

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVAS NANOPARTÍCULAS DE DERIVADOS DE PBLG PARA SU USO EN NANOMEDICINA

MARÍA ELISA MARTÍNEZ BARBOSA*, AN YOUNG S. TAYLOR CASTILLO, HERIBERTO ACUÑA CAMPA, LILIAN ARELY CARRASCO COTA

RESUMEN

En este trabajo se describe la realización de la síntesis y caracterización de cinco derivados de poli-L-glutamato de gamma-bencilo (PBLG) por polimerización aniónica de apertura de anillo utilizando iniciadores de interés biomédico, así como la preparación y caracterización de nanopartículas poliméricas preparadas usando los polímeros sintetizados. Los polímeros fueron caracterizados por resonancia magnética nuclear (RMN 1H) y cromatografía de exclusión de tamaño (GPC/SEC). Las nanopartículas fueron preparadas por nanoprecipitación y caracterizadas por microscopía electrónica de transmisión (MET) y dispersión de luz (DLS/DDLS). Como se requiere para aplicaciones en nanomedicina, nanopartículas en el intervalo de 20 a 50 nm fueron obtenidas. Por otro lado, se presenta la técnica de dispersión de luz depolarizada (DDL), como una técnica interesante para la caracterización morfológica y comportamiento dinámico de las nanopartículas poliméricas, en suspensión acuosa.

Palabras-clave: PBLG, nanopartículas poliméricas, nanomedicina, GPC/SEC, MET, DLS, DDL.

ABSTRACT

The synthesis and characterization of five derivatives of poly-gamma-benzyl-L-glutamate (PBLG) by anionic ring opening polymerization using initiators of biomedical interest was carried out, as well as the preparation and characterization of polymeric nanoparticles made from the synthesized polymers. Polymers were characterized by ¹H nuclear magnetic resonance (1HRMN) and size exclusion chromatography (GPC/SEC). Nanoparticles were prepared by nanoprecipitation and characterized by transmission electron microscopy (TEM) and light scattering (DLS/DDLS). As required for nanomedicine applications, nanoparticles between 20-50 nm were obtained. Moreover, static light scattering becomes an interesting technique to characterize the morphology and dynamic behavior of polymeric nanoparticles, in aqueous suspension.

Keywords: PBLG, polymeric nanoparticles, nanomedicine, GPC/SEC, TEM, DLS, DDL.

DRA. MARÍA ELISA MARTÍNEZ BARBOSA
Departamento de Investigación en
Polímeros y Materiales, Universidad de Sonora
Correo: memartinez@polimeros.uson.mx
M.C. AN YOUNG S. TAYLOR CASTILLO
Posgrado en Ciencia de Materiales, Departamento
de Investigación en Polímeros y Materiales,
Universidad de Sonora
Correo: anysa.87@gmail.com

DR. HERIBERTO ACUÑA CAMPA
Departamento de Física, Universidad de Sonora
Correo: hacuna@correo.fisica.uson.mx
M.C. LILIAN ARELY CARRASCO COTA
Posgrado en Ciencia de Materiales, Departamento de
Investigación en Polímeros y Materiales,
Universidad de Sonora
Correo: liliana.carrascoc@correo.uson.mx

*Autor para correspondencia: María Elisa Martínez Barbosa
Correo electrónico: memartinez@polimeros.uson.mx
Recibido: 25 de marzo de 2014
Aceptado: 02 de mayo de 2014
ISSN: 2007-4530



INTRODUCCIÓN

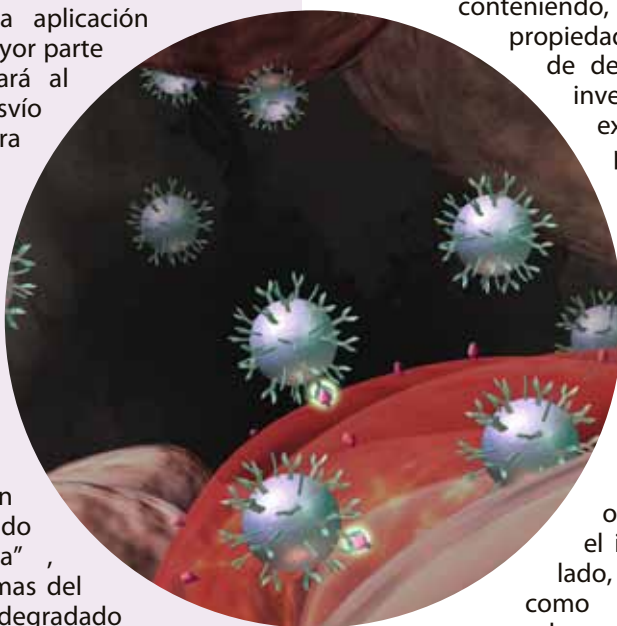
Uno de los principales objetivos de la investigación en nanomedicina es reducir los efectos secundarios y aumentar la eficacia de los fármacos administrados. Es aquí donde la ingeniería de nanomateriales tiene un papel fundamental para lograr llevar al fármaco sólo al sitio requerido del organismo, ya sea un órgano específico, una célula e inclusive, un compartimento subcelular.

Sabemos que una vez administrado un medicamento clásico, por vía oral o parenteral (intravenosa, intramuscular, subcutánea), éste se difunde en todo el organismo y solamente una pequeña cantidad llega al sitio requerido, lo que genera toxicidad y efectos secundarios. Para resolver dicha problemática, una de las ideas de investigación en este campo consiste en incorporar el fármaco en sistemas llamados "nanovectores" o "nanoacarreadores" cuyas propiedades y características son moldeadas y estudiadas de acuerdo a la aplicación requerida. De esta manera, la mayor parte del fármaco administrado llegará al sitio deseado, reduciendo su desvío a sitios en los cuales se considera tóxico.

Una vez administrado en el organismo, un vector o acarreador de fármacos debe asegurar una gran diversidad de funciones y propiedades específicas, como: presentar la mayor capacidad posible de encapsulación del fármaco, evitar las interacciones no deseadas en el organismo, lograr que el fármaco sea liberado sólo en el sitio requerido "fármaco dirigido a diana- liberación controlada", proteger al fármaco de las enzimas del cuerpo humano evitando que sea degradado antes de actuar, ser degradable o permitir la fácil eliminación después de haber realizado su función, entre otras. Para responder a todos estos requerimientos, durante los últimos años se han dirigido grandes esfuerzos a la concepción de diferentes sistemas vectores, en particular a los que presentan tamaños inferiores al micrómetro, tales como los liposomas, las micelas y más recientemente las nanopartículas (1). Entre estos sistemas de vectorización, las nanopartículas poliméricas presentan ciertas ventajas como: estabilidad, alta capacidad de encapsulación de moléculas terapéuticas, tamaños a escala nanoscópica, así como la posibilidad de modular sus propiedades de superficie. De esta manera, se han preparado diversos sistemas de nanopartículas que presentan diferentes propiedades, a partir de polímeros degradables(2).

Sin embargo, aún se tienen grandes retos en la preparación de sistemas nanovectores que sean capaces de asegurar la presencia simultánea de diferentes propiedades y funciones. En este sentido, se ha

encontrado que el poli- L-glutamato de gamma-bencilo, PBLG, es un polímero muy adecuado para la preparación de nanovectores multifuncionales debido a que en su estructura molecular se le pueden colocar moléculas con propiedades específicas (Figura 1). En nuestro caso, hemos sintetizado derivados del PBLG que contienen: a) polietilén glicol (PEG), estas cadenas por su carácter hidrófilo deben colocarse en la superficie de las nanopartículas, lo que permite el aumento del tiempo de residencia en el torrente sanguíneo; b) β -ciclodextrina, la cual posee una muy buena capacidad para formar complejos de inclusión con principios activos poco solubles en sistemas acuosos, lo que aumenta su solubilidad; c) biotina, la cual permite incorporar en la superficie del sistema vector, moléculas de reconocimiento específico en el organismo gracias a interacciones ligando – receptor. Estos derivados han permitido la formulación de nanopartículas poliméricas conteniendo, entonces, moléculas con propiedades específicas. Para este tipo de derivados, se ha encontrado en investigaciones recientes (3-5) que existen ciertos factores, como el peso molecular y composición del polímero, que afectan el tamaño y la morfología de las nanopartículas. Por ello, el presente trabajo consiste en la síntesis y caracterización de una nueva mini biblioteca de derivados del PBLG, en la preparación de una serie de nanopartículas a partir de estos derivados, y un estudio de morfología y tamaño, obteniendo nanopartículas en el intervalo de 20-50nm. Por otro lado, se presenta la técnica de DDLS como una interesante herramienta a explorar para el estudio morfológico y comportamiento dinámico de nanopartículas poliméricas, en suspensión acuosa.



METODOLOGÍA

Síntesis y caracterización de derivados del PBLG

La síntesis de derivados del PBLG se llevó a cabo por polimerización por apertura aniónica del anillo del anhídrido del glutamato de bencilo (γ -BLG-NCA) en dimetilformamida (DMF) a 30 °C, de acuerdo al método descrito por Martínez Barbosa y col. (6). Brevemente: N mmoles de monómero (NCA), ver tabla 1, fueron pesados bajo atmósfera de argón y disueltos en DMF. Posteriormente se agregó una solución de la molécula iniciadora. El peso molecular teórico de cada derivado fue ajustado variando la relación molar de iniciador/ monómero. La evolución de la reacción de polimerización fue seguida por espectroscopía de infrarrojo (Bruker Vector 22). Una vez terminada la reacción de polimerización, la

mezcla de reacción fue precipitada en éter etílico y el producto fue filtrado, para obtener el polímero en forma de polvo. A continuación se realizaron sucesivas etapas de purificación por re precipitación del polímero y filtración. Finalmente el polímero fue secado al vacío al menos durante 12 horas y congelado para su posterior caracterización. El peso molecular de los polímeros fue determinado por RMN ^1H /o GPC/SEC. Las muestras para RMN ^1H se prepararon en una mezcla $\text{CDCl}_3/\text{TFA-d}$ 85/15% v/v y se analizaron en un equipo Bruker B-ACS 60 a 400 MHz. Para los estudios por GPC/SEC se prepararon soluciones al 1% p/v de polímero en LiBr al 0.05 M en DMF. Las muestras fueron filtradas y analizadas a 30 °C con un flujo de 0.5 mL/min en un equipo GPC/SEC 270 MAX-Malvern, equipado con 2 columnas (I-MBHMW-3078). Los estándares utilizados fueron PMMA de 65 000 y 95 000 g mol^{-1} .

Tabla 1. Condiciones de la polimerización de BLG-NCA en DMF a 30°C.

Polímero	\overline{Mn}_t (g mol^{-1})	\overline{Dpn}_t (g mol^{-1})	NCA (mmol)	$[M]_0$ (mol L^{-1})	$[I]_0$ (mol L^{-1})	Tiempo de Reacción	Rendimiento (%)
PBLG-Bz	50000	228	7.8	0.5	0.0021	5	73
PBLG- β -CD	50000	228	17.3	0.5	0.0022	8	81
PBLG-PEG	60000	274	7.7	0.015	0.0547	6	66
PBLG-Biotina	50000	228	9.9	0.5	0.0022	6	75
PBLG-PEG-Biotina	50000	228	5.6	0.5	0.0022	7	70

$[M]_0$ y $[I]_0$: concentraciones iniciales de NCA e Iniciador, respectivamente. \overline{Mn}_t y \overline{Dpn}_t : valores teóricos. Los polímeros fueron denominados como: PBLG-seguido del nombre del iniciador (Bz=bencilamina, β -CD= β -ciclodextrina, PEG=polietilén glicol, PEG-biotina = polietilén glicol-biotina).

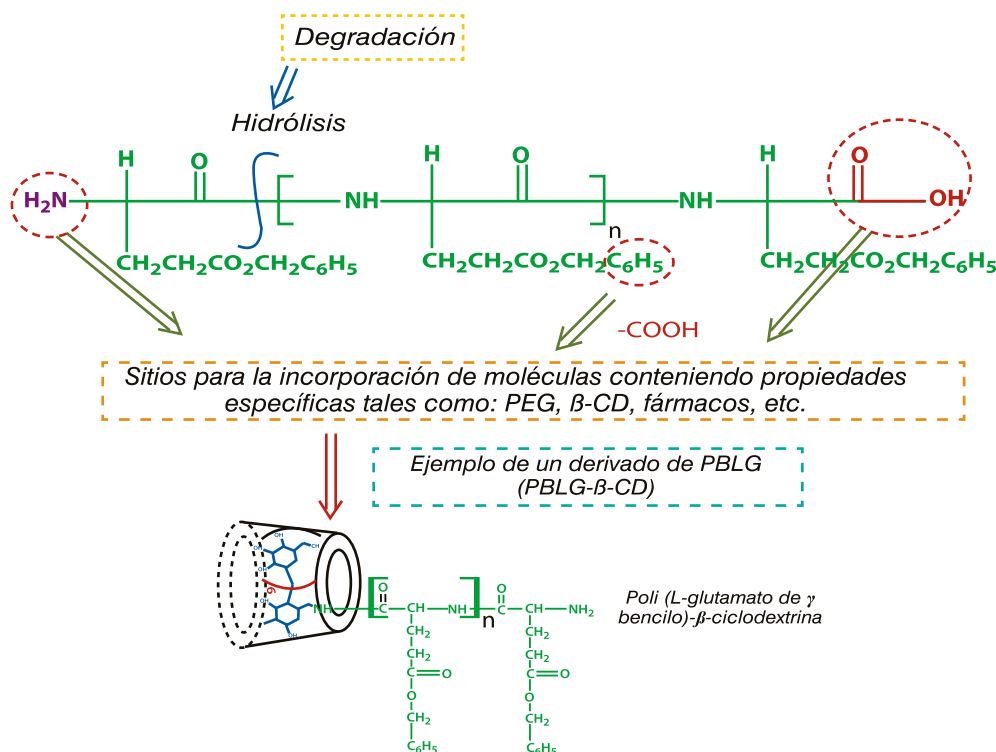


Figura 1. Estructura del PBLG y sus potencialidades.

Preparación de nanopartículas a base de derivados del PBLG

Las nanopartículas poliméricas fueron preparadas utilizando una modificación del método de nanoprecipitación (6,7). Brevemente, 5 mL de solución de polímero disuelto en THF se añadieron por goteo a 10 mL de una solución 0.125% m/v de Lutrol® F68. La mezcla fue posteriormente trasladada a un recipiente recubierto de Teflon® para evaporar el disolvente a 30 °C, bajo flujo de aire. Las nanopartículas fueron lavadas con 5 mL de agua Milli-Q y la evaporación se llevó a cabo hasta ajustar el volumen a 10 mL. Las nanopartículas se conservaron a 4 °C hasta su posterior caracterización.

Dispersión de luz

Para este estudio se analizaron las nanopartículas poliméricas en suspensión acuosa en dos equipos diferentes: 1) 3D LS Spectrometer (LS Instruments), en el cual para los 7 sistemas preparados se hicieron mediciones a un ángulo de dispersión de 90 grados analizando la función de correlación de intensidades a través de cumulantes (8,9), y mediante análisis con CONTIN, para la distribución de tamaños, 2) ALV-5000/E, en el cual fue analizada la muestra E1 con un arreglo de polarización VH en un intervalo angular de 30-75 grados con el fin de determinar anisotropía geométrica de la muestra analizada.

Microscopía electrónica de transmisión

Las nanopartículas se analizaron mediante MET, lo que nos permitió observar morfología y tamaño. Para ello: 5 µL de suspensión de nanopartículas fueron depositadas durante 5 minutos en una rejilla de cobre cubierta con

carbono-formvar. Posteriormente se retiró el exceso de la muestra y se realizó una tinción negativa agregando una gota de ácido fosfotúngstico al 1%. Se dejó secar la muestra a temperatura ambiente. Posteriormente la rejilla se conservó al vacío durante 12 horas. Las muestras fueron observadas a través de un microscopio electrónico de transmisión, JEOL 1400 (120 kV) o JEOL JEM-2010F (200kV).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Síntesis y caracterización de derivados del PBLG

En el presente trabajo se realizó la síntesis de una mini-biblioteca de derivados del poli(γ -bencil-L-glutamato), la cual incluye PBLG-Bz, PBLG- β -CD, PBLG-biotina, PBLG-PEG, y PBLG-PEG-biotina. En la tabla 1 se puede observar que se obtuvieron rendimientos entre el 70 y 80%. Dichas polimerizaciones fueron anteriormente publicadas entre el 70 y 98% de rendimiento (6). Esta disminución en el porcentaje de rendimiento puede atribuirse a una pérdida de producto al aumentar las etapas de purificación. En la tabla 2, se muestran los resultados obtenidos para la determinación del peso molecular de los diferentes derivados. Los espectros de RMN ¹H (en ppm) se presentan en la figura 2. Como ejemplo citamos aquí las señales para el PBLG-PEG: CH, 3.98; CH, 2.18–2.58; CH₂, 5.12; CH_{arom}, 7.26; CH₂PEG, 3.76. Los datos concuerdan con lo reportado en la literatura (6,10). El ligero corrimiento en ciertas señales es atribuido al cambio de solventes para el análisis, el cual permitió una mayor resolución en los espectros. El grado de polimerización del segmento del PBLG, en los derivados PBLG-PEG y PBLG-PEG-biotina, fue determinado por la relación entre las intensidades de los picos de los protones del metileno en la cadena de PEG, OCH₂CH₂, y de los protones del grupo bencílico de la cadena de PBLG,



COOCH₂C₆H₅. Sin embargo, como puede observarse en la tabla 2, no fue posible realizar la determinación de los pesos moleculares por RMN ¹H para los otros derivados del PBLG debido a que es difícil localizar las señales de las moléculas de iniciador por la presencia de otras señales en la misma región. Es importante mencionar que en el presente trabajo se logró la caracterización de estos derivados del PBLG por GPC/SEC. A diferencia del trabajo realizado anteriormente (6,10) donde se utilizó THF, los estudios del presente trabajo se realizaron en DMF con LiBr 0.05 M. En la tabla 2 se puede observar que para todos los casos se obtuvieron pesos moleculares muy cercanos a los pesos moleculares teóricos.

Tabla 2. Características de los polímeros obtenidos por polimerización por apertura de anillo del γ -BLG-NCA en DMF a 30°C.

Polímero	$Mw_{(exp)}$ RMN ^(a) (g mol ⁻¹)	$Mw_{(exp)}$ GPC/SEC ^(b) (g mol ⁻¹)	IP GPC/SEC
PBLG-Bz	-	26200	1.159
PBLG- β -CD	-	43900	1.193
PBLG-PEG	48200	59900	1.3
PBLG-PEG-Biotina	46250	45700	1.18
PBLG-Biotina	-	53500	1.205

(a) Caracterización en CDCl₃/TFA-d 85/15% v/v, equipo Bruker B-ACS 60 400 MHz. (b) Caracterización en LiBr 0.05 M en DMF, n=3, equipo de GPC/SEC 270 MAX-Malvern.

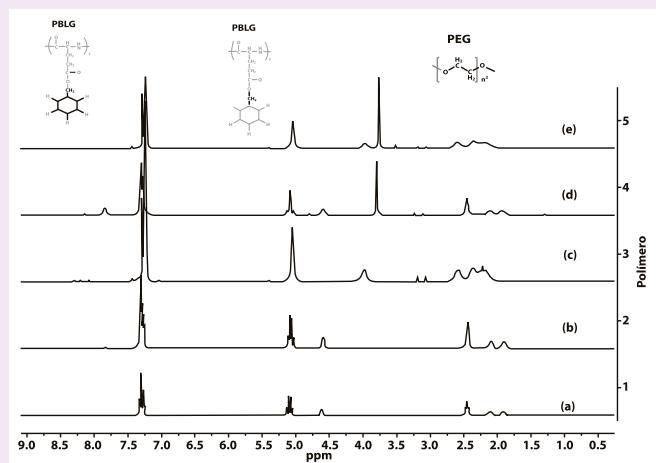


Figura 2. Espectros de RMN ¹H en CDCl₃/TFA-d 85/15% v/v para los polímeros (a) PBLG-Bz, (b) PBLG- β -CD, (c) PBLG-biotina, (d) PBLG-PEG-biotina, y (e) PBLG-PEG. Equipo Bruker ABS 60, 400 MHz.

Preparación y caracterización de nanopartículas a base de derivados del PBLG

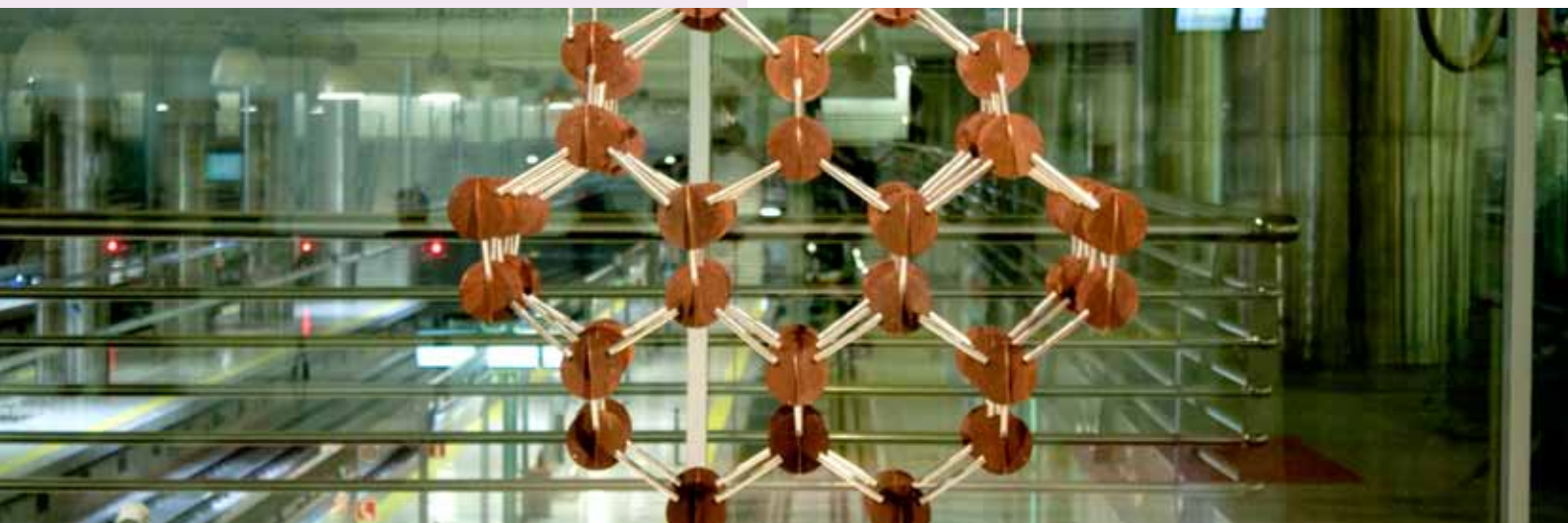
Se obtuvieron sistemas poliméricos nanoparticulados, simples y binarios, a partir de derivados del PBLG, utilizando la técnica de nanoprecipitación adaptada por Martínez Barbosa y col. (6). La composición de los sistemas preparados se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Composición de los sistemas de nanopartículas poliméricas de las diferentes formulaciones a base de derivados de PBLG.

Formulación	Composición
E1	PBLG- β -CD
E2	PBLG- β -CD/PBLG-PEG (70/30 % peso)
E3	PBLG- β -CD/PBLG-Biotina (70/30 % peso)
E4	PBLG-Bz
E5	PBLG- β -CD/PBLG-PEG-Biotina (70/30 % peso)
E6	PBLG-PEG
E7	PBLG-Biotina

Microscopía electrónica de transmisión y dispersión de luz

La técnica de dispersión de luz ha sido muy utilizada para caracterizar forma, tamaño y dinámica de nanopartículas de muy diversa naturaleza química. En el caso de nanopartículas de PBLG, recientemente esta técnica se ha usado para determinar su utilidad en la administración de fármacos orientada a hueso (11). Un aspecto central en la utilidad de estas nanopartículas



radica en el hecho de que para tener posibilidades de ser utilizadas como vectores para administrar fármacos y que no tenga restricciones por tamaño en llegar a los sitios deseados, su tamaño característico deberá estar en el intervalo de 20 – 50 nm.

Para la determinación de la distribución de tamaños, en el presente estudio, se utilizaron dos equipos diferentes. Los resultados para los tamaños característicos determinados en el equipo 3D LS Spectrometer se muestran en la tabla 4. Las distribuciones de tamaño obtenidas con el mismo equipo se presentan en la figura 3. Con el análisis CONTIN se determina la distribución de tamaños, la cual muestra una diferencia en el ancho de la distribución para los sistemas E1, E2 y E5, respecto al resto de los sistemas analizados. Debemos aclarar que los resultados de tamaño de nanopartículas por esta técnica, está basada en un modelo de esfera efectiva. Puede observarse que en todos los casos los tamaños están en el intervalo 20-50 nm, la cual es una característica buscada para su utilidad, como se señaló anteriormente.

Tabla 4. Diámetro de los sistemas preparados, determinados por MET (n=250) y DLS.

	Nanopartículas	Diámetro (nm) MET	IP MET	Diámetro (nm) DLS
E1	PBLG-β-CD	60 ± 11	0.186	63
E2	PBLG-β-CD/PBLG-PEG	54 ± 08	0.156	51
E3	PBLG-β-CD/PBLG-biotina	59 ± 13	0.216	62
E4	PBLG-Bz	75 ± 11	0.189	90
E5	PBLG-β-CD/PBLG-PEG-Biotina	41 ± 11	0.280	47
E6	PBLG-PEG	40 ± 06	0.153	45
E7	PBLG-biotina	72 ± 18	0.245	56

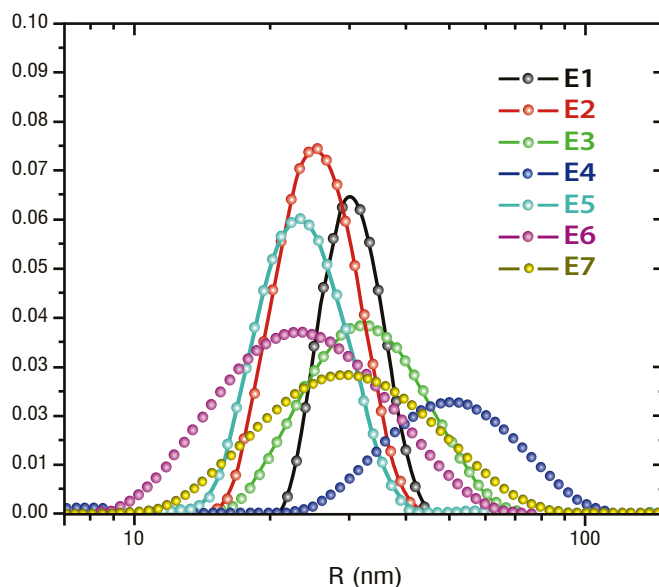


Figura 3. Distribución de tamaños para los sistemas E1 a E7, obtenidas con análisis CONTIN en el equipo 3D LS Spectrometer.

La característica fundamental que marca la diferencia entre los sistemas E1, E2, E3 y E5 (Tabla 3), con respecto al resto de los sistemas estudiados, es que contienen en su formulación β-ciclodextrina. Estudios recientes sobre sistemas nanoparticulados de PBLG han demostrado que tanto la composición de los sistemas (3,4), así como el peso molecular de los polímeros (5) tienen un efecto en la morfología y tamaño de los sistemas nanoparticulados. En la figura 3 podemos ver que los sistemas que contienen β-CD presentan un ancho de distribución de tamaños similar entre sí, a excepción del sistema E3, el cual además contiene PBLG-biotina. En las micrografías obtenidas por MET (Figura 5) podemos observar que los sistemas que contienen β-CD presentan una morfología cuasi-esférica, si los comparamos con el sistema preparado a base de

100% PBLG-Bz, el cual presenta una morfología tendiendo a elipsoidal prolata. Estos resultados son congruentes con lo anteriormente reportado (3,4). En la figura 5 podemos observar también, que el sistema E7, formulado de 100% PBLG-biotina, presenta la coexistencia de estas dos morfologías. En la tabla 4, se presentan los resultados del análisis estadístico de las micrografías de MET. Podemos observar que los sistemas E3 y E7 son los que presentan el más alto índice de polidispersidad, lo cual es concordante con los resultados obtenidos mostrados en la figura 3.

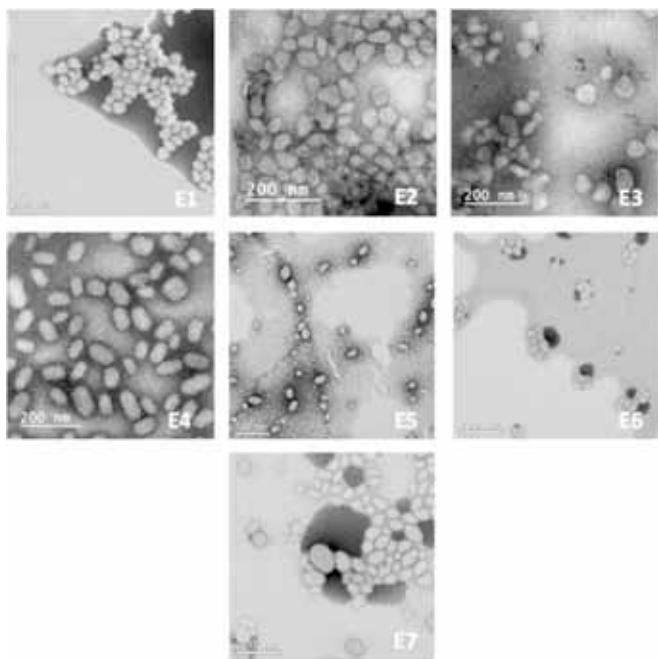


Figura 4. Micrografía de los sistemas nanoparticulados simples a base de: (E1) PBLG-β-CD, (E2) PBLG-β-CD/PBLG-PEG, (E3) PBLG-β-CD/PBLG-biotina, (E4) PBLG-Bz, (E5) PBLG-β-CD /PBLG-PEG-biotin, (E6) PBLG-PEG y (E7) PBLG-biotina.

Por otra parte, hablando de morfología de nanopartículas, la cual es un aspecto importante en la caracterización de este tipo de sistemas, ésta puede establecerse experimentalmente por dispersión estática de luz (SLS) o a través de dispersión de luz depolarizada (DDLS), además de microscopía electrónica de transmisión (MET). Como un ejemplo de aplicación de dispersión de luz depolarizada se utilizó el equipo ALV-5000/E para hacer mediciones con control de polarización de luz dispersada (arreglo VH) para la muestra E1. En este caso la función de correlación del campo eléctrico dispersado es expresada como (12).

$$g_{VH}^{(1)}(q,t) = \frac{\langle E^*(q,0)E(q,t) \rangle}{\langle E^2 \rangle} = e^{-\Gamma_{VH} t}$$

$$\text{con } \Gamma_{VH} = D_t q^2 + 6 D_r$$

donde, $q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin(\theta/2)$ siendo n el índice de refracción del solvente, λ la longitud de onda de la radiación incidente y θ el ángulo de dispersión. Además, D_t y D_r son los coeficientes de difusión traslacional y rotacional respectivamente.

Como podemos observar en la figura 4, el hecho de que los datos sean ajustables a una recta permiten, a través de la pendiente, obtener el coeficiente de difusión traslacional y el hecho de que prácticamente el corte con el eje esté muy cerca de cero, nos permite asegurar la no contribución del movimiento rotacional. Este coeficiente de difusión traslacional nos permite confirmar el radio hidrodinámico de las nanopartículas obteniendo $R = 30.89$ nm (o un diámetro $D = 61.78$ nm), el cual se encuentra dentro de la banda que cubre el ancho medio en la distribución de la figura 3.

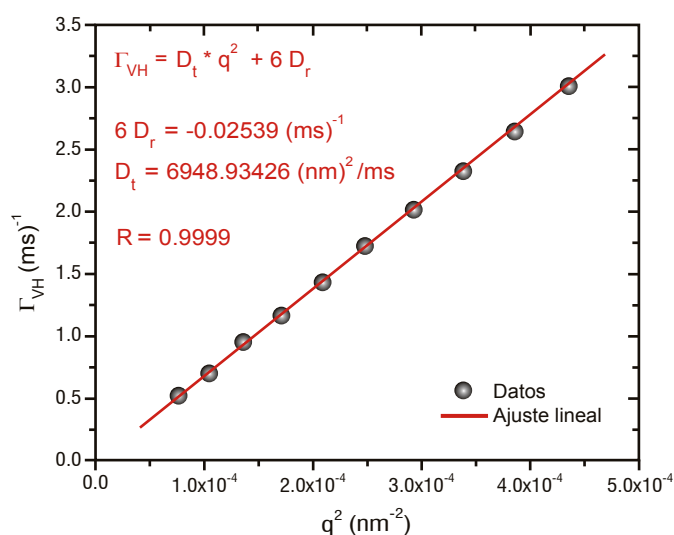


Figura 5. Comportamiento difusivo de las nanopartículas, para el sistema E1.

Estos estudios concuerdan con lo observado por MET para el sistema E1 y nos permiten abrir las puertas para contar con una técnica de caracterización de morfología de estos sistemas nanoparticulados, directamente en el medio de suspensión. Cabe resaltar que falta mucho por estudiar y comprender con respecto al efecto de la forma y tamaño de estos sistemas poliméricos en el organismo. Es por ello que es muy importante ampliar la diversidad de técnicas experimentales que nos permitan caracterizarlos y obtener información complementaria. En un trabajo futuro, se pretende caracterizar por esta técnica la contribución de la parte rotacional en la morfología de las nanopartículas de todos los sistemas preparados y su correlación con los resultados de MET.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una nueva minibiblioteca de derivados del PBLG y se prepararon nanopartículas poliméricas tanto para sistemas simples como binarios, los cuales contienen diferentes moléculas de interés biomédico. Las nanopartículas obtenidas presentan tamaños en el intervalo de 20-50 nm, como se requiere para aplicaciones en nanomedicina. Por otro lado, la utilización de dispersión de luz depolarizada (DDLDS) abre nuevas perspectivas que no solamente nos proporciona información estructural de las nanopartículas, sino además su comportamiento dinámico.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer el financiamiento obtenido a través del proyecto de CONACyT CB-2008-104931 y mediante el proyecto de la Red Temática de Colaboración Física de la Materia Blanda SEP/Promep, así como a la RED de la Materia Condensada Blanda (CONACyT) y a Fondos PIFI. Además al Dr. José Luis Arauz Lara del Laboratorio de Fluidos Complejos de la UASLP por permitirnos hacer uso sin restricciones del equipo de dispersión de luz, así como al Prof. Gilles Ponchel de la Facultad de Farmacia de la Universidad Paris Sud (UMR CNRS 8612) por el asesoramiento durante la estancia realizada para síntesis de polímeros. Agradecimientos también al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión de la Universidad de Sonora.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Elias, F. and Christine, V. (2013). Nanoparticles as Drug Delivery Systems. Encyclopedia of Pharmaceutical Science and Technology, Fourth Edition (Taylor and Francis), Vol. null, pp. 2272-2286.
- 2) Kumari, A., Yadav, S.K. and Yadav, S.C. (2010). Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 75(1):1-18.
- 3) Martínez Barbosa, M.E., Bouteiller, L., Cammas-Marion, S., Montembault, V., Fontaine, L. and Ponchel, G. (2008). Synthesis and ITC characterization of novel nanoparticles constituted by poly(γ -benzyl L-glutamate)-beta-cyclodextrin. Journal of Molecular Recognition 21(3):169-178.
- 4) Martínez-Barbosa, M.E., Cammas-Marion, S., Bouteiller, L., Vauthier, C. and Ponchel, G. (2009). PEGylated degradable composite nanoparticles based on mixtures of PEG-b-poly(γ -benzyl L-glutamate) and poly(γ -benzyl L-glutamate). Bioconjugate Chemistry 20(8):1490-1496.
- 5) Cauchois, O., Segura-Sanchez, F. and Ponchel, G. (2013). Molecular weight controls the elongation of oblate-shaped degradable poly(γ -benzyl-L-glutamate) nanoparticles. International Journal of Pharmaceutics 452(12):292-299.
- 6) Martínez Barbosa, M.E., Montembault, V., Cammas-Marion, S., Ponchel, G. and Fontaine, L. (2007). Synthesis and characterization of novel poly(γ -benzyl-L-glutamate) derivatives tailored for the preparation of nanoparticles of pharmaceutical interest. Polymer International 56(3):317-324.
- 7) Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J.P. and Puisieux, F. (1997). Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: Influence

of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. International Journal of Pharmaceutics 146(2):233-238.

- 8) Dhont, J.K.G. (1996). An Introduction to Dynamics of Colloids. Elsevier Science B.V.
- 9) Scharl, W. (2007). Light Scattering from Polymer Solutions and Nanoparticle Dispersions. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- 10) Segura-Sánchez, F. et al. (2010). Synthesis and characterization of functionalized poly(γ -benzyl-L-glutamate) derivatives and corresponding nanoparticles preparation and characterization. International Journal of Pharmaceutics 387(1-2):9-9.
- 11) Özcan, İ. et al. (2011). Synthesis and characterization of surface-modified PBLG nanoparticles for bone targeting: In vitro and in vivo evaluations. Journal of Pharmaceutical Sciences 100(11):4877-4887.
- 12) Bruce, J., Berne, R.P. (1976). Dynamic Light Scattering: with applications to chemistry, Biology, and Physics. John Wiley and Sons, New York.

