicación para el control de algunos patógenos bacterianos, bajo ciertas aplicaciones específicas de acuicultura [8]. Otra característica recientemente descubierta en los PHAs, es poseer una naturaleza piezoeléctrica. Lo cual podría permitir la fabricación de algunos dispositivos como: sensores de presión para teclados, sensores de medición de aceleración o estiramiento, materiales para pruebas de esfuerzo, sensores de ondas de choque, encendedores de gas, micrófonos, detectores de ultrasonido, instrumentos de medición de presión y osciladores, entre otros [17].

Incluso algunas aplicaciones han sido sugeridas recientemente para el uso de PHAs en el ámbito energético. Se han propuesto como precursores de biocombustibles tales como el bioetanol, el cual es producido a partir de azúcar [27]. Esto mediante la esterificación de PHAs la cual produce 3-hidroxicanoatos esteres metilo, que tiene un contenido energético que es comparable con el bioetanol [27]. Sin embargo, esta aplicación se encuentra aún en discusión debido a que un combustible basado en PHA, requiere primeramente una fuente de carbón para la producción del PHA. Posteriormente, requeriría de los procesos de metilación, lo cual podría incrementar los gastos de producción en comparación con la fermentación directa de la glucosa u otras azúcares para la producción de bioetanol [8].

Por otra parte, debido a la ampliamente reportada biocompatibilidad exhibida por los PHAs, estos materiales tienen aplicaciones de gran impacto en el rubro médico, especialmente el P(3HB), P(3HB-3HV) y P(4HB). Por ejemplo, algunos de ellos han sido utilizados en el área médica como placas de crecimiento óseo, como materiales osteo sintéticos y para la producción de material quirúrgico. Aunque, debido a su baja tasa de biodegradación y su resistencia a la hidrólisis en tejidos estériles, el uso de P(3HB) ha ido decayendo para la fabricación de materiales quirúrgicos [17].

Sin embargo, esta baja tasa de biodegradación podría ser útil en otro tipo de aplicaciones biomédicas, tales como la ingeniería de tejidos, donde se ha experimentado con el uso de algunos PHAs para la fabricación de “*scaffolds*” o entramados para la diferenciación y proliferación de tejido óseo humano a partir de células madre [28]. El uso de PHAs también ha sido reportado en aplicaciones de reparación de tendón, mostrando buenos resultados en experimentos en ratas [29]. Por su parte, también se ha propuesto para la fabricación de “*scaffolds*” para la regeneración de tejidos suaves, como tejido cardíaco, para la construcción de válvulas cardiovasculares, injertos ventriculares y esófagos artificiales [30]. Incluso los PHAs han sido propuestos para la fabricación de entramados en 3D para el tratamiento de lesiones medulares [31].

Adicionalmente, los PHAs también han sido propuestos para aplicaciones farmacéuticas, en donde diversos sistemas liberadores de fármacos (DDS) pueden ser producidos. Como se ha observado, los productos de la degradación de los PHAs no son peligrosos para diversos ambientes orgánicos como el cuerpo humano. Incluso, debido a que los PHAs pueden ser degradados por las lipasas, producidas por diversos microorganismos, es posible que también puedan ser degradados por las lipasas producidas por el organismo humano [10]. Actualmente existen algunos biopolímeros que se utilizan para la fabricación de DDSs, estos dispositivos se utilizan de forma parenteral y comúnmente, la liberación del fármaco se difunde a lo largo de un periodo de 30 días. Sin embargo, estos materiales no son biodegradables y tienen que ser retirados posteriormente [17]. De modo que los PHAs

presentan ventajas para ser usados en la fabricación de DDSs al ser biodegradables y cuyos subproductos no son tóxicos para el organismo [32].

2.2 Microencapsulación

Diferentes rutas han sido exploradas para la administración de fármacos dentro del cuerpo humano, como por ejemplo oral, sublingual, intravascular, intramuscular, subcutánea, tópica, etc. Cada ruta con propósitos específicos y con sus ventajas y desventajas. Recientemente la micro y nano medicina, se centra en la aplicación de micro y nanotecnología para monitorear, reparar, construir y controlar algunos procesos biológicos del cuerpo humano a un nivel microscópico, inclusive a nivel molecular, por medio de distintos microsistemas.

Una fuerte tendencia en los últimos años en la industria farmacéutica consiste en adoptar la implementación de micro herramientas para diseñar repositorios de fármacos de alta eficiencia. Para posteriormente utilizarlos para: diagnosticar, como biomarcadores para estudios clínicos y preclínicos, desarrollar diagnósticos de imagenología y para aplicar diferentes enfoques de liberación de fármacos [33]. Algunas estructuras referidas en la literatura, que pueden aplicarse para estos objetivos, giran en torno a la microencapsulación de fármacos por medio de partículas, matrices, esferas y algunas otras estructuras más complejas como las micelas [34] y los dendrimeros [33]. Incluso más recientemente, se han propuesto algunas estructuras en la nano escala que involucran campos magnéticos a partir de partículas fabricadas a base de óxido de hierro (SPIONs), encapsuladas en diversos biopolímeros construyendo sistemas llamados partículas teranósticas [2]. Estas partículas que combinan el agente terapéutico y el agente localizador en el mismo DDS, además son dispositivos que pueden diferenciar entre la zona donde debe ser liberado el fármaco.

El éxito en la accesibilidad del fármaco en la zona donde debe ser liberado, depende en gran medida de la ruta de administración usada. Por ello, la ruta de administración tiene un efecto profundo en la velocidad y en la eficiencia con la que el fármaco actuará [33]. La introducción de dicho sistema de administración en la ubicación objetivo también da como resultado la administración de fármacos específicos en el sitio deseado. Por su parte, las propiedades de biocompatibilidad, biodegradabilidad, así como el hecho de que la cinética de liberación del fármaco se puede controlar mediante la modificación de los parámetros de la matriz de PHA, y con ello obtener las tasas de degradación deseadas, los convierte en excelentes materiales

para la fabricación de matrices poliméricas que permitan la liberación controlada de medicamentos.

Existen diferentes formas de generar microencapsulación mediante el uso de PHA y, dependiendo del PHA utilizado, se puede mejorar su procesamiento. Existe una amplia gama de PHAs que pueden ser utilizados para la microencapsulación, algunos ejemplos de ellos son los PHAs no modificados como P(3HB), copolímeros de PHAs como P (3HB-co-3HV), copolímeros de PHA anfífilicos como P (3HB-3HHx) -b-PEG y mezclas de PHAs con otros polímeros biodegradables como la poli (ϵ -caprolactona) (PCL) con P (3HB-co-3HV), incluso los PHA se ha mezclado con otros polímeros inorgánicos como hidroxiapatita (HA) incorporados en P (3HB-co- 3HV) para su aplicación [2].

Diversos estudios han revelado que los PHAs se degradan por medio de erosión superficial, volviéndolos candidatos para liberación de fármacos; sin embargo, durante la fabricación de estas matrices poliméricas, se llegan a formar poros en la superficie debido a su alta cristalinidad, hidrofobicidad y la técnica de procesamiento. Esto hace que los medicamentos se liberen muy rápido, aún sin ningún signo de degradación del polímero [30]. Cada individuo responde de forma diferente a los fármacos, y existen muchos parámetros que pueden afectar esta respuesta. Ninguna ruta de administración de fármacos es ideal para todos los fármacos y para todas las circunstancias. En los últimos años, el desarrollo de sistemas de administración oral de fármacos de liberación controlada ha aumentado considerablemente [35]. A pesar de que existen los PHAs de cadena media (mcl-PHA), los cuales pueden formar matrices poliméricas para la liberación de fármacos más adecuadas debido a su bajo punto de fusión y baja cristalinidad, la investigación sobre mcl-PHA aún es limitada, principalmente debido a la dificultad y el costo de producción de estos mcl-PHA a gran escala [30].

Existen diversas técnicas para generar micro y nano partículas, las dos técnicas mayormente utilizadas son: el método de secado por pulverización (*spray drying*) y el método de emulsión de fases mas evaporación de solventes. Ambos métodos permiten generar gránulos de PHA desde la micro hasta rozar la nanoescala [2]. Para fabricar dispositivos útiles como sistemas de administración de fármacos a nivel micro y nano, es deseable principalmente tener un control de la tasa de liberación del fármaco, ya sea por difusión o por degradación del material, así como eliminar o minimizar la toxicidad de los productos de la degradación de los DDS. La cinética de liberación del fármaco deseada también se puede lograr variando el tamaño de partícula. La composición química de la matriz polimérica y del fármaco también influyen en la estructura de las micropartículas resultantes y en consecuencia, en la cinética de liberación del fármaco. Existen algunos trabajos realizados por *Francis et al.* en la última década, donde se ha reportado la adición de gentamicina en microesferas de P(3HB), o el uso de biocerámicos en P(3HB) con éxito [36, 37].

El interés en la liberación de medicamentos a través del uso de micro y nano DDS basados en PHA se debe a las ventajas y propiedades novedosas que estos dispositivos pueden lograr como: la liberación prolongada, liberación controlada, el efecto localizado y la liberación dirigida. Así como la exploración de nuevas vías de administración como: inhalación, transdérmica, intravenosa e intracelular entre otras [2, 33, 36, 38-40]. Estas nuevas rutas de administración podrían ser convenientes para la administración de distintos fármacos. Estudios recientes muestran el potencial de los DDS basados en PHAs para el atrapamiento de distintos componentes como proteínas, antibióticos, vitaminas y algunos extractos naturales utilizados como fármacos modelo [32, 34, 41-47]. Sin embargo, la eficiencia de atrapamiento varía dependiendo de las características de cada fármaco como: la hidrofobicidad, la afinidad con los solventes orgánicos, la temperatura de degradación, entre otras propiedades; mismas que pueden modificar la estabilidad del compuesto cargado en la matriz polimérica [16, 35, 42, 48-50].

2.3 Extractos naturales como fármacos modelo

Desde hace mucho tiempo, algunas hierbas y plantas se han utilizado en la realización de diferentes tratamientos tradicionales, incluso en algunas culturas la medicina herbal es un término común que se usa para referirse a los tratamientos tradicionales basados en plantas naturales y sus mezclas. En los últimos años, ha surgido cierta insatisfacción con la medicina convencional y una percepción de que los productos naturales son más saludables que los fármacos fabricados sintéticamente. Según la Organización Mundial de la Salud, alrededor del 80% de la población mundial depende de la medicina tradicional para satisfacer sus necesidades de atención de salud primaria [51]. A pesar de que, desde la invención de los fármacos sintéticos en 1897, con la fabricación de la aspirina el interés en la terapéutica derivada del uso de plantas disminuyó; recientemente, el uso de extractos naturales y derivados se ha vuelto popular nuevamente. Esto se puede notar también en el incremento en la cantidad de artículos publicados que contienen la palabra clave "medicina herbal", de 1778 al 2018 (consultado en Scopus, 01.07.19). Inclusive, recientemente se dedicó un número especial de la Revista Internacional de Ciencias Moleculares, a los productos naturales derivados de plantas y la creciente importancia e interés en moléculas útiles que se puedan obtener de fuentes vegetales y su aplicaciones en la salud [52]. Aunque, debido a la complejidad de los extractos naturales, es difícil demostrar su efecto terapéutico específico o diferenciado a que componente en particular se debe tal efecto, para posteriormente poder estandarizar su uso a gran escala. De modo que la investigación en torno a el uso de extractos naturales y a la evidencia de efectos positiva en su aplicación, aún se encuentra en discusión.

También se ha demostrado que una alternativa para hacer más efectivo el uso de los extractos naturales es combinarlos y administrarlos por medio de biomateriales “convencionales” para que se consigan efectos sinérgicos [52-54].

Un compuesto natural que es compatible con los solventes más comunes de los PHAs es la curcumina, la cual es un polifenol asociado recientemente con propiedades interesantes como: ser antioxidante, antiinflamatorio, antimicrobiano, promotor de la curación de heridas y protector contra algunas enfermedades degenerativas [55-57]. Por otra parte, también se ha reportado evidencia que muestra que la curcumina induce la apoptosis en algunas líneas celulares cancerígenas como las células de carcinoma de pulmón [58]. Otro compuesto interesante es la riboflavina, la cual al ser un nutriente esencial para la salud humana que se encuentra en diversos alimentos [59, 60], también puede ser considerada como un extracto natural. Además, la riboflavina también es soluble en la mayoría de los solventes comunes para los PHAs. La riboflavina, la cual forma parte del grupo de las vitaminas B, es un precursor del mono nucleótido de flavina (FMN) y del dinucleótido de adenina de flavina (FAD), ambos compuestos importantes para la realización de numerosos procesos metabólicos celulares. Además, es importante para la actividad mitocondrial, la producción de ATP, el ciclo de Krebs, la oxidación beta de ácidos grasos y la oxido-reducción entre otros. Incluso, se ha reportado que la deficiencia de riboflavina está relacionada con el malfuncionamiento celular, la inducción de apoptosis y probablemente también esté relacionada con otras enfermedades [60-62]. Al igual que la curcumina, también existen reportes sobre la aplicación de riboflavina en el tratamiento del cáncer, la riboflavina es un compuesto fotosensible que, ante la exposición de luz ultravioleta, desprende foto productos como lumicromo, lumiflavina, 7,8-dimetil-10-formilmetil isoaloxazina y algunas especies reactivas de oxígeno. Algunas de estas especies radicales como el ion superóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrógeno pueden causar citotoxicidad y muerte en las células cancerígenas. Por lo que, la riboflavina en combinación con fototerapia UV podría usarse como una alternativa para el tratamiento de algunos tipos de cáncer [63, 64].

De modo que la curcumina y la riboflavina tienen potencial para ser utilizadas como compuestos alternativos para el tratamiento de algunos tipos de cáncer. El atrapamiento de riboflavina y curcumina a través de una matriz polimérica de PHA es factible debido a la afinidad de ambos compuestos con los solventes más comunes de los PHAs. Además, pueden usarse como fármacos modelo, definiendo a un fármaco modelo como aquel que puede servir para rastrear o medir su liberación por medio del DDS. En este sentido, ambos compuestos son detectables por medio de espectrofotometría de luz visible por lo que pueden proponerse como fármacos modelo [65]. La incorporación de extractos naturales en matrices poliméricas de PHA es una solución interesante para aprovechar los beneficios de estos componentes naturales a través de nuevas vías de administración, como las que pueden ser posibles mediante la micro y nano encapsulación [52].

2.4 Partículas como DDS

Los biopolímeros más comunes utilizados en aplicaciones farmacológicas son algunos polímeros que no son biodegradables, como el polidimetilsiloxanoato (PS), el poliuretano (PU) y el polietileno-co-acetato de vinilo (EVA). Por lo que su primera desventaja es que deben de ser retirados del organismo una vez que se liberó el fármaco incorporado. Para la fabricación de DDS biodegradables, se han propuesto algunos materiales como proteínas y polisacáridos los cuales tienen propiedades mecánicas pobres, en este contexto los DDS basados en PHAs representan ventajas sobre los materiales propuestos actualmente. Los PHAs no sólo son biodegradables, si no que en teoría pueden permitir nuevas y diferentes propiedades como, proporcionar efectividad prolongada del fármaco, al promover una alta estabilidad del fármaco atrapado. Además, pueden reducir los efectos secundarios debidos a las liberaciones en ráfaga, baja degradación del fármaco atrapado, reducción de las fluctuaciones en la concentración del fármaco en la sangre y tejidos, así como la reducción de la frecuencia entre cada administración [2].

Actualmente, el PHA más utilizado en aplicaciones de farmacológicas es el polihidroxibutirato (PHB), el cual comparte las dos propiedades más importantes de la familia de los PHAs, la biocompatibilidad y la biodegradabilidad. Además, el producto más común después de la degradación por hidrólisis del PHB, es el ácido hidroxibutírico, el cual es un componente común en la sangre. Este componente se produce naturalmente para algunas células durante la cetogénesis, por lo que no debería representar un riesgo para el organismo [41].

Existe una gama de técnicas para la fabricación de micro y nano partículas, la técnica más común actualmente utilizada es la evaporación de solventes en emulsión o también conocida como emulsión de aceite en agua (o/w). Esta técnica, la cual se ha utilizado ampliamente desde hace aproximadamente dos décadas, consiste en la emulsión de una solución de polímero fundido (fase orgánica o fase oleosa) en una solución acuosa (fase acuosa) para su posterior emulsificación. La figura 2 muestra un esquema de la técnica y los componentes involucrados en ella. Mediante la agitación de estas dos soluciones no miscibles, comúnmente por homogeneización mecánica, y la posterior solidificación de las burbujas de biopolímero al enfriarse, es posible obtener esferas de biopolímero en escala micro e incluso nano. A través de la modificación de algunos parámetros como las revoluciones por minuto (rpm) y la temperatura de enfriamiento, así como la incorporación de pasos adicionales como sonicación o micro

fluidización, es posible mejorar el tamaño y la dispersión del diámetro de las partículas resultantes [66].

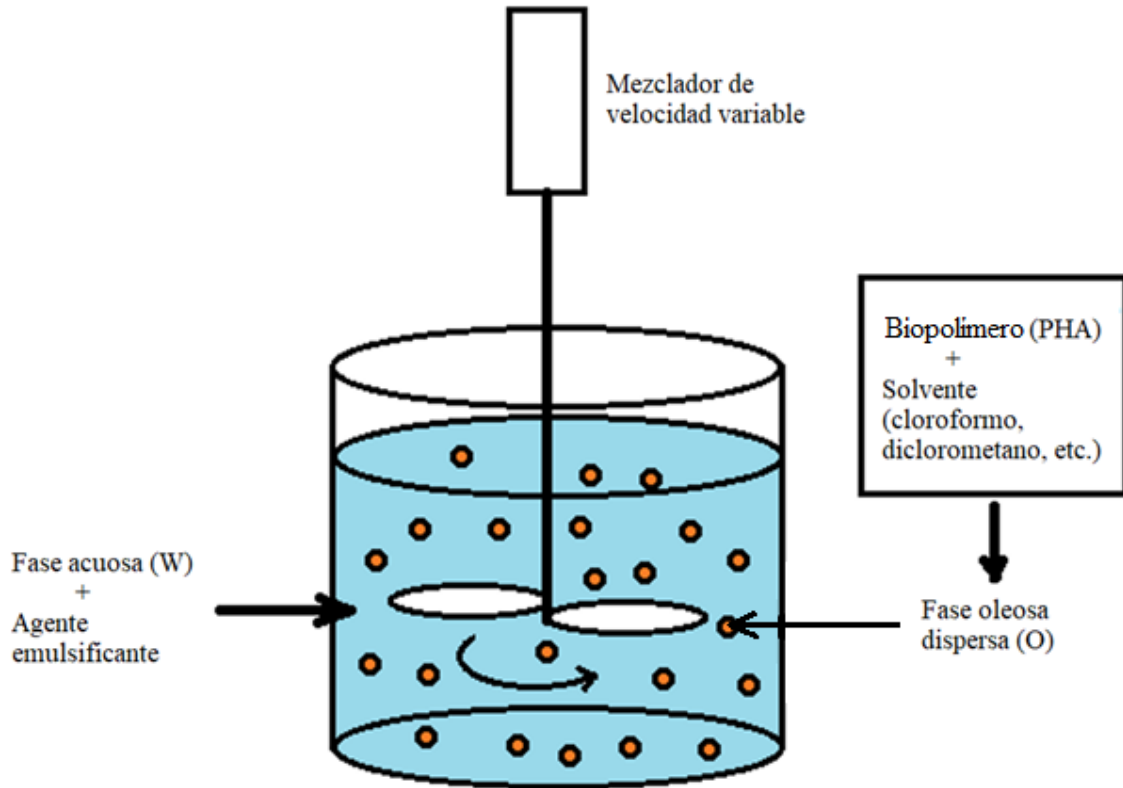


Figura 2 - Diagrama esquemático de la técnica de emulsión de aceite en agua.

Además de la técnica de emulsión O/W, existen otros métodos para la fabricación de micro y nano partículas, como la separación de fases orgánicas, la polimerización interfásica, la polimerización en emulsión de agua y el secado por pulverización.

Clasificación de partículas

Existen diversos tipos de partículas poliméricas utilizadas para la administración de fármacos, estas se pueden clasificar de distintas maneras y siguiendo distintos parámetros. De acuerdo a su

tamaño, se pueden clasificar en dos grandes grupos: como micropartículas $<125 \mu\text{m}$ y nanopartículas $<1 \mu\text{m}$ [67].

En cuanto a su constitución estructural, se pueden clasificar como:

- Microcápsulas: que son sistemas vesiculares en los que el fármaco está rodeado por una membrana polimérica.
- Microesferas: Una matriz en la que el fármaco queda atrapado disperso a través de la matriz polimérica [67].

Las microesferas producidas a través de las técnicas de emulsión y evaporación del solvente se encuentran comúnmente en el rango de 5 a 10 μm . Por otro lado, el tamaño de partícula producido por secado por pulverización pueden llegar al rango de 0.6 a 1.1 μm [2]. Algunos de los parámetros involucrados en la producción de una microesfera que funcione como DDS son: el biopolímero utilizado como matriz, el tamaño de partícula resultante deseada, la cantidad de fármaco incorporado, la estabilidad del fármaco, la morfología superficial, la humectabilidad superficial, la toxicidad de los productos de degradación y la cinética de liberación deseada, entre otros. Las propiedades deseadas al fabricar una microesfera para la liberación de fármacos son principalmente: liberación localizada, liberación prolongada, liberación controlada, efectos secundarios mínimos producto de la liberación del fármaco y productos de la degradación del DDS de baja toxicidad [67]. Los dispositivos utilizados actualmente en diferentes aplicaciones biomédicas son principalmente hechos de PLA, cuyos productos de degradación han reportado producir una respuesta inflamatoria considerable [68].

Para su aplicación en liberación de fármacos, inicialmente se propusieron los biopolímeros no degradables PS, PU y EVA, pero resultaron no ser muy convenientes para aplicaciones *in vivo* debido a que era necesario eliminarlos vía quirúrgica posteriormente [49]. Por lo que los PHAs al ser biodegradables y cuyos productos de biodegradación no son tóxicos muestran una clara ventaja sobre los biopolímeros propuestos con anterioridad. Información más detallada sobre la biodegradación de los PHA y los factores que influyen en dicha biodegradación se muestran en el [Apéndice III](#).

Diseño de un sistema de liberación de fármacos

3.1 Introducción

Como se ha mencionado con anterioridad, el objetivo de este trabajo de tesis es diseñar un DDS a base de PHAs para liberar de forma controlada un fármaco. En esta sección, se propusieron microesferas basadas en PHB como DDS, la caracterización general de la morfología superficial se realizó a través de SEM para todas las muestras. Se realizó el estudio del comportamiento de liberación en entornos abióticos y bióticos, así como la modelación y simulación matemática de la cinética de liberación por difusión, la comparación de los resultados del modelo matemático con los valores experimentales y el estudio del comportamiento de liberación del DDS en el entorno biótico. Los experimentos fueron propuestos con la intención de visualizar la biocompatibilidad del DDS, así como evidencia de liberación controlada. Se propusieron microesferas basadas en PHB para atrapar curcumina y riboflavina como fármacos modelo (es decir fármacos que pueden ser detectados posterior a su liberación). Además, tanto la curcumina como la riboflavina se encuentran bien definidos como fármacos por diversas instituciones como la Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU., El Instituto Nacional del Cáncer del Instituto Nacional de Salud de EE. UU. y el Banco de Datos de Fármacos Digital de Canadá, entre otros [69-73].

Se utilizaron diferentes concentraciones de curcumina y riboflavina para realizar las cinéticas de liberación y en diferentes entornos abióticos, como el fluido biológico simulado (SBF, por sus siglas en inglés) y un medio de pH ácido, usando ácido fosfórico (H_3PO_4). Se realizó el modelado matemático de la liberación por difusión de uno de los fármacos modelo (curcumina) en SBF, incorporando algunos conceptos adicionales al modelo de difusión clásico. Posteriormente, el comportamiento de liberación se estudió en el entorno biótico, en este caso

se utilizaron células de carcinoma pulmonar humano ATCC-A549 en cultivo celular. Por otro lado, se realizó el estudio de biocompatibilidad de DDS y se estudió del comportamiento de liberación de curcumina en la línea celular A549. Los resultados mostraron evidencia de liberación controlada en términos de un efecto de retardo del fármaco empleado en el cultivo celular.

3.2 Metodología Experimental

3.2.1 Materiales

El PHB fue adquirido de la compañía GoodFellow® (Huntingdon, Reino Unido) lote No. LS422208. El alcohol polivinílico (PVA) se adquirió de la empresa Química Suastes (México). La curcumina se obtuvo de la Droguería Cosmopolita (México), la riboflavina se obtuvo de la compañía HYCEL (México) y el cloroformo de Reactivos Meyer (México).

3.2.2 Fabricación de las Microesferas

Para la fabricación de las microesferas de PHB, se utilizó la técnica O/W de acuerdo al protocolo descrito por *Murueva et al.* [74], esta técnica se explicó brevemente en la [Sección 2.2](#). Diferentes concentraciones de cada uno de los fármacos modelo utilizados, fueron incorporados en el material PHB de acuerdo a esta técnica. Se prepararon microesferas con distintas proporciones de 5, 10 y 15% (p/p) de fármaco cargado. El PHB y cada fármaco modelo respectivamente se disolvieron en 9 ml de cloroformo, esto para conformar la fase oleosa (O). Posteriormente, se preparó una solución acuosa hecha de 1.25 mg/ml de PVA para conformar la fase acuosa (W) y se mezclaron cada una a 600 rpm. La emulsión O/W se homogeneizó a 20000 rpm durante aproximadamente 15 minutos usando un equipo Polytron PT-MR 2100 (Suiza), este se muestra en la Figura 3. Posteriormente, la solución se sonicó durante 15 minutos en un sonicador de baño de agua Branson 5210 (EE. UU.). Finalmente, la emulsión se dejó precipitar por gravedad durante 2 horas, y una vez separado, se retiró el sobrenadante de cada muestra; posteriormente, las muestras se almacenaron en un desecador durante una noche hasta

que el disolvente restante se evaporó por completo. Una vez secas, se extrajeron las muestras de microesferas y se almacenaron en tubos de vidrio con tapa en ambiente seco, a temperatura ambiente y protegidas de la luz.



Figura 3 - Equipo Polytron PT-MR 2100 para homogenizar la emulsión de dos fases.

3.2.3 Morfología superficial de las Microesferas

La morfología de la superficie de las microesferas a base de PHB se observaron utilizando un microscopio JEOL JSM-6360LV (Japón) el cual se muestra en la Figura 4. Las muestras se recubrieron con una película de oro (10 mA, 20 seg.) en un *Ion Sputter* JEOL JFC-1100E (Japón) antes de su observación en SEM.



Figura 4 - Microscopio electrónico de barrido (SEM) JEOL JSM-6360LV.

3.2.4 Eficiencia de atrapamiento

La eficiencia de atrapamiento (EE, por sus siglas en inglés) de curcumina y riboflavina se determinó de acuerdo con el método analítico indirecto reportado por *Zidan et al.* [75]. Este método consiste brevemente, en medir la concentración del fármaco presente en el sobrenadante, después de la inmersión de las microesferas en solución. En seguida, utilizando la cantidad teórica inicial de fármaco incorporado en la muestra y la concentración medida en el sobrenadante, es posible calcular el fármaco atrapado dentro de la muestra de microesferas.

Siguiendo esta técnica, las microesferas se colocaron en etanol para capturar el fármaco depositado en la superficie de las muestras de microesferas, luego se calculó la cantidad de fármaco atrapado de ellas [75] a través de la siguiente fórmula:

$$EE = \frac{(M_{the} - M_{sup})(100\%)}{M_{the}} \quad (1)$$

donde M_{sup} es la cantidad en masa de fármaco medida en el sobrenadante (mg) y M_{the} es la cantidad en masa inicial teórica de fármaco agregado (mg).

La concentración del fármaco modelo en el sobrenadante se midió utilizando un espectrofotómetro (Figura 5) de luz visible (UV / Vis) Libra S80PC Biochrom (Reino Unido) a 428 nm para la curcumina [75], y 444 nm para la riboflavina [76].



Figura 5 - Espectrofotómetro de luz visible Libra S80PC Biochrom.

3.2.5 Análisis de diámetros de Microesferas

El estudio de los diámetros para las microesferas basadas en PHB se realizó mediante el análisis de imágenes de alrededor de 60 micrografías de SEM. Para esto se utilizó el software de análisis de imágenes Digimizer, de la compañía MedCalc (Bélgica), para medir las partículas. Después, los resultados fueron procesados mediante el software estadístico Minitab, de la empresa Minitab inc. (EE. UU.), para así obtener la distribución de diámetros de las microesferas.

3.2.6 Cinética de liberación en SBF

La cinética de liberación de las microesferas basadas en PHB se realizó en SBF a un pH: 7.4. El SBF es una solución con concentración de iones muy similar al plasma sanguíneo, además de que tiene un pH similar. Por ello es comúnmente utilizado como un ambiente simulado en ensayos de bioactividad para diversos biomateriales y en cinéticas de liberación de fármacos es más aproximado al ambiente en el que se pretenden aplicar las microesferas que el buffer de solución fisiológica o el agua destilada [36, 77, 78]. Las muestras de microesferas con curcumina atrapada a concentraciones de 5, 10 y 15% (p/p) se colocaron en tubos de vidrio estériles con tapas (5 mg de microesferas por tubo) por triplicados. Paralelamente, se colocaron diferentes cantidades de masa (2, 4 y 8 mg) de muestras de microesferas con riboflavina atrapada, en este caso todas al 10% (p / p), en tubos de vidrio estériles con tapas. Posteriormente, 10 ml de SBF convencional (), preparado de acuerdo con *Oyane, Kokubo et al.* [77], fueron agregados a cada tubo. Todas las muestras se lavaron en etanol antes de realizar las cinéticas de liberación. Las cantidades de cada fármaco modelo (curcumina y riboflavina) fueron calculadas para trabajar en un rango de concentración liberada en SBF significativamente inferior al límite de saturación de cada fármaco en SBF, 50.7 mg/l y 84.7 mg/l para curcumina y riboflavina respectivamente [70, 73]. Los tubos con muestras de microesferas en SBF se colocaron sobre un agitador de mesa a temperatura ambiente durante 60 horas. Posteriormente, se tomaron muestras de sobrenadante a lo largo de distintos periodos de tiempo para medir la concentración mediante el uso de un espectrofotómetro UV/Vis Libra S80PC de la empresa Biochrom (Reino Unido) a 428 nm para la curcumina [75], y 444 nm para la riboflavina [76]. Las curvas de calibración de cada fármaco modelo se obtuvieron antes de cada una de las mediciones de las cinéticas de liberación, de manera similar a lo reportado por *Gopinath et al.* [57]. Se utilizaron cinco puntos de concentraciones conocidas como estándar para el ajuste de cada curva. En todas las mediciones se usó una celda con solamente

SBF como blanco de referencia. También se sometió una muestra de 5g de microesferas de PHB sin carga a la misma cinética y se midió a las longitudes de onda para ambos fármacos. Los valores de concentración se expresaron como la media y la desviación estándar como las barras de error.

3.2.7 Cinéticas de liberación en ambiente ácido

La cinética de liberación de las microesferas de PHB con fármaco incorporado también se realizaron en una solución de ácido fosfórico (H_3PO_4) a un pH: 2.5 (0.1 M). Las mismas condiciones de muestra de microesferas que la liberación en SBF se colocaron en tubos de vidrio estériles con tapas y por triplicado. Posteriormente se añadieron 10 ml de H_3PO_4 a cada tubo. Los tubos con muestra de microesferas se colocaron sobre un agitador de mesa de forma similar al ensayo con SBF. Posteriormente y a lo largo de distintos periodos de tiempo, se tomaron muestras de sobrenadante para medir la concentración por UV/Vis a las mismas longitudes de onda de liberación en SBF. Las curvas de calibración de cada fármaco modelo se obtuvieron previamente a cada cinética de liberación, usando cinco puntos de concentraciones conocidas como estándar para el ajuste de cada curva. En todas las mediciones se usó una celda con solamente H_3PO_4 como blanco de referencia. También se sometió una muestra de 5g de microesferas de PHB sin carga a la misma cinética y se midió a las longitudes de onda para ambos fármacos. Los valores de concentración se expresaron como la media y las desviaciones estándar como las barras de error.

3.2.8. Modelado matemático de la liberación en SBF

Se utilizaron los resultados de la curva experimental de la cinética de liberación de curcumina en SBF para realizar la modelación matemática. El enfoque para el modelo matemático propuesto se basó en un comportamiento clásico de difusión con una nueva consideración añadida, el balance de masa, para así realizar el ajuste del modelo con los valores

experimentales obtenidos. Se supuso que la velocidad de la liberación de curcumina de las microesferas debía seguir un comportamiento similar a una ley potencial [79], adicionalmente se asumió que el coeficiente de difusión efectivo D sería independiente de la concentración de curcumina en el medio SBF. El balance de masa total se realizó agregando al modelo una ecuación de movimiento para la penetración de la curcumina dentro del medio SBF. Se calculó el balance total y el balance local de masa para construir el modelo. También se supuso que el balance de masa debía estar limitado por el flujo de masa desde la superficie de la matriz polimérica en lugar de imponer una condición adicional límite para la superficie de la matriz polimérica. Se utilizaron métodos numéricos para resolver el sistema de ecuaciones diferenciales resultante del modelo.

3.2.9 Ensayos en cultivo celular

Ensayos preliminares

Para el ensayo preliminar, se suspendieron muestras de 20 mg de microesferas de PHB con curcumina cargada a razones de 5, 10 y 15% (p/p) en medio de cultivo Eagle de Dulbecco (DMEM). Se sembraron células de carcinoma pulmonar humano ATCC-A549 en placas de 12 pocillos y se añadieron 1.5 ml de DMEM con 10% de suero fetal bovino (FBS) y 1% de penicilina, para luego ser incubadas durante 12 horas. Después de alcanzar el 80% de confluencia, se añadieron a las células 100 μ l de solución de microesferas por duplicado. Simultáneamente, se añadió en otros pocillos solución de curcumina libre a las células para alcanzar diferentes concentraciones de 5, 10, 20 y 30 mM. La Figura 6 muestra un frasco de cultivo celular con DMEM y células A549.

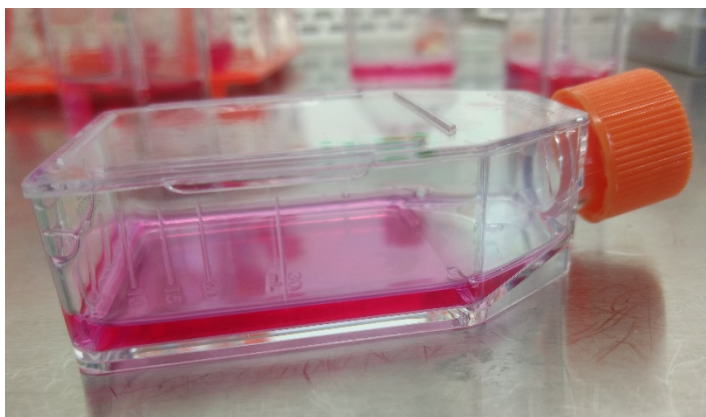


Figura 6 - Cultivo de células A549 en frascos de cultivo con DMEM.

Ensayos de liberación controlada

Utilizando los resultados del ensayo preliminar y valores reportados en literatura [58], se estableció una cantidad de curcumina de 1.5 mg (42 mM aprox.) para inducir apoptosis en las células A549 [58]. Se prepararon diferentes soluciones madre de DMEM y la masa necesaria de microesferas para conseguir la cantidad de curcumina establecida, esto para cada concentración p/p fabricada (5, 10 y 15%). Además, se preparó una solución madre adicional con 1.5 mg de curcumina libre. Posteriormente, se añadieron 100 μ l de cada solución en placas de 12 pocillos con células A549 al 90% de confluencia, por duplicado (Figura 7). Como controles de viabilidad se utilizó peróxido de hidrógeno como control negativo y células sólo con DMEM como control. El ensayo de viabilidad celular MTT (Sigma-Aldrich, EE. UU.) se realizó a las 6 y 24 horas de incubación a 32 ° y 5% de CO₂. Como parte del ensayo, se transfirieron 100 μ l de sobrenadante de cada pocillo con células y reactivo MTT a una placa de 96 pocillos para su medición en absorbancia a 590 nm por medio de un lector de microplacas Varioskan Flash Thermo Scientific (EE. UU.). Simultáneamente, se realizó la citometría de flujo por Annexin V (Luminex, EE. UU.), mediante un analizador de células, citómetro de flujo, Muse (EE. UU.). Ambos ensayos se realizaron a las 6 y 24 horas de incubación previa para ser comparativos.



Figura 7 - Placas de cultivo de 12 pocillos con células A549 tratadas con microesferas y puestas en incubación.

Los datos son presentados como el promedio \pm desviación estándar de cada tratamiento. Los datos se analizaron para determinar la significancia estadística mediante el análisis de varianza ANOVA One-way, seguido de la prueba de Tukey ($p < 0,05$), utilizando el software Origin 8 (Origin Lab, EE. UU.).

3.3 Resultados y Discusión

3.3.1 Morfología superficial

Mediante SEM se observaron las microesferas fabricadas a base de PHB y cargadas con riboflavina a diferentes concentraciones de 5, 10 y 15% (p/p) (Figura 8). Las microesferas fabricadas exhibieron una forma esférica con superficie semi porosa, muchas de ellas exhibiendo poros de diferentes tamaños. Esta superficie porosa podría atribuirse al solvente utilizado para su fabricación, cloroformo, el cual se ha reportado que produce superficies semi porosas similares [36, 80]. La forma de las microesferas no se vio afectada por las diferentes concentraciones de riboflavina incorporada, al menos en el rango de 15% y menor. Como también se ha reportado con anterioridad por *Francis et al.*, el cloroformo, a diferencia de otros solventes como el diclorometano, ayuda a evitar una mayor deposición de PVA residual en la superficie de las microesferas, lo que influye en algunas propiedades físicas como la hidrofobicidad de la superficie, la tasa de liberación del fármaco y la tasa de adsorción de proteínas en su superficie [36].

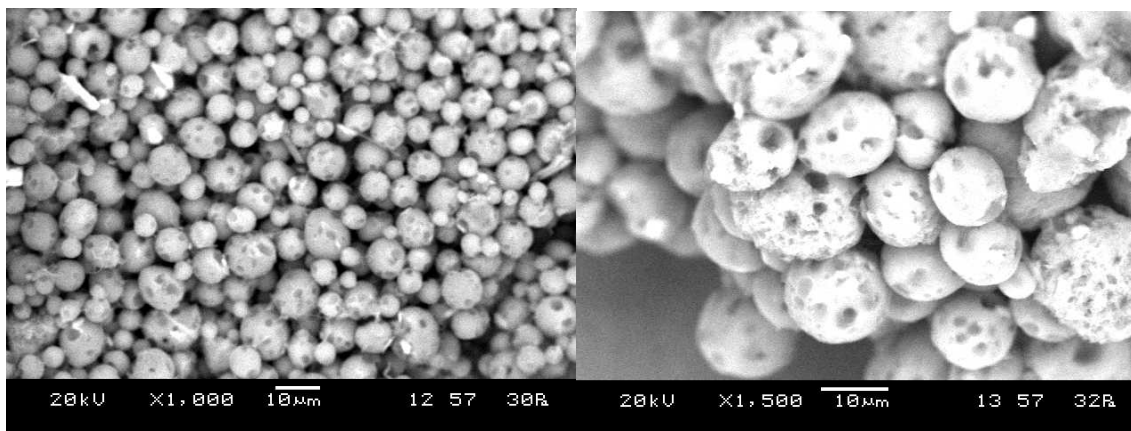


Figura 8 - Micrografías SEM de microesferas de PHB cargadas con riboflavina.

La Figura 9 muestra las microesferas de PHB cargadas con curcumina. De forma similar a las microesferas cargadas con riboflavina, las microesferas fabricadas con curcumina cargada exhibieron una forma esférica con una superficie semi suave. En este caso con aparentemente menos porosidad en la superficie y algunas de ellas con poros de diferentes tamaños. La forma de las microesferas no se vio afectada por las diferentes concentraciones de curcumina incorporada. Como ambas condiciones de microesferas se fabricaron con el mismo método, la diferencia en la porosidad puede explicarse por la dispersión del surfactante utilizado durante su fabricación (PVA), lo cual puede afectar la formación de los poros en la superficie, como ha sido reportado previamente por *O'Donell et al.* [36, 66]. Es necesario realizar más estudios para establecer si existe una correlación entre el fármaco atrapado y la porosidad en la microesfera, esto podría ser considerado como trabajo a futuro. Para ambos fármacos modelo utilizados (riboflavina y curcumina), las microesferas producidas exhibieron forma esférica con una morfología superficial similar a la reportada previamente por diversos autores y utilizando la misma técnica [36, 41, 43, 74, 81].

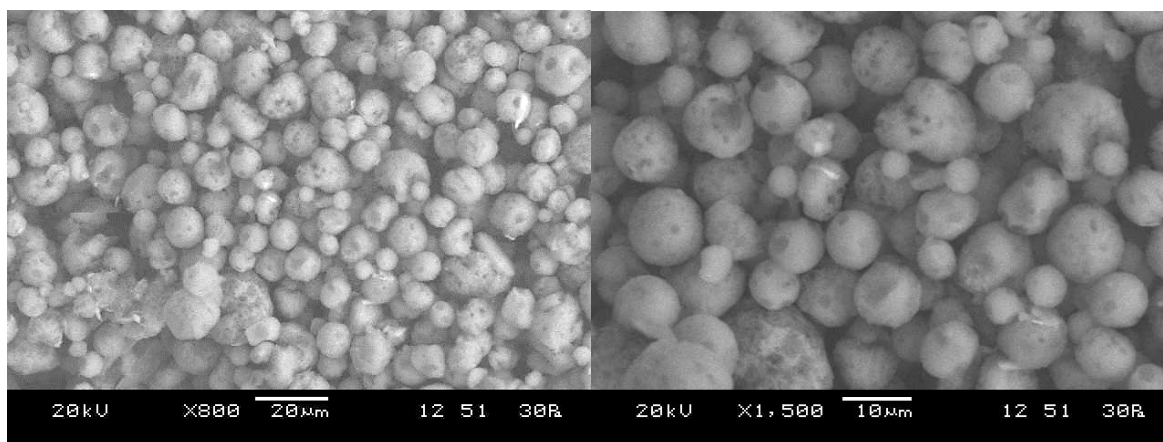


Figura 9 - Micrografías SEM de microesferas de PHB con curcumina cargada.

3.3.2 Tamaño de Microesferas

En la Tabla 1, se muestran los promedios de los diámetros de las microesferas fabricadas con ambos fármacos modelo utilizados, así como su desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés). Los diámetros mostrados son similares a los reportados en trabajos previos y utilizando técnica de emulsión O/W para la fabricación de microesferas. En estos trabajos se utilizaron diferentes biopolímeros tales como poli-lactida-co-glicólido, PHB y polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato/polietilenglicol, para el atrapamiento de distintos fármacos modelo como la heparina, tetraciclina y flomoxef sódico [80, 82-84].

Tabla 1- Diámetros de microesferas basadas en PHB.

Fármaco incorporado	Diámetro promedio (μm)	SD (μm)
Riboflavina	9.10	2.32
Curcumina	6.98	1.89

3.3.3 Eficiencia de atrapamiento

Los resultados de la EE para las microesferas de riboflavina y curcumina se muestran en la Tabla 2. Como se puede observar, las eficiencias de atrapamiento son similares, posiblemente debido a la compatibilidad de ambos fármacos modelo con el solvente orgánico utilizado. Para este caso cloroformo, en el cual son solubles tanto la curcumina como la riboflavina como ha sido reportado previamente por *Modasiya et al.* y diversas bases de datos de fármacos públicas [69, 85]. Esto también podría explicar los porcentajes de EE por encima del 97% en todos los casos, correspondientes a valores similares reportados en trabajos previos, donde se han utilizado matrices poliméricas similares [45, 86, 87]. Así mismo, se ha reportado en ambos fármacos modelo empleados (curcumina y riboflavina), la existencia de grupos funcionales afines a algunos grupos presentes en el PHB lo cual aumenta la afinidad del fármaco a la matriz polimérica y explica los valores de EE observados [57, 60].

Tabla 2 - Eficiencia de atrapamiento de microesferas a base de PHB.

Eficiencia de atrapamiento (EE)	5%	10%	15%
Riboflavina	98.07 ± 0.749 %	97.51 ± 0.560 %	97.02 ± 0.638 %
Curcumina	98.88 ± 0.789%	98.32 ± 0.530 %	98.01 ± 0.530 %

3.3.4 Cinética de liberación en SBF

La liberación acumulativa de curcumina desde las microesferas de PHB en SBF se muestra en la Figura 10. En ella se puede observar un comportamiento de liberación bifásico. En todas las condiciones estudiadas, la liberación inicial, llamada por algunos autores como la fase explosiva [43, 81, 83], ocurrió durante las primeras 7 horas. Posteriormente, la liberación se vuelve lenta y gradual hasta que la concentración de curcumina se estabiliza (después de 10 h). A esta segunda fase también se le ha llamado en la literatura como la fase controlada, debido a que la curva de concentración presenta un comportamiento asintótico, con una razón de cambio de la pendiente constante, hasta llegar a un valor constante. Este comportamiento de liberación fue similar a algunas curvas previamente reportadas por autores como *Monnier, Grillo y Bonartsev*, entre otros [43, 81, 83]. En estos trabajos, distintos fármacos modelo fueron incorporados en microesferas basadas en PHA. La muestra con solo microesferas de PHB sin carga no mostro valor de concentración en comparación con el blanco, en la longitud de onda para la curcumina (428 nm).

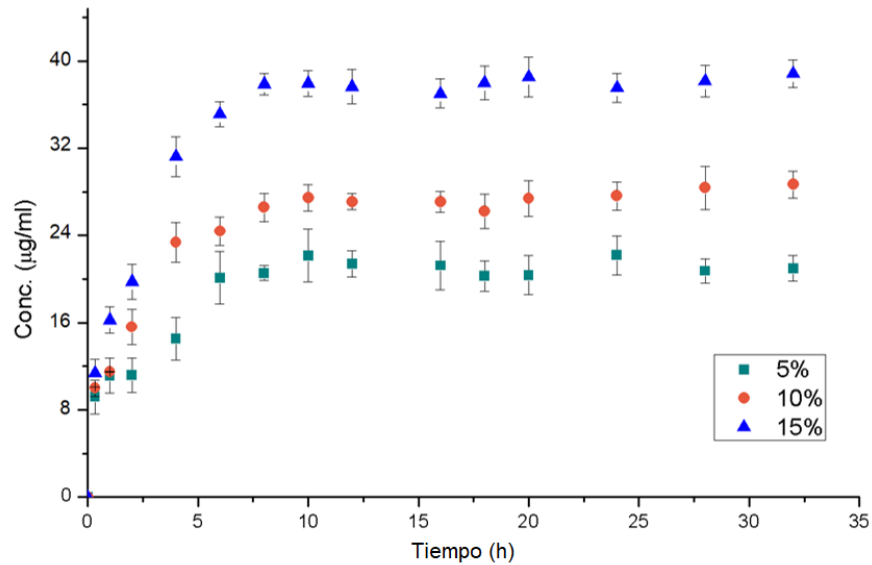


Figura 10 - Liberación acumulativa de curcumina en SBF de 5 mg de muestra de microesferas cargadas a diferentes concentraciones de 5, 10 y 15% (p/p).

La liberación rápida en la primera fase de la cinética de liberación podría atribuirse a dos razones principales. En primer lugar, a la liberación de curcumina atrapada en la superficie semi-porosa de las microesferas. La presencia de poros resulta en un aumento del área de la superficie de contacto que interactúa con el SBF, lo cual puede ser una causa de las tasas de liberación altas durante las horas iniciales. Este comportamiento fue similar al comportamiento explosivo debido a las superficies porosas pero de microesferas basadas en PLGA, reportadas previamente por *Erden et al.*[48]. En segundo lugar, la liberación durante la primera fase podría atribuirse a las microesferas más pequeñas presentes en la distribución, debido a que, como se ha reportado en trabajos previos realizados por *Francis et al.*, la velocidad de liberación está influenciada por tamaño de las microesferas [36]. La diferencia en la concentración de curcumina atrapada en las microesferas también pudo haber influido, al menos como se puede observar en las curvas de liberación. La pendiente de la fase explosiva es distinta en cada una de las concentraciones estudiadas, las muestras con concentración mayor exhibieron pendientes mayores durante las primeras horas de la cinética, así como valores de concentración más elevados cuando se estabilizaron.

La segunda fase, la cual también es referida en la literatura como la fase controlada [43, 80, 81, 83], apareció después de 7 horas aproximadamente, con el comportamiento asintótico previamente mencionado. Este comportamiento puede atribuirse a la difusión del fármaco a través de las capas más profundas de la matriz polimérica de las microesferas, hasta llegar a un posible agotamiento casi completo. Un comportamiento similar tanto de las partículas grandes como de partículas más pequeñas ha sido reportado previamente por *Panith et al.* [80]. Después de 20 horas, el valor de concentración se estabilizó y no se observaron cambios significativos en la concentración en el tiempo siguiente. A partir de las 35 horas, se hicieron mediciones a diferentes intervalos de tiempo, sin que se observaran cambios significativos en la concentración.

La cinética acumulativa de liberación de riboflavina se muestra en la Figura 11. Como se puede observar, el comportamiento de liberación de riboflavina, esta vez debida a diferentes cantidades de masa de microesferas con riboflavina cargada, fue similar a la curva cinética de liberación de curcumina en términos del comportamiento bifásico observado, esto también es consistente con reportes previos en la literatura [43, 81, 83]. Algunas cinéticas de liberación de riboflavina se han estudiado previamente por *Abd et al.*, mediante el uso de otras matrices poliméricas como DDS, pero un medio de pH similar al utilizado en el presente estudio [45]. En ese trabajo se confirmó la influencia del pH del medio en la tasa de liberación del fármaco modelo liberado, esto también correspondiente con estudios realizados por *Chen et al.*, donde se observa relación entre pH en el medio con la variación de las tasas de liberación de diferentes fármacos modelo [34].

En apariencia, la fase controlada comenzó a las 10 horas y tuvo un comportamiento de crecimiento aparentemente constante hasta las casi 30 horas, luego, al igual que en los casos anteriores, la concentración se estabilizó en un valor constante final. A partir de las 35 horas, se hicieron mediciones a diferentes intervalos de tiempo sin que se observaran cambios significativos en la concentración. La muestra con solo microesferas de PHB sin carga, no mostro valor de concentración en comparación con el blanco, en la longitud de onda para la riboflavina (444 nm).

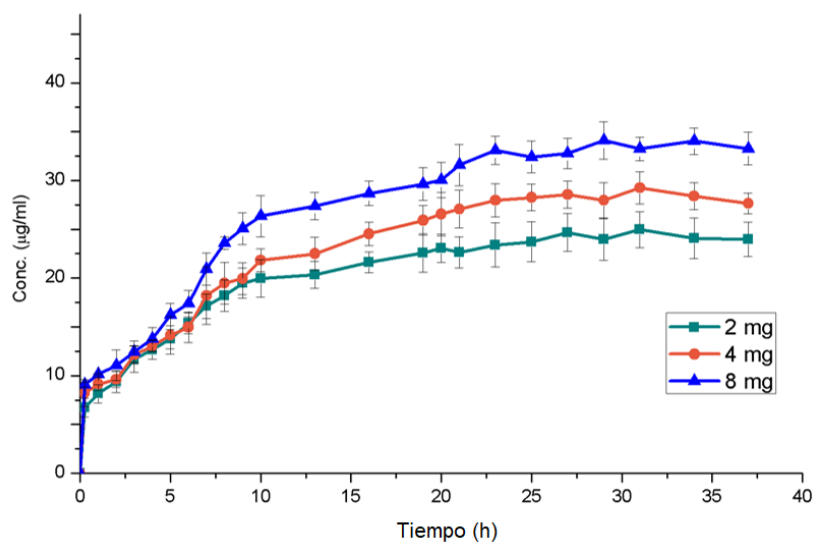


Figura 11 - Liberación acumulativa de riboflavina en SBF de diferentes cantidades de microsferas con riboflavina cargada al 10% (p/p).

3.3.5 Cinética de liberación en ambiente ácido

La liberación acumulativa de curcumina a través de microsferas de PHB en ácido fosfórico (H_3PO_4) se muestra en la Figura 12. La cinética de liberación es similar a la de la liberación en SBF en términos del comportamiento bifásico observado. Sin embargo, la liberación inicial en la fase explosiva ocurrió más rápido que en SBF, es decir con una mayor pendiente y durante menos tiempo, 5 h en comparación con las 7 h que tomo esta misma fase en el SBF. Después de las 7 h la liberación se vuelve lenta y gradual, se entra en la fase controlada, hasta que la concentración de curcumina se vuelve estable después de 10 h aproximadamente.

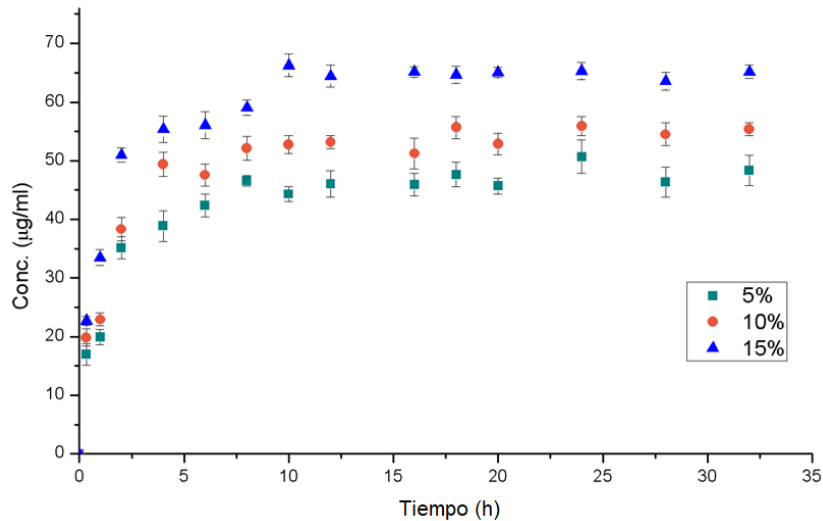


Figura 12 - Liberación acumulativa en H₃PO₄ de 5 mg de microesferas cargadas con curcumina a concentraciones de 5, 10 y 15% (p/p).

En comparación con la cinética de liberación en SBF, la cinética de liberación en ácido fosfórico exhibió una pendiente mayor en la fase de estallido. Además de que se observaron valores de concentración más altos después de que se estabilizó. Por otro lado, también llegó a un valor de concentración estable antes de la liberación de SBF; es decir, en apariencia la liberación total se realizó a las 15 horas aprox. Este comportamiento podría explicarse debido al efecto combinado de la liberación por difusión mas la degradación de la matriz polimérica al estar expuesta al pH ácido. Como se ha mencionado con anterioridad, algunos autores como *Chen et al.*, han reportado que el pH juega un papel en la liberación de algunos fármacos modelo [34]. En concordancia con ello, la cinética de liberación de riboflavina, que se muestra en la Figura 13, exhibió también una pendiente más alta en la fase inicial y valores de concentración más altos después de la fase llamada controlada. Esto también similar al comportamiento de liberación reportado por *Saez et al.* en ambientes ácidos, solo que mediante librando otros fármacos modelo [67].

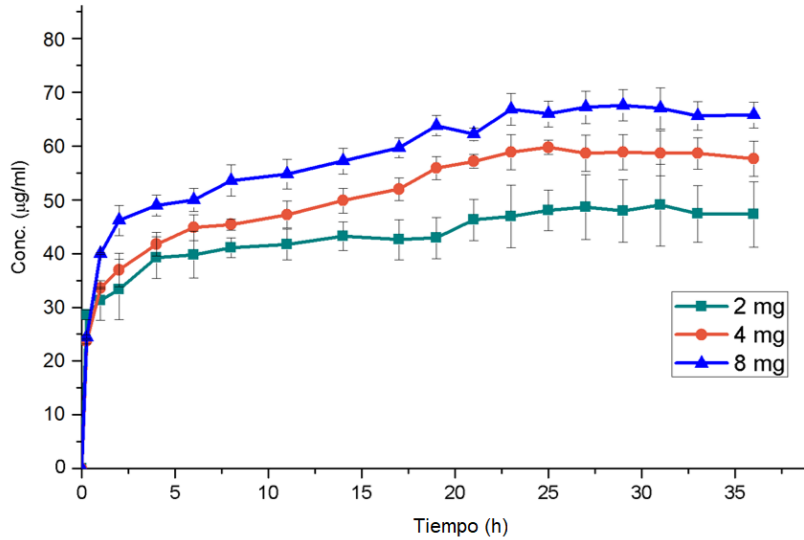


Figura 13 - Liberación acumulativa en H_3PO_4 de diferentes cantidades de muestra de microesferas con riboflavina cargada a 10% de concentración (p/p).

En el caso específico de la riboflavina, también se ha reportado por algunos autores como *Lopez-de-Alba et al.*, que los ambientes ácidos, representan un ambiente que favorece la solubilidad de los fármacos utilizados, lo cual mejora su captación [76]. Para ambos casos, curcumina y riboflavina, el pH podría influir en la liberación del fármaco a través de las capas más internas de la matriz de PHB, como se ha reportado previamente esto ocurre con algunos otros biopolímeros [34]. La Figura 14 muestra micrografías SEM de microesferas después de distintos tiempos de su inmersión en ácido fosfórico. La erosión progresiva de la superficie de las microesferas se puede apreciar a través del avance en el tiempo. La degradación de la matriz polimérica de las microesferas a partir de las 36 h es considerable y después de 60h prácticamente no se pueden identificar formas esféricas. Esta erosión es similar a la degradación enzimática, en términos de la degradación superficial que se observa en de la matriz polimérica en algunos estudios de biodegradación previamente reportados por *Zenkiewicz, Iwata y Xu et al.*, a lo largo de varias semanas [46, 88, 89]. En estos términos, la cinética de liberación en medio ácido podría utilizarse como una aproximación para observar el cambio de la morfología superficial que presentaría el DDS al exponerse a una biodegradación; pero en el primer caso, desarrollada en un tiempo mucho menor (36h).

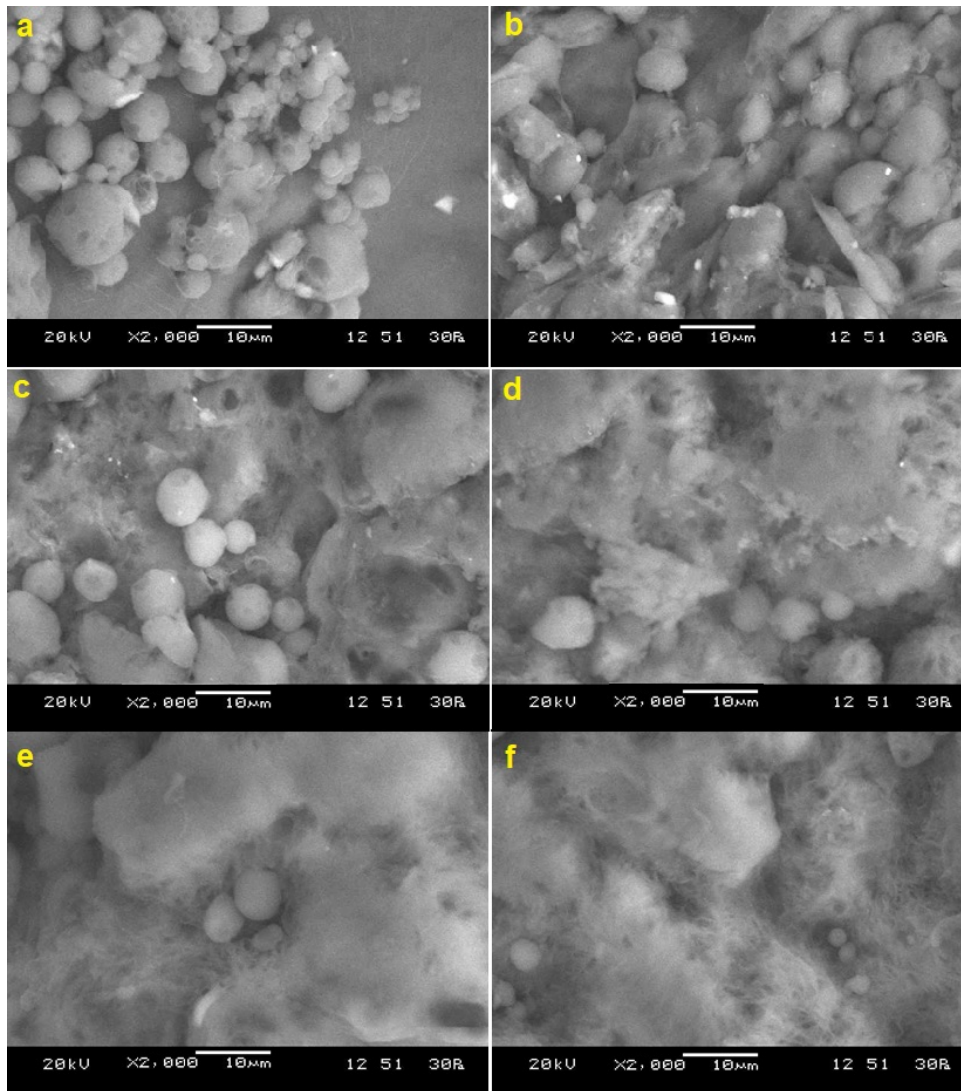


Figura 14 – Erosión superficial de microsferas de PHB con curcumina cargada después de a) 24, b) 36, c) 48, d) 60, e) 80 and f) 120 h de inmersión en H₃PO₄.

3.3.6 Modelado matemático de la cinética de liberación en SBF

Se consideró un mecanismo de difusión del soluto (curcumina) que se encontraba contenido dentro de las microesferas, dentro del sustrato (SBF), el cual debería de obedecer a la segunda ley de Fick, a través de la ecuación de difusión clásica. El balance de masa local se pudo asumir de acuerdo a la ecuación de la segunda ley de Fick reportada en algunos trabajos previamente reportados [90]. Sin embargo, se observó que en el problema en cuestión también era necesario obtener el balance de masa total para poder reproducir los resultados en las condiciones experimentales. Como primer paso, se supuso que la liberación del fármaco en términos de la tasa de liberación debería tener un comportamiento de ley potencial, similar al de trabajos reportados por algunos autores como *Shaik et al.* [79]. Este comportamiento también se ajusta mejor al exhibido por los datos experimentales. Se supuso que la constante de difusión efectiva D es independiente de la concentración del fármaco en el medio SBF. Se utilizó el balance de masa total agregando una ecuación de movimiento para la penetración del fármaco dentro del medio SBF. El equilibrio de masa se limitó por el flujo de masa desde la superficie de la matriz polimérica hacia el SBF.

El sistema físico propuesto consiste en una matriz polimérica esférica de radio R_0 que inicialmente contenía toda la curcumina con una masa total M_0 . El polímero se rodea del medio SBF que constituye una capa de espesor $\delta \gg \xi_{\max}$, donde ξ_{\max} es la penetración máxima de la curcumina en el medio SBF. Por lo tanto, la difusión se asume en un medio semi-infinito. La penetración $\xi(t)$, se definió como la distancia máxima recorrida por el fármaco dentro del sustrato en cada instante de tiempo t . Además, la concentración de curcumina se asumió cero más allá del valor de penetración máxima. Adicionalmente, para ser consistente con el balance de masa local, el flujo en $r=\xi(t)$ también debería ser cero después de la penetración máxima. De modo que para el problema se asumieron las siguientes condiciones de frontera:

$$\begin{aligned} C(r, t) \Big|_{r=\xi(t)} &= 0, \\ -4\pi D r^2 \frac{\partial C(r, t)}{\partial r} \Big|_{r=\xi(t)} &= 0. \end{aligned} \tag{2}$$

donde, $C(r,t)$ es el perfil de concentración del fármaco en el sustrato SBF en cualquier tiempo t y posición r . Después, la masa total de curcumina $m(t)$ dentro del medio SBF en el tiempo t , es igual a la masa liberada desde $t=0$ hasta el tiempo t . Esta masa se obtuvo del perfil de concentración en el tiempo t , de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$m(t) = 4\pi \int_{R_0}^{\xi(t)} r^2 C(r,t) dr. \quad (3)$$

La variación en el tiempo de esta masa es igual al flujo instantáneo $\dot{m} = dm(t)/dt$ del fármaco liberado de la matriz polimérica. De modo que, se desarrolla la siguiente ecuación de movimiento para la penetración del fármaco dentro del medio SBF:

$$\dot{m}(t) = 4\pi \frac{d}{dt} \int_{R_0}^{\xi(t)} r^2 C(r,t) dr. \quad (4)$$

Finalmente, se consideró el balance de masa local utilizando la segunda ley de Fick de la siguiente manera:

$$\frac{\partial C(r,t)}{\partial r} = D \frac{\partial^2 C(r,t)}{\partial r^2}. \quad (5)$$

Las condiciones de frontera dadas por la ecuación (2), junto con el balance de masa total y local dado por las ecuaciones (4) y (5) constituyen en su conjunto el modelo propuesto para describir el transporte del fármaco dentro del medio SBF. Desde la superficie y después de ser liberado de la matriz polimérica de la microesfera. La ecuación (4) representa una ecuación integro-diferencial para la variable dinámica $\xi(t)$, e introduce una no-linealidad en el problema clásico de difusión. Luego entonces, suponiendo una analogía entre la transferencia de calor y la transferencia de masa, se puede utilizar un enfoque numérico basado en el método integral de balance de calor (HIBM, por sus siglas en inglés), para encontrar una solución al modelo matemático propuesto. El HIBM ha sido descrito con anterioridad en algunos trabajos de *Otero et al.* [91], donde se ha aplicado a problemas de límites de movimiento unidimensionales en los mecanismos de transferencia de calor, y en algunos otros problemas similares [92, 93]. En estas

soluciones se aplicó un método refinado para predecir el comportamiento dinámico y térmico de los materiales de cambio de fase.

Aunque el modelo de HBIM se basa en la conservación de energía, se puede aplicar de manera análoga al problema discutido en este trabajo, debido a la similitud de los comportamientos cinéticos de la transferencia de calor y la transferencia de masa. La única consideración relevante, es que la transferencia de calor puede ocurrir en ambas direcciones dependiendo de la diferencia de calor. Por su parte, siempre y cuando la masa transferida desde la matriz polimérica al SBF no alcance el límite de saturación del medio SBF, la transferencia de masa ocurrirá en una sola dirección. De modo que el modelo matemático se usó para predecir la penetración $\xi(t)$ mediante el uso de algunos valores iniciales de la cinética de liberación experimental de liberación de curcumina de \dot{m} .

Estos valores se ajustaron a una función monótonicamente decreciente de t , y las soluciones semi analíticas se compararon con los valores de masa de la cinética de liberación experimental al final de la liberación. El perfil de concentración inicial para la primera aproximación de la fase de liberación masiva se obtuvo de acuerdo con la siguiente ecuación para la penetración $\xi(t)$:

$$\xi(t) \approx R_0 + \sqrt{\pi D t}, \quad (6)$$

donde R_0 es el radio de la matriz polimérica. Según la solución analítica al problema semi-infinito, la ecuación (6) proporciona una buena aproximación para valores de intervalos de tiempo pequeños; esto debido al comportamiento de la curva cinética de liberación en este intervalo. Se supone que el perfil de concentración inicial tiene una variable espacial con forma parabólica, como se muestra en la siguiente ecuación:

$$C(r, t) = a(t)(r - R_0) + b(t)(r - R_0)^2 + C_1(t), \quad (7)$$

donde $a(t)$, $b(t)$, y $C_1(t)$ son funciones dependientes del tiempo que se determinan utilizando el modelo matemático propuesto. La constante $a(t)$ y la concentración máxima $C_1(t)$ para cualquier tiempo t pueden determinarse en términos de $b(t)$, por medio de una sustitución en el perfil de concentración dado por la ecuación (7).

Posteriormente, el perfil de concentración se sustituye en la ecuación (4) para obtener una ecuación diferencial ordinaria (ODE) para la penetración $\xi(t)$ y la función dependiente del tiempo $b(t)$. Finalmente, la ecuación de difusión clásica (5) se promedia sobre el dominio de la variable espacial $0 \leq r \leq \xi(t)$, de manera similar a como se ha aplicado en trabajos previos [91].

Al realizar el promedio espacial se produce una segunda ODE para $\xi(t)$ y $b(t)$. El sistema resultante de dos ODE se puede resolver mediante métodos numéricos para obtener la penetración, es decir, la transferencia de masa al sustrato SBF, de la curcumina que proviene de las microesferas hacia el SBF y así un perfil de concentración en cualquier momento t .

La Tabla 3 muestra los valores experimentales de masa M en el tiempo t y la desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés). El perfil de masa inicial se calculó utilizando el primer valor experimental de las cinéticas de liberación de curcumina en SBF, esto corresponde al $t = 0.33$ h. Este valor de masa se utilizó para obtener una ecuación algebraica inicial con las constantes $a(0.33)$, $b(0.33)$ y $C1(0.33)$ de la ecuación (7), integrando el perfil de concentración en el intervalo $[0, \xi(0.33)]$, en donde el límite superior se obtuvo utilizando la ecuación (6). Finalmente las otras dos ecuaciones algebraicas para las constantes $a(0.33)$, $b(0.33)$ y $C1(0.33)$ fueron estimadas utilizando las condiciones de frontera dadas por la ecuación (2).

Tabla 3 - Valores experimentales de la masa de liberada M a través de microesferas con diferentes concentraciones de curcumina cargada (p/p) y desviación estándar.

t (h)	5%		10%		15%	
	M (mg)	SD (mg)	M (mg)	SD (mg)	M (mg)	SD (mg)
0	0	0	0	0	0	0
0.33	0.11471625	0.038240568	0.1247665	0.01876434	0.141912	0.031921026
1	0.1392405	0.040217633	0.143934	0.000851606	0.2028354	0.030217633
2	0.1397875	0.040006644	0.195041	0.039743638	0.24693025	0.0401774
4	0.18174275	0.048455554	0.29230075	0.045645	0.39034275	0.045556664
6	0.2512715	0.06032645	0.3047553	0.032555757	0.439103	0.029143721
8	0.256578	0.017032119	0.3321955	0.03261558	0.473522	0.025234463
10	0.276825	0.060217633	0.34340775	0.029957894	0.47430425	0.028841638
12	0.26760725	0.029957894	0.33871425	0.01823418	0.470393	0.039514188
16	0.26552125	0.05535515	0.33819275	0.024028285	0.4625705	0.033141588
18	0.25318825	0.034808519	0.327502	0.039917386	0.4750865	0.038762125
20	0.254492	0.045114506	0.3426255	0.041094425	0.48160525	0.045008449
24	0.27717725	0.044318731	0.345233	0.032982556	0.46908925	0.033423499
28	0.2591855	0.027595186	0.35462	0.04965112	0.47691175	0.036454056
32	0.262129	0.029104625	0.35853125	0.031241289	0.48525575	0.0322305

Los valores experimentales de masa se ajustaron a una función de la ley de potencia como se explicó anteriormente y también ha sido reportado por [79]. Los coeficientes D obtenidos para el primer ajuste a la función de potencia, fueron los siguientes: $0.00358 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $0.00216 \mu\text{m}^2/\text{s}$ y $0.001156 \mu\text{m}^2/\text{s}$, para las concentraciones de 5, 10 y 15% respectivamente. En la Figura 15, se muestran las soluciones numéricas, que reproducen el perfil de transferencia de masa del fármaco dentro del medio SBF. Estas soluciones también predicen la evolución en el tiempo de la penetración en el medio, descrita por la variable dinámica $\xi(t)$, sin la asunción del comportamiento parabólico clásico [94]. El perfil del modelo propuesto se ajusta dentro de las barras de error en la cinética de liberación de masa (Figura 15a) y además se ajusta exactamente a los valores experimentales en términos de penetración $\xi(t)$ (Figura 15b).

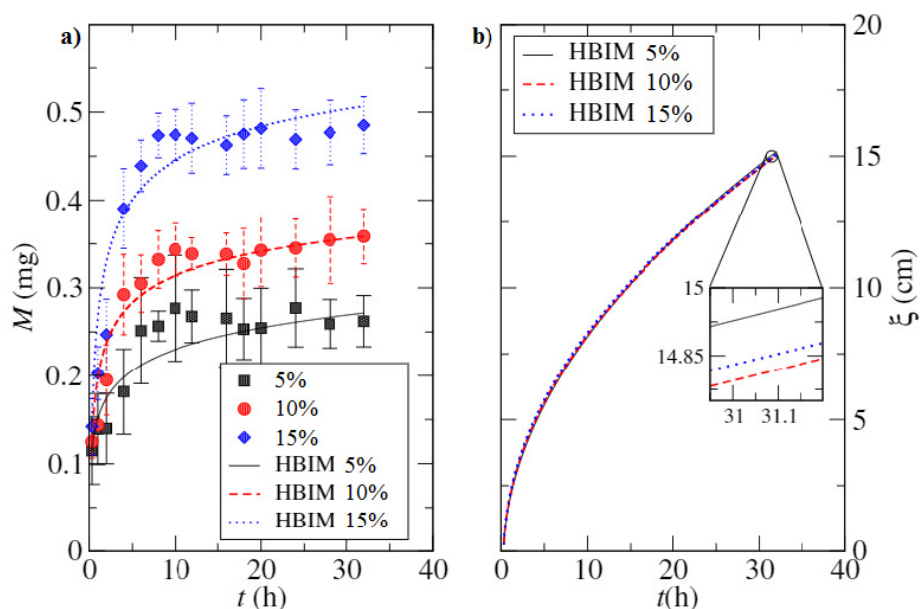


Figura 15 - a) Perfil en tiempo de la masa de fármaco derivada del modelo matemático (líneas) comparada con los valores experimentales. b) Perfil en tiempo de la penetración $\xi(t)$ obtenido de la solución semi-analítica al modelo propuesto para las curvas cinéticas

3.3.7 Resultados de ensayos celulares

Los trabajos preliminares en cultivo celular consistieron en dos ensayos por separado. En el primero se agregaron diferentes concentraciones de curcumina libre en las células A549 y en el segundo se agregó una cantidad de microesferas, pero cargadas a diferentes concentraciones de curcumina. Las diferentes concentraciones de curcumina libre, utilizadas en el primer experimento, se seleccionaron para verificar el efecto apoptótico debido a altas concentraciones de curcumina en células A549, previamente reportado por *Yao et al.* [58]. Existen principalmente dos vías involucradas para la presencia de apoptosis: las mediadas por los receptores mitocondriales externos y por los receptores mitocondriales internos. Las vías mediadas por estos receptores mitocondriales, se caracterizan por la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la liberación del citocromo c desde la mitocondria hacia el citoplasma [95, 96]. En ciertas concentraciones, la curcumina genera estrés oxidativo a partir de la liberación de moléculas reactivas tales como radicales libres de oxígeno y nitrógeno. Esto

hace que se activen los receptores de estrés del retículo endoplásmico y el receptor de daño mitocondrial, lo que induce la apoptosis celular [58, 95]. De forma paralela, se agregaron 20 mg de microesferas cargadas con curcumina a diferentes concentraciones, ambos ensayos preliminares se midieron mediante ensayo de viabilidad celular MMT después de 24 h de incubación.

El ensayo MTT es un ensayo colorimétrico que se usa para medir la actividad metabólica celular, en función de la capacidad de las enzimas oxidoreductasa celulares dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH). Esto para reducir el tinte de tetrazolio MTT a formazán insoluble, el cual tiene un color púrpura y que puede ser rastreable por métodos colorimétricos; este ensayo suele ser usado para medir viabilidad celular y ha sido ampliamente reportado con anterioridad [97]. La Figura 16 muestra la viabilidad celular obtenida a través del ensayo MTT de ambos experimentos preliminares. En el primer ensayo (figura 16b) se observó una disminución en la viabilidad celular a medida que aumentó la concentración curcumina libre sobre las células A549, esto en consistencia con el efecto apoptótico reportado por *Yao et al.* [58]. Por otro lado, para el ensayo con microesferas cargadas de curcumina a diferentes concentraciones (Figura 17a), se observó que la viabilidad disminuyó a medida que aumentó la concentración de la curcumina atrapada en las microesferas. Como principal causa se asumió que se debió a la curcumina liberada desde las microesferas, en combinación con un posible efecto citotóxico debido a la concentración también elevada de PHB por la cantidad de microesferas añadidas. Un efecto citotóxico debido a altas concentraciones de microesferas de PHB, tendría concordancia con estudios previamente reportados por *Moorkoth et al.*, en los cuales se observó un efecto citotóxico al aplicar altas cantidades de material PHB [98].

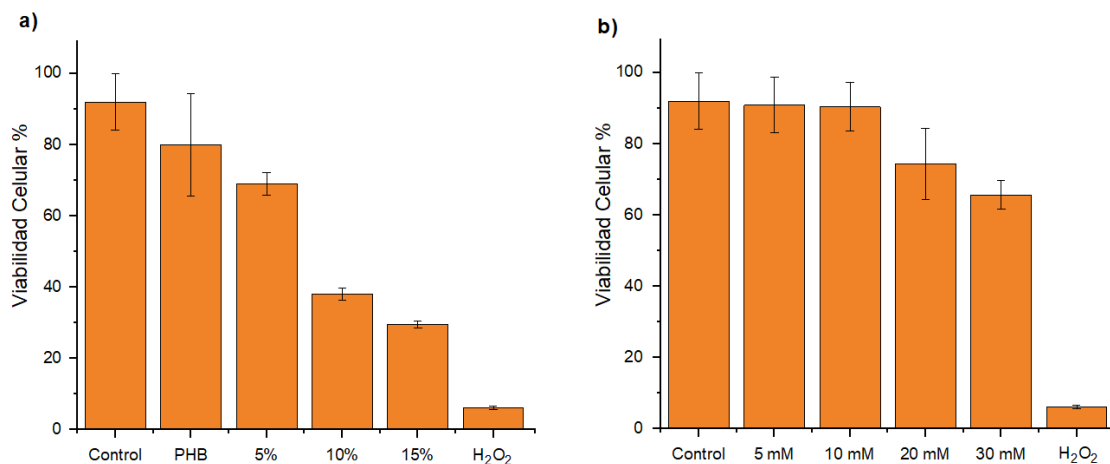


Figura 16 - Viabilidad celular por MTT de células A549 con a) 20 mg de microesferas con diferentes concentraciones de curcumina cargada y b) diferentes concentraciones de curcumina libre, a las 24 h de incubación.

Estos resultados además de confirmar el efecto apoptótico de la curcumina en células A549, previamente reportado en literatura [58], se utilizaron como guía para seleccionar una cantidad de curcumina que se encontrara en un rango apoptótico. De esta manera, al trabajar con una cantidad conocida para producir apoptosis sobre las células A549, se podría tomar este efecto como evidencia de la liberación del fármaco. La cantidad de curcumina seleccionada fue de 1.5 mg, para producir una concentración por encima de los 42 mM (lo cual garantiza el efecto de apoptosis). Posteriormente, se calculó la cantidad de muestra de microesferas, de acuerdo con cada condición de atrapamiento, necesaria para contener los 1.5 mg de curcumina y depositarlos en el ensayo celular. La Figura 17 muestra diferentes microfotografías de microesferas de PHB cargadas con curcumina, depositadas en pozos con células A549 al comienzo del experimento. En la figura 17 se puede observar una dispersión semi homogénea de las microesferas en los pozos con las células.

Después de 6 y 24 h de incubación, se realizó la medición de viabilidad por medio de ensayo MTT (Figura 18), ambos lapsos de tiempo para las mediciones se seleccionaron tomando como referencia la cinética de liberación de SBF. Esto con el objeto de seleccionar dos puntos donde la liberación del fármaco esperada fuera claramente diferente. En el primer tiempo (6 h) de

aproximadamente el 60% y en el segundo tiempo (24 h), prácticamente el total de la liberación. También se tomó en cuenta los perfiles reproducidos por el modelo matemático, los cuales fueron muy similares con los resultados experimentales en SBF. Los valores viabilidad celular se normalizaron con respecto a los valores del control, de acuerdo al inserto del ensayo MTT del fabricante y de manera similar a diversos trabajos previamente reportados [99, 100].

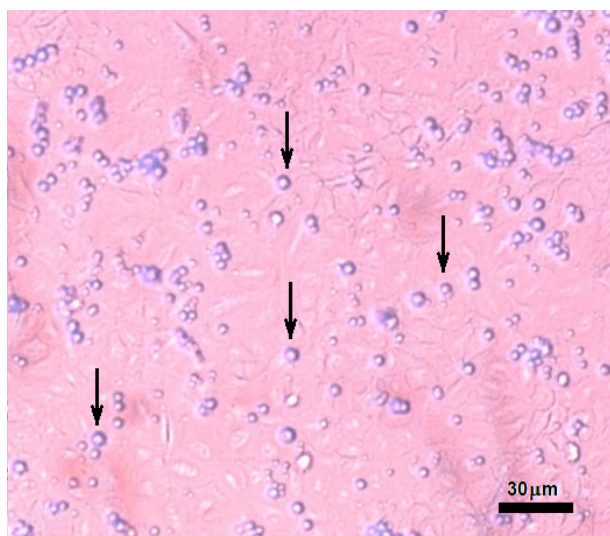


Figura 17 - Microesferas de PHB con curcumina cargada, depositadas de forma semi-homogénea en células A549 a 4X, con luz visible.

Como se puede observar en la Figura 18a, a las 6 horas, se presentó una diferencia significativa entre la viabilidad celular que presentaron las muestras tratadas con curcumina libre y con curcumina administrada por medio de microesferas. La diferencia fue más evidente en las microesferas con curcumina cargada al 10% y 15% (p/p). Este comportamiento se puede explicar por una liberación gradual, debida al efecto de difusión de la curcumina desde la matriz polimérica de las microesferas de PHB al medio. Esta liberación gradual, retrasó el efecto apoptótico de la curcumina en las células A549 en comparación con la curcumina administrada directamente. El comportamiento de liberación en cultivo celular además, es consistente con los resultados de la cinética de liberación observados en SBF, para los tiempos seleccionados y correspondiente también con resultados previamente reportados [101]. En contraste, la

solución de curcumina libre produce el estrés oxidativo desde las primeras horas, reduciendo la viabilidad rápidamente desde su aplicación, como se esperaba.

Adicionalmente, se observó que a las 6 h (Figura 18a) la viabilidad en las muestras con microesferas cargadas con curcumina al 5% y 10%, fue menor que las muestras con microesferas cargadas al 15%. Este comportamiento se puede atribuir, de manera similar a lo observado en los resultados del ensayo preliminar realizado, a la mayor cantidad de PHB presente en los pozos con microesferas al 5% y 10%. Esto debido a la mayor cantidad de microesferas necesarias para lograr la cantidad de 1.5 mg de curcumina en las microesferas cargadas a menor concentración. Por su parte, las microesferas cargadas al 15%, requirieron menor cantidad de microesferas para llegar a la misma cantidad de curcumina y tal vez por ello presentaron un valor mayor de viabilidad a las 6 h. El efecto de reducción en la viabilidad en los primeros casos podría deberse a la combinación del efecto apoptótico de la curcumina liberada, con un efecto de citotoxicidad aparente debido a la gran masa de microesferas de PHB presente, en aparente concordancia con estudios previamente reportados [98]. Sin embargo, cabe destacar que solo se encontró diferencia significativa entre las muestras tratadas con microesferas cargadas al 5% y 15%.

Posteriormente, a las 24 horas, la viabilidad por medio de MTT (Figura 18b) en todas las condiciones, siguió una misma tendencia. Es decir, una reducción en la viabilidad sin diferencia significativa entre las muestras con curcumina libre y las muestras con curcumina liberada por medio de microesferas. Estos resultados son correspondientes con el cálculo realizado para depositar la misma cantidad de curcumina en todas las condiciones, solo que, en este caso el efecto apoptótico de las muestras con microesferas se presentó hasta después de las 24 h. Este comportamiento contrasta con el efecto muy temprano que presentaron las muestras tratadas con curcumina libre. La diferencia de los resultados de viabilidad a las 6 y a las 24 h, muestran un efecto retardado en la apoptosis debido a la liberación gradual del fármaco (curcumina) en las células A549. Dicho comportamiento podría considerarse como una liberación controlada, en términos del retraso del efecto apoptótico de la curcumina en un periodo de tiempo específico, debido a la liberación gradual del fármaco en las células. Esta liberación gradual, es posible a través de la administración de la curcumina por medio del DDS diseñado. Además, la liberación en cultivo celular mostró tener similitud con la liberación exhibida en SBF, al menos en los dos lapsos de tiempo seleccionados (6 y 24 h).

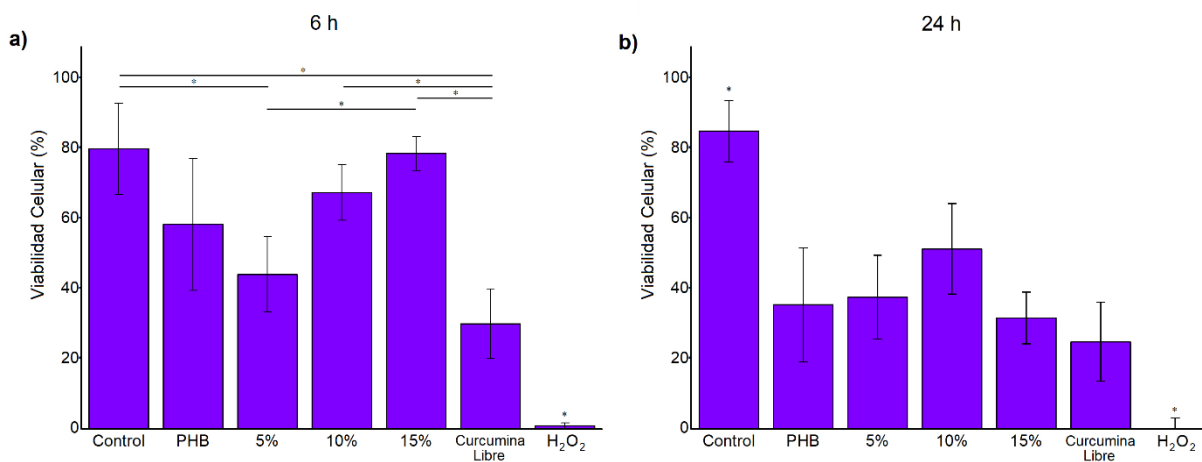


Figura 18 - Viabilidad celular por medio de MTT de células A549 en todas las condiciones después de a) 6 y b) 24 horas de incubación. Los asteriscos indican una diferencia significativa, * $p < 0.05$, de acuerdo con análisis ANOVA de una vía (se utilizó la prueba de Tukey).

De manera paralela, se realizó el estudio de viabilidad celular a través de una técnica distinta, anexina V y yoduro de propidio (PI), en los mismos periodos de tiempo (6 y 24 h). El ensayo de anexina V con yoduro de propidio (PI) consisten en un biomarcador fluorescente, el cual se une a la fosfatidilserina ubicada en el lado citoplasmático de la membrana celular en las células sanas. Durante la apoptosis y el rompimiento de la membrana celular, la muerte celular, este componente se expone hacia el exterior, por lo que el reactivo se emplea para el conteo de células vivas y células en proceso apoptosis o de muerte [102]. Este biomarcador se detecta usualmente mediante citometría de flujo para realizar conteo celular y por convención, los diagramas de citometría de flujo se dividen en cuatro cuadrantes: células vivas, en apoptosis temprana, apoptosis tardía y muerte celular. En ellos, cada célula contada se representa como un punto localizado en un cuadrante de acuerdo con su nivel de apoptosis.

Los gráficos de citometría de flujo de los ensayos realizados a las 6 y 24 h se muestran en la Figura 19. Durante las primeras 6 h, el gráfico de anexina V y PI exhibió una población de células vivas más grande en todas las muestras tratadas con microesferas, en comparación con las tratadas con curcumina libre. Por otra parte, a las 24 h, el ensayo de citometría de flujo exhibió un aumento en las células apoptóticas en las muestras tratadas con microesferas. Este

comportamiento fue el esperado, de manera también observada y discutida en los ensayos por MTT. El retraso en el efecto apoptótico debido a la liberación, que denominamos controlada, de curcumina fue más evidente en las microesferas con una proporción de 15% de curcumina atrapada. En el recuadro rojo de la Figura 19, se enmarcan las citometrías de flujo de las muestras tratadas con microesferas cargadas al 15% de curcumina y con curcumina libre. En el recuadro se puede observar claramente la diferencia a las 6 h, donde es evidente se está controlando o retardando el efecto de apoptosis celular por medio de la administración de curcumina a través de las microesferas. Por otra parte, la misma cantidad de curcumina, pero administrada de manera convencional (directa) produce una gran población de células apoptóticas desde las primeras 6 h. Posteriormente, a las 24 h, las poblaciones de células apoptóticas entre ambas condiciones se volvieron similares, debido a la liberación casi total de la curcumina desde las microesferas y la cual como se mencionó antes, fue la misma cantidad. Este comportamiento fue similar solo que, en menor medida en las microesferas cargadas al 5 y 10% de curcumina, como se muestra en el recuadro amarillo de la Figura 19.

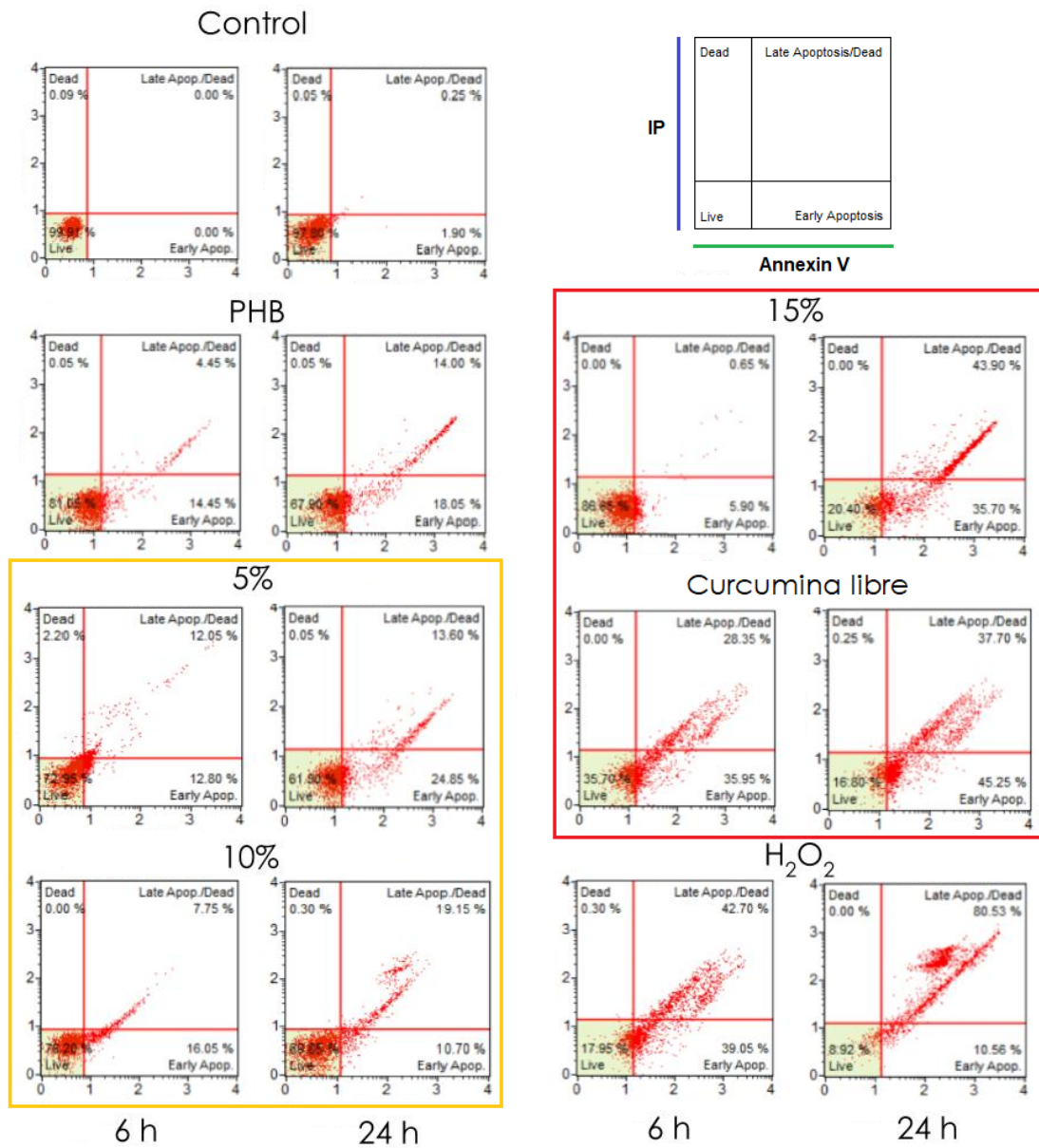


Figura 19 – Análisis comparativo de poblaciones de células A549 en diferentes estadios de viabilidad citometría de flujo, a las 6 h (columna izquierda) y 24 h (columna derecha) de incubación.

Las poblaciones de cada cuadrante de las gráficas de citometría de flujo, para ambos lapsos de tiempo (6 y 24 h), se representaron también a través de gráficos de barras (Figura 20), para ser analizadas de mejor manera. En la figura 20a, se muestran las poblaciones de todas las condiciones estudiadas a las 6 h de incubación. En esta gráfica se puede observar con mayor claridad la diferencia de las poblaciones de células vivas entre las muestras tratadas con curcumina liberada a través de microesferas y la viabilidad de las tratadas con curcumina libre. Por su parte, en la figura 20b se muestran las poblaciones después de 24 h. En esta gráfica se observa que las muestras tratadas con microesferas de PHB cargadas con curcumina al 5% y 10% aún exhibieron valores de viabilidad superiores al 60% después de las 24h. Esto podría indicar que, a bajas concentraciones de atrapamiento, el efecto apoptótico podría retrasarse aún más. En otras palabras, el tiempo de liberación podría controlarse por medio de la concentración de atrapamiento del fármaco en las microesferas. En contraste, las muestras tratadas con microesferas cargadas al 15%, mostraron un valor de viabilidad inferior al 20%. Este valor fue muy similar a la viabilidad exhibida por las muestras tratadas con solución de curcumina libre. Lo que indica que, a esa concentración de atrapamiento, la liberación total del fármaco contenido podría esperarse a las 24 h. En la Figura 19 solo se marcan las diferencias significativas, entre las poblaciones que aportan a la discusión: células vivas, las condiciones de curcumina libre, microesferas de PHB y curcumina cargada en microesferas. Las diferencias existentes entre el resto de las poblaciones (apoptosis temprana y tardía, células muertas, etc.) no se marcan en la gráfica para facilitar su análisis.

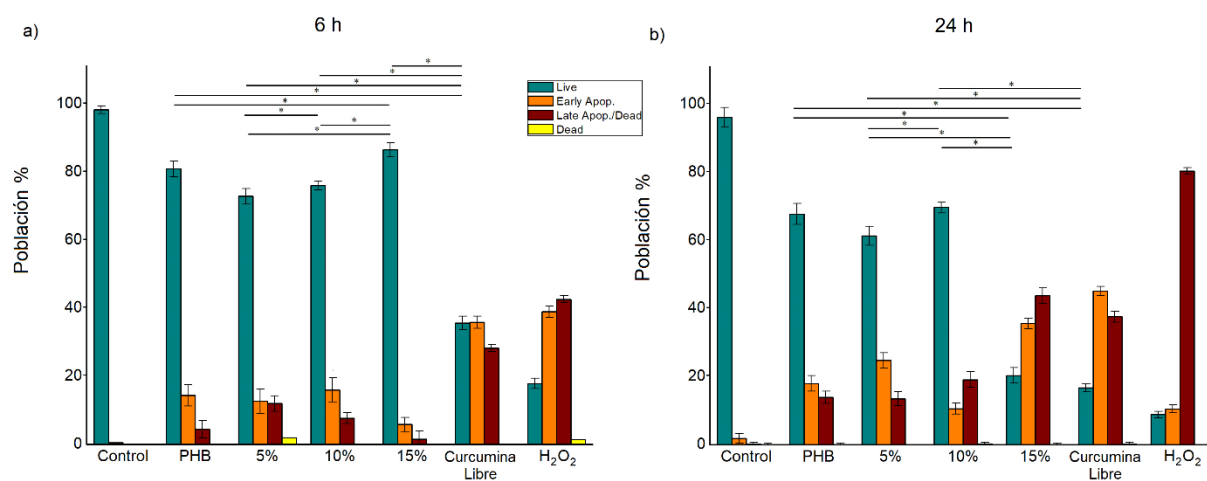


Figura 20 - Comparación de poblaciones celulares de citometría de flujo después de a) 6 h y b) 24 h de incubación. Los asteriscos indican una diferencia significativa, * p < 0.05, de acuerdo con análisis ANOVA de una vía (se utilizó la prueba de Tukey)

El comportamiento exhibido tanto en las mediciones por citometría de flujo como en los ensayos medidos por MTT, mostraron un efecto retardado en la apoptosis, debido a la administración de curcumina a través de las microesferas de PHB. Este efecto retardado, producto de la liberación de curcumina gradual, también correspondió con el comportamiento de liberación observado en SBF, al menos en los dos lapsos utilizados para las mediciones en cultivo celular (6 y 24 h). Además, ambos comportamientos también fueron similares a los valores obtenidos por modelo matemático, en los mismos lapsos de tiempo. De modo que el modelo matemático también mostró potencial para su uso en la estimación de la liberación del fármaco en un cierto periodo de tiempo para el cultivo celular. Sin embargo, se necesitan más estudios en cultivo celular para establecer una mejor correlación con el modelo matemático. De modo que se podría proponer como trabajo futuro, la realización de la cinética de liberación en cultivo celular y su comparación con el modelo matemático desarrollado en este trabajo.

Otro comportamiento interesante observado, fue la rápida disminución de la viabilidad celular en las muestras con mayor cantidad de masa de microesferas de PHB; la cual se presentó en el ensayo por MTT. Lo que en un principio se planteó como un efecto de citotoxicidad debido a las altas concentraciones de PHB presentes en las muestras, y que además tenía concordancia con trabajos previamente reportados en literatura [98]. Sin embargo, al no observarse evidencia de este comportamiento en los ensayos por citometría de flujo, no fue posible concluir un efecto de citotoxicidad debido a altas cantidades de microesferas de PHB. Lo que implica que el DDS a base de PHB presentado en este trabajo, puede considerarse con una buena biocompatibilidad, esto último es correspondiente con trabajos previamente reportados por *Shishatskaya* [103].

Conclusiones

Los resultados presentados en este trabajo de tesis muestran la viabilidad del PHB para la fabricación de microesferas y para ser usadas como un DDS. Las microesferas fabricadas con PHB pueden usarse para incorporar extractos como la curcumina y riboflavina con buena eficiencia de atrapamiento (superiores al 97%). Se puede usar este tipo de DDS para liberar dichos extractos en SBF y en ambientes ácidos. Las cinéticas de liberación por medio de microesferas de PHA y de los extractos utilizados en este trabajo mostraron similitud con la liberación de trabajos previamente reportados que utilizan distintas matrices poliméricas en sus dispositivos. Esta liberación en términos del comportamiento bifásico exhibido.

La liberación por difusión en SBF se describe de forma más precisa, si se agrega el elemento de balance de masa al modelo matemático, en comparación con los modelos empíricos usados actualmente. La solución del modelo matemático desarrollado además de mostrar buena correspondencia al ser comparado con los valores experimentales puede simular cinéticas de liberación con distintas condiciones iniciales. La degradación en ambiente ácido mostró similitud con la erosión superficial exhibida en la matriz polimérica del DDS durante la degradación enzimática. Esto podría permitir estimar los efectos de erosión del dispositivo con mayor rapidez, en la degradación en ácido (horas) a diferencia de la biodegradación (semanas).

La biocompatibilidad del DDS diseñado, exhibida en células A549, fue superior al 60% en todas las condiciones estudiadas, lo que brinda potencial al DDS diseñado para aplicarse en entornos biológicos. Ambientes tales como en cultivo celular, *in vivo* y posiblemente, después de estudios adicionales, en el cuerpo humano. Se consiguió la liberación gradual de curcumina en un ambiente biológico (cultivo celular) por medio de microesferas de PHB como DDS. La comparación de la administración por medio de microesferas, en dos lapsos distintos de tiempo y medida por dos técnicas distintas, mostro una diferencia significativa con respecto a la administración por un método convencional (administración directa). Lo anterior representa un avance en comparación con trabajos previos donde solo se reporta el estudio de biocompatibilidad del dispositivo en conjunto con el fármaco cargado.

El retraso en el efecto del fármaco debido a la liberación gradual del fármaco modelo, es un avance importante hacia la liberación controlada por medio de DDSs a base de PHA. Los resultados observados en la viabilidad por citometría de flujo, mostraron indicios de que posiblemente se puede retardar aún más la liberación, mediante la variación de la concentración del fármaco cargado dentro de las microsferas. Sin embargo, este último punto podría ser fundamentado con estudios adicionales.

Por último, el efecto de liberación gradual de la curcumina a través del DDS, podría ser utilizado en el diseño de tratamientos de administración de fármacos especializados. Aquellos donde se requiera de un intervalo de tiempo previo al inicio de la liberación del fármaco. Esta ventana de tiempo podría aprovecharse, por ejemplo, para permitir la ubicación del DDS mediante técnicas adicionales, en tejidos u órganos específicos para una vez ahí, liberar fármacos alquilantes como el Trabectedin o Cisplatino, entre muchos otros. Dichos agentes son actualmente utilizados en terapias de cáncer, cuyos efectos adversos en células sanas son amplios [104, 105]. Estos y otros fármacos podrían administrarse de forma más eficiente y con la reducción de sus efectos secundarios en zonas no deseadas. Algunas de estas perspectivas para la localización del DDS se plantean en la sección de trabajo futuro.

Trabajos publicados

Durante la realización del doctorado, se publicaron dos trabajos relacionados con el tema de tesis, en revistas indexadas de cuartil 1, una como co-autoría y otra como primer autoría (Figura 21).



International Journal of Biological Macromolecules

Volume 144, 1 February 2020, Pages 47-52



Modeling the release of curcumin from microparticles of poly(hydroxybutyrate) [PHB]

Arturo Elias Aguilar-Rabiela ^a, Ernesto Manuel Hernández-Cooper ^a, José Antonio Otero ^a, Berenice Vergara-Porras ^{a, b}

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.242>

International Journal of Biological Macromolecules

Q1

Medicine (miscellaneous)

best quartile

SJR 2018

0.96

powered by scimagojr.com



Food Packaging and Shelf Life

Volume 20, June 2019, 100297



Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil

A.O. Pérez-Arauz ^a, A.E. Aguilar-Rabiela ^b, A. Vargas-Torres ^a, A.-I. Rodríguez-Hernández ^a, N. Chavarría-Hernández ^{a, b}, B. Vergara-Porras ^b , M.R. López-Cuellar ^a

[Show more](#)

<https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2019.01.001>

Food Packaging and Shelf Life

Q1

Food Science

best quartile

SJR 2018

0.96

powered by scimagojr.com

Figura 21 - Publicaciones en revistas indexadas (Q1) durante la realización del doctorado.

Trabajo futuro

El trabajo experimental presentado en esta tesis mostró resultados que podrían ampliarse o complementarse mediante la propuesta de estudios adicionales como se menciona a continuación.

La liberación de curcumina por medio del DDS cargado al 5 y 10% en células A549, medido a través de citometría de flujo, mostró valores de apoptosis menores que las muestras cargadas al 15% después de las 24 h de incubación. Por lo que posiblemente el efecto de retraso en la liberación podría ser aún mayor en dichas concentraciones de carga, logrando así un mayor control sobre la liberación del fármaco. Para comprobar esto, se podrían realizar ensayos de liberación usando concentraciones de atrapamiento menores a 15%, en lapsos de tiempo posteriores a 24 h, para observar si la liberación del fármaco se puede retrasar aún más.

Como se mencionó en las conclusiones, el efecto de retraso en la liberación del fármaco podría ser empleado en conjunto con técnicas de dirección de DDS para ser aplicado en terapias de liberación localizada. En este sentido se han planteado algunos experimentos preliminares para la localización de un DDS a base de PHAs, mediante la incorporación de nano componentes dentro de la matriz polimérica. Estos nano componentes, al estar basados en elementos inorgánicos, pueden ser inducidos por campos magnéticos y con ello, poder dirigir el DDS hacia zonas específicas para la liberación localizada del fármaco. Adicionalmente, se podrían explorar otras sustancias como fármacos modelo, mismas que puedan ser rastreables en de manera directa en ambientes biológicos, como en cultivo celular, y así poder trazar cinéticas de liberación de fármacos de manera directa. Algunos de los resultados preliminares de estos dos últimos enfoques aplicados, se muestran a continuación en el [Apéndice I](#).

Apéndice I

Dispositivos liberadores de fármacos compuestos (Composite DDSs)

Introducción

Como trabajo adicional, se propusieron algunos experimentos en microesferas compuestas basadas en PHA. En primer lugar, se desarrolló la incorporación de nanopartículas de componentes de PHA, esto para conferir nuevas propiedades como la susceptibilidad magnética al DDS. Paralelamente, se propuso el atrapamiento del biomarcador DAPI como fármaco modelo, con el fin de rastrear de manera directa la liberación del fármaco modelo desde las microesferas de PHA hacia el cultivo celular.

El biomarcador DAPI es un agente fluorescente comúnmente utilizado para la observación de la viabilidad y proliferación celular, este biomarcador se encuentra definido como un fármaco por la Biblioteca Nacional de Medicina de EE. UU. [106]. Además, existen otros biomarcadores comúnmente utilizados para análisis de viabilidad celular. Por ejemplo, el de tinción selectiva de ADN por permeabilidad de la membrana celular (Vybrant) y la tinción fluorescente impermeable a la membrana (Calceína), este último utilizado con frecuencia para el análisis de células vivas [107, 108]. Otra técnica para la medición de viabilidad celular, al igual que el MTT, es la reducción de las sales de tetrazolio mediante el NAD(P)H a formazan (WST-8). Este es un método colorimétrico comúnmente utilizado para la medición cuantitativa de la actividad deshidrogenasa y con ello la viabilidad celular.

Por otra parte, las nanopartículas súper paramagnéticas, también llamadas SPIONs por sus siglas en inglés, son partículas inorgánicas basadas en óxido de hierro, las cuales han despertado

gran interés en los últimos años. Esto debido a sus propiedades magnéticas y la posibilidad de permitir la entrega dirigida de fármacos. Estas nanopartículas ya se aplican en diferentes trabajos de investigación enfocados en el diseño de terapias localizadas [109-111]. Finalmente, debido al tamaño de las microesferas producidas por técnicas de emulsión, también se podrían agregar otros nano componentes como los bioceánicos, en especial nano BioGlass. Este es un material que ha demostrado exhibir propiedades interesantes como la formación de capas de hidroxiapatita en su superficie, material que es fundamental en la constitución del tejido óseo. Por ello, actualmente es utilizado en diversas aplicaciones relacionadas a la ingeniería de tejidos, principalmente en la regeneración de tejido óseo [37, 112-118].

En esta sección se muestran los resultados preliminares del trabajo realizado durante una estancia de investigación en el departamento de Biomateriales de la *Fredrich-Alexander Universität*. Donde se realizó el atrapamiento de SPIONs y DAPI, por separado, en microesferas de PHA para formar un DDS compuesto. Además de algunos resultados de la caracterización del DDS y algunos estudios de viabilidad celular mediante el ensayo WST-8 y microscopía de fluorescencia, en células de osteo-fibroblastos humanos ATCC-MG-63.

Metodología experimental

Materiales

El PHBV se adquirió de Goodfellow (Alemania), el biomarcador DAPI se obtuvo de Sigma-Aldrich (Alemania), los SPIONs fueron proporcionados por el Departamento de Nanomedicina de HNO-Klinik, Erlangen, Alemania, el PVA se compró de Baxter Healthcare (Suiza) y la curcumina se adquirió de Sigma-Aldrich (Alemania).

Fabricación de las Microesferas

Se prepararon diferentes microesferas basadas en PHBV a través de las técnicas de emulsión O/W y W/O/W. En primer lugar, el biomarcador DAPI se incorporó a una concentración del 10%, en una solución de PHBV previamente disuelto en 9 ml de cloroformo, la cual fue mezclada a 800 rpm. En segundo lugar, se agregaron SPION a diferentes concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50% en una fase O que contenía PHBV y curcumina, en una proporción de 10%, previamente disueltos en 9 ml de cloroformo y mezclados por agitador de cabeza a 800 rpm.

Simultáneamente, se prepararon soluciones acuosas de 1.25 mg/ml de PVA para conformar la fase W, mezcladas a 600 rpm. Cada emulsión se homogeneizó a 18,000 rpm durante aproximadamente 15 minutos usando un T18 IKA (Alemania), mostrado en la Figura 22. Posteriormente, las soluciones se centrifugaron a 5000 rpm durante 7 minutos y se lavaron con agua ultra pura dos veces antes de retirar completamente el sobrenadante. Por último, se secaron las muestras en una incubadora a 60 ° durante toda la noche, al término las muestras se almacenaron en tubos Falcon protegidas de la luz.



Figura 22 - Homogeneizador T18 IKA utilizado en la fabricación de microesferas.

Morfología superficial de las microesferas

La morfología de la superficie de las microesferas de PHBV se observaron mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un microscopio Auriga-Zeiss (Alemania), mostrado en la Figura 23. Las muestras de microesferas se recubrieron con oro en un *Ion Sputter* previas a su observación en SEM.

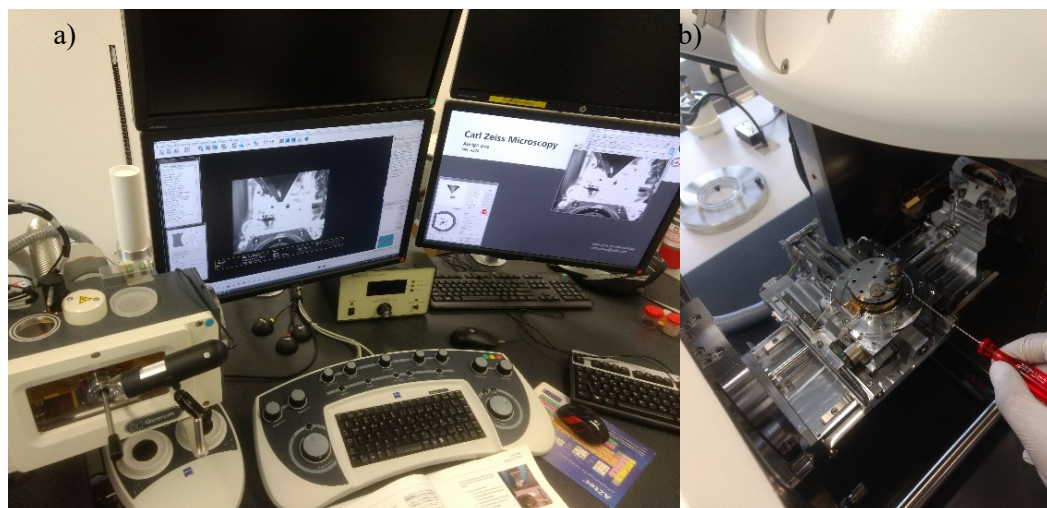


Figura 23 - SEM Auriga-Zeiss utilizado para el análisis de morfología de las microesferas fabricadas, a) tablero de control, b) cámara de análisis.

Eficiencia de atrapamiento de curcumina

La eficiencia de atrapamiento de curcumina (CE) para las microesferas basadas en PHBV se determinó de acuerdo con el método analítico indirecto reportado previamente por *Zidan et al.* [75]. La concentración en del sobrenadante se midió utilizando un espectrofotómetro de UV/Vis Specord 250 (Analytikjena, Alemania) a 428 nm [75].

Eficiencia de atrapamiento de SPIONs

Para las microesferas tratadas con SPIONs, la determinación del contenido de hierro se realizó en el Departamento Nanomedicine de *HNO-Klinik*. Las microesferas fueron suspendidas en ácido nítrico (HNO₃) y diluidas con agua desionizada. Después se midieron por espectroscopia de emisión atómica de plasma de microondas utilizando un MP-AES Agilent 4200 (EE.UU.), de acuerdo a la metodología previamente reportada por *Idris et al.* [99]. La eficiencia SPIONs atrapamiento (SE) se determinó utilizando el contenido en masa de hierro medido en la muestra de microesferas y la cantidad de masa de hierro teórica inicial, usando la siguiente fórmula:

$$SE = \frac{(I_{mea})(100\%)}{I_{the}} \quad (A1)$$

donde I_{mea} es la cantidad de masa de hierro medida en la muestra (μg) y I_{the} es la cantidad de masa de hierro inicial teórica agregada a la muestra (μg).

Análisis de tamaño de microesferas

El análisis de tamaño de las microesferas fabricadas fue realizado utilizando un Marlvern Zetasizer Nano ZS (Reino Unido). Las medidas de tamaño se llevaron a cabo suspendiendo muestras de microesferas en agua desionizada. El promedio de los diámetros de partícula fue determinado a través del uso del pico promedio de cada distribución.

Susceptibilidad magnética

Para las muestras de microesferas tratadas con SPIONs, la medición de la susceptibilidad magnética se realizó en el departamento de Nanomedicina de *HNO-Klinik*. Se colocó 1 mg de muestras de microesferas en el tubo de medición del instrumento de susceptibilidad magnética MS2G Bartington (Reino Unido). Posteriormente, se colocó en la columna con los sensores de medición de acuerdo con el protocolo reportado por *Idris et al.* [99].

Ensayos en cultivo celular

Se prepararon soluciones madre de 1 mg/ml de microesferas tratadas con DAPI y SPIONs respectivamente en DMEM. Se cultivaron células de osteo-fibroblastos humanos ATCC-MG-63 en frascos de cultivo celular de acuerdo con el estándar ISO 10993-5. Las células se contabilizaron y se agregaron aproximadamente 50,000 células placas de 24 pozos, después se incubaron durante 12 horas. Posteriormente, se agregaron volúmenes de 10, 100 y 1000 μ l de cada solución madre de microesferas por triplicado. La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo WST-8 (Sigma-Aldrich, Alemania) en lapsos de 24 h y 7 días. Se retiró el sobrenadante de los pozos y se lavó con PBS, luego se añadió medio de cultivo celular recién preparado con 1% de volumen de solución WST-8, seguido de incubación durante 2 horas. Posteriormente, se transfirieron 100 μ l de sobrenadante de cada placa hacia una placa de 96 pocillos para medir la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas PHOmo Autobio Labtec Instruments (China), mostrado en la Figura 24.



Figura 24 - Lector fotométrico de microplacas PHOmo Autobio, utilizado para el análisis del ensayo WST-8.

De forma paralela, se cultivaron células MG-63 placas de 24 pozos y se trataron con las mismas condiciones de microesferas utilizadas para el ensayo WST-8 pero, en el caso de las células tratadas con SPIONs. Después, se realizó el análisis de viabilidad celular mediante ensayo de

tinción DAPI/Vybrant DyeCycle (Merck, Alemania), a las 24 horas y 7 días de incubación. Los ensayos celulares se observaron mediante microscopía de fluorescencia utilizando un microscopio AxioCam ERc 5s, Primovert, Carl Zeiss (Alemania). Los núcleos celulares fueron modificados a color verde para un mejor análisis. Para las microesferas de PHBV cargadas con DAPI, solo se agregó acetoximetil éster de calceína, Calcein AM (Merk, Alemania), y se observaron en un microscopio confocal espectral Nikon A1R (EE. UU.). El procesamiento de imágenes confocales se realizó por medio del software de análisis de imágenes Fiji (ImageJ, USA).

Resultados preliminares

Morfología superficial

La morfología de la superficie de las microesferas de PHBV con SPION incorporados se muestra en la figura 25. Las microesferas exhibieron una forma esférica con superficie lisa, no se observó presencia de poros. La forma de las microesferas no se vio afectada por la incorporación los SPIONs ni por la curcumina atrapada.

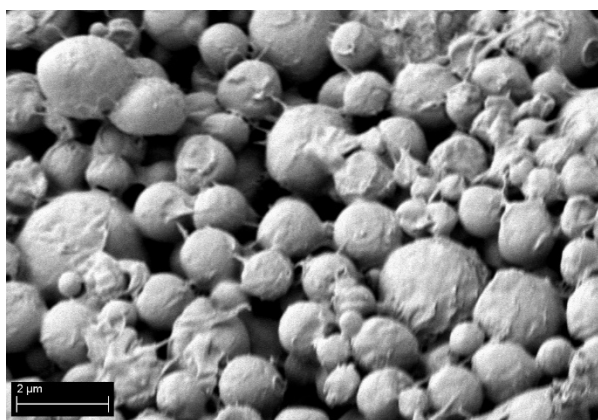


Figura 25 - Micrografías SEM de microesferas de PHBV con SPIONs y curcumina incorporados.

Análisis de tamaño de microesferas

Los promedios de los diámetros de las microesferas compuestas con SPIONs y curcumina incorporados fue de $3.4 \pm 0.6 \mu\text{m}$. Este diámetro de estas microesferas es similar al obtenido en las microesferas a base de PHB y similar a los reportados en literatura [80, 82-84].

Eficiencia de atrapamiento de curcumina

Los distintos CE para las condiciones estudiadas se muestran en la Figura 26. La incorporación de SPIONs en las microesferas de PHBV aparentemente redujeron el CE a medida que aumentaba la proporción de SPION. Este comportamiento puede explicarse por la diferencia entre la curcumina y los SPION en términos de hidrofobicidad y la compatibilidad con el solvente utilizado. La incorporación de SPION reduce la hidrofobicidad de la emulsión, lo que puede reducir la afinidad de la curcumina y la matriz polimérica. Debido a que ambos son hidrofóbicos, esto podría causar una reducción en la eficiencia de atrapamiento como ha sido discutido con anterioridad en la literatura [99, 119]. Otra posible causa puede ser la alta densidad de los SPION, partículas a base de hierro, la cual podría reducir la capacidad de la matriz polimérica para incorporar otros compuestos, sin embargo, se necesitan más estudios para respaldar esta suposición. Aunque se observó este comportamiento, la CE de curcumina fue superior al 63% para todas las concentraciones de SPION incorporadas estudiadas.

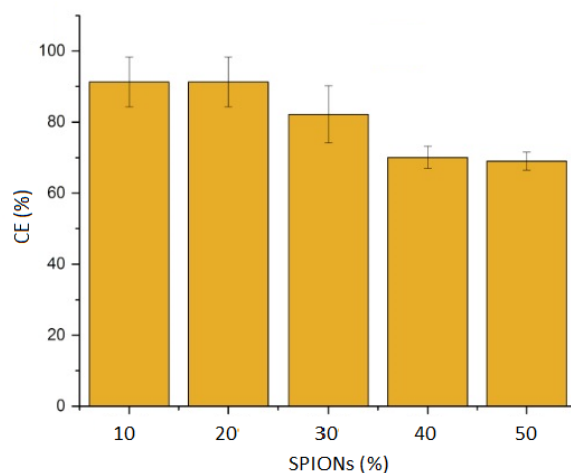


Figura 26 - Eficiencia de atrapamiento de curcumina en microesferas de PHBV con distintas concentraciones de SPIONs incorporados.

Eficiencia de atrapamiento de SPIONs y susceptibilidad magnética

La SE de las microesferas basadas en PHBV para todas las relaciones SPION estudiadas se muestra en la Figura 27. A medida que aumentó la relación SPION incorporada, la SE también aumentó, este comportamiento también es correspondiente con el comportamiento de eficiencia de atrapamiento de curcumina observado. Aparentemente, a medida que el contenido de SPIONs aumentó en la matriz de polímero PHBV, la retención de curcumina en las microesferas disminuyó, atribuido a las mismas razones discutidas en la sección de eficiencia de atrapamiento de curcumina.

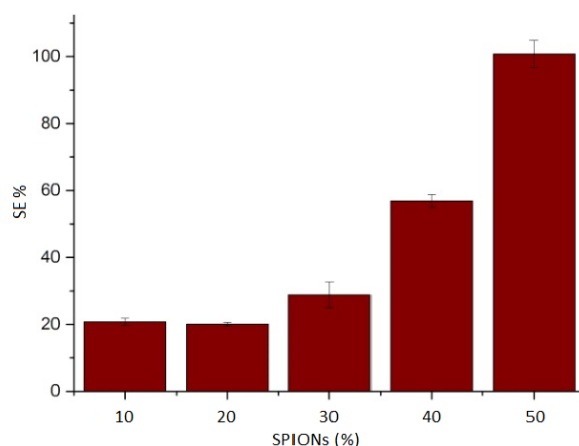


Figura 27 - Eficiencia de atrapamiento de SPIONs en microesferas de PHBV fabricadas con diferentes cargas de SPIONs incorporados.

Los valores de susceptibilidad magnética " χ " de las microesferas de PHBV a diferentes proporciones de SPIONs incorporados se muestran en la Tabla 4. Como se puede observar, la incorporación de SPION confirió a las microesferas de PHBV cargadas con curcumina susceptibilidad magnética, en la medida en la que valores registrados en las mediciones fueron positivos y la teoría física detrás de la susceptibilidad magnética [120]. Brevemente, consiste en que los materiales diamagnéticos o no susceptibles a campos magnéticos presentan valores negativos o cero, por el contrario, las microesferas con SPIONs incorporados, al presentar

valores positivos, podrían ser influenciadas por campos magnéticos y así poder ser manipuladas [95]. De modo que así las microesferas podrían ser localizadas sobre los tejidos u órganos específicos para la liberación del fármaco cargado en ellas.

Tabla 4 - Susceptibilidad magnética de microesferas de PHBV con diferentes concentraciones de SPIONs.

Concentración de SPIONs	Susceptibilidad magnética promedio (mg ⁻¹)	Desviación estándar
10%	0.001265525	2.3036E-05
20%	0.00164445	2.10362E-05
30%	0.004525625	2.10362E-05
40%	0.0091384	2.08573E-05
50%	0.0203478	0.00367172

Resultados de ensayos celulares

La viabilidad celular de cada una de las concentraciones de SPIONs incorporados se realizó mediante el ensayo de viabilidad celular WST-8. Los valores de viabilidad después de 24 h y 7 días se presentan, en términos de la densidad óptica, en la Figura 28. Como se puede observar después de 24 h, la biocompatibilidad de las microesferas compuestas con SPIONs en todas las

concentraciones estudiadas es similar al control. Sin embargo, el análisis de la varianza para determinar el rango de significancia estadística está pendiente.

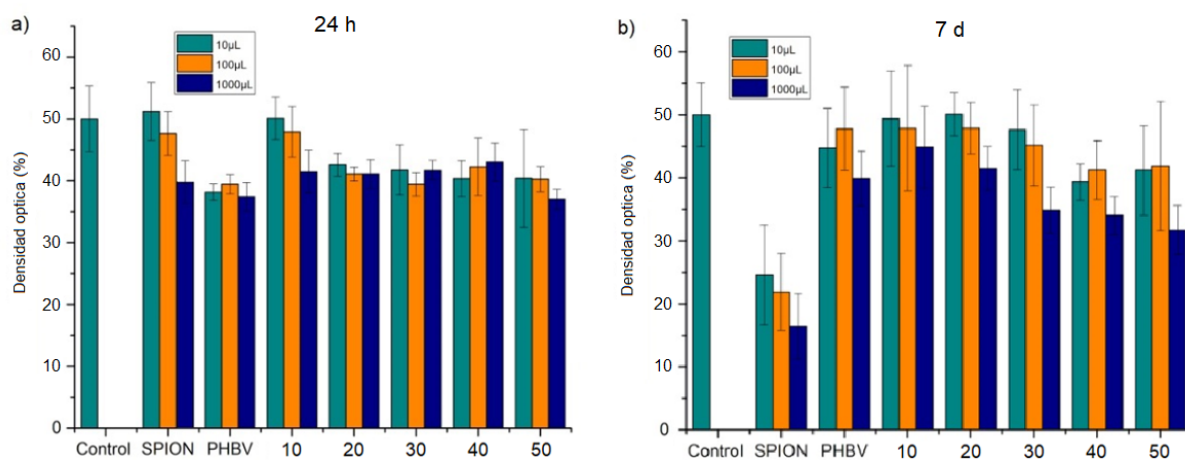


Figura 28 - Viabilidad celular por WST-8 de microesferas de PHBV cargadas del 10 al 50% de SPIONs después de a) 24 h y b) 7 días de incubación.

La viabilidad celular después de 7 días de microesferas de PHBV tratadas con SPIONS se muestran en la Figura 28a. En ella se puede observar la diferencia entre la viabilidad de las muestras tratadas con microesferas de PHBV/SPIONs en las cinco concentraciones estudiadas y las muestras con SPION libres, la cual es menor que cualquiera de las muestras tratadas con microesferas. Esta diferencia es considerable en la mayoría de las diluciones estudiadas. Este comportamiento puede explicarse debido a la diferencia de tamaño, entre las microesferas basadas en PHBV y los SPION y NBG, que permiten que las nanopartículas pasen a través de la membrana celular, aumentando con esto la citotoxicidad de la nanopartícula. Además de que este comportamiento de citotoxicidad es consistente con los observados previamente por *Wei*

y *Sethi et al.*, debido a la presencia de nanopartículas a base de materiales inorgánicos [121, 122].

La diferencia en la viabilidad celular después de 7 días, entre los SPIONs incorporados en las microesferas de PHBV y por separado, puede indicar una mitigación de los efectos secundarios de las nanopartículas debido a su incorporación de la matriz de polímero PHBV. Esto resulta en un DDS de mayor tamaño, lo que modifica la interacción entre el DDS y las células, lo cual reduce el daño producido en ellas, producto de esta diferencia de tamaño [121]. Además, de una posible combinación con los efectos benéficos atribuidos a la curcumina a bajas concentraciones, como ser antioxidante, promotor de curación, entre otras, y previamente reportadas por algunos autores como *Hewlings y Pulido-Moran et al.* [55, 123]. Sin embargo, se necesitan más estudios para respaldar el efecto benéfico de la curcumina en la viabilidad celular para las condiciones estudiadas.

Microscopía de Fluorescencia

Paralelamente a los ensayos de viabilidad por WST-8, el análisis de viabilidad celular por tinción DAPI/Vybrant se realizó en los mismos intervalos de tiempo. El biomarcador DAPI y Vybrant tienen un color azul y rojo respectivamente, DAPI tiñe el ADN nucleico y Vybrant tiñe el citoesqueleto de las células. Las diferentes capas de las imágenes, producto de cada tinción y el campo blanco (microesferas), fueron fusionadas a través del software de imagen del microscopio, además los núcleos celulares fueron modificados a color verde para un mejor análisis.

La Figura 29 muestra una micrografía fluorescente de una muestra tratada con 100 μ l de microesferas de PHBV con SPION a una concentración de 10%, después de 24 h de incubación. En la micrografía, se observan las microesferas (en blanco) depositadas en las células MG-63, los núcleos de las células (en verde) y el citoesqueleto de las células (en rojo). La presencia de numerosas células vivas en los alrededores de las microesferas son indicio de la buena

viabilidad celular de DDS. Esta observación coincide con los resultados del ensayo WST-8 después a las 24 h.

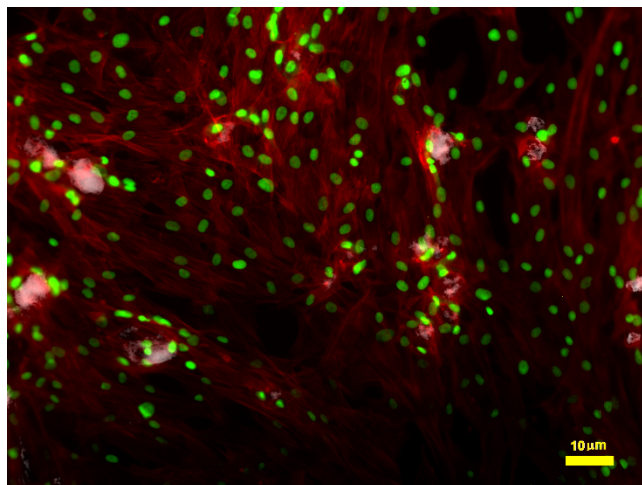


Figura 29 – Microesferas de PHBV/SPIONs/curcumina (blanco) en células MG-63 después de 24 h. (los núcleos celulares fueron modificados a verde para su mejor análisis).

Posteriormente, micrografías de fluorescencia de una muestra tratada con 100 μ l de microesferas de PHBV con SPION a la misma concentración (10%) y con SPION libres, después de 7 días de incubación, se muestran en la figura 30. En la muestra tratada con microesferas de PHBV (Fig. 30b) se puede observar un número considerable de células vivas (núcleos verdes) que rodean a una microesfera (en blanco). En contraste, en la muestra tratada con SPIONs libres (Fig. 30a), se observaron menos células vivas (núcleos teñidos de verde). Además, el citoesqueleto de estas células parece estar dañado, disperso y los núcleos también exhiben una forma irregular, alargada. Ambos resultados, los observados en la microscopía de fluorescencia y los de la viabilidad celular por WST-8, de las muestras tratadas con SPIONs libres después de 7 días, confirman un efecto citotóxico mayor producido por los SPIONs libres sobre las células MG-63.

Por otra parte, la mayor viabilidad en los resultados de los ensayos de WST-8 y en la microscopía de fluorescencia, de las muestras tratadas con la misma cantidad de SPIONs pero

incorporados en las microesferas de PHBV, puede atribuirse a la mejor biocompatibilidad del biopolímero el cual atenúa el efecto citotóxico de la nanopartícula incorporada. Además de la posible combinación de las propiedades beneficiosas reportadas para la curcumina [55-57, 124]; la cual también está incorporada dentro de las microesferas, lo que en conjunto mejora la viabilidad celular del DDS compuesto.

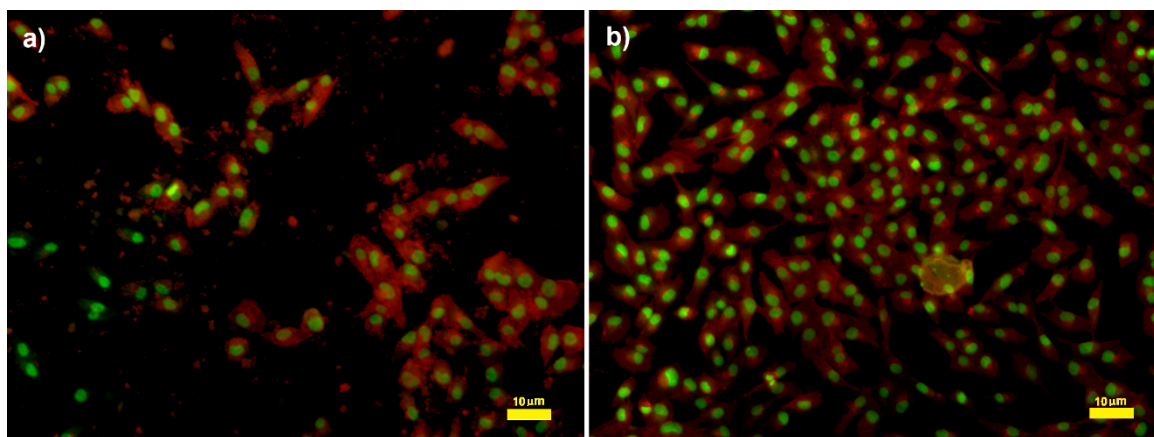


Figura 30 – Células MG-63 tratadas con a) SPIONs libres y b) microesferas de PHBV/SPIONs/curcumina (en blanco) después de 7 días. (los núcleos fueron modificados a verde para su mejor análisis).

Microscopía confocal de microesferas de PHBV tratadas con DAPI

Las microesferas de PHBV tratadas con DAPI como fármaco modelo, se incubaron en células MG-63 durante 24 h, con el objetivo de ver si se producía una difusión de DAPI, desde el DDS a las células, lo que se confirmaría a través de la tinción de los núcleos de las células. Las muestras tratadas con microesferas de PHBV cargadas con DAPI y sin carga, fueron observadas por medio de microscopía confocal. La Figura 31 muestra una microesfera sin carga de DAPI y otra con carga de DAPI al 10%, en células MG-63. La tinción azul en los alrededores de la microesfera cargada con DAPI (Fig. 31b), indica la liberación del biomarcador cargado en la microesfera hacia las células. A medida que las células están más próximas a la microesfera, la intensidad del azul producto de la tinción de DAPI aumenta. Por otro lado (Figura 31a), la microesfera sin carga de DAPI no mostró ninguna tinción azul, esto como se

esperaba, debido a que no se incorporó biomarcador DAPI en el DDS y no hay razón para que haya tinción de los núcleos. Como se establece por el fabricante del biomarcador (ThermoFisher), el biomarcador DAPI puede teñir células vivas en altas concentraciones, y es un reactivo común para la observación de células vivas así como el Hoechst y Draq5 [125, 126]. Sin embargo, se puede asegurar que se están observando células vivas, debido a la tinción verde de las membranas celulares producto del tratamiento de las células con Calceína, biomarcador que exclusivamente tiñe células vivas [108], previa a su observación.

De modo que, la única razón para observar una tinción azul en los núcleos celulares en los alrededores de la microesfera se debió a la difusión del DAPI desde la microesfera. La intensidad del azul en las células adheridas a la microesfera puede deberse también a la combinación de la liberación por difusión y al consumo del biopolímero por las células adheridas a la microesfera (biodegradación). Sin embargo, se necesitan más estudios para confirmar un efecto por biodegradación en las condiciones del ensayo. Con los resultados observados, solo se puede atribuir la tinción a la liberación por difusión, de manera similar a como corrió en la liberación de curcumina, en los ensayos con microesferas a base de PHB.

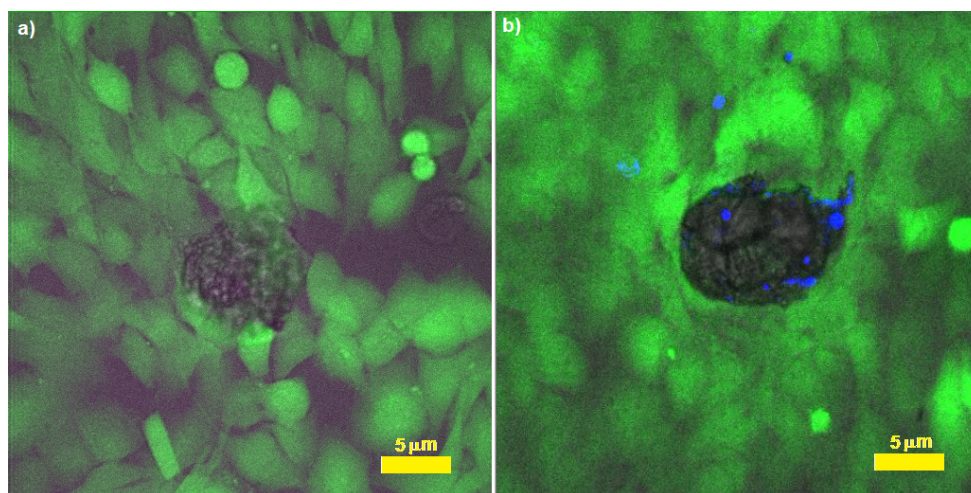


Figura 31 - Microesferas de PHBV a) sin carga y b) con carga de DAPI al 10%.

Adicionalmente, mediante el uso del software de análisis de imágenes Fiji, se ensamblaron varias micrografías confocales (28 capas) de secciones del entorno de la microesfera. La Figura 32 muestra dos superficies en 3D diferentes regiones de los alrededores de una microesfera PHBV cargada con DAPI rodeada de células MG-63, después de 24 h de incubación. A través de esta reconstrucción 3D, fue posible observar desde diferentes ángulos y a distinta profundidad. También se pudo identificar la adhesión de las células en la superficie de la microesfera e identificar las regiones teñidas con DAPI. Esta reconstrucción podría realizarse agregando más capas hasta cubrir la totalidad de la microesfera y así tener un modelo 3D completo.

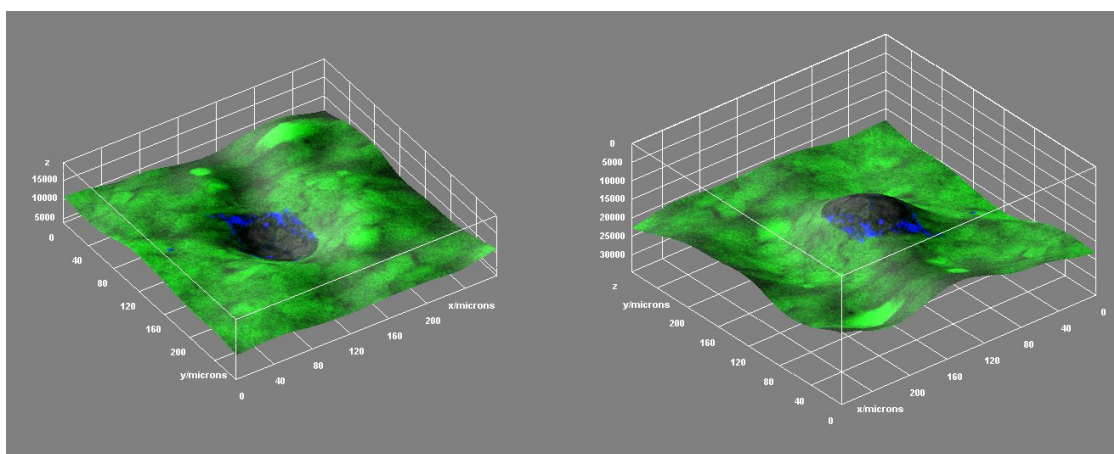


Figura 32 - Reconstrucciones 3D de dos secciones de una microesfera de PHBV/DAPI rodeadas de células MG-63 a través de microscopía confocal.

Perspectivas a futuro

Los resultados hasta el momento muestran el potencial de la incorporación de SPIONs en microesferas de PHBV para la fabricación de un DDS compuesto. A pesar de que observó una aparente relación de disminución en la eficiencia de atrapamiento de curcumina a medida que se incrementa la concentración de SPIONs. Los ensayos de viabilidad celular mostraron buena biocompatibilidad del DDS basados en PHBV, así como las propiedades del biopolímero en conjunto con el tamaño del DDS, aparentemente ayudaron a reducir los efectos secundarios debidos a los SPIONs por sí solos. Además, las microesferas de PHBV con SPIONs y curcumina incorporados exhibieron susceptibilidad magnética, lo que podría permitir su dirección mediante campos magnéticos. Esta propiedad, en combinación con la liberación controlada de curcumina exhibida en las microesferas a base de PHB, podría brindar una ventana de tiempo adecuada para localizar las microesferas en los órganos o tejidos específicos. Esto antes del inicio de la liberación de curcumina, logrando así una administración más eficiente y evitando los efectos del fármaco en zonas no deseadas. De modo que más estudios en esta dirección pueden resultar en el diseño de nuevos tratamientos de liberación localizada.

Por su parte, los experimentos en células con microesferas de PHBV con DAPI cargado, mostraron evidencia directa de la liberación por difusión del fármaco modelo incorporado en el DDS hacia las células. Lo cual en conjunto con la microscopía confocal y el procesamiento de imágenes, puede brindar mejores herramientas para el análisis y estudio del comportamiento de liberación a través de este tipo de DDSs en ambientes biológicos como el cultivo celular. Ambas perspectivas de investigación pueden ser complementadas a través de estudios adicionales.

Apéndice II

PHA Depolimerasa

Las enzimas a cargo de la degradación del PHA están constituidas de un dominio de unión con el sustrato, un dominio catalítico y una región de unión entre estos dos dominios. El dominio de unión con el sustrato es el que se une con el PHA sólido. El dominio catalítico tiene una llamada triada catalítica (Ser-His-Asp). La serina es parte del pentapéptido cuadrado de lipasa (Gly-X-Ser-X-Gly), y está presente en todas las hidrolasas como lipasa, esterasa y serina proteinasa [127]. Las serinas hidrolasas tienen un dominio activo que forma el tercio catalítico con un aspartato (o glutamato) y un residuo de histidina, en el que el grupo hidroxilo de la serina sirve como un nucleófilo que ataca los enlaces de las cadenas poliméricas [3]. Esta enzima divide principalmente el segundo grupo y el tercer enlace éster de las terminales hidroxilo [128]. Dependiendo de la depolimerasa presente, los productos de la hidrólisis pueden ser monómeros o monómeros y dímeros, o una mezcla de oligómeros. A su vez, una transición tetraédrica de carbono a carbonilo y un átomo de oxígeno cargado negativamente que se estabiliza por dos grupos NH de la cadena principal (oxianión) [128].

Todas las despolimerasas de PHB son proteínas con una estructura compuesta, que consta de entre 25 y 37 aminoácidos peptídicos, que se dividen a través de su camino hacia la membrana plasmática, un dominio catalítico largo de N terminales, una unión de sustrato llamado C terminal y el dominio conjunto que conecta el dominio catalítico con la unión al dominio del sustrato [128]. A medida que aumenta la cristalinidad del polímero, disminuye la degradabilidad. La posición del grupo hidroxilo y la longitud de la tensión lateral tienen una gran influencia en la tasa de degradación [128]. De acuerdo con el modelo de Mukai, la reacción de absorción del equilibrio inicial de la PHB-despolimerasa en el sustrato sólido se refiere específicamente a la enzima del dominio de unión. La unión es seguida por la reacción de

hidrólisis que implica el dominio catalítico de la enzima y una porción de la superficie del sustrato que no está ocupada por el dominio de unión de la enzima (superficie libre) [25].

El dominio catalítico de la enzima es capaz de dividir los enlaces éster en PHA, el dominio de unión tiene la función de adsorber la superficie sólida en PHA. Se ha propuesto en la literatura que la degradación enzimática de PHA por la depolimerasa de PHB toma dos pasos, primero la adsorción de la enzima en la superficie sólida de poliéster, hecha por el dominio de unión, forma un anticuerpo conjugado con cada cristal individual y la unión dominio, posteriormente, la hidrólisis de las cadenas de polímero por el dominio catalítico [129].

El dominio de unión es capaz de reconocer el PHA insoluble por las interacciones químicas entre aminoácidos en el dominio de unión y la superficie del poliéster, además de interacciones hidrofóbicas. Además, se ha informado que la depolimerasa de PHB puede adherirse también a películas de PLLA, PHO, PS, PE y, según el tipo de polímero, es la cantidad de enzima absorbida, sin embargo, la erosión no se presenta en esas películas. Algunos autores como Murase sugieren que la enzima perturba la morfología en los alrededores de la cadena más ordenada, a pesar de la actividad hidrolítica, fragmenta el cristal individual a través del hacha cristalográfica. Esto crea agujeros en la superficie del poliéster. La microscopía de fuerza atómica se conoce como una herramienta útil para observar los cambios morfológicos en la superficie durante la degradación enzimática e hidrolítica [129]. Algunos autores como *Brandl et al.*, han propuesto dos mecanismos responsables de la degradación del PHA, en condiciones estériles o asépticas, los PHA se degradan por hidrólisis. Este tipo de degradación es relevante para aplicaciones médicas y farmacológicas. En un entorno natural, el polímero se degrada enzimáticamente a través de la actividad de las depolimerasas o esterases. Los compuestos de carbono de menor peso molecular se mineralizan más rápido, a medida que la estructura es más compleja, el tiempo de mineralización y las estructuras repetidas de cadena larga aumentan la hidrofobicidad del polímero. Por otro lado, la degradación disminuye en presencia de la configuración (S), lo que indica que las esterases son estereoselectivas. A través del control de la unidad principal de la cadena es posible controlar la biodegradabilidad y la tasa de degradación de un polímero [130]. La Tabla 5 muestra la degradación aeróbica de varios tipos de películas de PHA por un cultivo bacteriano mixto.

Tabla 5 - Degradación aeróbica de varias películas de PHAs por una mezcla de bacterias [130].

Type ^a	Configuration	Composition of PHA (%)	M _w	Degradation ^b
PHB	[R]	100	150'000	+
PHB	[R]	100	800'000	+
PHB	[R, S] stereoblock	100	ND ^c	—
PHB	[R, S] atactic	100	ND	—
PHB	[S]	100	ND	—
PHB-co-HV	[R]	83/17	150'000	+
PHB-co-HV	[R]	80/20	ND	+
PHB-co-HV	[R]	70/30	ND	+
PHH-co-HV	[R]	94/4	360'000	+
PHN-co-HH	[R]	59/32	190'000	—

^a structure according to formula (1);

^b + : polymer degraded; — : polymer not degraded;

^c not determined

La degradación enzimática de los cristales poliméricos por la depolimerasa extracelular de PHB comienza desde el borde y a través del eje más largo más que en la superficie de los pliegues del cristal único. Los pesos moleculares de las cadenas principales de PHB en los cristales permanecen sin cambios durante la degradación enzimática. La adsorción de la PHB depolimerasa en los cristales individuales tiene un gran efecto en el aumento de la movilidad de las cadenas de PHB de cada cristal. Como resultado, el ataque de la unión catalítica tiene lugar preferiblemente contra las zonas desordenadas de la cadena, las cadenas se orientan en los bordes de los cristales o se cortan en la dirección hacia los lados del cristal en lugar del eje de la cadena. la enzima hidroliza la cadena de polímero con un comportamiento exo [88]. Algunas propiedades de las depolimerasas de PHB son que tienen un peso molecular relativamente pequeño, inferior a 100 KDa, entre 40 y 50 kDa. No se unen a los intercambiadores de aniones, pero tienen una fuerte afinidad con los materiales hidrófobos, su pH óptimo está entre 7,5 y 9,8 y muchas de las depolimerasas de PHA son inhibidas también por los inhibidores de la serina esterasa [128].

Debido a que el PHB es un sustrato insoluble. La biodegradación enzimática es una reacción heterogénea [131]. Cuando la PHB depolimerasa rompe el PHB insoluble en el monómero y el dímero del ácido 3-hidroxibutírico [132]. Las lipasas y las PHA depolimerasas tienen un mecanismo de hidrólisis de sustrato similar. La estructura química y el estado de la superficie del poliéster influyen en la degradación y la modificación de estos factores puede ocurrir en cualquier etapa de degradación, lo que puede afectar a la continuidad de esta. El PHA puede degradarse aeróbicamente en agua y dióxido de carbono [20, 133], y en metano en condiciones anaeróbicas [20].

Una de las bacterias degradantes de PHB más interesantes es la *P. lemoignei*, la cual se especializa en la biodegradación de PHA de cadena corta. Tiene al menos cinco genes de depolimerasa de PHA (*phaZ1* - *phaZ5*) para producir al menos cinco depolimerasas de PHA diferentes, dos depolimerasas de PHB (A y B), y cada una se puede separar en dos isoenzimas específicas para PHB y copoliésteres de 3- hidroxibutirato (3HB), C, D y PHV depolimerasa para 3HV [3]. La Tabla 6 muestra algunas propiedades relevantes de las PHA depolimerasas producidas por la *P. lemoignei*.

Tabla 6 - Propiedades de las PHA depolimerasas producidas por la *P. lemoignei* purificada de la *E. Coli* recombinante [3].

PHA depolymerase gene, protein, isoenzyme	Length (amino acids)		M_r		Glycosylation	Activity ^a					Sp act (10 ³ U/mg)		Optimal temp (°C)
	Preprotein	Signal peptide	Deduced mature	By SDS- PAGE		PHB	P(4HB)	PHV	PHD, P (HO-co-HD)	PCL, PL	PHB	PHV	
<i>phaZ1</i> , PhaZ1, C	414	37	39,510	44,000	-	+++	-	++	-	-	11.3	2.97	61.5
<i>phaZ2</i> , PhaZ2, B	433	37	41,793	46,500	-	+++	-	-	-	-	14.1	ND	54.5
<i>phaZ3</i> , PhaZ3, D	419	26	41,162	ND ^b	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>phaZ4</i> , PhaZ4, PHV depolymerase 1	567	25	57,459	65,500	-	+++	+	+	-	-	22.7	0.72	50
<i>phaZ5</i> , PhaZ5, A	433	26	42,221	49,000	-	+++	-	-	-	-	22.3	ND	51

^a -, no PHA depolymerase activity detectable (no haloformation); +, low PHA depolymerase activity (small halo); ++, medium PHA depolymerase activity (medium halo); +++, high PHA depolymerase activity (large halo).

^b ND, not determined.

Apéndice III

Niveles de degradación de polímeros

Degradación

La mayoría de los plásticos no biodegradables están hechos de varios monómeros pequeños que le confieren un alto peso molecular. En comparación, los polímeros biodegradables tienen menos peso molecular, lo que los hace degradables a través de la luz UV, el agua, las enzimas y algunos cambios de pH. En general, la degradación se define como cualquier proceso que puede romper moléculas grandes y complejas de un polímero en pequeñas [23].

Degradación termo oxidativa

Esta requiere de oxígeno y calor para romper las largas cadenas poliméricas en bloques de monoméricos llamados radicales que interactúan adicionalmente con los radicales peróxidos, formadores de oxígeno.

Biodegradación

Este proceso involucra organismos vivos que producen enzimas activas para degradar las cadenas de polímeros para su posterior uso como fuentes de carbono y de energía. Los monómeros son luego absorbidos por el organismo degradador y luego se mineralizan, se lleva a cabo en grupos o colonias que se adhieren a la superficie del grupo formador de polímeros para comenzar la biodegradación del material, este comportamiento es el responsable de la llamada

erosión aparente. Hay enzimas capaces de hidrolizar diferentes plantas oleaginosas, triglicéridos y ésteres metílicos en ácidos grasos [23, 134].

Los mecanismos de acción de los microorganismos sobre los polímeros están influenciados por dos procesos. [23]:

1. Acción directa: es cuando la degradación del polímero sirve como alimento para el crecimiento de los microorganismos.
2. Acción secundaria: es cuando los productos metabólicos del microorganismo (H_2O , CO_2 , CH_4 , biomasa, etc.) actúan sobre el polímero, deteriorándolo aún más.

La temperatura de fusión T_m tiene un gran efecto sobre la degradabilidad enzimática, se ha reportado que la degradabilidad disminuye cuando la T_m aumenta [20, 127, 135]. Los enlaces de hidrógeno juegan un papel importante en la mejora de las propiedades térmicas de los poliésteres alifáticos T_m a través de las cadenas de distribución CAPE que influyen fuertemente en la hidrólisis enzimática [20]. También se ha reportado que las propiedades de orden superior como la cristalinidad y el módulo elástico reducen la degradabilidad del polímero [127, 135], a mayor cristalinidad, una menor degradabilidad [21].

La estructura cristalina, las esferulitas, la orientación molecular y la temperatura de transición vítrea T_g también se ha observado por diversos estudios que afectan la hidrólisis y la biodegradación del poliéster [20]. El procesamiento del material también afecta la degradación, un polímero fabricado por técnicas de uso de solventes se degrada más fácilmente que el producido por termoformado, la principal diferencia entre estos procesos es la inducción de polímeros de cristalinidad elevada de acuerdo con *Guo et al.* [21]. Chowdhury descubrió en 1963 los primeros microorganismos degradadores de PHA, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*. El PHB puede ser degradado por las depolimerasas intracelulares y extracelulares [127]. La Tabla 7 muestra algunas tasas de degradación a través de diferentes cepas de bacterias.

Tabla 7 - Tasa de degradación de diferentes biopolímeros por diferentes cepas bacterianas [127].

Polyester film	M_n	Degradation of polyester (% w/w)		
		<i>Streptomyces</i> MG	<i>Aspergillus</i> ST-01	<i>Bacillus</i> TT96
PHB	2.1×10^5	100	93	14
PCL	6.7×10^4	71	97	100
PBSA	4.9×10^4	92	95	ND
PES	5.9×10^4	ND	ND	5
PBS	4.8×10^4	0	0	4
PLA	2.1×10^5	0	0	1

Finalmente, la degradación intracelular solo ocurre al interior de la bacteria cuando esta, al haber acumulado de forma endógena el PHA, lo usa como fuente de carbono o energía. Al polímero en el interior se le llaman gránulos nativos y es totalmente amorfo lo cual fue reportado por primera vez por Amor et al. en 1991 y tienen pequeños péptidos que rodean estos gránulos *in vivo*, se supone que estos péptidos cumplen con una función estructural según *Jendrossek et al.* [128]. La degradación extracelular, es en cambio cuando el PHA ha sido extraído del microorganismo, una vez que se extrae del gránulo natural, diversas impurezas se agregan comenzando la nucleación que causa la cristalización de poliéster en poco tiempo, una vez extraído se llama PHA desnaturalizado, este proceso lo vuelve altamente cristalino como ha sido estudiado previamente por Hocking y Marchessault en 1994 [128].

Referencias

1. Bugnicourt, E., *Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging*. Express Polymer Letters, 2014. **8**(11): p. 791-808.
2. Nigmatullin, R., et al., *Polyhydroxyalkanoates, a family of natural polymers, and their applications in drug delivery*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2015. **90**(7): p. 1209-1221.
3. Jendrossek, D., et al., *Biochemical and Molecular Characterization of the *presudomonas-Lemoignei* Polyhydroxyalkanoate Depolymerase System*. Journal of Bacteriology, 1995. **177**(3): p. 596-607.
4. Naveen, S.V., et al., *Unmodified medium chain length polyhydroxyalkanoate (uMCL-PHA) as a thin film for tissue engineering application – characterization and in vitro biocompatibility*. Materials Letters, 2015. **141**: p. 55-58.
5. Lenz, R.W. and R.H. Marchessault, *Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology*. Biomacromolecules, 2005. **6**(1): p. 1-8.
6. Kaur, G. and I. Roy, *Strategies for Large-scale Production of Polyhydroxyalkanoates*. Chemical and Biochemical Engineering Quarterly, 2015. **29**(2): p. 157-172.
7. Sukan, A., I. Roy, and T. Keshavarz, *Dual production of biopolymers from bacteria*. Carbohydrate Polymers, 2015. **126**: p. 47-51.
8. Gumel, A.M., M.S.M. Annuar, and Y. Chisti, *Recent Advances in the Production, Recovery and Applications of Polyhydroxyalkanoates*. Journal of Polymers and the Environment, 2012. **21**(2): p. 580-605.
9. Flores-Sanchez, A., et al., *Synthesis of Poly-(R-hydroxyalkanoates) by *Cupriavidus necator* ATCC 17699 Using Mexican Avocado (*Persea americana*) Oil as a Carbon Source*. International Journal of Polymer Science, 2017.
10. Jain, R., S. Kosta, and A. Tiwari, *Polyhydroxyalkanoates: a way to sustainable development of bioplastics*. Chronicles of Young Scientists, 2010. **1**(3): p. 10.
11. Orts, W.J., et al., *Poly(hydroxyalkanoates): Biorefinery polymers with a whole range of applications. The work of Robert H. Marchessault*. Canadian Journal of Chemistry, 2008. **86**(6): p. 628-640.
12. Barham, P.J., et al., *Crystallization and Morphology of a Bacterial Thermoplastic - poly-3-Hydroxybutyrate*. Journal of Materials Science, 1984. **19**(9): p. 2781-2794.
13. Lovera, D., et al., *Crystallization, morphology, and enzymatic degradation of polyhydroxybutyrate/polycaprolactone (PHB/PCL) blends*. Macromolecular Chemistry and Physics, 2007. **208**(9): p. 924-937.
14. Jiang, N. and H. Abe, *Effect of atactic poly(3-hydroxybutyrate) block on the crystallization and degradation behavior of 6-arm poly(L-lactide)-b-atactic poly(3-hydroxybutyrate)*. Polymer Degradation and Stability, 2015. **114**: p. 8-15.
15. Vergara-Porrás, B., J.N. Gracida-Rodríguez, and F. Pérez-Guevara, *Thermal processing influence on mechanical, thermal, and biodegradation behavior in poly(β-hydroxybutyrate)/poly(ε-caprolactone) blends: A descriptive model*. Journal of Applied Polymer Science, 2016. **133**(27): p. n/a-n/a.
16. Vergara-Porrás, B., J.N. Gracida-Rodríguez, and F. Pérez-Guevara, *Morphology of *Penicillium funiculosum* During Biodegradation of Poly (β-hydroxybutyrate-co-β-hydroxyvalerate) [PHBV] with Poly (ε-Caprolactone) [PCL] Blends*. Journal of Polymers and the Environment, 2011. **19**(4): p. 834-840.
17. Philip, S., T. Keshavarz, and I. Roy, *Polyhydroxyalkanoates: biodegradable polymers with a range of applications*. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 2007. **82**(3): p. 233-247.

18. Tanaka, T., et al., *Mechanical properties and enzymatic degradation of poly (R)-3-hydroxybutyrate fibers stretched after isothermal crystallization near T-g*. *Polymer Degradation and Stability*, 2007. **92**(6): p. 1016-1024.
19. Rai, R. and I. Roy, *Polyhydroxyalkanoates: The Emerging New Green Polymers of Choice*, in *Handbook of Applied Biopolymer Technology: Synthesis, Degradation and Applications*, S.K. Sharma and A. Mudhoo, Editors. 2011, Royal Soc Chemistry: Cambridge. p. 79-101.
20. Tokiwa, Y. and B.P. Calabia, *Biodegradability and biodegradation of polyesters*. *Journal of Polymers and the Environment*, 2007. **15**(4): p. 259-267.
21. Guo, Z.Q., et al., *Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) by a novel P3/4HB depolymerase purified from Agrobacterium sp DSGZ*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2016. **133**(1).
22. Lucas, N., et al., *Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques*. *Chemosphere*, 2008. **73**(4): p. 429-442.
23. Ghosh, S.K., S. Pal, and S. Ray, *Study of microbes having potentiality for biodegradation of plastics*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2013. **20**(7): p. 4339-4355.
24. Jendrossek, D. and R. Handrick, *Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates*. *Annual Review of Microbiology*, 2002. **56**: p. 403-432.
25. Scandola, M., M.L. Focarete, and G. Frisoni, *Simple kinetic model for the heterogeneous enzymatic hydrolysis of natural poly(3-hydroxybutyrate)*. *Macromolecules*, 1998. **31**(12): p. 3846-3851.
26. Hocking, P.J., et al., *Enzymatic degradation of single crystals of bacterial and synthetic poly(beta-hydroxybutyrate)*. *Macromolecules*, 1996. **29**(7): p. 2472-2478.
27. Gao, X., et al., *Polyhydroxyalkanoates as a source of chemicals, polymers, and biofuels*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2011. **22**(6): p. 768-774.
28. You, M.L., et al., *Chondrogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells on polyhydroxyalkanoate (PHA) scaffolds coated with PHA granule binding protein PhaP fused with RGD peptide*. *Biomaterials*, 2011. **32**(9): p. 2305-2313.
29. Webb, W.R., et al., *The application of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) scaffolds for tendon repair in the rat model*. *Biomaterials*, 2013. **34**(28): p. 6683-94.
30. Rai, R., et al., *Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future*. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 2011. **72**(3): p. 29-47.
31. Ribeiro-Samy, S., et al., *Development and characterization of a PHB-HV-based 3D scaffold for a tissue engineering and cell-therapy combinatorial approach for spinal cord injury regeneration*. *Macromol Biosci*, 2013. **13**(11): p. 1576-92.
32. Jain, R. and A. Tiwari, *Role of polyhydroxyalkanoates in cancer and other drug delivery systems*. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 2015. **11**(2): p. 494-U270.
33. Mignani, S., et al., *Expand classical drug administration ways by emerging routes using dendrimer drug delivery systems: A concise overview*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. **65**(10): p. 1316-1330.
34. Chen, C.-Y., et al., *pH-dependent, thermosensitive polymeric nanocarriers for drug delivery to solid tumors*. *Biomaterials*, 2013. **34**(18): p. 4501-4509.
35. Cai, Z.J., et al., *Poly(hydroxybutyrate)/cellulose acetate blend nanofiber scaffolds: Preparation, characterization and cytocompatibility*. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2016. **58**: p. 757-767.
36. Francis, L., et al., *Controlled Delivery of Gentamicin Using Poly(3-hydroxybutyrate) Microspheres*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2011. **12**(7): p. 4294-4314.
37. Francis, L., et al., *Multi-functional P(3HB) microsphere/45S5 Bioglass (R)-based composite scaffolds for bone tissue engineering*. *Acta Biomaterialia*, 2010. **6**(7): p. 2773-2786.
38. Fonte, P., et al., *Polymer-based nanoparticles for oral insulin delivery: Revisited approaches*. *Biotechnology Advances*, 2015. **33**(6): p. 1342-1354.
39. Michalak, M., et al., *Synthesis of PHB-based carrier for drug delivery systems with pH-controlled release*. *European Polymer Journal*, 2013. **49**(12): p. 4149-4156.

40. Xiong, Y.-C., et al., *Application of polyhydroxyalkanoates nanoparticles as intracellular sustained drug-release vectors*. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 2010. **21**(1): p. 127-140.
41. Zhao, Y.L., et al., *Preparation and Evaluation of Poly(3-hydroxybutyrate) Microspheres Containing Bovine Serum Albumin for Controlled Release*. Journal of Applied Polymer Science, 2008. **110**(6): p. 3826-3835.
42. Solaiman, D.K.Y., et al., *Control-release of antimicrobial sophorolipid employing different biopolymer matrices*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2015. **4**(3): p. 342-348.
43. Grillo, R., et al., *Controlled release system for ametryn using polymer microspheres: Preparation, characterization and release kinetics in water*. Journal of Hazardous Materials, 2011. **186**(2-3): p. 1645-1651.
44. Bernardos, A., et al., *Controlled release of vitamin B2 using mesoporous materials functionalized with amine-bearing gate-like scaffoldings*. Journal of Controlled Release, 2008. **131**(3): p. 181-189.
45. Abd El-Hay, A.M., et al., *Biodegradable polymeric microcapsules for sustained release of riboflavin*. International Journal of Biological Macromolecules, 2016. **92**: p. 708-714.
46. Zenkiewicz, M., et al., *A comparative analysis of mass losses of some aliphatic polyesters upon enzymatic degradation*. Polymer Testing, 2013. **32**(2): p. 209-214.
47. Danis, O., et al., *Preparation of poly(3-hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) films from halophilic archaea and their potential use in drug delivery*. Extremophiles, 2015. **19**(2): p. 515-24.
48. Erden, N. and N. Celebi, *Factors influencing release of salbutamol sulphate from poly(lactide-co-glycolide) microspheres prepared by water-in-oil-in-water emulsion technique*. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **137**(1): p. 57-66.
49. Pavurala, N. and L.E.K. Achenie, *Identifying polymer structures for oral drug delivery – A molecular design approach*. Computers & Chemical Engineering, 2014. **71**: p. 734-744.
50. Dong, W.F., et al., *Effect of partial crosslinking on morphology and properties of the poly(beta-hydroxybutyrate)/poly(D,L-lactic acid) blends*. Polymer Degradation and Stability, 2013. **98**(9): p. 1549-1555.
51. Sardesai, V.M., *Herbal medicines: Poisons or potions?* Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2002. **139**(6): p. 343-348.
52. Schuhladen, K., J.A. Roether, and A.R. Boccaccini, *Bioactive glasses meet phytotherapeutics: The potential of natural herbal medicines to extend the functionality of bioactive glasses*. Biomaterials, 2019: p. 119288.
53. Shruti, S., et al., *Curcumin release from cerium, gallium and zinc containing mesoporous bioactive glasses*. Microporous and Mesoporous Materials, 2013. **180**: p. 92-101.
54. Jing, X., et al., *Icariin doped bioactive glasses seeded with rat adipose-derived stem cells to promote bone repair via enhanced osteogenic and angiogenic activities*. Life sciences, 2018. **202**: p. 52-60.
55. Pulido-Moran, M., et al., *Curcumin and Health*. Molecules, 2016. **21**(3): p. 264.
56. Rejinold, N.S., et al., *Curcumin as a Novel Nanocarrier System for Doxorubicin Delivery to MDR Cancer Cells: In Vitro and In Vivo Evaluation*. ACS Appl Mater Interfaces, 2018.
57. Gopinath, D., et al., *Dermal wound healing processes with curcumin incorporated collagen films*. Biomaterials, 2004. **25**(10): p. 1911-1917.
58. Yao, Q., et al., *Curcumin induces the apoptosis of A549 cells via oxidative stress and MAPK signaling pathways*. International journal of molecular medicine, 2015. **36**(4): p. 1118-1126.
59. Saedisomeolia, A. and M. Ashoori, *Chapter Two - Riboflavin in Human Health: A Review of Current Evidences*, in *Advances in Food and Nutrition Research*, N.A.M. Eskin, Editor. 2018, Academic Press. p. 57-81.
60. Thakur, K., et al., *Riboflavin and health: A review of recent human research*. Critical reviews in food science and nutrition, 2017. **57**(17): p. 3650-3660.
61. Xin, Z., et al., *Riboflavin deficiency induces a significant change in proteomic profiles in HepG2 cells*. Scientific Reports, 2017. **7**: p. 45861.

62. Higdon, J. and V.J. Drake, *Riboflavin*. Micronutrient Information Center, Linus Pauling Institute at Oregon State University, 2007.
63. Khaydukov, E.V., et al., *Riboflavin photoactivation by upconversion nanoparticles for cancer treatment*. Scientific Reports, 2016. **6**: p. 35103.
64. De Souza, A.C.S., et al., *A promising action of riboflavin as a mediator of leukaemia cell death*. Apoptosis, 2006. **11**(10): p. 1761-1771.
65. Pramanik, N., et al., *Characterization and evaluation of curcumin loaded guar gum/polyhydroxyalkanoates blend films for wound healing applications*. RSC Advances, 2015. **5**(78): p. 63489-63501.
66. O'Donnell, P.B. and J.W. McGinity, *Preparation of microspheres by the solvent evaporation technique*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1997. **28**(1): p. 25-42.
67. Sáez, V., et al., *Liberación controlada de fármacos. Micropartículas*. Revista Iberoamericana de Polimeros, 2004. **5**(2): p. 87-101.
68. Basnett, P., et al., *Novel Poly(3-hydroxyoctanoate)/Poly(3-hydroxybutyrate) blends for medical applications*. Reactive & Functional Polymers, 2013. **73**(10): p. 1340-1348.
69. PubChem, *National Center for Biotechnology Information*. PubChem Database, (Riboflavin, CID=493570): p. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed on Nov. 23, 2019).
70. PubChem, *National Center for Biotechnology Information*. PubChem Database, (Curcumin, CID=969516): p. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov> (accessed on Nov. 23, 2019).
71. NIH, *Nationac cancer Institue*. National Institute of Healt, (Riboflavin): p. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/riboflavin>.
72. NIH, *National Cancer Institute*. National Institute of Healt, (Curcumin): p. <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-drug/def/curcumin>.
73. Wishart, D.S., et al., *DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018*. Nucleic acids research, 2017. **46**(D1): p. D1074-D1082.
74. Murueva, A.V., et al., *Microparticles prepared from biodegradable polyhydroxyalkanoates as matrix for encapsulation of cytostatic drug*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2013. **24**(8): p. 1905-1915.
75. Zidan, A.S., Z. Rahman, and M.A. Khan, *Product and process understanding of a novel pediatric anti-HIV tenofovir niosomes with a high-pressure homogenizer*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **44**(1-2): p. 93-102.
76. Lopez-de-Alba, P.L., et al., *Simultaneous determination and classification of riboflavin, thiamine, nicotinamide and pyridoxine in pharmaceutical formulations, by UV-visible spectrophotometry and multivariate analysis*. Journal of the Brazilian Chemical Society, 2006. **17**(4): p. 715-722.
77. Oyane, A., et al., *Preparation and assessment of revised simulated body fluids*. Journal of biomedical materials research Part A, 2003. **65**(2): p. 188-195.
78. Chen, G.-q. and Y. Wang, *Medical applications of biopolyesters polyhydroxyalkanoates*. Chinese Journal of Polymer Science, 2013. **31**(5): p. 719-736.
79. Shaikh, H.K., R. Kshirsagar, and S. Patil, *Mathematical models for drug release characterization: a review*. World J Pharm Pharm Sci, 2015. **4**(4): p. 324-338.
80. Panith, N., et al., *Development of tunable biodegradable polyhydroxyalkanoates microspheres for controlled delivery of tetracycline for treating periodontal disease*. Journal of Applied Polymer Science, 2016. **133**(42).
81. Bonartsev, A., et al., *Controlled release profiles of dipyridamole from biodegradable microspheres on the base of poly (3-hydroxybutyrate)*. Express Polymer Letters, 2007. **1**(12): p. 797-803.
82. Takeshima, K., et al., *Effect of Morphologycal properties on Drug release from Biodegradable Microspheres*. Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan, 1992. **112**(3): p. 203-210.
83. Monnier, A., et al., *Preparation and characterization of biodegradable polyhydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate/polyethylene glycol-based microspheres*. International Journal of Pharmaceutics, 2016. **513**(1-2): p. 49-61.

84. Lee, Y. and H. Sah, *Simple emulsion technique as an innovative template for preparation of porous, spongelike poly(lactide-co-glycolide) microspheres with pore-closing capability*. Journal of Materials Science, 2016. **51**(13): p. 6257-6274.
85. Modasiya, M. and V. Patel, *Studies on solubility of curcumin*. Int. J. Pharm. Life Sci, 2012. **3**: p. 1490-1497.
86. Refat, M.S., *Synthesis, characterization, thermal and antimicrobial studies of diabetic drug models: complexes of vanadyl (II) sulfate with ascorbic acid (vitamin C), riboflavin (vitamin B2) and nicotinamide (vitamin B3)*. Journal of Molecular Structure, 2010. **969**(1-3): p. 163-171.
87. Senthilkumar, P., et al., *Optimization and characterization of poly[R]hydroxyalkanoate of Pseudomonas aeruginosa SU-1 to utilize in nanoparticle synthesis for curcumin delivery*. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2017. **12**: p. 292-298.
88. Iwata, T., et al., *Visualization of enzymatic degradation of poly (R)-3-hydroxybutyrate single crystals by an extracellular PHB depolymerase*. Macromolecules, 1997. **30**(4): p. 833-839.
89. Xu, Y., et al., *Polymer degradation and drug delivery in PLGA-based drug-polymer applications: A review of experiments and theories*. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2017. **105**(6): p. 1692-1716.
90. Lenzi, E.K., et al., *Diffusion Processes and Drug Release: Capsaicinoids - Loaded Poly (ϵ -caprolactone) Microparticles*. PLoS ONE, 2016. **11**(6): p. e0157662.
91. Otero, J.A., et al., *Non-Parabolic Interface Motion for the One-Dimensional stefan Problem*. Thermal Science, 2017. **21**(6B): p. 2699-2708.
92. Hernández, E.M. and J.A. Otero, *Fundamental incorporation of the density change during melting of a confined phase change material*. Journal of Applied Physics, 2018. **123**(8): p. 085105.
93. Santiago Acosta, R.D., et al., *Thermal expansion effects on the one-dimensional liquid-solid phase transition in high temperature phase change materials*. AIP Advances, 2019. **9**(2): p. 025125.
94. Fu, Y. and W.J. Kao, *Drug Release Kinetics and Transport Mechanisms of Non-degradable and Degradable Polymeric Delivery Systems*. Expert opinion on drug delivery, 2010. **7**(4): p. 429-444.
95. Lv, Z.-D., et al., *Curcumin induces apoptosis in breast cancer cells and inhibits tumor growth in vitro and in vivo*. International journal of clinical and experimental pathology, 2014. **7**(6): p. 2818.
96. Xue, X., et al., *Curcumin induces apoptosis in SGC-7901 gastric adenocarcinoma cells via regulation of mitochondrial signaling pathways*. Asian Pac J Cancer Prev, 2014. **15**(9): p. 3987-3992.
97. Kuete, V., O. Karaosmanoğlu, and H. Sivas, *Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables*, in *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*. 2017, Elsevier. p. 271-297.
98. Moorkoth, D. and K.M. Nampoothiri, *Synthesis, Colloidal Properties and Cytotoxicity of Biopolymer Nanoparticles*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014. **174**(6): p. 2181-2194.
99. Idris, M.I., et al., *Surface Modification of SPIONs in PHBV Microspheres for Biomedical Applications*. Scientific Reports, 2018. **8**(1): p. 7286.
100. Misra, S.K., et al., *Incorporation of vitamin E in poly(3hydroxybutyrate)/Bioglass composite films: effect on surface properties and cell attachment*. Journal of the Royal Society Interface, 2009. **6**(33): p. 401-409.
101. Aguilar-Rabiela, A.E., et al., *Modeling the release of curcumin from microparticles of poly(hydroxybutyrate) [PHB]*. International Journal of Biological Macromolecules, 2020. **144**: p. 47-52.
102. Hingorani, R., et al., *Detection of apoptosis using the BD Annexin V FITC assay on the BD FACSVerser™ system*. BD Biosciences, 2011. **1**: p. 1-12.
103. Shishatskaya, E.I., et al., *Biocompatibility of polyhydroxybutyrate microspheres: in vitro and in vivo evaluation*. Journal of Materials Science-Materials in Medicine, 2008. **19**(6): p. 2493-2502.
104. Chu, C.S. and S.C. Rubin, *17 - Basic Principles of Chemotherapy*, in *Clinical Gynecologic Oncology (Ninth Edition)*, P.J. DiSaia, et al., Editors. 2018, Elsevier. p. 449-469.e2.
105. Freres, P., G. Jerusalem, and M. Moonen, *Chapter 2 - Categories of Anticancer Treatments*, in *Anti-Cancer Treatments and Cardiotoxicity*, P. Lancellotti, J.L. Zamorano Gómez, and M. Galderisi, Editors. 2017, Academic Press: Boston. p. 7-11.

106. PubChem, *National Center for Biotechnology Information*. PubChem Database, (4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI), CID=2954): p. (accessed on Nov. 24, 2019).
107. Viscor Carrasco, G., T. Pages Costas, and J.R. Torrella Guio, *Vybrant DyeCycle Violet stain discriminates two different subsets of CD34+ cells*. *Current Stem Cell Research & Therapy*, 2016, vol. 11, núm. 1, p. 66-71, 2016.
108. Peisajovich, S.G. and Y. Shai, *Liposomes in identification and characterization of viral fusogenic peptides*, in *Methods in enzymology*. 2003, Elsevier. p. 361-373.
109. Colombo, M., et al., *Biological applications of magnetic nanoparticles*. *Chemical Society Reviews*, 2012. **41**(11): p. 4306-4334.
110. Matuszak, J., et al., *Shell matters: Magnetic targeting of SPIONs and in vitro effects on endothelial and monocytic cell function*. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2015. **61**(2): p. 259-277.
111. Unterweger, H., et al., *Dextran-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging: Evaluation of size-dependent imaging properties, storage stability and safety*. *International journal of nanomedicine*, 2018. **13**: p. 1899.
112. Wu, J., et al., *Thermally triggered injectable chitosan/silk fibroin/bioactive glass nanoparticle hydrogels for in-situ bone formation in rat calvarial bone defects*. *Acta biomaterialia*, 2019. **91**: p. 60-71.
113. Breteanu, O., et al., *Electrospun nanofibrous biodegradable polyester coatings on Bioglass (R)-based glass-ceramics for tissue engineering*. *Materials Chemistry and Physics*, 2009. **118**(2-3): p. 420-426.
114. Hashemi-Beni, B., et al., *Cytotoxicity assessment of polyhydroxybutyrate/chitosan/nano-bioglass nanofiber scaffolds by stem cells from human exfoliated deciduous teeth stem cells from dental pulp of exfoliated deciduous tooth*. *Dental research journal*, 2018. **15**(2): p. 136.
115. Rai, R., et al., *Fabrication of a novel poly(3-hydroxyoctanoate)/nanoscale bioactive glass composite film with potential as a multifunctional wound dressing*, in *5th International Conference on Times of Polymers Top and Composites*, A. Damore, D. Aciermo, and L. Grassia, Editors. 2010, Amer Inst Physics: Melville. p. 126-128.
116. Reakasame, S., et al., *Cell laden alginate-keratin based composite microcapsules containing bioactive glass for tissue engineering applications*. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2018. **29**(12): p. 185.
117. Macías-Andrés, V.I., et al., *Preparation and characterization of 45S5 bioactive glass-based scaffolds loaded with PHBV microspheres with daidzein release function*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2017. **105**(6): p. 1765-1774.
118. Zafar, M.S., et al., *Bioactive Surface Coatings for Enhancing Osseointegration of Dental Implants*, in *Biomedical, Therapeutic and Clinical Applications of Bioactive Glasses*. 2019, Elsevier. p. 313-329.
119. Law, K.-Y., *Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity: getting the basics right*. 2014, ACS Publications.
120. Sosa, M., et al., *Medición de la susceptibilidad magnética de sustancias líquidas en el laboratorio de física*. *Revista mexicana de física E*, 2006. **52**(2): p. 111-115.
121. Wei, Z., et al., *Effect of particle size on in vitro cytotoxicity of titania and alumina nanoparticles*. *Journal of Experimental Nanoscience*, 2014. **9**(6): p. 625-638.
122. Sethi, K. and I. Roy, *Organically modified titania nanoparticles for sustained drug release applications*. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015. **456**: p. 59-65.
123. Hewlings, S. and D. Kalman, *Curcumin: a review of its' effects on human health*. *Foods*, 2017. **6**(10): p. 92.
124. Basniwal, R.K., et al., *Curcumin nanoparticles: preparation, characterization, and antimicrobial study*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2011. **59**(5): p. 2056-2061.
125. Walker-Daniels, J., *Live cell imaging methods review*. *Mater Methods*, 2012. **2**: p. 124.
126. Martin, R.M., H. Leonhardt, and M.C. Cardoso, *DNA labeling in living cells*. *Cytometry Part A: the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 2005. **67**(1): p. 45-52.
127. Tokiwa, Y. and B.P. Calabia, *Degradation of microbial polyesters*. *Biotechnology Letters*, 2004. **26**(15): p. 1181-1189.

128. Jendrossek, D., A. Schirmer, and H.G. Schlegel, *Biodegradation polyhydroxyalkanoic acids*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996. **46**(5-6): p. 451-463.
129. Kikkawa, Y., et al., *Dynamic adsorption behavior of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase onto polyester surface investigated by QCM and AFM*. Biomacromolecules, 2005. **6**(4): p. 2084-2090.
130. Brandl, H., et al., *Plastics from bacteria and for bacteria: poly(beta-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters*. Advances in biochemical engineering/biotechnology, 1990. **41**: p. 77-93.
131. Timmins, M.R., R.W. Lenz, and R.C. Fuller, *Heterogeneous kinetics of the enzymatic degradation of poly(beta-hydroxyalkanoates)*. Polymer, 1997. **38**(3): p. 551-562.
132. Kasuya, K., et al., *Kinetics of Surface Hydrolysis of Poly(R)3-Hydroxybutyrate Film by PHB Depolymerase from Alcaligenes-Faecalis T1*. Polymer Degradation and Stability, 1995. **48**(1): p. 167-174.
133. Panayotidou, E., et al., *Nanocomposites of poly(3-hydroxybutyrate)/organomodified montmorillonite: Effect of the nanofiller on the polymer's biodegradation*. Journal of Applied Polymer Science, 2015. **132**(11).
134. Shah, A.A., et al., *Microbial degradation of aliphatic and aliphatic-aromatic co-polyesters*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. **98**(8): p. 3437-3447.
135. Tokiwa, Y. and A. Jarerat, *Microbial degradation of aliphatic polyesters*. Macromolecular Symposia, 2003. **201**: p. 283-289.
136. Pérez-Arauz, A.O., et al., *Production and characterization of biodegradable films of a novel polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesized from peanut oil*. Food Packaging and Shelf Life, 2019. **20**: p. 100297.

Curriculum Vitae

Arturo Elías Aguilar Rabiela nació en Ciudad de México, México. Recibió el grado de Ingeniería Biónica Gen 2007, de la Unidad Profesional Interdisciplinaria en Ingeniería y Tecnologías Avanzadas (UPIITA) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) en la Ciudad de México, México. Posteriormente comenzó su doctorado en el Tecnológico de Monterrey en el programa de Ciencias e Ingeniería, en el cual fue desarrollado este trabajo de tesis. Durante el doctorado se realizaron dos publicaciones en *Journals Q1*, una como co-autor y otra como primer autor [101, 136]. Durante la realización del doctorado participo en dos estancias internacionales, la primera en el *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) completando el Taller de Nanofabricación impartido por el *Microsystems Technology Laboratory* (MTL) en abril de 2018. Posteriormente completando una estancia de investigación de seis meses a partir de mayo de 2019 en el Departamento de Biomateriales (*WW7*) de la *Friedrich-Alexander Universität* (FAU) en Erlangen, Alemania.

Como experiencia laboral en la industria, trabajo para algunas empresas internacionales en el área de diagnóstico clínico, como *Roche Diagnostics* México y *Winer Lab* México entre los años 2010 a 2014. También ha colaborado en el área docente, como docente de asignatura en instituciones tanto publicas como privadas de educación Superior y Media superior en línea, como la Universidad Abierta y a Distancia de Mexico (UNAD), Scala Higer Education (UTEL) y Prepa en Línea SEP, desde 2015. Finalmente ha participado como docente de asignatura en distintas intituciones de educación superior y media superior como Grupo Universitario Modelo y Nueva Escuela Tecnológica NET desde 2007 y más recientemente en el Tecnológico de Monterrey en el Departamento de Ciencias de la Escuela Nacional Preparatoria desde 2017.

CVs disponibles *online*:

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8253-7463>

ResearchGate: https://www.researchgate.net/profile/Arturo_Aguilar_Rabiela2

LinkedIn: www.linkedin.com/in/phd-arturo-e-aguilar

