

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE MICROESFERAS DE ÁCIDO POLI(D,L-LÁCTICO-CO-GLICÓLICO) CARGADAS CON ALBÚMINA SÉRICA DE BOVINO

Bernardino Isaac Cerde-Cristerna¹, Amaury de Jesús Pozos-Guillén¹, Mildred Quintana-Ruiz², Héctor Flores-Reyes^{1*}

1. Laboratorio de Ciencias Básicas, Facultad de Estomatología, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava #2, Zona Universitaria, C.P. 78290; San Luis Potosí, S.L.P. México. Correo electrónico: heflores@uaslp.mx

2. Laboratorio de Polímeros, Instituto de Física, Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Av. Dr. Manuel Nava #2, Zona Universitaria, C.P. 78290; San Luis Potosí, S.L.P. México.

Recibido: Abril 2013; Aceptado: Mayo 2014

RESUMEN

Las microesferas (ME) de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (APLG) son sistemas de liberación controlada que tienen aplicaciones en el área de la estomatología. Por sus propiedades de tamaño y liberación podrían emplearse para administrar proteínas que inducen regeneración de huesos maxilofaciales o dientes y resulta interesante explorar la producción de ME para su futura aplicación clínica. Este estudio exploró la síntesis de ME de APLG cargadas con la albumina sérica de bovino (ASB); tal molécula se escogió como proteína modelo. Las ME se produjeron con el método de extracción/evaporación de solvente. Se obtuvo un porcentaje de producción de 58,2%. Las partículas fueron esféricas con una superficie lisa y una matriz porosa. El tamaño de las ME sin carga o con carga de proteína fue de $(183 \pm 20 \mu\text{m})$ y $(193 \pm 23 \mu\text{m})$ ($p < 0,05$), respectivamente. El porcentaje de eficacia de carga de ASB fue de 14,68%. El porcentaje de liberación de la proteína fue 89,4% al cabo de 26 horas. La ASB liberada presentó una estructura secundaria normal, por lo tanto, el método de producción no la afectó. Los resultados mostraron que las ME formuladas presentaron características apropiadas para posibles usos en estomatología.

Palabras claves: Microesferas, ácido poli(D,L láctico-co-glicólico), sistemas de liberación controlada, estomatología, albúmina sérica de bovino.

ABSTRACT

Poly(D,L lactic-co-glycolic) acid (APLG) microspheres (ME) are controlled drug delivery systems having application in dentistry. Because of its size and its release profile, ME might be employed for releasing proteins inducing bone or dental regeneration. Accordingly it's of great interest to explore formulation of ME for future clinical use. Thus, we explored formulation of APLG-ME loaded with bovine serum albumin protein, a molecule employed as a model before encapsulating proteins inducing tissular regeneration. ME was produced by solvent extraction/evaporation method. The method produced a particle yield of 58.2%. The ME was spheres with smooth surface but a porous matrix. Blank and loaded microspheres sized $(183 \pm 20 \mu\text{m})$ and $(193 \pm 23 \mu\text{m})$ ($p < 0.05$), respectively. A protein efficiency encapsulation was of 14.68%. Burst release of protein was measured for 26 hr and it was found that ME released 89.4 % of protein. The released protein presented a normal structure showing that the method did not affect on the secondary structure of the protein. The formulated microspheres showed suitable characteristics for possible future uses in dentistry.

Key words: Microspheres, poly(D,L lactic-co-glycolic) acid, controlled drug delivery system, dentistry, bovine serum albumin.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de liberación controlada de medicamentos (SLC) se han estudiado ampliamente como acarreadores de proteínas terapéuticas con aplicaciones en ingeniería tisular para tejidos

orales [1]. Los SLC pueden ser formulados a base de polímeros biodegradables para atrapar moléculas activas como las proteínas y factores de crecimiento (FC) [2]. Cuando los SLC se colocan en el tejido y la matriz polimérica se degrada, los FC son liberados durante el tiempo que dura la degradación. Al liberarse los FC inducen la actividad metabólica en células blanco que a su vez inducen la regeneración tisular [2, 3]. En el caso de tejidos como huesos maxilofaciales o tejidos dentales se ha observado que su regeneración puede inducirse con SLC liberando algunos FC de la súper-familia de las proteínas morfogénicas óseas. Como ejemplo, SLC poliméricos cargados con BMP-2, BMP-7 o BMP-12 han demostrado utilidad en la regeneración de tejidos minerales en investigaciones *in vitro* o *in vivo* [4-7]. La investigación y desarrollo de SLC cargados con BMP resulta atractiva en el área de estomatología ya que podrían emplearse para tratamientos de regeneración ósea maxilofacial y de tejidos dentales. [8, 9]. Los SLC pueden manufacturarse en diversas arquitecturas tendiendo formas tales como andamiajes, membranas o microesferas (ME). Las ME formadas con polímero son sistemas muy atractivos para aplicaciones en estomatología pues debido a su micro-tamaño es posible depositarlas por inyección en espacios reducidos como la corona del diente, el conducto radicular y algunas lesiones maxilares (Figura 1).

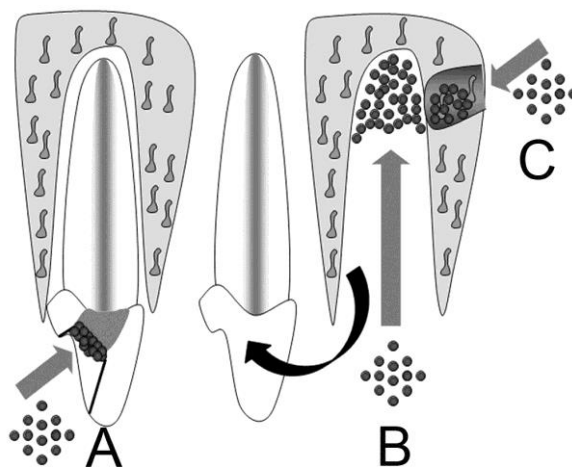


Figura 1. Esquema representando los usos de las ME para regeneración tisular en estomatología. A) Aplicación de ME sobre la pulpa dental, y B) Aplicación de ME en un alvéolo luego de una extracción dental, y C) Aplicación de ME en defecto óseo.

Las ME producen la liberación sostenida de una sustancia durante horas, días e incluso semanas. También la matriz en las ME protege la molécula atrapada contra el ambiente tisular y finalmente las ME pueden ser desarrolladas en el laboratorio con el método de extracción/evaporación del disolvente [10].

Las ME pueden formarse a base de ácido poli(D,L-láctico-co-glicólico) (APLG), un polímero biodegradable y bicompatible que tiene la aprobación de la “*Food and Drug Administration (EEUU)*” para su uso en humanos. En el mercado existen ME para aplicaciones clínicas incluyendo la estomatología, por ejemplo ME cargando el antibiótico minociclina empleado en tratamientos para enfermedades de origen periodontal [11, 12].

El proceso de producción de las ME se hace con el método de extracción/evaporación del disolvente por doble emulsión, también llamado método de solución acuoso/oleoso/acuoso. En el método una fase dispersa compuesta de una solución de fármaco/APLG/disolvente oleoso (primera emulsión) se mezcla con una fase acuosa (tensioactivo) para formar una segunda emulsión bajo un sistema de agitación magnética. Por consecuencia, durante la agitación la fase dispersa se separa en microgotas que cristalizan con la extracción y evaporación del disolvente de tal manera que se obtienen las ME [10, 12]. Por sus propiedades y por la posibilidad de prepararlas en el laboratorio sin necesidad de equipamientos sofisticados, las ME son interesantes a investigar como SLC para estomatología. El propósito del presente estudio fue formular y caracterizar ME-APLG cargadas con albumina sérica de bovino (ASB). Se empleó las ASB como proteína modelo para tener resultados como base antes de encapsular algún factor de crecimiento. La producción de las ME se hizo con el método de extracción/evaporación del solvente por doble emulsión. Para su caracterización se evaluó su morfología interna y externa, tamaño, eficacia de encapsulación, liberación de la ASB y posibles cambios en estructura secundaria de la ASB luego de liberarse.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó APLG 75/25, $19.000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, viscosidad intrínseca $0,20 \text{ dL}\cdot\text{mg}^{-1}$, polidispersidad de 1,8 (PLGA 7525 DL 2M, Batch 01-112-63; *Lakeshore Biomaterials, Birmingham, AL, USA*), poli(vinil alcohol) (APV; *Control Técnico y Representaciones, Monterrey, NL, México*); Albúmina sérica de bovino (*Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA*) y diclorometano (DCM) (*Productos Químicos Fermont, Monterrey, NL, México*). Todos los reactivos empleados fueron de grado analítico.

Formulación de las ME. Las ME se desarrollaron con el método de doble emulsión [13]. En breve, se diluyeron 200 mg en 1 mL de DCM y se mezclaron en vórtice a una velocidad máxima durante 1 minuto. Inmediatamente después, en la solución anterior se agregaron 200 μL de una solución de ASB ($30 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) (PBS pH 7,4) y se mezclaron en un vórtice a velocidad máxima durante 1 minuto. La fase dispersa que se formó fue vertida en un vaso de precipitado conteniendo

100 mL de APV al 0,1% bajo agitación magnética (800 rpm, 37°C) para inducir la formación de las microgotas. Después de 15 minutos, se agregaron 100 mL de agua desionizada en incrementos de 10 mL para facilitar la extracción del disolvente. La emulsión se mantuvo en agitación durante 1:30 horas (37°C) hasta obtener la formación de las ME. Después las partículas se recolectaron por filtración al vacío y durante la filtración se lavaron con agua desionizada. Las ME fueron recuperadas y congeladas para liofilizarlas posteriormente durante 4 horas. ME blanco (sin carga de ASB) fueron preparadas bajo las mismas condiciones. El procedimiento se realizó por triplicado.

Morfología. La morfología interna y externa de las ME se observaron con un microscopio electrónico de barrido (MEB) (*Phillips XL-30, Phillips; Koninklijke Philips Electronics NV, Amsterdam, Netherlands*). Se observaron ME completas o fracturadas colocadas sobre una cinta de carbón y cubiertas previamente con una capa de oro (20 mA). Las muestras se observaron en aumentos de 18, 200 y 400X.

Eficacia de recuperación. La eficacia de recuperación se calculó como el porcentaje del total de peso de ME con respecto al total del peso total de material sólido usado en el método.

Tamaño de partícula. Para medir el tamaño de las partículas, se fotografiaron 100 ME cargadas y 100 ME blanco con una cámara digital unida a un microscopio de luz usado en aumento de 4X. El tamaño fue determinado por el programa *Image J* (versión 1.37, *Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA*) y posteriormente se calculó un promedio. Se utilizó la prueba de Rangos Señalados de *Wilcoxon* para evaluar posibles diferencias estadísticas entre las ME cargadas y blanco.

Eficacia de encapsulación de la ASB. 5 mg de ME cargadas o blanco fueron disueltas en 2 mL de DCM, enseguida en la solución obtenida se hizo la medición del valor de absorbancia (277 nm) con un sistema UV-VIS (*Agilent 8453 UV-Visible Spectroscopy System, Agilent Technologies, Mexico City, Mexico*). En base a una curva de calibración hecha previamente, se calculó la concentración de ASB en la muestra. La eficacia de encapsulación se calculó de la siguiente manera: carga experimental/carga teórica x 100.

Liberación de ASB. La liberación de la ASB encapsulada en las ME fue evaluada durante 26 horas. Para eso, 20 mg de ME cargas con ASB fueron depositadas en un tubo *Eppendorf* cónico (1,5 mL) conteniendo 1 mL de PBS (pH 7,4). Las muestras se mantuvieron a una temperatura de 37°C durante toda la evaluación. A los tiempos establecidos, las muestras se centrifugaron (5 min, 5.000 rpm) (*Eppendorf Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Hauppauge, NY, USA*) para provocar la suspensión de las ME en el fondo del tubo. Enseguida el sobrenadante de las muestras fue recuperado con una

jeringa con un filtro de PTFE (45 μm); luego de cada recolección se agregó PBS nuevo. Las muestras recolectadas se almacenaron a 4°C hasta hacer las lecturas. Finalmente las muestras fueron analizadas en un sistema UV-Vis (277 nm) para obtener la concentración de ASB en relación a los valores de absorbancia encontrados. Todo el proceso fue hecho por triplicado.

Estabilidad de la ASB. La estabilidad de la ASB luego de liberarse en PBS se evaluó con la técnica de dicroísmo circular (*Spectropolarimeter J-810, Jasco Corp, Easton, MD, USA*). Una muestra de ASB diluida en PBS fue analizada y comparada con una muestra de PBS en el cual estuvieron suspendidas durante 26 horas las ME cargadas con ASB. Un espectro de la muestra fue medido ocho veces para obtener un promedio de las mediciones.

3. RESULTADOS

El porcentaje de eficacia de recuperación fue de 58,2%. Se obtuvieron partículas con una morfología esférica y de superficie lisa (Figuras 2 y 3). La matriz interna de las ME presentó porosidades (Figura 4). El promedio en tamaño de las ME cargadas fue de $183 \pm 20 \mu\text{m}$ mientras que para las ME blanco fue de $193 \pm 23 \mu\text{m}$ diámetro; no se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p < 0,05$) entre ambos tipos de ME. Se obtuvo un porcentaje de eficacia de encapsulación de 14,68%. La liberación, después de 26 horas, fue de 89,4% del total de la ASB encapsulada (Figura 5). La estructura secundaria de la ASB no presentó ningún cambio después de su liberación (Figura 6).

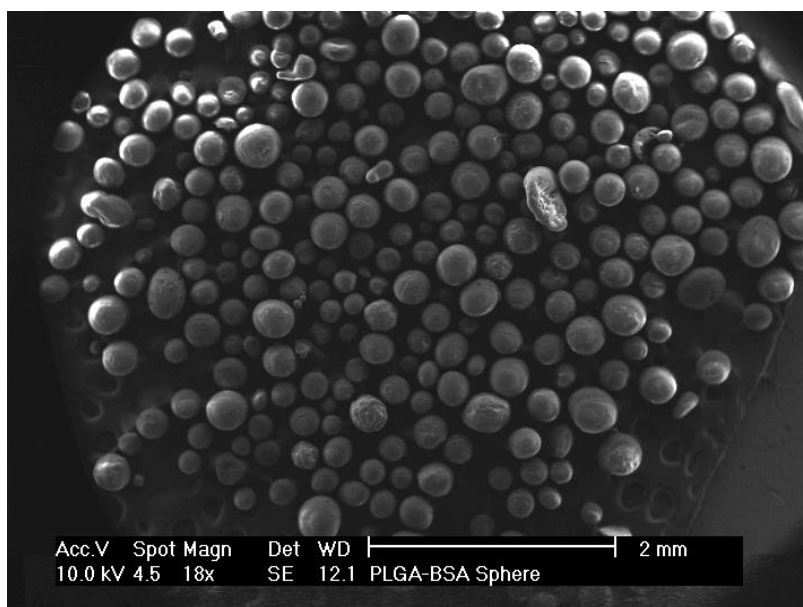


Figura 2. ME-APLG cargadas con ASB. La imagen representa una muestra de las partículas producidas.

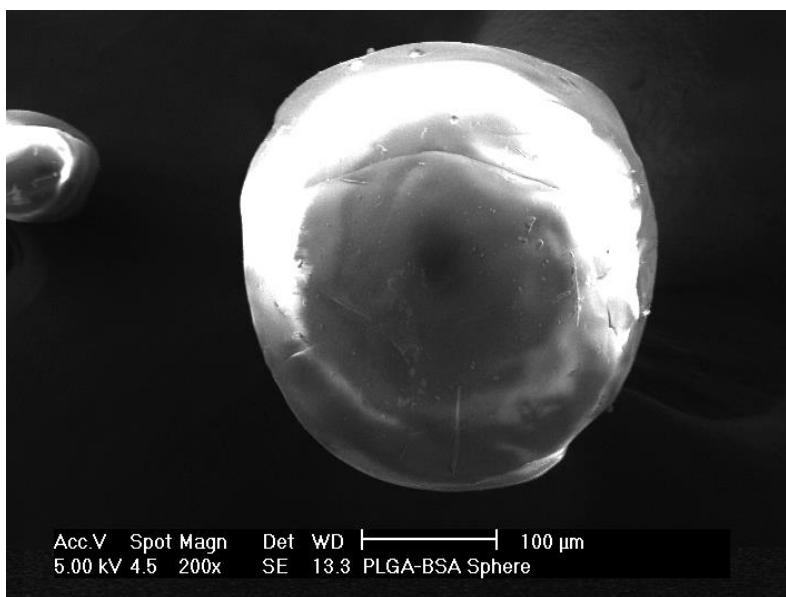


Figura 3. Imagen representativa de una ME-APLG con ASB. Se observa una superficie lisa. Las ME blanco presentaron también una superficie lisa (200X).

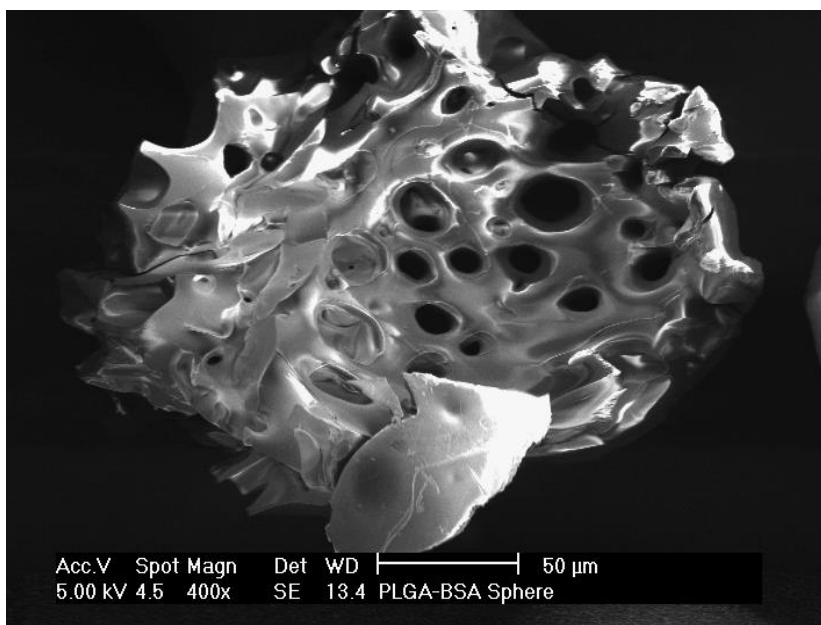


Figura 4. Imagen representativa de una ME-APLG con ASB que fue fracturada. Se observan poros en la matriz (400X).

DISCUSIÓN

Las ME-APLG son atractivos SLC para tratamientos en estomatología que requieran la liberación prolongada de sustancias activas, por ejemplo FC que inducen regeneración tisular. Por lo tanto es importante explorar un método de producción eficaz y que sirva como base para desarrollar ME con propiedades para un futuro uso clínico.

En este estudio se han desarrollado ME-APLG empleando el método de extracción/evaporación del disolvente por doble emulsión. Este método es usado comúnmente para la encapsulación de distintas sustancias activas y para formular ME con diversas características [12]. En el presente estudio se obtuvieron partículas con una morfología esférica que fue resultado de la naturaleza del método. Cuando la fase dispersa es agregada al APV sometido a agitación magnética, ésta se separa en microgotas que cristalizan formándose así las ME, igualmente el APV actúa como tensioactivo, facilitando la formación de microgotas esférica [14, 15]. Un hallazgo particular fue que en nuestras muestras algunas partículas fueron ovoides (Figura 2). Esa morfología puede explicarse por una perturbación de la fase acuosa (APV). En el método usado en este estudio, con la intención de inducir la extracción del DCM, se agregó agua destilada en el APV en agitación. Ese hecho pudo causar la perturbación del remolino durante la agitación y afectar en la morfología de las ME. *Yang y cols.* [16] observaron que entre los primeros 5 y 15 minutos de inicio de formación de la segunda emulsión las microgotas son suaves y sensibles a las fuerzas de estrés que perturban la fase continua, por lo tanto, las ME resultan con una geometría oval. La presencia de las ME ovoides indica que el sistema es inestable en el inicio de la preparación, entonces debe considerarse controlar la adición de agua o bien incrementar el porcentaje de APV para lograr una mejor estabilidad de las microgotas. En cuanto a la topografía, las imágenes con MEB mostraron que las ME presentaron una superficie lisa (Figura 3). La formación de una superficie lisa se explica debido a que no existe un flujo entre la fase dispersa y lisa (o viceversa) durante la solidificación de las microgotas ya que el flujo/influjo de agua produce canales que forman poros en el momento de la solidificación. El volumen/volumen de DCM/solución de ASB también tiene influencia en la formación de una superficie lisa que induce una redisolución del APLG en la superficie las microgotas de manera que hay una formación de superficie lisa [16]. En el caso de la matriz de las ME, se encontró la presencia de poros (Figure 4). Los poros en la matriz se explican debido a la presencia de la solución de ASB dentro de las microgotas. En la preparación de la fase dispersa, la solución de ASB queda atrapada por APLG/DCM, de esa manera se logró atrapar la proteína en la matriz de APLG. Por lo tanto, dentro de las microgotas que cristalizaron hay a su vez microgotas de la solución de ASB, eso da como resultado la presencia de porosidades al momento de la solidificación [17]. Por otro lado, la ASB participa también en la formación de poros porque se ha mostrado que tal proteína actúa como una película interfacial que forma gotas dentro de las ME que se forman durante la agitación lo que resulta en la presencia de poros en la matriz [18].

En su futura aplicación clínica las ME podrían colocarse dentro de un diente o en defectos

óseos, para eso el tamaño obtenido resulta adecuado. Incluso es adecuado para transportarlas con una cucharilla metálica o para depositarlas por medio de una jeringa con una aguja de calibre 23 o menor. En el caso de usarlas por inyección sería necesario hacerlo con ayuda de alguna solución transportadora.

La eficacia de recuperación obtenida fue mayor del 50%. Esto implica que hubo pérdida de material durante el proceso de preparación de las ME. Al respecto se observó sedimentación y coalescencia de las microgotas durante los primeros minutos de agitación. Aunque no se evaluó cuantitativamente el fenómeno, por observación se notó que APLG quedó pegado a la barra de imán usada en la agitación magnética. Igualmente consideramos que el porcentaje de APV (0,1%) no fue suficiente para mantener la estabilidad de la emulsión y se sugiere que este fenómeno influyó al no evitar la coalescencia de las microgotas. A pesar de la pérdida de material, los resultados fueron similares a los reportados por otros autores empleando un método de extracción/evaporación del solvente por doble emulsión; por ejemplo se han reportado porcentajes de eficacia de recuperación de 44,1, 58,6, 59,8 y 66,3% [19, 20]. Sin embargo, es posible obtener porcentajes mayores, como reportan *Soriano y cols.*, con eficacias de recuperación del 78,9 al 89,9% [21].

En relación a la eficacia de encapsulación, se encontró que no fue posible “atrapar” el 100% de la ASB. Evidentemente en el proceso de preparación de las ME se perdió ASB, tal situación se debió al flujo de la solución de ASB dentro de las microgotas hacia la fase acuosa. Por otro lado, es probable que la agitación por vórtice no haya sido ideal para formar la primera emulsión e influyó también en la pérdida de ASB. El porcentaje de eficacia de encapsulación obtenido (14,68%) fue similar al reportado por *Porjazoska y cols.* así como *por Boury y cols.* [19, 22] quienes obtuvieron valores del 8,5 al 12,7% y 9,0–11,4%, respectivamente. Estos resultados se relacionaron también con la pérdida de ASB durante la preparación de las ME. La encapsulación puede mejorarse con adaptaciones en el proceso de formación de la primera emulsión en el futuro.

El tiempo de liberación de ASB fue evaluado durante 26 horas, con lo que se obtuvo información sobre la acción temprana del sistema (Figura 5). Se encontró que se liberó un porcentaje de 89,4%. Durante las primeras 7,5 horas se observó que hubo un primer “chorro” de liberación y luego una liberación sostenida hasta las 26 horas. Tal perfil se entiende debido a que la liberación inicial ocurrió al liberarse la ASB en la superficie o capa superficial de la ME la ASB puede liberarse rápidamente cuando está atrapada superficialmente y comienza la erosión del APLG [23, 24]. Este resultado fue similar al porcentaje de liberación que encontraron *Porjazoska y cols.* [19] de 87% de liberación de ASB en 25 horas; estos autores atribuyeron la importante liberación a

la presencia de proteína sobre la superficie de la ME.

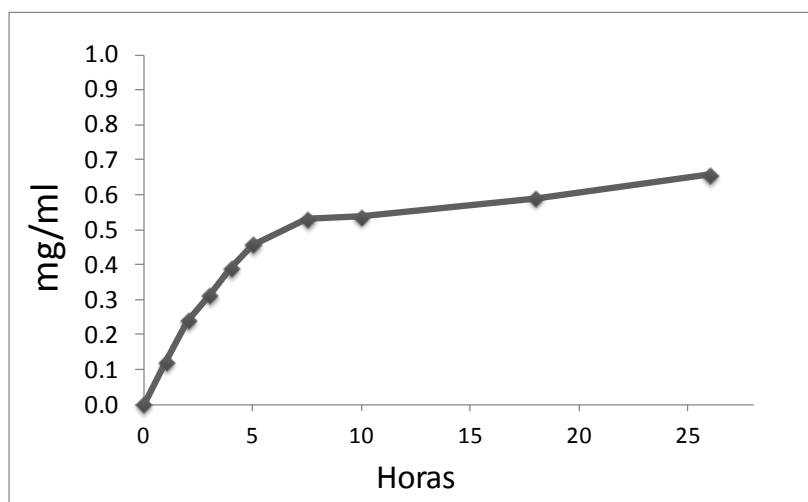


Figura 5. Liberación acumulativa de la ASB.

El procedimiento de encapsulación puede afectar la estructura de la proteína pues ésta se expone al estrés durante la preparación de la primera emulsión, además por el contacto del disolvente y por las fuerzas de agitación. Un cambio en la estructura de la proteína puede afectar su función, aunque nuestras ME no fueron hechas para inducir acción biológica, nos interesó conocer si el proceso de producción afectó la estructura de la ASB (Figura 6). En nuestro caso, la estructura secundaria de la proteína no sufrió ningún cambio. Otros autores han hecho observaciones similares, por ejemplo, *Sah y cols.* [25] no encontraron cambios en la estructura de ASB en solución después que la mezclaron con una fase acuosa/oleosa, mientras que *Kang y Singh* [26] no observaron agregación de la ASB suspendida en la fase acuosa/oleosa.

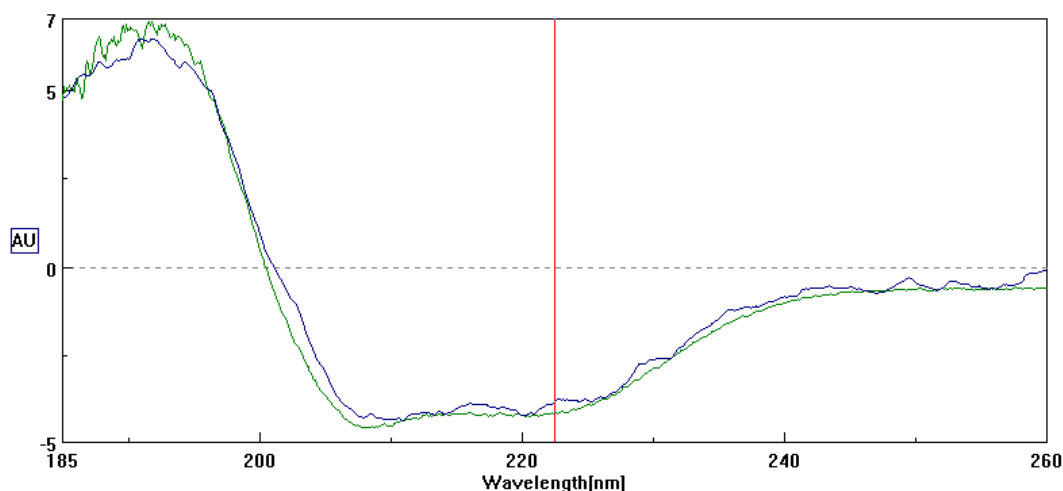


Figura 6. El espectro azul representa la ASB liberada desde las ME mientras que el espectro verde representa la ASB control. Cada espectro representa 8 determinaciones.

CONCLUSIONES

El método de extracción/evaporación del disolvente con doble emulsión fue eficaz para la producción de ME con características físicas y de acción para una posible aplicación clínica una vez que lleven una molécula bioactiva. Este estudio se hizo con la intención de tener un primer acercamiento a la producción de ME y tener resultados que sean puntos de referencia para basar futuras adaptaciones y mejoras del método. Por ejemplo, puede mejorarse el proceso de la formación de la primera emulsión que puede influir de manera importante en la eficacia de encapsulación. De igual manera, modificaciones al porcentaje de PVA podrían influir en la eficacia de recuperación.

Agradecimientos. Programa de Mejoramiento del Profesorado (PROMEP) a través de la convocatoria de Redes Temáticas de Colaboración y Beca Posdoctoral, Cuerpo Académico Ciencias Biomateriales CA–UASLP–181.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Malhotra N, Kundabala M, Acharya S “Current strategies and applications of tissue engineering in dentistry Part 2”, *Dent. Update.*, **36**(10),639 (2009)
- [2] Lee K, Silva EA, Mooney DJ “Growth factor delivery–based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments”, *J. R. Soc. Interface.*,**8**(55),153 (2011)
- [3] Nakashima M, Akamine A “The Application of Tissue Engineering to Regeneration of Pulp and Dentin in Endodontics”, *J. Endod.*, **31**(10), 711 (2005)
- [4] Alpaslan C, Irie K, Takahashi K, Ohashi N, Sakai H, Nakajima T, et al. “Long–term evaluation of recombinant human bone morphogenetic protein–2 induced bone formation with a biologic and synthetic delivery system”, *Br. J. Oral Maxillofac Surg.*, **34**(5), 414 (1996)
- [5] Woo BH, Fink BF, Page R, Schrier JA, Jo YW, Jiang G, et al. “Enhancement of bone growth by sustained delivery of recombinant human bone morphogenetic protein–2 in a polymeric matrix”, *Pharm. Res.*, **18**(12),1747 (2001)
- [6] Kempen DH, Lu L, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, Classic KL, et al. “Retention of in vitro and in vivo BMP–2 bioactivities in sustained delivery vehicles for bone tissue engineering”, *Biomaterials.*, **29**(22), 3245 (2008)
- [7] Wang J, Liu X, Jin X, Ma H, Hu J, Ni L, et al. « The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(L–lactic acid) scaffolds in vitro and in vivo”, *Acta Biomater.*, **6**(10), 3856 (2010)
- [8] Huang GT “Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: current progress”, *Regen Med.*, **4**(5), 697 (2009)
- [9] Moioli EK, Clark PA, Xin X, Lal S, Mao JJ “Matrices and scaffolds for drug delivery in dental, oral and craniofacial tissue engineering”, *Adv. Drug Del. Rev.*, **59**(4–5), 308 (2007)
- [10] Freitas S, Merkle HP, Gander B “Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology”, *J. Control Release.*, **102**(2), 313 (2005)
- [11] Javed S, Kohli K “Local delivery of minocycline hydrochloride: a therapeutic paradigm in periodontal diseases”, *Curr. Drug Deliv.*, **7**(5), 398 (2010)
- [12] Mundargi RC, Babu VR, Rangaswamy V, Patel P, Aminabhavi TM “Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L–lactide–co–glycolide) and its derivatives”, *J. Control Release.*,**125**(3), 193 (2008)
- [13] Cohen S, Yoshioka T, Lucarelli M, Hwang LH, Langer R “Controlled delivery systems for proteins based on poly(lactic/glycolic acid) microspheres”, *Pharm. Res.*,**8**(6),713 (1991)

- [14] Cui F, Cun D, Tao A, Yang M, Shi K, Zhao M, et al. "Preparation and characterization of melittin-loaded poly (DL-lactic acid) or poly (DL-lactic-co-glycolic acid) microspheres made by the double emulsion method", *J. Control Release*, **107**(2), 310 (2005)
- [15] Zolnik BS, Leary PE, Burgess DJ "Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres", *J. Control Release*, **112**(3), 293 (2006)
- [16] Yang Y-Y, Chung T-S, Bai X-L, Chan W-K "Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method", *Chem Eng Sci*, **55**(12), 2223 (2000)
- [17] Rosca ID, Watari F, Uo M "Microparticle formation and its mechanism in single and double emulsion solvent evaporation", *J. Control Release*, **99**(2), 271 (2004)
- [18] Nihant N, Schugens C, Grandfils C, Jerome R, Teyssie P "Polylactide Microparticles Prepared by Double Emulsion-Evaporation: II. Effect of the Poly(Lactide-co-Glycolide) Composition on the Stability of the Primary and Secondary Emulsions", *J. Colloid Interface Sci*, **173**(1), 55 (1995)
- [19] Porjazoska A, Goracinova K, Mladenovska K, Glavas M, Simonovska M, Janjevic EI, et al. "Poly(lactide-co-glycolide) microparticles as systems for controlled release of proteins — preparation and characterization", *Acta Pharma*, **54**(3), 215 (2004)
- [20] Ricci M, Blasi P, Giovagnoli S, Rossi C, Macchiarulo G, Luca G, et al. "Ketoprofen controlled release from composite microcapsules for cell encapsulation: effect on post-transplant acute inflammation", *J. Control Release*, **107**(3), 395 (2005)
- [21] Soriano I, Llabres M, Evora C "Release control of albumin from polylactic acid microspheres", *Int. J. Pharm.*, **125**(2), 223 (1995)
- [22] Boury F, Marchais H, Proust JE, Benoit JP "Bovine serum albumin release from poly(α -hydroxy acid) microspheres: effects of polymer molecular weight and surface properties", *J. Control Release*, **45**(1), 75 (1997)
- [23] Mao S, Xu J, Cai C, Germershaus O, Schaper A, Kissel T "Effect of WOW process parameters on morphology and burst release of FITC-dextran loaded PLGA microspheres", *Int. J. Pharm.*, **334**(1-2), 137 (2007)
- [24] Fredenberg S, Wahlgren M, Reslow M, Axelsson A "The mechanisms of drug release in poly(lactic-co-glycolic acid)-based drug delivery systems". *Int. J. Pharm.*, **415**(1-2), 34 (2011)
- [25] Sah H, Bahl Y "Effects of aqueous phase composition upon protein destabilization at water/organic solvent interface", *J. Control Release*, **106**(1-2), 51 (2005)
- [26] Kang F, Singh J "Conformational stability of a model protein (bovine serum albumin) during primary emulsification process of PLGA microspheres synthesis", *Int. J. Pharm.*, **260**(1), 149 (2003)