

# Implementación de la técnica de doble emulsión para la microencapsulación polimérica de moléculas iónicas

Erika González<sup>1,3</sup>, Azucena González<sup>2</sup>, Rocío Castro<sup>4</sup>, Hugo Luna<sup>3</sup>, Abelardo Chávez<sup>1</sup>  
Depto de Química<sup>1</sup>, Lab. de Ciencias Genómicas<sup>2</sup>, Instituto de Biotecnología<sup>3</sup>, Depto de Química Analítica<sup>4</sup>  
Facultad de Ciencias Biológicas<sup>1,2,3</sup>, Facultad de Medicina<sup>4</sup>,  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
San Nicolás de los Garza, N. L., México  
[akire\_goa, abelardoehm]@yahoo.com.mx

**Abstract**— The purpose of this research was preparing Eudragit® S100 microspheres by a modified double emulsion- evaporation of solvent method. First, we studied the effect over particle size parameters and we found that a significant effect of polymer concentration (2.5-10.0 mg/ml), and organic / external aqueous phase ratio (0.24-0.88) on the particles, producing sizes of 180-670 nm and 190-930 nm respectively. Then, we able to encapsulate methylene blue, with 97 % efficiency, but not red No 3. In order to improve this result, we found that the addition of Tween-80 to the internal aqueous phase, addition of Lecitin to the organic phase and, polyvinyl alcohol and MgCl<sub>2</sub> (70 % w/w) to the external aqueous phase, yielded an encapsulation efficiency of 72 % for red no.3 dye. The data showed indicates that the designed formulations are able to serve as an oral carrier for ionic drugs

**Keyword**— *microspheres, methylene blue, red No 3, Lecitin, ionic drugs*

**Resumen**— El objetivo de esta investigación fue el desarrollo de micropartículas a base de Eudragit® S100 por la técnica modificada de doble emulsión evaporación de solvente. Primeramente, Se estudió el efecto de la concentración de polímero (2.5-10.0 mg/ml), y la relación de fase orgánica/ fase acuosa externa (0.24-0.88) sobre el tamaño de partícula. Se encontró un efecto significativo, dando tamaños de 180-670 nm y 190-930 nm, respectivamente. Posteriormente, se logró incorporar el azul de metileno, con un 97 % de eficiencia de encapsulación, sin embargo, el Rojo No 3, no se encapsuló. Finalmente, se adicionó Tween-80 (2 % p/p) a la fase acuosa interna, lecitina (0.05 % p/v) a la fase orgánica y, alcohol polivinílico (4 % p/v) y MgCl<sub>2</sub> (70 % p/p) a la fase acuosa externa, permitiendo la encapsulación del colorante rojo con un 72 % de eficiencia de encapsulación. Se cuenta con formulaciones de nanopartículas con moléculas iónicas incorporadas con un potencial como acarreadores para su administración oral.

**Palabras claves**— *microesferas, azul de metileno, rojo No 3, lecitina, fármacos iónicos.*

## I. INTRODUCCIÓN

En la actualidad, se ha propuesto el uso de acarreadores poliméricos como sistemas de liberación controlada de activos biológicos, los cuales, además de aumentar la eficacia del activo pueden disminuir sus efectos adversos. Entre los sistemas vectoriales más comunes encontramos a los liposomas, las nanopartículas sólidas lipídicas, las microemulsiones y las nano y micro partículas poliméricas. Todos estos sistemas han sido estudiados en el área farmacéutica por su enorme potencial como acarreadores de moléculas con interés terapéutico, lo cual radica, básicamente, en sus características fisicoquímicas: tamaño micrométrico, su amplia área superficial y composición química variable [1,2].

Específicamente, las micropartículas poliméricas (MP) son sistemas sólidos formados de macromoléculas y presentan un tamaño alrededor de una micra. Estructuralmente, las MP pueden ser sistemas matriciales o capsulares en donde el principio activo que transportan se encuentra disperso, disuelto o adsorbido en la partícula. En el área farmacéutica, las MP se han utilizado como acarreadores potenciales para proteger al principio activo de la degradación por agentes de su entorno, biodireccionarlo a su sitio de acción y reducir la toxicidad o efectos secundarios que pudiera causar el mismo activo administrado en su forma libre [3,4].

El desarrollo de formulaciones de MP depende fundamentalmente del tipo de material polimérico elaborado, así como la caracterización de sus propiedades. Ya que debido a su naturaleza coloidal las dificultades técnicas se encuentran en las características físico-químicas de las partículas que incluye la evaluación de su morfología, la distribución de tamaño de partícula, la distribución de masa molar del polímero, la determinación de potencial zeta y el rango de pH, la determinación del porcentaje y eficiencia de encapsulación, cinética de liberación, entre otras. La información obtenida por la caracterización de MP puede conducir a la optimización de una formulación para obtener el tamaño de partícula y una eficiencia de encapsulación aceptable y adecuada para la aplicación que se le dará [5]. La importancia de encapsular agentes bioactivos, data de conferir protección ante la acción de enzimas y cambios de pH; así como el de aumentar el biodireccionamiento del bioactivo a su sitio de acción con respecto a la forma convencional de administración. Para tener una buena liberación del agente bioactivo encapsulado en las MP en su sitio de acción y en el tiempo adecuado, se deben de considerar cuatro factores: i) la matriz polimérica de la partícula, ii) el método de elaboración de la formulación, iii) la forma de liberación, y iv) la vía de administración [6].

Considerando la forma para la obtención de la formulación, diversos métodos han sido utilizados para preparar MP, tanto con polímeros naturales como con polímeros sintéticos. Algunos de las técnicas empleadas para preparar partículas poliméricas incluyen a emulsión simple y doble por evaporación o difusión de solvente, nanoprecipitación y spray drying [7,8]. Específicamente para principios hidrofílicos, la doble emulsión evaporación de solvente, proceso propuesto por Ogawa et al [9], representa un método fácil y reproducible que provee uniformidad en el tamaño de partícula. Esta técnica ha sido enormemente utilizada para obtener micro y nanopartículas a base de polímeros preformados [10-15], la cual consiste de cuatro pasos principalmente: i) emulsificación primaria: una solución acuosa del agente activo es emulsionada dentro de una solución orgánica que contiene el polímero; ii) re-emulsificación. La primera emulsión ( $W_1/O$ ) es también emulsionada dentro de una segunda fase acuosa conteniendo un tensoactivo para obtener la doble emulsión ( $W_1/O/W_2$ ); iii) purificación de la formulación: el solvente orgánico es removido por evaporación o extracción induciendo la solidificación de las partículas; y iv) separación y purificación de las MP: las partículas poliméricas son colectadas por centrifugación o filtración para finalmente secarlas [16].

La técnica doble emulsión/evaporación de solvente es utilizada para la encapsulación de agentes bioactivos hidrosolubles como moléculas iónicas, proteínas (i.e. insulina), péptidos, antígenos virales y bacterianos dentro de partículas poliméricas [13-15]. Sin embargo, es un proceso complejo para la incorporación de moléculas hidrofílicas pequeñas, en el cual muchos parámetros experimentales definen las características de las partículas poliméricas obtenidas. Dos de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la encapsulación de moléculas hidrofílicas son: la eficiencia del proceso de encapsulación y el contenido de activo en las partículas. La eficiencia de encapsulación mide la cantidad de agente bioactivo hidrofílico encapsulado en la matriz polimérica con respecto a la cantidad inicial. Por tanto, es un indicador de las pérdidas de bioactivos durante el proceso y es muy importante diseñar procesos de encapsulación en los cuales se pierda el mínimo de bioactivo hidrofílico [16].

El contenido de activo es la proporción de bioactivo hidrofílico respecto a la masa total de partículas poliméricas. Esta característica de las partículas es muy importante puesto que, teniendo en cuenta la dosis que se desea administrar, define la cantidad de MP que debe contener una dosis de la formulación en la cual se encuentran incluidas. Por tanto, la eficiencia de encapsulación y la carga dependen de las condiciones experimentales utilizadas para formar las partículas poliméricas. El volumen y la concentración del bioactivo hidrofílico en la fase acuosa interna, la concentración de polímero en la fase orgánica, el tipo de polímero, los tiempos y velocidades de emulsificación, así como la presencia de tensoactivos en las diferentes fases son los factores que más inciden en el valor de estos parámetros [17,18].

Por otro lado, existen parámetros dentro la técnica de doble emulsión/ evaporación de solvente que inciden sobre el tamaño de partícula. La concentración de tensoactivo en la fase acuosa externa, la velocidad y tiempos de agitación y homogenización, la relación de fase orgánica y fase acuosa externa, son los principales parámetros que muestran un efecto significativo sobre el tamaño. La reducción del tamaño de partícula a escala submicrométrica o micrométrica permite un incremento en el área superficial de las partículas y con ello un aumento de la biodisponibilidad del activo ya que permite una mayor interacción con el sitio diana [18].

En este contexto, el objetivo de esta investigación fue optimizar el desarrollo de una formulación particulada a base de Eudragit<sup>®</sup> S100 con tamaños submicrométricos y micrométricos y con una eficiencia de encapsulación mayor al 50 %; siendo una formulación con un potencial de acarreador de moléculas hidrofílicas (proteínas, péptidos, aminoácidos, etc.). Como moléculas iónicas modelo se utilizaron los colorantes: Azul de Metileno (AM) y Rojo No. 3 (R3); catión y anión, respectivamente

## II. METODOLOGÍA

### A. Preparación de micro y nanopartículas poliméricas

Para la preparación de las formulaciones de MP se siguió la técnica modificada de doble emulsión ( $W_1/O/W_2$ ) evaporación de solvente. Brevemente, 1 mL de una solución acuosa con el activo ( $W_1$ ) se adicionó a 8 mL de fase orgánica (O), que consistió de 20 mg de Eudragit<sup>®</sup> S100 en un sistema de solventes de diclorometano: etanol: isopropanol en una relación de 5:6:4 mL, y se sometió a homogenización (ultraturrax VWR VD112). Posteriormente, la primera emulsión ( $W_1/O$ ) se adicionó a 12.5 mL de fase acuosa externa ( $W_2$ ) que contenía 6.5 mL de la mezcla de solventes en una relación de 1.58:0.26:0.61 mL (etanol: isopropanol: diclorometano) y 6 mL de alcohol polivinílico acuoso (PVA 4 % p/v) para formar la doble emulsión ( $W_1/O/W_2$ ) manteniéndose en agitación (Eurostar power-b Ika<sup>®</sup> Werke). Finalmente, la doble emulsión se sometió a una segunda homogenización, a la cual se evaporó el solvente orgánico a presión reducida (Rotavapor Heidolph) para obtener la formulación de partículas poliméricas purificadas.

Inicialmente, se estudió el efecto de la relación de fase orgánica: acuosa externa (0.24 a 0.88) y la concentración de polímero (2.5 a 10 mg/ mL), sobre el tamaño de partícula. Con la finalidad de preparar formulaciones de partículas poliméricas con tamaños mayores a 900 nm.

Una vez establecidos las condiciones para la obtención de los tamaños deseados, se procedió a la preparación de formulaciones con moléculas iónicas modelo incorporadas (AM y R3, catión y anión respectivamente).

### B. Determinación del porcentaje y eficiencia de encapsulación

A partir de la formulación purificada, se determinó el diámetro de partícula mediante espectroscopía de correlación fotónica (Zetasizer Nanoseries; Malvern, Nano-Zs90).

#### •Cuantificación de azul de metileno incorporado en partículas poliméricas

La cuantificación del colorante incorporado en las MP se realizó por el método directo en el cual brevemente, se realizó la extracción de AM para lo que se tomaron 10 mL de la formulación de partículas purificada y se sometieron a centrifugación (25 000 rpm/ 4 °C/ 1 h) para obtener la pastilla de partículas con AM incorporado, la cual se congeló, liofilizó, pesó y finalmente, se solubilizó en metanol:agua (1:0.01) para desadsorber y extraer el colorante incorporado y de esta manera cuantificar por medio de espectrofotetría visible a una longitud de onda de 664 nm. Para lo que, inicialmente se determinó la longitud de onda de máxima absorción del AM en un sistema de metanol:agua (1:0.01) y se elaboró una curva de calibración en un rango de concentraciones de 0.4-2.4 µg/mL.

•Cuantificación de rojo No. 3 incorporado en partículas poliméricas

Para el caso de R3, se realizó el mismo proceso que con el AM para la obtención de las partículas por medio de centrifugación y liofilización de la pastilla. Posteriormente, para la extracción del R3 se solubilizó la pastilla con la adición de NaOH 0.1 M y a continuación se le adicionó HCl 0.1 M para inducir la precipitación del polímero (pH de 2.4), y se centrifugó a 3 000 rpm/ 5 min. El sobrenadante se leyó espectrofotométricamente a una longitud de onda de 517 nm. Para lo cual, inicialmente se preparó un sistema en agua acidificada (pH= 2.4) para obtener la longitud de onda de máxima absorción y se elaboró una curva de calibración en un rango de concentraciones de 5-18 µg/mL.

•Eficiencia y porcentaje de encapsulación

Se determinó el porcentaje (1) y eficiencia de encapsulación (2) de ambos colorantes a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Encapsulación} = (\text{Pastilla liofilizada en mg} / \text{Activo incorporado en mg}) \times 100 \quad (1)$$

$$\% \text{ Eficiencia de Encapsulación} = (\text{Activo encapsulado en mg} / \text{Activo teórico en mg}) \times 100 \quad (2)$$

C. Morfología

Finalmente, se observó la morfología y distribución de tamaño de una formulación de partículas por medio de micrografía electrónica de barrido (MEB).

III. RESULTADOS

Primeramente, considerando las condiciones iniciales, se estudió el efecto sobre el tamaño de partícula de la concentración de polímero (2.5-10.0 mg/mL) teniendo una relación de fases O/ W<sub>2</sub> constante (0.64). Se encontró que al aumentar la concentración de polímero aumenta el tamaño de partícula (190- 900 nm). En la Figura 1 se puede observar que a una concentración de polímero de 2.5 mg/mL se tiene un tamaño de partícula promedio de 200 nm y que al aumentar a una concentración de 10 mg/mL se observó un aumento en el tamaño de alrededor de 900 nm, esto puede ser explicado considerando que la concentración de polímero influye sobre la viscosidad de la fase orgánica; esto es, que al aumentar la concentración hay aumento en la resistencia para la transferencia de masa dando a su vez un mayor número de cadenas poliméricas por glóbulo y con ello un aumento en el tamaño de partícula [13, 15, 17].

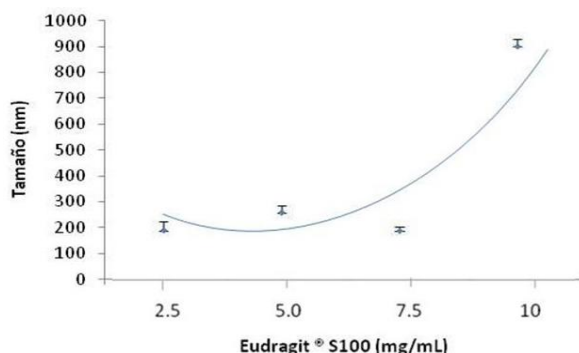


Fig. 1. Efecto de la concentración de polímero sobre el tamaño de las MP (media±s; n=3)

Posteriormente, se modificó la relación de fases O/ W<sub>2</sub> (0.24-0.88) manteniendo una masa de polímero de 20 mg y se encontró que al disminuir la relación de fases, el tamaño de partícula aumenta. En la Figura 2 se observa que al usar una relación de fases O:W<sub>2</sub> de 0.88 se obtiene un tamaño de partícula alrededor de 200 nm y al disminuir la relación a 0.24 hay partículas con tamaños alrededor de 700 nm.

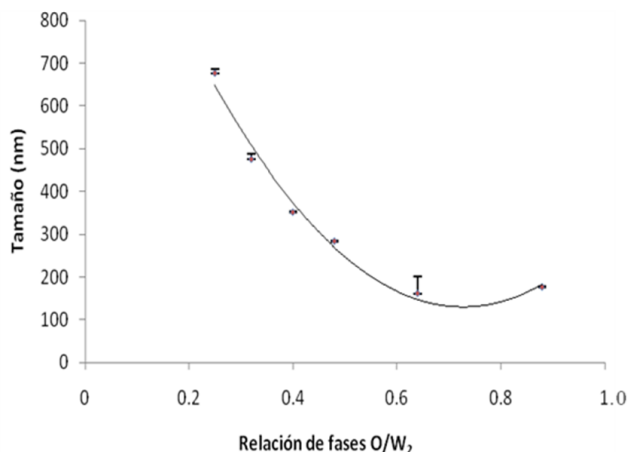


Fig. 2. Efecto de la relación de fases O/W<sub>2</sub> sobre el tamaño de partícula. (media±s; n=3)

Se realizó la incorporación de las moléculas iónicas modelo (AM y R3) en las partículas poliméricas, por la técnica de doble emulsión/evaporación de solvente, en la que W<sub>1</sub> correspondió a 20 y 150 µg/mL de AM y R3, respectivamente. Particularmente para la encapsulación de R3, se procedió a realizar la modificación de algunos parámetros de la técnica de doble emulsión/evaporación de solvente que inciden sobre la encapsulación del activo, para ello se adicionó Tween 80 al 2 % p/p a W<sub>1</sub>, lecitina 0.5 % p/v a O y PVA acuoso (4 % p/v) saturado con MgCl<sub>2</sub> (70 % p/p) a W<sub>2</sub>, permitiendo así, la encapsulación del colorante aniónico en las MP.

Después de la incorporación de cada uno de los colorantes se determinó la distribución de tamaño de partícula por espectroscopía de correlación fotónica y se obtuvo una formulación de MP de Eudragit® S100 con poblaciones de partículas con un tamaño alrededor de 600 nm (dato no mostrado) y mayores a 1 µm para el caso de la formulación con AM y una sola población de partículas con tamaño de alrededor de 1 µm para la formulación con R3 incorporado (Fig. 3).

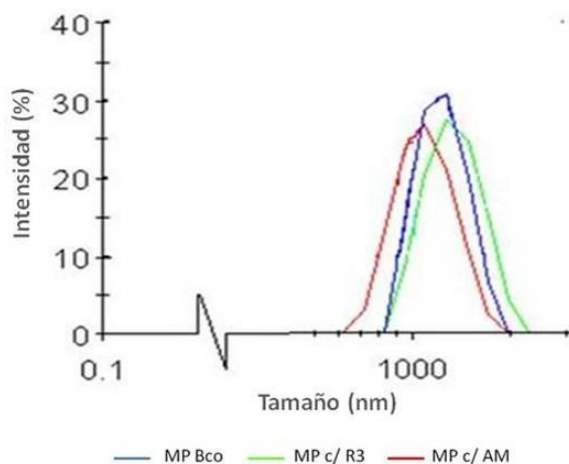


Fig. 3. Distribución de tamaño de partícula de una formulación sin activo, con AM y con Rojo No. 3 incorporado (n=3)

Para la cuantificación por espectrofotometría visible de AM incorporado en las MP, se obtuvo una curva de calibración del colorante en metanol:agua (1:0.01) a una longitud de onda máxima de 654 nm, se consideró la ecuación 3, la cual presentó un coeficiente de correlación de  $r^2 = 0.9996$ . Se obtuvo una eficiencia de encapsulación del AM del  $97 \pm 1.3\%$  y un porcentaje de encapsulación alrededor del  $0.1\% \pm 0.7$ .

$$Abs_{AM} = 0.3224 [AM] - 0.0058 \quad (3)$$

Por otro lado, para determinar el porcentaje y eficiencia de encapsulación del R3 y dado que el polímero en solución metanólica interfería en la cuantificación del colorante incorporado en las MP, se implementó un método de solubilización-precipitación del polímero para eliminarlo de la solución. Para ello se consideró que el Eudragit® S100 es sensible a cambios de pH, específicamente es soluble en medio alcalino e insoluble en medio ácido. Se obtuvo la ecuación lineal 4 a una longitud de onda máxima de 517 nm y con una correlación lineal aceptable igual a 0.9993 en un sistema ácido (pH= 2.41) que permitió calcular un  $72 \pm 0.6\%$  de eficiencia de encapsulación y un porcentaje de encapsulación alrededor del  $0.11 \pm 0.5\%$ .

$$Abs_{R3} = 0.0476 [R3] + 0.0097 \quad (4)$$

Se obtuvieron partículas poliméricas a base de Eudragit® S100 por la técnica modificada de doble emulsión/ evaporación de solvente con tamaños alrededor de 600 nm y con una morfología esférica, lo cual se observó mediante microscopía electrónica de barrido (Fig. 4).

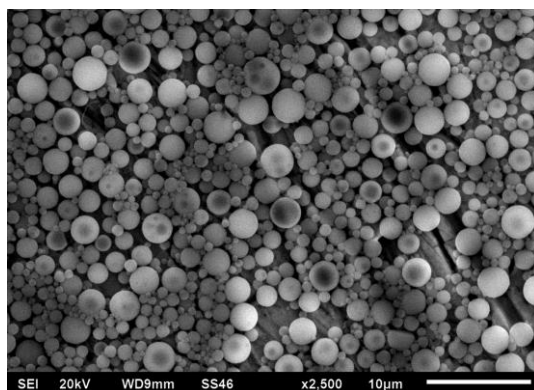


Fig. 4. Micrografía electrónica de barrido de una formulación de partículas poliméricas a base de Eudragit® S100

#### IV. DISCUSIÓN

Dentro de los métodos disponibles para la preparación de MP a partir de polímeros preformados, la emulsificación múltiple ( $W_1/O/W_2$ ) es el principal método para la encapsulación de compuestos hidrofílicos. Este proceso se basa en la emulsificación de una solución acuosa del activo en una solución orgánica del polímero. Esta primera emulsión (W/O) es dispersada en una fase acuosa externa, formando la doble emulsión ( $W_1/O/W_2$ ). Finalmente, el solvente orgánico es removido, permitiendo la formación de partículas sólidas. Para optimizar la técnica de emulsión múltiple  $W_1/O/W_2$  se ha llevado a cabo la variación de parámetros involucrados en la técnica de preparación de MP que inciden sobre sus propiedades fisicoquímicas, el tamaño y el % eficiencia de encapsulación, tales como la concentración de polímero, proporción de solventes, concentración de tensoactivo y sales en  $W_2$ .

El comportamiento que se observó en la figura 2 del presente trabajo, puede ser explicado considerando el número de cadenas por unidad de volumen de solvente, esto es que cuando O entra en contacto con  $W_2$  se induce la formación de glóbulos y de esta manera se da la distribución de las cadenas de polímero por unidad de volumen; lo que indica que dependiendo del tamaño y número de glóbulos formados es la distribución del número de cadenas poliméricas. Lo anterior quiere decir que al disminuir la cantidad de volumen (relación de fases) hay la formación de menos glóbulos y con más cadenas poliméricas por glóbulo, lo que ocasiona un aumento en el tamaño de partícula [19].

Considerando las figuras 1 y 2 de la sección de resultados, se tomaron como referencia los puntos máximos en los que se obtuvieron partículas con tamaños mayores a 600 nm, utilizando tanto la relación de fases O: $W_2$  de 0.24 como una concentración de polímero de 27 mg/mL, para la obtención de una formulación con tamaños micrométricos y realizar la incorporación de las moléculas iónicas modelo. Sin embargo, la incorporación del R3 no fue posible con las mismas condiciones de formulación utilizadas para incorporar al AM, debido a que tanto el polímero (Eudragit<sup>®</sup> S100) como el colorante (R3) son moléculas aniónicas y muestran una repulsión electrostática impidiendo la incorporación del colorante en las partículas poliméricas, lo anterior debido a que se obtuvo un porcentaje de eficiencia de encapsulación para R3 menor al 34.5 % (dato no mostrado). Por lo anterior, se modificaron diferentes parámetros de la técnica doble emulsión evaporación de solvente, siendo la concentración de tensoactivos y de sales los principales que incidieron sobre la encapsulación del R3 sin modificar el tamaño de partícula, permitiendo una eficiencia de encapsulación del  $72 \pm 0.6$  %. El aumento en la eficiencia de encapsulación del colorante R3 se debió principalmente a la influencia del surfactante (Tween 80 en  $W_1$  y Lecitina en O) sobre la estabilidad de la primera emulsión ( $W_1/O$ ) ya que evitó la difusión de  $W_1$  hacia  $W_2$ ; lo que además estuvo favorecido por la saturación con sales ( $MgCl_2$  70 % p/p) de la  $W_2$  [20-22]. Es importante resaltar que se observó dos poblaciones de partículas con diferentes tamaños (datos no mostrados), en las que la formación de las partículas más pequeñas (alrededor de 600 nm) está dada principalmente por la presencia de solventes parcialmente miscibles en agua (etanol e isopropanol) los cuales difunden libremente en la  $W_2$  induciendo la precipitación y solidificación del polímero ocasionando una disminución en el tamaño de partícula; mientras que el diclorometano no difunde hacia  $W_2$  y mantiene cada glóbulo permitiendo la formación de partículas de mayor tamaño [21].

Lo anterior se sustenta, al observar lo obtenido en la formulación con R3 incorporado, en la que sólo se obtiene una población de partículas con un tamaño alrededor de 1  $\mu m$  debido a que  $W_2$  se encontraba saturada con sales ( $MgCl_2$ ) disminuyendo la difusión de los solventes, de la fase orgánica, parcialmente miscibles en agua hacia  $W_2$  y de esta manera evitó la formación de partículas de menor tamaño [22, 23].

Finalmente, se puede mencionar que se obtuvieron partículas poliméricas a base de Eudragit<sup>®</sup> S100 por la técnica modificada de doble emulsión/ evaporación de solvente con tamaños alrededor de 600 nm y con una morfología esférica con la capacidad de encapsular compuestos iónicos de manera eficiente.

#### IV CONCLUSIÓN

Se logró optimizar una formulación de partículas poliméricas a base de Eudragit<sup>®</sup> S100, y se encontró que la relación de fases O: $W_2$  y la concentración de polímero inciden significativamente sobre el tamaño de partícula. Además, se obtuvieron formulaciones de partículas poliméricas con tamaños submicrométricos y micrométricos cargadas con moléculas iónicas modelos con más del 50 % de eficiencia de encapsulación y que podrían actuar como un potencial de acarreadores de activos hidrofílicos.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores deseamos expresar agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología para el apoyo recibido para este trabajo a través del proyecto CONACYT No CB176853 y EGA agradece también por la beca # 33764.

## REFERENCIAS

- [1] Siepmann J., (2006) Microparticles used as drug delivery systems. *Pro. Colloib. Pol. Sci.* 133:15
- [2] Zhiping Zhang, Sie Huey Lee, Chee Wee Gan, Si-Shen Feng. (2008), In vitro and in vivo investigation on PLA-TPGS nanoparticles for controlled and sustained small molecule chemotherapy, *Pharm. Res.* 25(8): 1925-1935.
- [3] Sharma M., Sharma V., Panda AK., Majumdar DK., (2011), Development of enteric submicron particle formulation of papain for oral delivery. *Yakugaku Zasshi.* 131(5):697-709.
- [4] Ogawa, Y.; Yamamoto, M.; Okada, H.; Yashiki, T.; Shimamoto, (1987),T. A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid. *Chem.Pharm.Bull.* 36: (3) 1095-1103.
- [5] Virto, M. R.; Elorza, B.; Torrado, S.; Elorza M. L.; Frutos, G.; (2007), Improvement of gentamicin poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres for treatment of osteomyelitis induced by orthopedic procedures. *Biomaterials*, 28, 877.
- [6] Chognot, D.; Léonard, M.; Six, J. L.; Dellacherie, E.; (2006), Surfactive water-soluble copolymers for the preparation of controlled surface nanoparticles by double emulsion/solvent evaporation *Colloids Surf., B*, 51, 86.
- [7] González Alvarez E., Castro Ríos R., Luna Olvera HA., González Horta A., Galindo Rodríguez SA., Chávez Montes A., (2013), Polymeric microparticles containing protein prepared using a controllable combination of diffusion and emulsification steps as part of the salting-out procedure. *AJPP* 7(43):2849-2858.
- [8] Sartori S., Caporale A., Rechichi A., Cufani D., Cristallini C., Barbori N., Giusti P., Ciardelli G. (2013), Biodegradable paclitaxel-loaded microparticles prepared from novel block copolymers: influence of polymer composition on drug encapsulation and release. *J. Pept. Sci.* 19(4): 205-213.
- [9] Rosca, I. D.; Watari, F.; Uo, M.; (2004). Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation, *J. Control. Release*, 99, 271.
- [10] Bömer M., Mol A., Balguid A., (2007), Delivery of bioactive agents to tissue-engineered constructs using polymeric microparticles
- [11] Meng, F. T.; Ma, G. H.; Qiu, W.; Su, Z. G. (2003), W/O/W double emulsion technique using ethyl acetate as organic solvent: effects of its diffusion rate on the characteristics of microparticles *J. Control. Release* 91, 407.
- [12] Licciardi M., Di Stefano M., Craparo EF., Amato G., Fontana G., Cavallaro G., Giammona G., (2012), PHEA-graft-polybutylmethacrylate copolymer microparticles for delivery of hydrophobic drugs. *Int J Pharm.* 433 (1-2):16-24..
- [13] Galindo R. S., Allémann E., Fessi H., Doelker E., (2004). Physicochemical parameters associated with nanoparticle formation in the salting-out, emulsification-diffusion, and nanoprecipitation methods. *Pharm. Res.* 21 (8) 1428-1439.
- [14] Sohler, J.; Dijkhuizen-Radersma, R.; Groot, K.; Bezemer, (2003), Release of small water-soluble drugs from multiblock copolymer microspheres: a feasibility study *J.M.; Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 55, 221.
- [15] Deepti J, Amulya K. Panda, and Dipak K. Majumdar. (2005), Eudragit S100 Entrapped Insulin Microspheres for Oral Delivery. *APPS PharmSciTech.* 6 (1):100-107.



- [16] Al Maaieh A., Flanagan D.R. (2001). Salt and cosolvent effects on ionic drug loading into microspheres using an O/W method. *J. Control. Rel.*, 70:169-181.
- [17] Sohier J., van Dijkhuizen-Radersma, de Groot K., Bezemer J.M., (2003), Release of small water-soluble drugs from multiblock copolymer microspheres: a feasibility study. *J. Pharm. and Biopharm.* 55: 221-228.
- [18] Harikarnpakdee S., Lipipum V., Sutanthavibul N., Ritthidej G., (2005), Spray dried mucoadhesive microspheres: preparation and transport through nasal cell monolayer. *Pharm Sci.* 7 (1):E1-E10.