

Potencial bioadhesivo de las nanopartículas de gliadina en el estómago

Miguel Angel Arangoa, Miguel Angel Campanero, Juan M. Irache*

Resumen

El objetivo fue evaluar el potencial bioadhesivo de las nanopartículas de gliadina, convencionales (NP) o reticuladas con glutaraldehído (CL-NP), tras su administración oral en animales de laboratorio. Las nanopartículas se prepararon por un proceso de desolvatación y utilizando carbazol como marcador fluorescente. El procedimiento permitió obtener nanopartículas de 450 nm y un contenido de 12,5 μg carbazol/mg. Por vía oral, las nanopartículas mostraron un tropismo por las zonas superiores del tracto gastrointestinal, principalmente la mucosa del estómago. Esta capacidad adhesiva se puede explicar por el elevado contenido en residuos neutros y apolares que contiene la gliadina y que permiten, respectivamente, el desarrollo de interacciones por puente de hidrógeno e hidrofóbicas. Dentro del estómago la cantidad de nanopartículas adheridas a la región glandular fue siempre significativamente menor que la fracción adherida a la zona no glandular. En esta, CL-NP mostraba una intensidad adhesiva (AUC_{adh}) un 50% superior a NP y un tiempo medio de residencia de la fracción adherida de aproximadamente 95 min mayor que para NP. Las fuertes interacciones adhesivas de las nanopartículas de gliadina desarrolladas con la mucosa del estómago pueden ser de interés para el tratamiento de patologías localizadas en esta región como la erradicación de *Helicobacter pylori*.

Palabras clave: bioadhesión, estómago, gliadina, nanopartículas, vía oral.

Summary

Bioadhesive potential of gliadin nanoparticles in the stomach

The aim was to evaluate the bioadhesive potential of gliadin nanoparticles, either non-hardened (NP) or cross-linked with glutaraldehyde (CL-NP), after their oral administration to laboratory animals. Nanoparticles were prepared by a desolvation method and using carbazol as fluorescent marker. This method enabled us to obtain nanoparticles of about 450 nm and a carbazol loading of 12.5 $\mu\text{g}/\text{mg}$. These carriers showed a great tropism for the upper gastrointestinal regions, mainly the stomach mucosa. This adhesive capacity may be explained by the gliadin composition with a high content in neutral and lipophilic residues. Neutral amino acids may promote hydrogen bonding interactions with the mucosa, while the lipophilic components may develop hydrophobic interactions with the biological support. Within the stomach, the amount of adhered nanoparticles to the glandular region was always significantly lower than to the non-glandular area. In this last region, CL-NP displayed a 1.5-times higher adhesive intensity than NP. Similarly, the mean residence time of the adhered fraction to the stomach mucosa was about 95 min higher for CL-NP than for NP. The strong bioadhesive interactions of gliadin nanoparticles with the stomach may be of interest for the treatment of local pathologies such as the eradication of *Helicobacter pylori* infections.

Key words: bioadhesion, stomach, gliadin, nanoparticles, oral route.

Recibido para evaluación: 4 de febrero de 2004
Aceptado para publicación: 20 de mayo de 2004

* Centro Galénico, Facultad de Farmacia, Universidad de Navarra, 31080 – Pamplona (España).
E-mail: jmirache@unav.es

Introducción

La vía oral es la forma más aceptada de administración de medicamentos tanto para el paciente como para el personal sanitario. Sin embargo, la eficacia de numerosos fármacos cuando son administrados por esta vía es bastante mediocre. Entre los factores que pueden condicionar la eficacia y/o biodisponibilidad oral de un fármaco se puede destacar el tiempo de residencia de la forma farmacéutica en las diferentes regiones del tracto gastrointestinal, una baja o parcial solubilidad del compuesto activo en los fluidos gastrointestinales (caso de fármacos lipófilos), una baja o restringida permeabilidad para atravesar la mucosa (caso de fármacos de naturaleza hidrófila) y la presencia de enzimas y de condiciones físico-químicas desfavorables que puedan inducir la degradación del fármaco.

Una estrategia para prolongar el tiempo de residencia del fármaco en contacto con su lugar de acción o absorción puede ser el uso de sistemas de liberación adhesivos (1, 2). Estos sistemas tienen que ser capaces de aumentar el tiempo de contacto con la mucosa y permitir el establecimiento de un gradiente de concentración de fármaco entre la forma farmacéutica y el soporte biológico (3, 4). El establecimiento de dicho gradiente permite incrementar de manera significativa la cantidad de fármaco capaz de absorberse o de ejercer su acción en el lugar donde se encuentra inmovilizada la forma farmacéutica. Por ello, el objetivo principal de las formas farmacéuticas adhesivas es el de aumentar la biodisponibilidad oral y la eficacia de los fármacos (2, 4, 6). En este contexto, el uso de micropartículas y nanopartículas parece ser una buena aproximación para solventar problemas relacionados con la baja biodisponibilidad oral de numerosos fármacos. Al comparar estas formas microscópicas con las convencionales (comprimidos, cápsulas y microgránulos), se deduce que la mayor superficie específica de las primeras facilita el desarrollo

de interacciones adhesivas con los componentes de la mucosa. Además, las fuerzas hidromecánicas de aclaramiento del tracto gastrointestinal (peristaltismo, presencia de líquidos) tienen una menor eficacia al disminuir el tamaño de la forma farmacéutica (6).

Cuando las micro- y nanopartículas se administran por vía oral, bajo forma de suspensión, difunden en el medio y pueden ser inmovilizadas en la superficie intestinal por un mecanismo de adhesión, que se conoce bajo el nombre de bioadhesión (4). Mas específicamente, cuando la adhesión está restringida a la capa de mucus que recubre la superficie de la mucosa, se emplea también el término mucoadhesión (7). Sin embargo, en muchos casos, la localización exacta de las partículas en la superficie de la mucosa no es conocida con exactitud; aunque, las partículas más pequeñas pueden penetrar a través de la capa de mucus (8) y, así, alcanzar el epitelio de la mucosa.

El fenómeno de interacción adhesiva entre las partículas y componentes de la mucosa gastrointestinal ha sido corroborado en diferentes estudios. Así, aumentos considerables en el tiempo de tránsito de la forma farmacéutica a lo largo del tracto han sido observados con micropartículas del copolímero de ácido fumárico y anhídrido sebáico (9), micropartículas de ácido poliláctico (10), microesferas de carboxivinilo y ésteres de ácidos grasos y poliglicerol (11), nanopartículas de poli(hexilcianoacrilato) (12), nanopartículas de poli(metilmecacrilato) (13) y nanopartículas del copolímero de metilviniléter y anhídrido maleico (14). Por otra parte, en numerosos casos también se ha podido demostrar el efecto de estos transportadores en el incremento de la biodisponibilidad oral y/o la eficacia de numerosos fármacos, incluyendo ciertos anticancerosos (15, 16), antígenos para vacunación (17) e, incluso, plásmidos de ADN (18).

En este trabajo, se prepararon nanopartículas de gliadina. Gliadina es un grupo de proteínas

extraído del gluten de trigo mediante tratamiento directo de un extracto crudo con etanol 70% (19). Estas proteínas son polimórficas y pueden ser clasificadas, en función de su movilidad electroforética, en 4 fracciones: alfa-, beta-, gamma- y omega-gliadinas (20). La composición en aminoácidos muestra que gliadina posee cantidades importantes de residuos apolares y neutros, principalmente glutamina (alrededor del 40%) (20), elevado contenido en prolina (14%) y una baja proporción en aminoácidos cargados (21). En un estudio previo se demostró que las nanopartículas de gliadina tenían una capacidad adhesiva importante (22). Por vía oral, estos transportadores eran capaces de aumentar la biodisponibilidad oral del carbazol (utilizado como modelo de fármaco de naturaleza hidrofóbica) y de permitir niveles plasmáticos sostenidos durante algunas horas. Además, se pudo demostrar que estos efectos farmacocinéticos estaban directamente relacionados con la adhesión de las nanopartículas por la mucosa del estómago (23).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el comportamiento y potencial bioadhesivo de las nanopartículas de gliadina en el tracto gastrointestinal, especialmente en el estómago. Para ello, nanopartículas convencionales y reticuladas conteniendo carbazol (como modelo de fármaco de naturaleza lipófila) fueron administradas por vía oral a animales de laboratorio.

Metodología

Materiales

Glutaraldehído grado II (25% solución acuosa), gliadina cruda, ácido trifluoroacético (AFT) y Pluronic F-68 fueron obtenidos de Sigma (Madrid, España). Carbazol fue suministrado por Aldrich (España). Todos los demás reactivos fueron de calidad "Reagent" y obtenidos de Merck (Germany).

Extracción y purificación de la gliadina

La gliadina usada para la preparación de las nanopartículas fue extraída y purificada desde un extracto crudo (Sigma). En primer lugar, el extracto se dispersó bajo agitación en una solución hidroalcohólica 70% a temperatura ambiente durante 24 h. La suspensión se centrifugó durante 30 min a 45.500 g (centrífuga Sorvall RC 5C, USA) y los sobrenadantes se dializaron contra agua durante 15 min y, posteriormente, frente ácido acético 0,05 M durante 24 h. La solución resultante se liofilizó (Virtis Genesis 12 EL, USA). El análisis de la gliadina extraída se realizó por electroforesis capilar de alta resolución (24) y HPLC en fase reversa (25). Las proporciones de las diferentes fracciones de gliadina fueron: omega-gliadina (10% p/p), alfa- y beta-gliadinas (52% p/p) y gamma-gliadina (37,5% p/p).

Preparación de las nanopartículas

Las nanopartículas de gliadina se prepararon por un procedimiento de desolvatación descrito anteriormente (22, 26). Brevemente, 100 mg del extracto proteico purificado de gliadina y 4,5 mg de carbazol se disolvieron en 20 mL de una mezcla hidroalcohólica (etanol: agua 7:3 en vol.). Esta solución se añadió a una solución salina (NaCl 0,9% p/v), bajo agitación, de Pluronic F-68 (0,5 % p/v). Posteriormente, el etanol se eliminó en un rotavapor (Büchi R-144, Suiza) y las nanopartículas (NP) se purificaron por centrifugación a 20.000 g durante 15 min (Sorvall RC, 5C, USA). El sobrenadante se eliminó mientras que el precipitado se dispersó en agua y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Finalmente, las nanopartículas se dispersaron en una solución acuosa de sacarosa al 5% p/v y se liofilizaron.

Algunos lotes de nanopartículas se reticularon mediante la adición de 2 mg de glutaraldehído por mg de nanopartícula y posterior incubación durante 2 h a temperatura ambiente.

Posteriormente, las nanopartículas reticuladas (CL-NP) se purificaron y liofilizaron como se ha descrito anteriormente.

Caracterización fisicoquímica de las nanopartículas

El tamaño de las partículas y su potencial zeta se determinaron en un aparato Zetamaster (Malvern Inst., UK). Para ello las muestras se dispersaron previamente en una solución de 10^{-4} M de HCl (pH = 4).

La cantidad de gliadina transformada en nanopartículas se estimó por HPLC (26). Para ello, una muestra de las nanopartículas purificadas se centrifugó (20,000 g, 15 min) y el residuo se disolvió en una mezcla de acetonitrilo y agua (7:3 en vol.) conteniendo 0,2% de AFT. Posteriormente, las soluciones se inyectaron en el HPLC.

La cantidad de marcador fluorescente (carbazol) asociada a las nanopartículas se determinó en un espectrofluorímetro LS 50 (Perkin Elmer, USA) a λ excitación de 290 nm y λ emisión de 356 nm. Para ello, el carbazol se extrajo previamente de una cantidad conocida de nanopartículas tras tratamiento con una solución hidroalcohólica (70% etanol).

Distribución de las nanopartículas de gliadina en la mucosa del tracto gastrointestinal

Estos estudios, aprobados por el Comité Ético responsable de la Universidad de Navarra, se realizaron usando protocolos descritos anteriormente (23). Para ello los animales utilizados se mantuvieron, trataron y manipularon de acuerdo con las normas y regulaciones estipuladas por la directiva europea 86/609. Ratas Wistar macho (peso medio de 220 g) fueron suministradas por CIFA (Universidad de Navarra, España) y se colocaron en jaulas

metabólicas. Durante la noche previa al experimento, se les retiró la comida pero se mantuvo el acceso libre al agua de bebida.

Las nanopartículas liofilizadas se dispersaron en agua y 0,5 mL de las suspensiones resultantes, conteniendo 20 ó 30 mg nanopartículas (91 o 136 mg/kg de peso), se administraron por vía oral a los animales. A diferentes tiempos, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical. Inmediatamente después, el tracto gastrointestinal se recogió y dividió en 3 regiones anatómicas: estómago, intestino delgado y ciego. Cada porción de la mucosa se abrió a lo largo del mesenterio y se lavó cuidadosamente con 20-40 mL de solución salina para eliminar la fracción de nanopartículas no adherida a la mucosa. El intestino delgado se dividió en porciones de 14 cm (I1 a I6) y, junto con el ciego, se cortaron en segmentos de aproximadamente 2 cm mientras que el estómago de los animales se cortó en 2 porciones para distinguir las zonas glandular y no glandular. Todos estos segmentos se digirieron en NaOH 3M durante 24 h. Finalmente, el carbazol se extrajo mediante la adición a cada muestra de 1,5 mL de metanol y posterior centrifugación a 20.000 g durante 10 min. Las soluciones metanólicas se valoraron por espectrofluorimetría.

Para cada tipo de muestra, la curva de calibración del carbazol se estableció entre 10 y 500 ng/mL en su correspondiente medio biológico.

Parámetros de bioadhesión

La curva de adhesión de cada formulación se obtuvo al representar la fracción adherida frente al tiempo. A partir de esta curva se estimaron los siguientes parámetros de bioadhesión: AUC_{adh} , k_{adh} y MRT_{adh} (14, 23). k_{adh} representa la velocidad de eliminación de la fracción adherida y se calculó con ayuda del programa WinNonlin versión 1.5 (Scientific Consulting, Inc.). AUC_{adh} o área bajo la curva obtenida al representar la

fracción adherida frente al tiempo (expresada en forma de cantidad de marcador adherido con respecto al tiempo), se evaluó por el método de trapecios hasta t_z (el último punto de muestreo), y permite cuantificar la intensidad del fenómeno bioadhesivo. Finalmente, MRT_{adh} es el tiempo medio de residencia de la fracción adherida de nanopartículas y permite evaluar la duración relativa de las interacciones adhesivas, tomando como límite el último punto de muestreo.

Análisis estadístico

Las diferencias en las medias se analizaron utilizando el test t-de Student. La prueba de Mann-Whitney se utilizó para evaluar diferencias entre parámetros de bioadhesión. En todos los casos, diferencias con $p < 0,05$ se consideraron significativas.

Resultados

Caracterización de las nanopartículas de gliadina

La Tabla 1 recoge las principales características físico-químicas de las nanopartículas descritas en este estudio. Ambas formulaciones, nanopartículas convencionales (NP) y reticuladas (CL-NP) mostraban valores similares en cuanto a su tamaño (cercano a los 450 nm), rendimiento de fabricación (superior al 85% de la proteína inicial

transformada en nanopartícula) y contenido en carbazol (12,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ nanopartícula) ($p < 0,01$). Por otra parte, aunque ambas formulaciones presentaban un carga superficial positiva, ésta era significativamente menor cuando las nanopartículas estaban reticuladas con glutaraldehído ($p < 0,05$).

Distribución de las nanopartículas en la mucosa del tracto gastrointestinal

La cantidad de nanopartículas adheridas a la mucosa gastrointestinal se calculó desde los datos que cuantificaban la cantidad de marcador fluorescente encontrado en cada uno de los segmentos del tracto gastrointestinal (23).

La Figura 1 muestra el perfil bioadhesivo de NP en el tracto gastrointestinal tras la administración oral de una dosis de 30 mg. Treinta minutos después de su administración, alrededor del 25% de la dosis inicial se encontraba adherida a la mucosa del tracto gastrointestinal. Sin embargo, más del 80% de esa fracción adherida se localizaba en el estómago del animal. Este perfil bioadhesivo no variaba con el tiempo; aunque, 1 hora después de la administración de las nanopartículas, sólo el 8% de la dosis inicial podía todavía encontrarse en el estómago. Tres horas después el porcentaje era del 4%. En todos los casos la presencia de nanopartículas adheridas a la mucosa del intestino o del ciego era despreciable. Por otra parte, la

Tabla 1. Características físico-químicas de las nanopartículas de gliadina utilizadas en este estudio. NP: nanopartículas convencionales; CL-NP: nanopartículas reticuladas. Los datos expresan media \pm desviación típica ($n=6$).

	Tamaño (nm)	Potencial zeta (mV)	Rendimiento (%)	Carbazol encapsulado ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
NP	460 \pm 19	27.5 \pm 0.8	89.6 \pm 4.5	12.57 \pm 1.23
CL-NP	453 \pm 24	24.5 \pm 0.5	86.8 \pm 5.7	12.23 \pm 0.78

reticulación de las nanopartículas no modificaba de manera apreciable el perfil bioadhesivo ni el tropismo de estos transportadores por la mucosa del estómago (no mostrado).

Bioadhesión en el estómago

La Figura 2 muestra la evolución de la fracción de nanopartículas adheridas en las regiones glandular y no glandular del estómago para las nanopartículas convencionales (NP) y las reticuladas (CL-NP). En ambos casos, la fracción inicial de nanopartículas adheridas a la zona no glandular del estómago era significativamente mayor que en la zona glandular ($p < 0,01$). Por otro lado, la reticulación de las nanopartículas de gliadina conduce a una menor capacidad de los transportadores resultantes para desarrollar interacciones bioadhesivas con la mucosa del estómago ($p < 0,05$); aunque la fracción de nanopartículas adheridas a la mucosa disminuye más rápidamente con las convencionales que con las reticuladas (Figuras 2A y 2B).

La Tabla 2 recoge los parámetros de bioadhesión. En la región glandular del estómago no existen claras diferencias entre los parámetros obtenidos para las dos tipos de nanopartículas.

Ambas formulaciones muestran parámetros similares salvo la velocidad de eliminación de CL-NP que es significativamente menor que para NP ($p < 0,01$). Sin embargo, al comparar la capacidad adhesiva de las dos formulaciones en la zona no glandular, se puede observar como las diferencias entre ambas formulaciones se hacen más drásticas. Así, la velocidad de eliminación de la fracción adherida de NP es dos veces mayor que para CL-NP. Por otra parte, en esta región, CL-NP

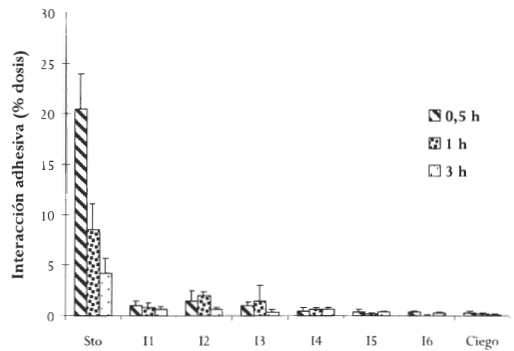


Figura 1. Perfil bioadhesivo de las nanopartículas de gliadina (NP), tras la administración oral simple de 30 mg. Sto: estómago, I: porciones intestinales. Los resultados están expresados como el % de la dosis dada y representados como la media ± SD (n=6).

Tabla 2. Parámetros de bioadhesión. k_{adh} : velocidad de eliminación de la fracción adherida; AUC_{adh} : área bajo la curva de bioadhesión; MRT_{adh} : tiempo medio de residencia de la fracción adherida a la mucosa. Las estimaciones de estos parámetros se realizaron con el programa farmacocinético WinNonlin version 1.5 (Scientific Consulting, Inc.).

		k_{adh} (h-1)	AUC_{adh} (μg h)	MRT_{adh} (min)
Zona Glándular	NP	$0,581 \pm 0,001$	$17,4 \pm 1,2$	$65,5 \pm 0,1$
	CL-NP	$0,516 \pm 0,003$	$23,9 \pm 5,2$	$66,2 + 1,1$
Zona No Glandular	NP	$0,771 \pm 0,007$	$35,5 \pm 7,9$	$56,9 \pm 1,2$
	CL-NP	$0,327 \pm 0,021$	$51,6 \pm 10,1$	$77,6 \pm 2,3$

presentó una intensidad adhesiva (AUC_{adh}) superior en un 50% a NP y un tiempo medio de residencia de la fracción adherida de aproximadamente 20 min más largo que para NP.

Discusión

Las nanopartículas de gliadina se obtuvieron por desolvatación controlada y, eventualmente, reticulación con glutaraldehído. Esta etapa suplementaria en el proceso de fabricación no afecta significativamente al tamaño ni a la cantidad de marcador fluorescente encapsulado. Sin embargo, la reticulación si modifica el potencial zeta de las partículas resultantes (tabla 1).

En relación con el potencial bioadhesivo, la Figura 1 muestra como estas partículas parecen no ser capaces de desarrollar interacciones adhesivas más allá del estómago. Este resultado puede explicarse, al menos en parte, por la naturaleza proteica de estos transportadores. Así, su ingestión daría lugar al desencadenamiento del fenómeno de la digestión, como ocurre con la administración de nutrientes líquidos (27) y,

como consecuencia, a un retraso considerable en el vaciado gástrico.

Por lo que respecta a las interacciones adhesivas observadas para las nanopartículas de gliadina, estas pueden ser debidas al desarrollo de puentes de hidrógeno entre los grupos amino de la glutamina (alrededor del 40% de la composición en aminoácidos de la gliadina) (20), y grupos polares de la mucosa. De igual manera, interacciones similares han sido propuestas para explicar la fuerte capacidad adhesiva de micropartículas del copolímero de ácido fumárico y anhídrido sebáico en la mucosa gastrointestinal (9) o de las nanopartículas de poli(N-isopropilacrilamida) (28). Sin embargo, en nuestro caso, gliadina también posee una importante cantidad de aminoácidos apolares (21) que pueden ser usados para el desarrollo de uniones hidrofóbicas con dominios hidrofóbicos de la mucosa (29). Además, la baja proporción de aminoácidos cargados en gliadina (22) y el bajo potencial zeta de estas partículas (ver Tabla 1) hacen difícil suponer que la capacidad adhesiva de las nanopartículas pueda ser debida a interacciones de tipo iónico, tal como han sido descrito para las microesferas de quitosano (30).

La reticulación de las nanopartículas de gliadina con glutaraldehído influenciaba tanto la estabilidad de los transportadores obtenidos como su adhesividad en el tracto gastrointestinal. Es conocido el aumento de la estabilidad de las partículas proteicas cuando se tratan con agentes reticulantes. Este efecto se ha observado para nanopartículas de albúmina (31, 32). En nuestro caso, las diferencias entre las cantidades de NP y CL-NP localizadas en el estómago (Figura 2), parecen indicar que la reticulación de las nanopartículas incrementa su estabilidad dentro del tracto gastrointestinal. Sin embargo, la cantidad de transportadores adheridos a la mucosa disminuye al tratar las nanopartículas con glutaraldehído (Figura 2). En realidad, esta molécula posee dos grupos

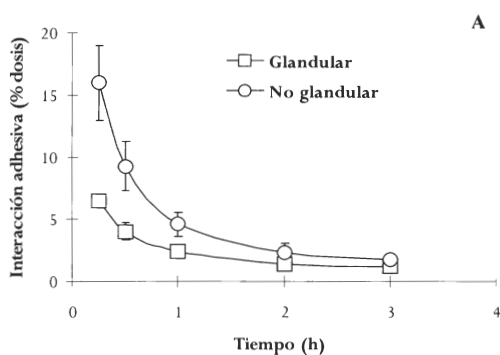


Figura 2. Curva de bioadhesión para NP (A) y CL-NP (B) en las zonas no glandular y glandular del estómago, tras la administración oral de 20 mg nanopartículas. Los resultados están expresados como el % de la dosis administrada y representados como la media \pm SD ($n=6$).

aldehído que pueden reaccionar con grupos amina libre, principalmente residuos de Lys (33), localizados en la superficie de las nanopartículas. Esta reacción consumiría los residuos aminados que pudiera haber en la superficie de las nanopartículas y, de esta forma, disminuiría el número de grupos polares capaces de desarrollar puentes de hidrógeno con componentes de la mucosa.

En relación con la adhesión de las nanopartículas en el estómago, el porcentaje de dosis encontrada adherida fue siempre mayor en la zona no glandular que en la región glandular; aunque este fenómeno es más importante para NP que para CL-NP (Figura 2). La región glandular es opaca y muestra muchos pliegues donde se localizan las glándulas digestivas, mientras que la no glandular es transparente, blanquecina y no hay presencia de glándulas digestivas (34). El análisis de las curvas de bioadhesión y el cálculo de los parámetros permite concluir que el comportamiento de las nanopartículas en la zona glandular era bastante similar con pocas diferencias en cuanto a su velocidad de eliminación, intensidad de las interacciones adhesivas y tiempo de residencia (Tabla 2). Sin embargo, en la región no glandular, la intensidad de las interacciones adhesivas (expresada como AUC_{adh}) y la duración de estas (MRT_{adh}) para CL-NP son significativamente mayores que para NP ($p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente). Esto se confirma con el resultado de una mayor velocidad de eliminación de la fracción adherida de NP respecto a CL-NP.

La eliminación de las nanopartículas desde la mucosa estomacal puede explicarse por la digestión de las partículas y/o su desorción debida al recambio del mucus que recubre la mucosa del estómago. En el caso de las partículas adheridas a la región glandular, parece plausible pensar que el fenómeno principal de eliminación sería en todos los casos la degradación por su proximidad

a las glándulas digestivas. Sin embargo, en la región no glandular del estómago, la digestión sería el principal mecanismo de eliminación de NP, mientras que el fenómeno de desorción lo sería para CL-NP. La mayor estabilidad de esta formulación proporcionaría una residencia más prolongada en el tiempo. Además, las velocidades de eliminación calculadas para las nanopartículas adheridas en la mucosa (Tabla 2) muestran que NP desaparece más rápidamente que CL-NP. Esto podría ser considerado una evidencia del efecto de la reticulación en las nanopartículas.

En conclusión, nanopartículas de gliadina convencionales o reticuladas muestran una gran capacidad para desarrollar fuertes interacciones bioadhesivas con la mucosa estomacal, especialmente en la zona no glandular. El grado de reticulación de estos transportadores puede ser una herramienta importante para modular la permanencia de las nanopartículas de gliadina en el estómago. Finalmente, el tropismo de estas formulaciones por el estómago puede ser interesante para el desarrollo de nuevos tratamientos de patologías asociadas a este órgano como las úlceras o la erradicación de *Helicobacter pylori*.

Agradecimientos

El Dr. Arango agradece al Ministerio de Educación en España la beca predoctoral recibida que le permitió realizar estos estudios.

Referencias

1. K. Park y R. Robinson, Bioadhesive polymers as platforms for oral controlled drug delivery: method to study bioadhesion. *Int. J. Pharm.*, **19**, 107 (1984).
2. J.M. Gu, J.R. Robinson y H.S. Leung, Binding of acrylic polymers to mucin-epithelial surfaces. Structure/property relationship,

- Crit. Rev. Therp. Drug Carrier Syst.*, **5**, 21 (1998).
3. C.M. Lehr, Bioadhesion technologies for the delivery of peptide and protein drugs to the gastrointestinal tract. *Crit. Rev. Therp. Drug Carrier Syst.*, **11**, 119 (1994).
 4. D. Duchêne y G. Ponchel, Bioadhesion: A new pharmacotechnical method for improving therapeutic efficiency, *STP Pharma.*, **5**, 830 (1989).
 5. H.S. Ch'ng, H. Park, P. Kelly y R. Robinson, Bioadhesion polymers as platform for oral controlled drug delivery II: Synthesis and evaluation of some swelling, water insoluble bioadhesive polymers, *J. Pharm. Sci.*, **74**, 399 (1985).
 6. G. Ponchel y J.M. Irache, Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract, *Adv. Drug Del. Rev.*, **34**, 191 (1998).
 7. H.E. Junginger, Mucoadhesive hydrogels, *Pharm. Ind.*, **53**, 1056 (1991).
 8. C. Durrer, J.M. Irache, F. Puisieux, D. Duchêne y G. Ponchel, Mucoadhesion of latexes. II. Adsorption isotherms and desorption studies, *Pharm. Res.*, **11**, 680 (1994).
 9. D.E. Chickering III, J.S. Jacob, T.A. Desai, M. Harrison, W.P. Harris, C.N. Morrell, P. Chaturvedi y E. Mathiowitz, Bioadhesive microspheres: III. An *in vivo* transit and bioavailability study of drug-loaded alginate and poly (fumaric-co-sebacic anhydride) microspheres, *J. Controlled Release*, **48**, 35 (1997).
 10. G. Ponchel, M.J. Montisci, A. Dembri, C. Durrer y D. Duchêne, Mucoadhesion of colloidal particulate systems in the gastrointestinal tract, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **44**, 25 (1997).
 11. Y. Akiyama, N. Nagahara, E. Nara, M. Kitano, S. Iwasa, I. Yamamoto, J. Azuma e Y. Ogawa, Evaluation of oral mucoadhesive microspheres in man on the basis of the pharmacokinetics of furosemide and riboflavin, compounds with limited gastrointestinal absorption sites, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50**, 159 (1998).
 12. J. Kreuter, Peroral administration of nanoparticles, *Adv. Drug Del. Rev.*, **7**, 71 (1991).
 13. L. Araujo, M. Sheppard, R. Löbenberg y J. Kreuter, Uptake of PMMA nanoparticles from the gastrointestinal tract after oral administration to rats: modification of the body distribution after suspension in surfactant solutions and an oil vehicles, *Int. J. Pharm.*, **176**, 209 (1999).
 14. P. Arbós, M.A. Campanero, M.A. Arangoa, M.J. Renedo y J.M. Irache, Influence of the surface characteristics of PVM/MA nanoparticles on their bioadhesive properties, *J. Controlled Release*, **89**, 19 (2003)
 15. P. Maincet, R. Le Verge, P. Sado, P. Couvreur y J.P. Devissaguet, Disposition kinetics and oral bioavailability of vincamin-loaded polyalkylcyanoacrylate nanoparticles, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 955 (1986).
 16. P. Arbós, M.A. Campanero, M.A. Arangoa y J.M. Irache, Nanoparticles with specific bioadhesive properties to circumvent the pre-systemic degradation of fluorinated pyrimidines, *J. Controlled Release* (en prensa)
 17. M. Murillo, M.J. Grilló, J. Reñé, C.M. Marín, M. Barberán, M.M. Goñi, J.M. Blasco, J.M. Irache y C. Gamazo, A *Brucella ovis* antigenic complex bearing poly- ϵ -caprolactone microparticles confer protection against experimental brucellosis in mice, *Vaccine*, **19**, 4099 (2001)
 18. E. Mathiowitz, J.S. Jacob, J.Y. Jong, G.P. Carino, D.E. Chickering, P. Chaturvedi, C.A. Santos, K. Vijayaraghavan, S. Montgomery, M. Basset y C. Morrell, Biologically erodable microspheres as potential oral drug delivery systems, *Nature*, **386**, 411 (1997).

19. D.D. Kasarda, Structure and properties of α -gliadins, *Ann. Technol. Agric.*, **29**, 151 (1980).
20. M. Byers, J. Mifflin y S.J. Smith, A quantitative comparison of the extraction of protein fractions from wheat grain by different solvents, and of the polypeptide and amino acid composition of the alcohol-soluble proteins, *J. Sci. Food Agric.*, **34**, 447 (1983).
21. D.D. Kasarda, J.C. Autran, E.J.L. Lew, C.C. Nimmo y P.R. Shewry, N-terminal amino acid sequences of ω -gliadins and ω -secalins. Implications for the evolution of prolamin genes, *Biochim. Biophys. Acta.*, **477**, 138 (1983).
22. M.A. Arangoa, G. Ponchel, A.M. Orecchioni, M.J. Renedo, D. Duchêne, y J.M. Irache, Bioadhesive potential of gliadin nanoparticulate systems, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **11**, 333 (2000).
23. M.A. Arangoa, M.A. Campanero, M.J. Renedo, G. Ponchel y J.M. Irache, Gliadin nanoparticles as carriers for the oral administration of lipophilic drugs. Relationship between bioadhesion and pharmacokinetics, *Pharm. Res.*, **18**, 1521 (2001)
24. M.A. Arangoa, M.A. Campanero, Y. Popineau y J.M. Irache, Electrophoretic separation and characterisation of gliadin fractions from isolates and nanoparticulate drug delivery systems, *Chromatographia*, **50**, 243 (1999).
25. M.A. Arangoa, M.A. Campanero, Y. Popineau y J.M. Irache, Evaluation and characterisation of gliadin nanoparticles and isolates by reversed-phase HPLC, *J. Cereal Sci.*, **31**, 223 (2000).
26. I. Ezpeleta, J.M. Irache, S. Stainmesse, C. Chabenat, J. Gueguen, Y. Popineau y A.M. Orecchioni, Gliadin nanoparticles for the controlled release of all-trans-retinoic acid, *Int. J. Pharm.*, **131**, 191 (1996).
27. C.G. Wilson y N. Washington, En "Physiological pharmaceuticals. Biological barriers to drug absorption", Ed. por E. Horwood, Series in Pharmaceutical Technology, Chichester, UK, 1989, pp. 47-70.
28. S. Sakuma, N. Suzuki, H. Kikuchi, K.I. Hiwatari, K. Arikawa, A. Kishida y M. Akashi, Oral peptide delivery using nanoparticles composed of novel graft copolymers having hydrophobic backbone and hydrophilic branches, *Int. J. Pharm.*, **149**, 93 (1997).
29. C. Durrer, J.M. Irache, F. Puisieux, D. Duchêne y G. Ponchel, Mucoadhesion of latexes. I. Analytical methods and kinetics studies, *Pharm. Res.*, **11**, 674 (1994).
30. I. Genta, B. Conti, P. Perugini, F. Pavanetto, A. Spadaro y G. Puglisi, Bioadhesive microspheres for ophthalmic administration of acyclovir, *J. Pharm. Pharmacol.*, **49**, 737 (1997).
31. P.K. Gupta, C.T. Hung y D.G. Perrier, Albumin microspheres. I. Release characteristics of adriamycin, *Int. J. Pharm.*, **33**, 137 (1986).
32. M. Merodio, A. Arnedo, M.J. Renedo y J.M. Irache, Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and in vitro release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **12**, 251 (2001).
33. K. Peters y F.M. Richards, Chemical cross-linking: reagent and problems in studies of membrana structure, *Annu. Rev. Biochem.*, **46**, 523 (1977).
34. T.T. Kararli, Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals, *Biopharm. Drug Dispos.*, **16**, 351 (1995).