

## OPTIMIZACIÓN DE LA ENCAPSULACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO EN MICROESFERAS DE POLI(LACTIDA-CO-GLICOLIDA) MEDIANTE UN DISEÑO FACTORIAL $3^2$

*Vivian Saez<sup>1</sup>, Raymersy Aldana<sup>1</sup>, José A. Ramón<sup>2</sup>, Rolando Páez<sup>1</sup>, Carlos Peniche<sup>2</sup>*

1) Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacan, Playa. AP 6162, CP 10 600, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [vivian.saez@cigb.edu.cu](mailto:vivian.saez@cigb.edu.cu)

2) Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana, Ave. Universidad e/ Ronda y G, Vedado, AP 6130 CP 10600, La Habana, Cuba. Correo electrónico: [peniche@reduniv.edu.cu](mailto:peniche@reduniv.edu.cu)

*Recibido: Febrero 2008; Aceptado: Junio 2008*

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue obtener microesferas poliméricas cargadas con Factor de crecimiento epidérmico (FCE) y evaluar el efecto de la concentración de FCE y del volumen de la fase acuosa interna en las características de las microesferas mediante la determinación de las ecuaciones matemáticas que relacionan los parámetros experimentales con las características de las partículas. Las microesferas con FCE fueron obtenidas por la técnica de doble emulsión – evaporación del disolvente. Se utilizó un diseño factorial del tipo  $3^2$  para estudiar el efecto de la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna en la carga de las microesferas y en la eficiencia de encapsulación. Se obtuvieron partículas esféricas con poros en la superficie y un tamaño promedio entre 16 y 22  $\mu\text{m}$ . Al aumentar la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna se produjo un aumento en la carga de las micropartículas mientras que la eficiencia de encapsulación disminuyó. Las relaciones matemáticas encontradas entre las variables respuestas y los parámetros experimentales ofrecen una guía para determinar qué valores de estos parámetros seleccionar atendiendo a las características deseadas para cada muestra particular de microesferas.

**Palabras claves:** microesferas poliméricas, liberación controlada de proteínas, factor de crecimiento epidérmico, poli(lactida-co-glicolida).

### ABSTRACT

This work was aimed to obtain polymeric microspheres containing epidermal growth factor (EGF) and to evaluate the effect of the EGF concentration and the volume of the inner aqueous phase on the microspheres characteristics. The latter was achieved by obtaining the mathematical equations relating the experimental parameters and the properties of the particles. The EGF-loaded microspheres were prepared by the double emulsion–solvent evaporation method. A  $3^2$  factorial design was employed to study the effect of the EGF concentration and the volume of the inner aqueous phase on the protein load of the microspheres and the encapsulation efficiency. Spherical particles with porous surface and a mean diameter between 16 and 22  $\mu\text{m}$  were obtained. When the EGF concentration and the volume of the inner aqueous phase were increased, an increase in protein load was observed, while the encapsulation efficiency decreased. The mathematical equations relating the response variables with the experimental parameters offer useful guidelines to choose the proper values for these parameters depending on the desired characteristics for each particular batch of microspheres.

**Keywords:** polymeric microspheres, controlled release of proteins, epidermal growth factor, poli(lactide-co-glicolide).

## 1. INTRODUCCIÓN

Por sus importantes funciones en el organismo, las proteínas han sido estudiadas como posibles agentes terapéuticos desde hace varias décadas. Sin embargo, no fue hasta el surgimiento de la era biotecnológica que las investigaciones cobraron auge debido al desarrollo de procesos de producción eficientes de estas biomoléculas, los cuales han permitido disponer de cantidades suficientes para el desarrollo de productos biofarmacéuticos.

Actualmente existen varias proteínas que se utilizan como principio activo de diversas formas farmacéuticas, las cuales se encuentran disponibles en el mercado internacional, entre ellas podemos citar las siguientes: Eritropoyetina; Interferón alfa-2b, alfa-2a y beta; Insulina; Estreptoquinasa; Factor estimulador de colonias de granulocitos; Hormona de crecimiento humana, Interleucina; Factor de crecimiento derivado de plaquetas y Factor de crecimiento epidérmico (FCE). El FCE es un polipéptido de 53 aminoácidos que estimula la proliferación y diferenciación de las células epiteliales [1], por lo que se ha estudiado como posible agente terapéutico en el tratamiento de heridas de diferente naturaleza [2, 3], la reparación del daño en la mucosa gastrointestinal [4, 5] y de otros sistemas [6, 7]. De hecho, se ha empleado desde hace varios años como principio activo de una crema cicatrizante [2, 8] y más recientemente como agente activo de una formulación parenteral con efectividad demostrada en la prevención de la amputación de miembros inferiores de pacientes diabéticos [3, 9]. El tratamiento que se aplica a los pacientes diabéticos tiene el inconveniente de ser traumático ya que la administración de inyecciones en la lesión es muy dolorosa. En cada tratamiento deben aplicarse varias inyecciones y el paciente debe recibir el tratamiento en días alternos durante un período de 5 a 8 semanas. Teniendo en cuenta los inconvenientes de este método, el empleo de una formulación que libere de forma sostenida el FCE pudiera reducir la frecuencia de administración del fármaco lo cual beneficiaría considerablemente al paciente. Ritter y col. trataron estas lesiones mediante la aplicación tópica de formulaciones basadas en microesferas no biodegradables [10], pero esta vía tiene la limitación de ofrecer poco control de la dosis que se alcanza en el sitio de acción. Ello se debe a que existen diversos factores que pueden interferir en la absorción, entre los que se encuentran: la presencia de tejido necrótico y exudado local, compromiso del flujo sanguíneo y presencia de enzimas que degradan el FCE.

Teniendo en cuenta estos aspectos, una formulación con el FCE encapsulado en microesferas biodegradables, pudiera ofrecer ventajas con respecto a la formulación de liberación inmediata existente, especialmente en la reducción de la frecuencia de

administración del FCE con lo que se lograría mayor aceptación del medicamento por parte del paciente [11-14].

La técnica de doble emulsión – evaporación del disolvente ha sido la más comúnmente empleada para obtener microesferas cargadas con proteínas con fines investigativos y para la obtención de los productos que se comercializan actualmente. Sin embargo, es un proceso complejo, en el cual muchos parámetros experimentales definen las características del producto final. Por esta razón resulta imprescindible evaluar el efecto de todos o los principales parámetros experimentales que afectan las propiedades de las partículas en estudio. Además, es de gran utilidad, determinar las relaciones matemáticas entre ellos, de modo que sea posible seleccionar las condiciones de trabajo en función del tipo de partículas que se desea obtener. Dos de los aspectos más importantes a tener en cuenta en la microencapsulación de péptidos y proteínas son: la eficiencia del proceso de encapsulación y la carga de las partículas. La eficiencia de encapsulación mide la cantidad de proteína encapsulada en la matriz polimérica con respecto a la cantidad inicial. Por tanto, es un indicador de las pérdidas de biomoléculas durante el proceso. Dado el alto valor agregado de las proteínas terapéuticas, es muy importante diseñar procesos de microencapsulación en los cuales se pierda el mínimo de proteína, esto significa valores cercanos a 100% para la eficiencia de encapsulación. Por otra parte, la carga es la proporción de proteína respecto a la masa total de microesferas. Esta característica de las partículas es muy importante puesto que, teniendo en cuenta la dosis que se desea administrar, define la cantidad de microesferas que debe contener una dosis de la formulación en la cual se encuentran incluidas. O, desde otro punto de vista, si se desea incluir siempre una misma cantidad de microesferas en una formulación dada, pueden necesitarse microesferas con cargas distintas dependiendo de las diferentes dosis requeridas según cada aplicación clínica particular.

La eficiencia de encapsulación y la carga dependen de las condiciones experimentales utilizadas para formar las microesferas. El volumen y la concentración de la proteína en la fase acuosa interna, la concentración de polímero en la fase orgánica, el tipo de polímero, los tiempos de emulsificación, así como la presencia de aditivos en las diferentes fases son los factores que más inciden en el valor de estos parámetros [15, 16].

El objetivo de este trabajo es obtener microesferas de poli(lactida-co-glicolida) (PLGA, siglas en inglés) cargadas con FCE mediante la técnica de doble emulsión – evaporación del disolvente y evaluar, mediante un diseño experimental factorial completo del tipo  $3^2$ , el efecto de la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna, en las

características de las microesferas obtenidas.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1. Materiales.

El FCE obtenido por la vía recombinante fue suministrado por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, CIGB (*La Habana*, Cuba). El PLGA (Lactel BP-0100, cuyo peso molecular promedio viscoso,  $\overline{M}_V$ , oscilaba entre = 40.000-75.000 g.mol<sup>-1</sup>) y el PVA (*Sigma*, *St. Louis*, Missouri, USA; cuyo peso molecular promedio en peso,  $\overline{M}_W$ , oscilaba entre 30.000 – 70.000 g.mol<sup>-1</sup>). Los otros reactivos utilizados se obtuvieron de la empresa *Merck* (*Darmstadt*, Alemania).

### 2.2. Ensayos.

**2.2.1. Obtención y caracterización (morfología y tamaño) de las microesferas cargadas con FCE.** Las microesferas de poli(lactida-co-glicolida) se prepararon por la técnica de doble emulsión- evaporación del disolvente [17]. De forma breve, 100  $\mu$ L de FCE en solución tamponada con fosfato, pH 7,2, se emulsionaron durante 30 segundos con 1 mL de poli(lactida-co-glicolida) 50:50 al 10% en diclorometano. Para ello se usó un equipo de ultrasonido *IKASONIC U 200 S control* (*IKA Labortechnik*, Alemania). La emulsión se vertió en 40 mL de alcohol polivinílico (PVA) al 1% en agua y se obtuvo la segunda emulsión (w/o/w), mediante agitación durante dos minutos en un homogeneizador de tipo Ultraturrax T8 (*IKA Labortechnik*, Alemania) con una velocidad de agitación de 14.000 rpm. La doble emulsión se vertió en 140 mL de PVA al 1% en agua y se agitó en un homogeneizador de paleta tipo hélice (*IKA Labortechnik*, Alemania) para evaporar el diclorometano. Finalmente, las microesferas se colectaron por filtración, se lavaron cinco veces con agua destilada (20 mL cada vez) y se secaron por congelación-deshidratación en una liofilizadora (*Edwards*, Reino Unido). El diagrama de flujo que representa la obtención de la microesferas se ilustra en la Figura 1.

El análisis morfológico de las partículas se realizó empleando un microscopio electrónico ambiental de barrido, (ESEN, *Philips XL 30*, *Eindhoven*, Holanda) y el tamaño de las partículas fue determinado utilizando un analizador de tamaños de partículas *Coulter LS230* (*Beckman Coulter*, Fullerton, CA).

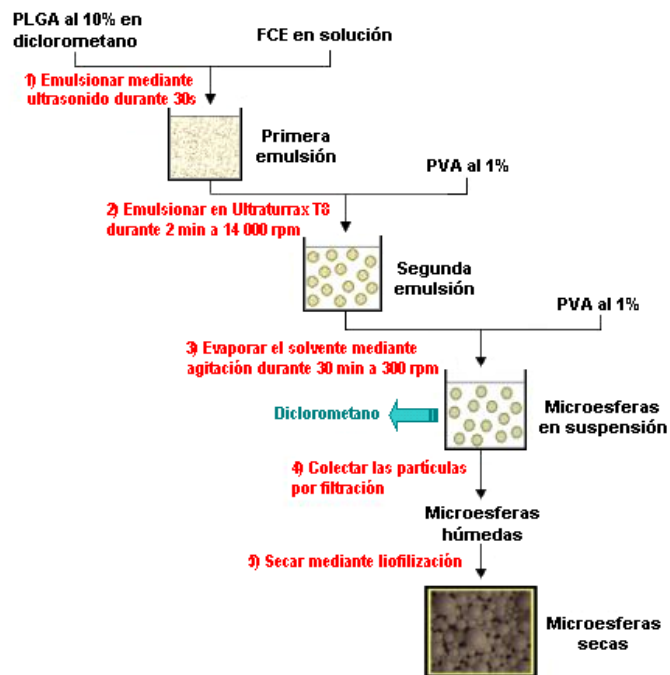


Figura 1. Diagrama del proceso de obtención de las microesferas por la técnica de doble emulsión – evaporación del disolvente.

**2.2.2. Carga y eficiencia de encapsulación.** 10 mg de microesferas se incubaron en 0,5 mL de NaOH 1 N a temperatura ambiente (25°C), durante 16 horas y con agitación moderada. La solución se neutralizó con HCl 1N y la concentración de FCE se determinó por duplicado mediante el método del ácido bicinconínico utilizando el juego de reactivos para la determinación de proteínas microBCA (Pierce, Rockford, IL, EEUU). La eficiencia de encapsulación (EE) se calculó como la proporción de la carga real de las partículas con respecto a la carga teórica ( $Q_t$ ) y se expresó en porcentaje (ecuación 1). La carga experimental ( $Q$ ) fue determinada dividiendo la masa de FCE determinada por la masa de partículas disueltas para realizar el ensayo de microBCA y se expresó en porcentaje (ecuación 2). La carga teórica de FCE ( $Q_t$ ) fue definida como el cociente de la masa de FCE introducida en el proceso entre la masa inicial de polímero utilizada para formar la primera emulsión, también se expresó en porcentaje (ecuación 3). Se ha supuesto que la masa de FCE utilizada para microencapsular es muy pequeña con respecto a la masa de PLGA:

$$EE = 100 \frac{\text{Carga experimental}}{\text{Carga teórica}} = \frac{Q}{Q_t} \quad (1)$$

$$Q = 100 \frac{\text{Masa de interferón en las partículas disueltas}}{\text{Masa de partículas disueltas}} \quad (2)$$

$$Q_t = 100 \frac{\text{Masa inicial de FCE}}{\text{Masa inicial de PLGA}} \quad (3)$$

### 2.2.3. Diseño del estudio para evaluar el efecto de la concentración de proteína y del volumen de la fase acuosa interna en la eficiencia de encapsulación y la carga de las microesferas de FCE (Diseño Factorial Completo 3<sup>2</sup>).

Para obtener las ecuaciones matemáticas que relacionan las variables independientes estudiadas (la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna) con las características de las microesferas se empleó un diseño factorial completo en tres niveles (3<sup>2</sup>). En la Tabla 1 se indican los niveles de estudio de cada variable experimental.

Tabla 1. Niveles de las variables independientes para el diseño factorial completo 3<sup>2</sup>.

| Variable independiente                 | Niveles |     |     |
|--|---------|-----|-----|
|  | 1       | 2   | 3   |
| Concentración de FCE (mg/mL)           | 5       | 10  | 20  |
| Volumen de la fase acuosa interna (μL) | 50      | 100 | 200 |

Las muestras requeridas se prepararon de forma aleatoria mediante la técnica de doble emulsión – evaporación de disolvente descrita anteriormente (véase epígrafe 2.2.1). Los valores de las respuestas estudiadas (eficiencia de encapsulación y carga) fueron hallados como se describió en el epígrafe anterior. El análisis estadístico de los resultados fue realizado mediante el empleo del programa *Statgraphics Plus* versión 5.1 (Statistical Graphics Corp., EEUU).

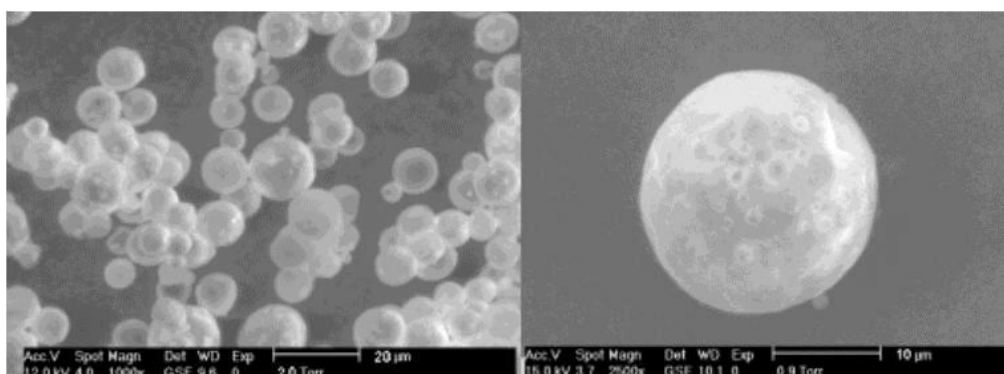


Figura 2. Micrografías de microesferas de PLGA cargadas con FCE, obtenidas por el método de doble emulsión–evaporación del disolvente. Las partículas son esféricas (izquierda) y se observan poros en

la superficie (derecha).

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**3.1. Obtención y caracterización de las microesferas cargadas con FCE.** Las partículas obtenidas muestran una apariencia esférica y exhiben una superficie regular con presencia de poros (véase la Figura 2). No se observan signos de agregación. Los cambios en las condiciones experimentales no produjeron cambios notables en las características morfológicas de las microesferas.

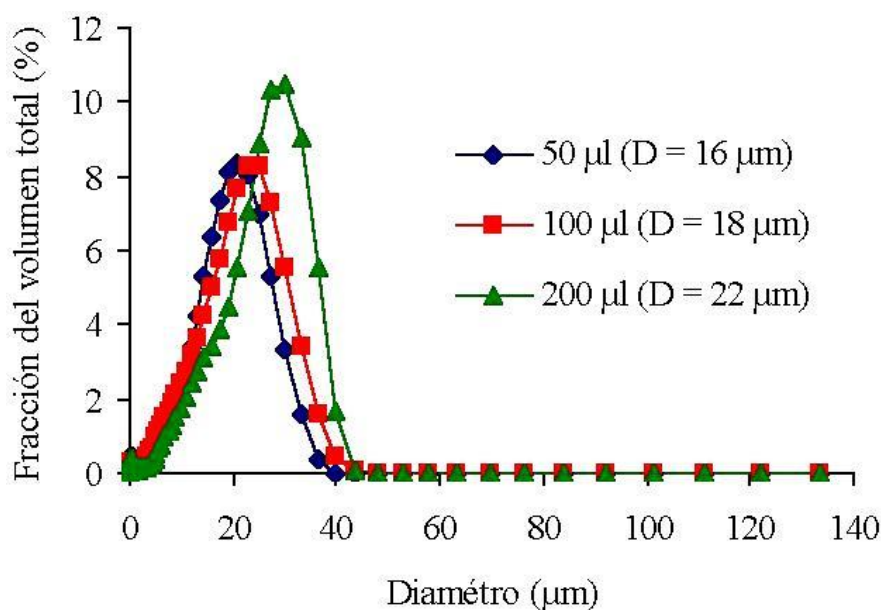


Figura 3. Efecto del volumen de la fase acuosa interna en el tamaño de las microesferas de PLGA con FCE obtenidas por el método de doble emulsión–evaporación del disolvente.

Las microesferas cargadas con FCE obtenidas por el procedimiento descrito en este trabajo tuvieron un tamaño promedio entre 16 y 22 µm y no se detectaron poblaciones minoritarias de partículas con mayor o menor tamaño (véase la Figura 3). La variación en la concentración de FCE en la fase acuosa interna de la primera emulsión no causó cambios significativos en el tamaño de las partículas (Resultados no mostrados en este artículo). Sin embargo, a medida que aumentó el volumen de la fase acuosa interna se produjo un ligero aumento del tamaño promedio de las microesferas (véase la Figura 3). Este efecto ha sido encontrado también por otros autores: *Parikh* y cols. observaron un aumento significativo del tamaño de microesferas de PLGA cargadas con 5-Fluorouracilo al aumentar el volumen de la fase interna de 0,75 a 1 mL [18], mientras que *Jeffery* y col. hallaron un efecto similar al encapsular albúmina de huevo en microesferas de PLGA [19]. Este fenómeno puede deberse a

que el tamaño de las gotas de la primera emulsión puede aumentar con el incremento de volumen de la fase acuosa interna, lo cual puede generar, a su vez, un aumento en la talla de las partículas [18].

**3.2. Efecto de la concentración de proteína y del volumen de la fase acuosa interna en eficiencia de encapsulación y la carga de las microesferas de FCE.** En este trabajo, se estudió el efecto de la concentración de FCE y del volumen de la fase acuosa interna sobre la eficiencia de encapsulación y la carga de las micropartículas. Se determinó el valor de estos parámetros a muestras elaboradas con diferentes combinaciones de valores para la concentración de FCE y para el volumen de la fase acuosa interna de acuerdo con los niveles seleccionados para cada variable independiente estudiada (Ver Tabla 1).

Tabla 2. Factores experimentales y características de las microesferas de PLGA cargadas con FCE.

| No. | Condiciones experimentales |                    | Características de las microesferas |                                 |
|-----|----------------------------|--------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
|     | FCE (mg/mL)                | Volumen ( $\mu$ L) | Carga (%)                           | Eficiencia de encapsulación (%) |
| 1   | 5                          | 50                 | 0,24                                | 96                              |
| 2   | 10                         | 50                 | 0,29                                | 58                              |
| 3   | 20                         | 50                 | 0,58                                | 58                              |
| 4   | 5                          | 100                | 0,35                                | 70                              |
| 5   | 10                         | 100                | 0,56                                | 56                              |
| 6   | 20                         | 100                | 0,96                                | 48                              |
| 7   | 5                          | 200                | 0,74                                | 74                              |
| 8   | 10                         | 200                | 1,09                                | 54                              |
| 9   | 20                         | 200                | 1,85                                | 46                              |

En la Tabla 2 se muestra el efecto de las variables experimentales en las características de las microesferas. De manera general se puede apreciar que la variación de los parámetros experimentales provoca cambios en las características de las microesferas. El aumento de la concentración y el volumen favorece la obtención de microesferas con mayor carga en tanto que la eficiencia de encapsulación experimenta una disminución. El efecto de la concentración de la proteína sobre la eficiencia de encapsulación coincide con lo descrito por otros autores. Péan y colaboradores en 1998 demostraron la influencia negativa del aumento de la concentración de albúmina sérica humana en la eficiencia de encapsulación [15].



Además también se observa que la eficiencia de encapsulación disminuyó al aumentar el volumen de la fase acuosa interna empleada para formar la primera emulsión. Este efecto también ha sido encontrado por otros investigadores al encapsular albúmina de suero humano [15] y bovino [20].

**3.2.1. Análisis del diseño experimental.** Para conocer la contribución independiente de cada una de las variables así como de las interacciones de las mismas, sobre las características de las microesferas, se realizó el análisis del diseño experimental factorial realizado ( $3^2$ ) para cada una de las variables respuesta mediante el Statgraphics Plus 5.1.

El ANOVA realizado para evaluar el efecto de las variables experimentales en la carga de las microesferas arrojó como resultado que todos los coeficientes del modelo son significativamente diferentes de cero ( $p < 0,05$ ) y, que todos los efectos ejercen un efecto positivo en la variable respuesta (véase la Figura 4).

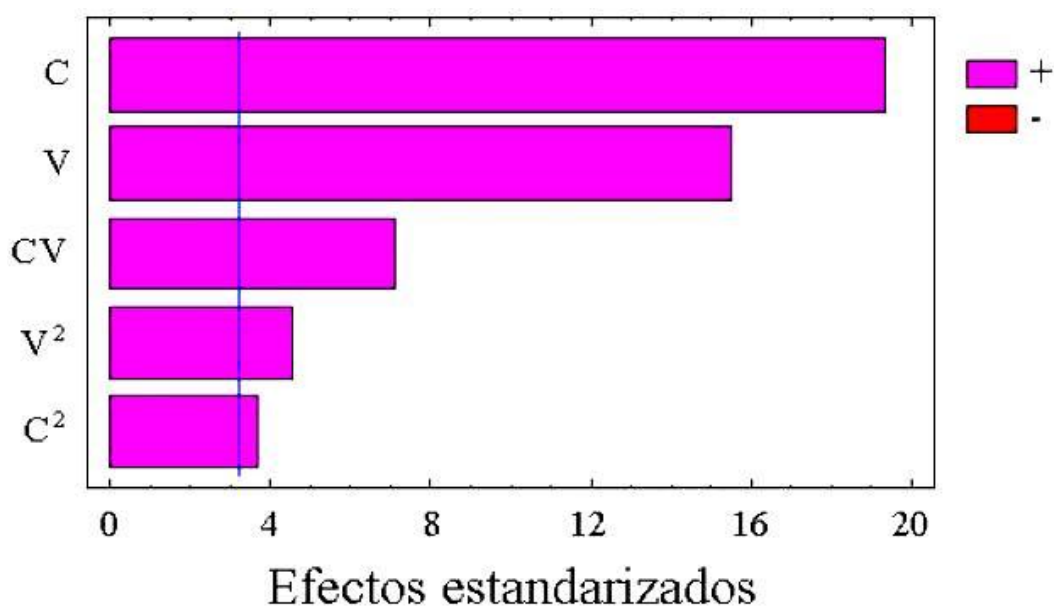


Figura 4. Representación de *Pareto* estandarizado para la carga. La línea vertical indica el umbral de significación de los efectos.

La siguiente ecuación describe la relación matemática de la carga con la concentración de FCE, C, y el volumen de la fase acuosa interna, V:

$$Q = 0,53 + 0,43 C + 0,34 V + 0,18 C^2 + 0,19 CV + 0,14 V^2 \quad (4)$$

La superficie de respuesta para Q en función de la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna indica que los valores máximos para esta respuesta se obtienen cuando se emplean las soluciones más concentradas de la proteína y un mayor volumen de las

mismas (véase la Figura 5).

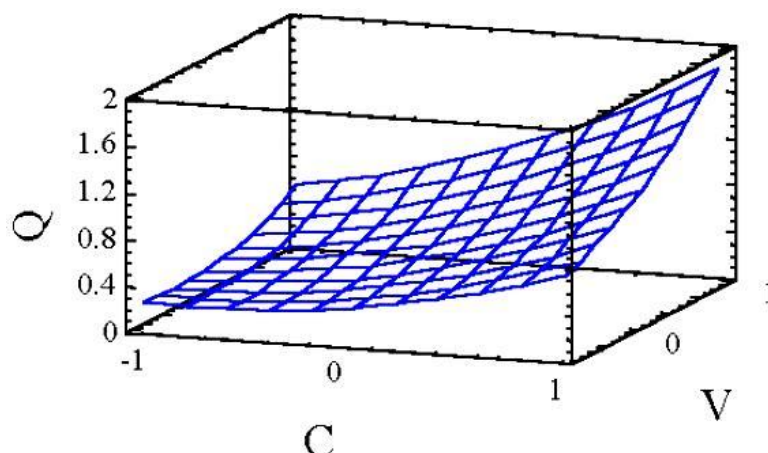


Figura 5. Superficie de respuesta para la carga en función de la concentración de FCE y del volumen de la fase acuosa interna.

Al analizar el efecto de las variables experimentales en la eficiencia de encapsulación, el ANOVA arrojó que sólo el volumen de la solución de FCE, de forma independiente, ejerce un efecto significativo en esta característica ( $p < 0,05$ ) y que dicho efecto es negativo, lo que indica que emplear menor volumen de la fase acuosa interna se logra mayor eficiencia de encapsulación. El resto de los efectos no influyen significativamente en la respuesta estudiada (véase la Figura 6). El efecto negativo del volumen en la eficiencia de encapsulación ha sido referido por otros autores [15, 16, 18] y pudiera estar relacionado con la estructura de las microesferas la cual tiende a presentar mayor cantidad de poros y canales mientras mayor es el volumen de la fase acuosa interna. Este fenómeno pudiera facilitar la migración de la proteína hacia la fase acuosa externa durante el proceso de obtención de las microesferas.

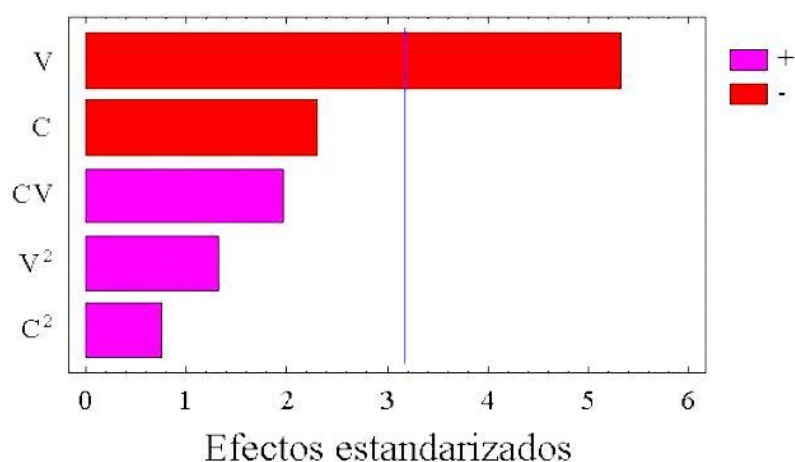


Figura 6. Representación de Pareto estandarizado para la eficiencia de encapsulación. La línea vertical indica el umbral de significación de los efectos.

La siguiente ecuación describe la relación matemática entre la eficiencia de encapsulación y el volumen de la solución de FCE:

$$EE = 51,78 - 14,66 V \quad (5)$$

La superficie de respuesta para EE en función de la concentración de FCE y el volumen de la fase acuosa interna indica que los valores máximos para esta respuesta se obtienen cuando se emplea menor volumen de las soluciones de FCE menos concentradas (véase la Figura 7).

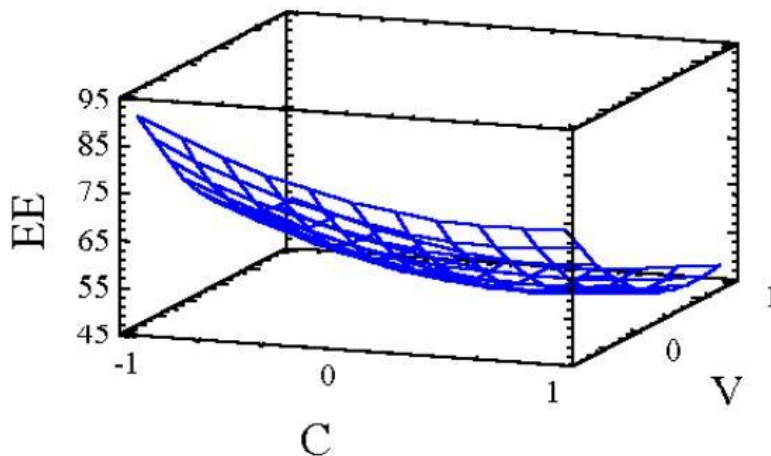


Figura 7. Superficie de respuesta para la eficiencia de encapsulación en función de la concentración de FCE y del volumen de la fase acuosa interna.

De los estudios realizados se obtuvo que el aumento ambos parámetros experimentales permite obtener microesferas con mayor cantidad de proteína encapsulada por masa de partículas (carga) pero con una eficiencia menor en la encapsulación. Dado que las proteínas son fármacos de un gran valor agregado resulta beneficioso disponer de un proceso lo más eficiente posible, para reducir al máximo la cantidad de proteína que queda sin encapsular. Teniendo en cuenta esta consideración resulta recomendable trabajar con soluciones de proteína con valores de concentración cercanas al mínimo estudiado en el presente trabajo (5 mg/mL), siempre que la carga que se obtenga satisfaga la dosis del principio activo que debe ser administrada en una cantidad dada de microesferas.

#### 4. CONCLUSIONES

El FCE puede ser encapsulado en microesferas de PLGA mediante la técnica de doble

emulsión – evaporación del disolvente obteniéndose partículas esféricas con características que dependen de los parámetros experimentales. La concentración de la proteína y el volumen de la fase acuosa interna afectaron la carga de las micropartículas de forma significativa, mientras que sólo la concentración afectó a la eficiencia de encapsulación significativamente. La ecuación matemática que relaciona a las respuestas estudiadas con las variables experimentales proporciona una guía para seleccionar los valores de dichas variables dependiendo de las características que se desea lograr en una muestra particular de microesferas.

### BIBLIOGRAFÍA

1. Carpenter G, Cohen S "Epidermal growth factor (EGF)", *Ann Rev Biochem*, **48**, 193 (1979)
2. Berlanga J, Lodos J, Labarta V, Merino N, González T, Hayes O, Oramas P, Mulet J, López-Saura P "The effect of epidermal growth factor treatment schedule on the healing of full-thickness wounds in pigs", *Biotechnol Apl.*, **14**(3), 163 (1997)
3. Acosta JB, Savigne W, Valdez C, Franco N, Alba JS, Rio Ad, López-Saura P, Guillén G, Lopez E, Herrera L, Fernández-Montequin J "Epidermal growth factor intralesional infiltrations can prevent amputation in patients with advanced diabetic foot wounds", *Int Wound J.*, **3**(3), 232 (2006)
4. Goodlad RA, Wright NA "Epidermal growth factor and transforming growth factor-[alpha] actions on the gut", *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **7**(10), 928 (1995)
5. Sullivan PB, Lewindon PJ, Cheng C, Lenehan PF, Kuo BS, Haskins JR, Goodlad RA, Wright NA, Iglesia FAdl "Intestinal mucosa remodeling by recombinant human epidermal growth factor(1-48) in neonates with severe necrotizing enterocolitis", *J. Pediatr. Surg.*, **42**(3), 462 (2007)
6. Guglietta A, Sullivan PB "Clinical applications of epidermal growth factor", *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, **7**(10), 945 (1995)
7. Caballero ME, Berlanga J, Ramirez D, Lopez-Saura P, Gozalez R, Floyd DN, Marchbank T, Playford RJ "Epidermal growth factor reduces multiorgan failure induced by thioacetamide", *Gut*, **48**(34-40) (2001)
8. Aguilera A, García O, Rojas I, Berlanga J, Hardy E "Estudio de penetrabilidad y liberación del FCE a partir de diferentes formulaciones semisólidas", *Biotechnol. Apl.*, **18** (Número Especial), p. E49 (2001)
9. Berlanga J, Fernández-Montequin J, Valdés C, Franco N, Rojas I, Santana H, Chacon L, Guillen G, Herrera L, Canan-Haden L, Gerónimo H, Sotolongo J "Use of pharmaceutical composition containing epidermal growth factor (EGF) for preventing diabetic limb amputation", WO 03/053458, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Cuba (2003)
10. Ritter V, Ritter M "Compositions of microspheres for wound healing", US 6086863, Polyheal Ltd, USA (2000)
11. Langer R "Drug delivery and targeting", *Nature*, **392**(6679 (Suppl)), 5 (1998)
12. Putney SD, Burke P "Improving protein therapeutics with sustained-release formulation", *Nat Biotechnol*, **16**(2), 153 (1998)
13. Tracy M "Development and scale-up of a microsphere protein delivery system", *Biotechnol Prog*, **14**(1), 108 (1998)
14. Saez V, Ramon J, Peniche C "Las microesferas como sistemas de liberación controlada de péptidos y proteínas", *Biotechnol. Apl.*, en prensa (2007)
15. Péan JM, Venier-Julienne MC, Filmon R, Sergeant M, Phan-Tan-Luu R, Benoit JP "Optimization of HSA and NGF encapsulation yields in PLGA microparticles", *Int. J. Pharm.*, **166**(1), 105 (1998)
16. Cleland JL "Solvent evaporation processes for the production of controlled release biodegradable microsphere formulations for therapeutics and vaccines", *Biotechnol. Prog.*, **14**(1), 102 (1998)
17. Saez V, Ramon JA, Aldana R, Pérez D, Hardy E "Microencapsulation of recombinant interferon a-2b into poly (D,L-lactide-co-glycolide) microspheres", *Biotechnol. Apl.*, en prensa

(2008)

18. Parikh RH, Parikh JR, Dubey RR, Soni HN, Kapadia KN "Poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres containing 5-Fluorouracil: Optimization of process parameters", *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **4**(2), 13 (2003)
19. Jeffery H, Davis SS, O'Hagan DT "The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles. II. The entrapment of a model protein using a (water-in-oil)-in-water emulsion solvent evaporation technique", *Pharm. Res.*, **10**(3), 362 (1993)
20. Pistel KF, Kissel T "Effects of salt addition on the microencapsulation of proteins using W/O/W double emulsion technique", *J. Microencapsul.*, **17**(4), 467 (2000)