

Artículo Invitado

POLÍMEROS BIOTECNOLÓGICOS FUNCIONALIZADOS PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS: EL ÁCIDO POLI(β ,L-MÁLICO)

José A. Portilla-Arias, Montserrat García-Alvarez, Sebastián Muñoz-Guerra*

Departament d'Enginyeria Química, Universitat Politècnica de Catalunya, ETSEIB. Diagonal 647, 08028 Barcelona, España.

* E-mail: sebastian.munoz@upc.edu

Recibido: 08-Ene-2008; Revisado: 09-Abr-2008; Aceptado: 10-Abr-2008

Publicado On-Line: 30-Jun-2008

Disponible en: www.polimeros.labb.usb.ve/RLMM/home.html

Resumen

El ácido poli(β ,L-málico) (PMLA) es un poliéster funcionalizado con grupos carboxílicos que es producido en la naturaleza por una extensa variedad de hongos, se puede sintetizar por vía química y se puede fabricar por biosíntesis en el laboratorio en cantidades de hasta 60 g·L⁻¹. La excelente biodegradabilidad, y biocompatibilidad que presenta este biopolímero junto con el hecho de estar funcionalizado, le hacen excepcionalmente atractivo para ser utilizado en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas de uso temporal. Sin embargo, las serias dificultades que entraña su modificación química, así como la limitación técnica que existe para su fabricación a gran escala, determinan que el grado de desarrollo tecnológico del PMLA sea aun incipiente. En este artículo se describe la estructura y las propiedades del PMLA, se hace una revisión de los métodos de síntesis y biosíntesis que se conocen para su preparación, y se reseñan y critican los distintos derivados y modificaciones químicas que se han realizado hasta el momento con el objetivo de extender su uso a la fabricación de dispositivos biomédicos de última generación.

Palabras Claves: Ácido málico, Ácido polimálico, Biopolímeros tecnológicos, Polímeros Biotecnológicos, Poliésteres biodegradables, Sistemas transportadores de fármaco.

Abstract

Poly(β ,L-malic acid) (PMLA) is a carboxylic functionalized polyester which is produced in the nature by a wide variety of fungi. PMLA may be both chemically synthesized and prepared by biosynthesis in the laboratory in up 60 g·L⁻¹ yields. The excellent biodegradability and biocompatibility displayed by this innocuous biopolymer, along with the fact of being functionalized, made it exceptionally interesting for biomedical and pharmaceutical applications of temporal use. However, severe difficulties for chemical modification and technical limitations for high scale production determine that the technological development of PMLA is still incipient. In this paper, the structure and properties of PMLA are described and the synthetic and biosynthetic methods known for its preparation are revised. The different derivatives and chemical modifications realized up to date with the aim of extending its use to the manufacture of last generation biomedical devices are critically referenced.

Keywords: Malic acid, Poly(malic acid), Technological biopolymers, Biotechnological polymers, Biodegradable polyesters, Drug delivery systems.

1. INTRODUCCIÓN

El ácido poli(β ,L-málico) (PMLA) es un poliéster que contiene un grupo lateral carboxilo unido al carbono β de la unidad repetitiva (Figura 1). Este carbono β es por tanto asimétrico y tiene configuración L. Procede del ácido L-málico (nombre IUPAC, ácido 2S-2-hidroxiбутanodioico), un compuesto orgánico natural presente en numerosos frutos y verduras y un eslabón esencial del ciclo de Krebs en el mecanismo de formación

del adenosin trifosfato. El ácido málico natural es homoquiral existiendo únicamente la forma levógira de configuración L.

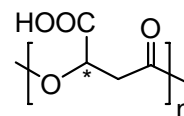


Figura 1. Estructura química del ácido poli(β ,L-málico) (PMLA).

Al contrario de lo que ha sucedido con la mayoría de los compuestos naturales, el PMLA fue sintetizado por vía química antes de que se conociera su existencia natural. El ácido poli(β ,L-málico) natural fue descubierto por Shimada *et al.* [1] en 1969 como un inhibidor de las proteasas ácidas en el hongo *Penicillium cyclopium*. Después de varios años se redescubre en el mixomiceto *Physarum polycephalum* como inhibidor de la DNA-polimerasa- α [2] y como inhibidor del complejo α primasa de la DNA polimerasa [3]. Ahora se sabe que el PMLA es producido por una amplia variedad de hongos filamentosos y mixomicetos, habiéndose reportado hasta 237 especies productoras [4].

A diferencia de otros biopolímeros producidos por bacterias como es el caso de los polihidroxi-alcanoatos (PHA), los cuales tienen como cometido primordial el almacenamiento de carbono y energía, la actividad biológica del PMLA parece ser más compleja, habiéndosele atribuido funciones de almacenaje y transporte molecular de proteínas nucleares en las células del plasmodium de *P. polycephalum* [5].

El grupo carboxilo presente en el PMLA determina que su comportamiento físico y químico sea típico de polielectrolito y claramente diferente al de otros poliésteres naturales, tales como los PHA's. Las particulares propiedades que derivan de tal comportamiento, junto con las características propias de su origen natural, le confieren un alto potencial como material de utilidad en aplicaciones relacionadas con la biomedicina y la farmacia.

2. ESTRUCTURA Y PROPIEDADES

2.1 Estructura Molecular

El PMLA está constituido por unidades monoméricas de ácido L-málico engarzadas por el grupo éster que se forma entre el grupo hidroxilo y el carboxilo en posición β . El ácido L-málico puede generar por policondensación poli(α ,L-málico) o poli(β ,L-málico) según cual sea el grupo carboxilo que se utilice para la reacción, o copolímeros α,β en caso de que ambas reacciones se den simultáneamente (Figura 2).

La constitución del poliácido natural se ha determinado por RMN de ^1H y ^{13}C . Se sabe con certeza que el PMLA es un polímero estereoregular y regioregular, con todas las unidades de ácido málico de configuración L unidas por la posición β .

El poli(α ,L-málico) no se conoce naturalmente pero ha sido sintetizado en el laboratorio, tanto en forma pura como copolímero α,β .

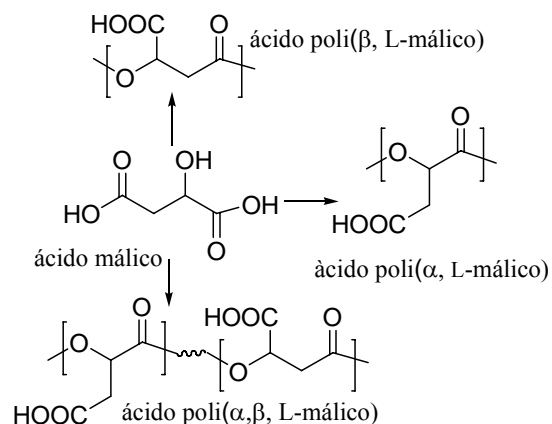


Figura 2. Posibilidades de policondensación del ácido L-málico.

La conformación del PMLA no ha sido estudiada con detalle. La única referencia accesible es un estudio basado en cálculos energéticos realizado por Valassi *et al.* [6], que concluye que cuando se encuentra en disolución acuosa no es de esperar que adopte ningún tipo de conformación regular. Unos estudios preliminares de dicroísmo circular llevados a cabo a diferentes temperaturas y pH's apuntan a una conformación en ovillo estadístico bajo todas las condiciones ensayadas según resultados de Portilla-Arias *et al.* [7], confirmando así las predicciones sustentadas en los cálculos teóricos.

2.2 Propiedades Físico-Químicas

El ácido PMLA es un polvo blanco e inodoro, muy soluble en agua y soluble en ciertos disolventes orgánicos como acetona, piridina, NMP y THF. Es un ácido débil con un pK_a que oscila alrededor de 3 o 4, dependiendo de si es de origen natural o si procede de síntesis química.

El PMLA suele encontrarse en estado amorfo debido a la elevada humedad que normalmente contiene, pero cuando se seca a fondo, por ejemplo mediante tratamiento con acetona anhidra, muestra una cristalinidad considerable y una temperatura de fusión de 215°C . Cuando se somete a calentamiento en atmósfera inerte, el PMLA inicia su degradación térmica cuando se rebasan los 200°C alcanzando la máxima velocidad de descomposición a 245°C y dejando un 5% de residuo final.

El proceso degradativo ocurre a través de un

mecanismo de depolimerización cabeza-cola que genera inicialmente ácido fumárico, el cual a continuación es parcialmente convertido en una mezcla de ácido y anhídrido maléico (Figura 3). El análisis cinético realizado por Portilla-Arias *et al.* [8], reveló que toda la descomposición tiene lugar a través de este mecanismo exclusivamente.

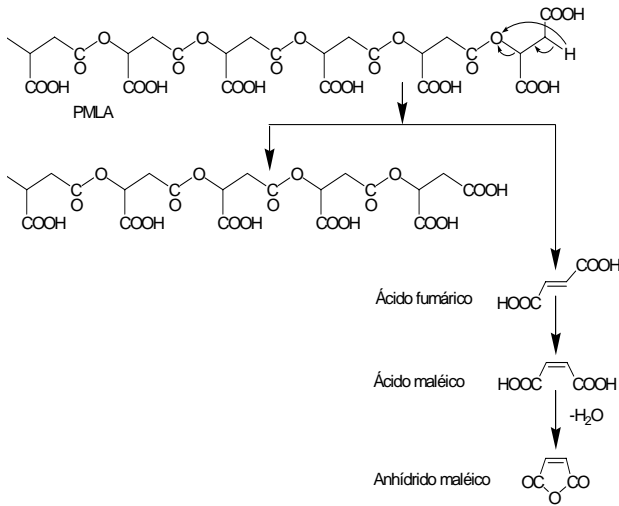


Figura 3. Mecanismo de degradación térmica del PMLA.

2.3 Degradación Hidrolítica y Biodegradabilidad

El PMLA es fácilmente atacado por el agua con la consiguiente rotura de la cadena principal que genera oligómeros y finalmente ácido L-málico. La hidrólisis del enlace éster ocurre espontáneamente en condiciones de entorno muy suaves, lo cual llega a representar un problema serio para la conservación del polímero.

La hidrólisis del PMLA en medio fisiológico (pH de 7,4 a 37°C) es muy rápida, ya que se reduce el peso molecular del polímero casi en su totalidad en 70 horas, y cuando la hidrólisis está catalizada por lipasa, el tiempo total de degradación se reduce a aproximadamente 40 horas (Figura 4) [9].

El PMLA es perfectamente bioasimilable, ya que el ácido L-málico que se genera en su degradación es un intermediario en el ciclo de Krebs de los ácidos tricarboxílicos. Este ciclo metabólico constituye la vía intracelular por la que los alimentos se convierten en energía utilizable, o bien se transforman en intermedios adecuados para la síntesis de aminoácidos, hidratos de carbono y polímeros de reserva [10].

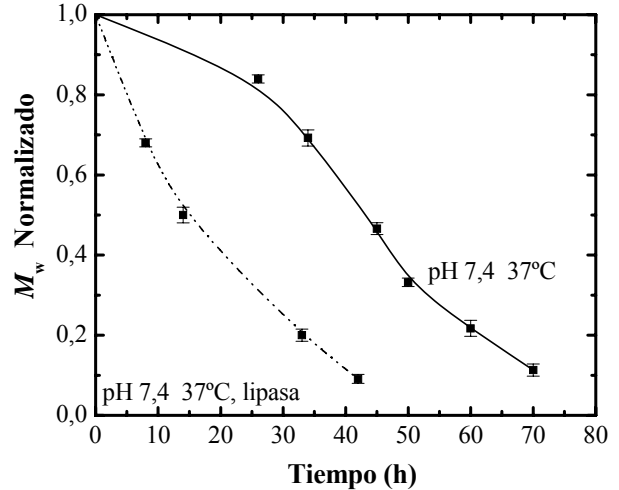


Figura 4. Degradación hidrolítica del PMLA en ausencia y presencia de lipasa

(Figura adaptada y reimpresa con permiso de John Wiley & Sons, Inc. de la Ref. [9]: Portilla-Arias *et al.*, "Synthesis, Degradability, and Drug Releasing Properties of Methyl Esters of Fungal Poly(β ,L-malic acid)", *Macromol. Biosci.* 2008; **8**: 540-550. Figura 5, p. 546. ©2008 John Wiley & Sons, Inc.).

Los microorganismos pueden utilizar el PMLA que se encuentra en su entorno extracelular como reserva alimenticia. Tanto en bacterias como en hongos se han encontrado enzimas que activan la hidrólisis del PMLA, tales como las hidrolasas de *Comamonas acidovorans* y *P. polycephalum*. Todas ellas son depolimerasas exolíticas que degradan el poliácido a través de un mecanismo escalonado con generación continuada de ácido L-málico [11].

La biodegradación de PMLA *in vivo* se ha estudiado mediante marcaje radioactivo, lo cual permite seguir la ruta de eliminación que sigue tanto el polímero residual como los fragmentos que se generan en la degradación. Estos estudios han mostrado que la eliminación del PMLA en sangre es muy rápida y que la mayor parte se excreta por vía urinaria en forma de pequeños fragmentos oligoméricos, no observándose toxicidad sistémica para inyecciones de hasta 6 g·kg⁻¹ de peso del animal ensayado [12].

3. SÍNTESIS Y BIOSÍNTESIS

3.1 Síntesis Química

La mayor parte de la investigación llevada a cabo sobre la síntesis del PMLA se ha centrado en la síntesis química, la cual puede efectuarse a través de dos caminos: policondensación o polimerización por apertura de anillo.

La síntesis del PMLA por policondensación directa del ácido L-málico se llevó a cabo a mediados de los 70's produciéndose un polímero de muy bajo peso molecular (~2.000 Da) constituido por unidades α y β . Por otra parte, la policondensación del malato de bencilo usando dicitclohexilcarbodiimida como agente de acoplamiento produce oligómeros de muy bajo peso molecular [13].

En 1979 se llevó a cabo con éxito la síntesis de β -malolactonas β -sustituídas racémicas, lo cual abrió el camino para obtener PMLA de alto peso molecular mediante ciclopimerización. La mayoría de estas preparaciones utilizan compuestos racémicos, no prestándose, por lo general, especial atención al aspecto configuracional. Así, el β -malolactonato de bencilo racémico polimeriza en presencia de trietilamina para producir poli(β -bencil D,L-malato) [14], a partir del cual se obtiene el PMLA racémico después de eliminar los grupos bencilo mediante hidrogenólisis catalítica.

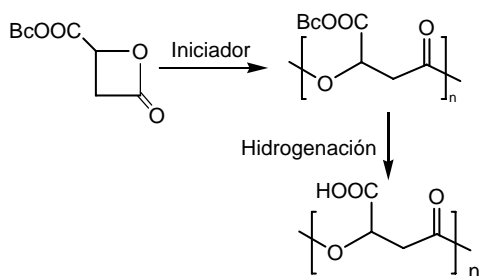


Figure 5. Síntesis de PMLA basada en la reacción de polimerización por apertura de anillo.

Los pesos moleculares obtenidos por este método son inferiores a 6.000 Da [15], pero si se utiliza como iniciador benzoato de tetrabutyl amonio se puede llegar a pesos moleculares de alrededor 40.000 Da [16,17]. La apertura del anillo se produce por ataque nucleofílico sobre el átomo de carbono en posición β de la lactona y ocurre con inversión de la configuración del estereocentro afectado (Figura 5).

La aplicación de esta misma metodología aplicada a malolactonas ópticamente puras permite preparar PMLA enantioméricamente puro. La síntesis de estas lactonas es un proceso laborioso que utiliza como material de partida sustancias naturales de configuración bien definida tales como el ácido L-aspártico o el mismo ácido L-málico.

3.2 Biosíntesis

La complejidad de las rutas sintéticas sólo permite obtener PMLA en pequeñas cantidades, claramente insuficientes como para llevar a cabo estudios extensivos sobre sus potenciales aplicaciones. Esta es la razón por la cual, se ha buscado en la bioingeniería nuevas estrategias más eficientes y económicas. Hasta ahora los dos microorganismos empleados en la producción biotecnológica del PMLA son el hongo *Aureobasidium pullulans* y el mixomiceto *Physarum polycephalum* (Tabla 1 y Figura 6).

Tabla 1. Comparación de la producción del ácido poli(β ,L-málico) por biosíntesis.

	<i>A. pullulans</i> ^a	<i>P. polycephalum</i> ^b
Células productoras	Tipo levaduras	Macroplasmidio estacionario
Secreción	Con glucanos	En forma pura
$M_w \times 10^{-3}$ (Da)	5 - 11	50 - 300
Producción ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	12 - 60	3,3
Fuente de carbono	Gluc, Fruc, Sac, Gluc	Gluc, almidón
R (% base glucosa)	40	11
pH del medio	3 - 4	4 - 5,5
Tiempo (días)	7 - 9	3 - 4

a: Liu y Steinbüchel [18]; *b:* Holler *et al.* [3]

Las cepas de *Aureobasidium* utilizan glucosa, sacarosa, fructosa, glucitol y succinato como fuente de carbono. El rendimiento de la biosíntesis oscila entre los 12 y los 60 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ dependiendo de la naturaleza de la cepa. El PMLA es secretado por el hongo conjugado con glucanos, pero es liberado en el mismo caldo de cultivo cuando el enlace con la glucosa es hidrolizado mediante la intervención de las enzimas que el propio hongo genera.

En *Physarum* el PMLA es sintetizado por polimerización enzimática del ácido L-málico convenientemente activado. Este se genera a partir de la glucosa a través de la glucólisis y del ciclo de los ácidos tricarbónicos. Esta ruta es la que también ha sido descrita para *Aureobasidium* [18].

El PMLA producido por *P. polycephalum* es secretado en forma pura y con pesos moleculares entre 50.000 y 300.000 Da. Si el polímero se deja permanecer en el medio de cultivo por tiempos

largos, los enlaces éster de la cadena principal se hidrolizan al ser atacados por una hidrolasa específica que el *Physarum* segrega al medio de cultivo. El PMLA se encuentra en el medio de cultivo como sal cálcica, sódica o potásica, dependiendo de los aditivos empleados en la fermentación. Para su aislamiento se precipita con metanol o etanol y luego se desaliniza mediante cromatografía de intercambio iónico. Se obtiene así la forma ácida del polímero, que después de liofilizar, se purifica mediante reprecipitación en acetona [19]. El uso de células estacionarias mejora el rendimiento del proceso y reduce la cantidad de biomasa formada.

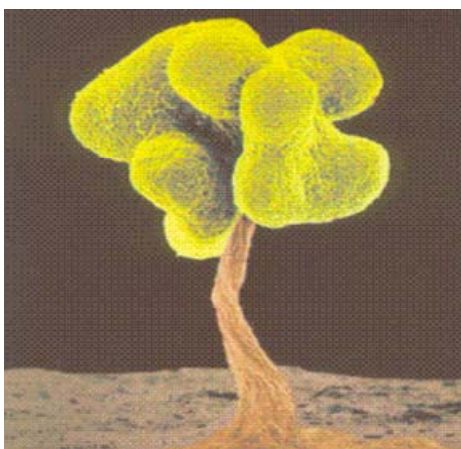


Figura 6. Arriba: Reactor de producción biotecnológica del PMLA mediante cultivo de *P. polycephalum*. Abajo: Plasmodium de *P. polycephalum*.

A pesar de los muchos esfuerzos realizados, la enzima responsable de la polimerización del ácido málico, la ácido poli(β ,L-málico)-sintetasa, no se ha podido aislar de extractos celulares, debido a su espontánea inactivación durante la homogenización de los plasmodios. Por otra parte, la polimerización

in vivo del PMLA se ha intentado durante varios años, pero los resultados han sido poco satisfactorios, ya que la síntesis del polímero se interrumpe al romperse la célula para aislar las polimerasas [5].

4. DERIVADOS DEL PMLA

La elevada solubilidad del PMLA en agua y su alta susceptibilidad a la hidrólisis, ha motivado la búsqueda de derivados que presenten mejor estabilidad ambiental y mayor resistencia a la degradación. Las modificaciones se basan en disminuir la hidrofiliidad mediante derivatización del grupo carboxilo lateral. Cuando estas modificaciones se realizan sobre el poliácido, las reacciones implicadas han de ser muy específicas y se han de llevar a cabo en condiciones muy suaves. De otra manera, se provoca la degradación por hidrólisis del grupo éster de la cadena principal con la consiguiente disminución del peso molecular. Esta limitación restringe muy severamente los métodos basados en la derivatización directa del PMLA, siendo más frecuente la preparación de derivados por síntesis química, una vez que las materias primas han sido adecuadamente seleccionadas.

4.1 Modificación del Polímero de Biosíntesis

La metilación del grupo carboxilo lateral es la única reacción de modificación directa del PMLA que se ha aplicado con resultados satisfactorios. La esterificación del grupo carboxilo del PMLA por métodos típicos de condensación es prácticamente inviable dado que no se puede evitar que la cadena principal quede afectada. En cambio el tratamiento con diazometano constituye un procedimiento elegante y efectivo de esterificación aunque lógicamente limitado a la preparación de los derivados metilados.

La metilación del PMLA con diazometano en acetona anhidra produce poli(β -metil L-malato) con una conversión del 100% sin que el grado de polimerización del poliácido original disminuya perceptiblemente (Figura 7) [20,21].

El procedimiento es no obstante muy sensible a la humedad, de forma que cuando en lugar de acetona se emplean otros disolventes de más difícil secado, tales como DMSO o NMP, la metilación va acompañada de una degradación significativa del polímero.

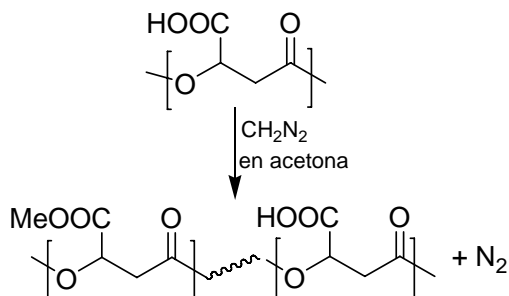


Figura 7. Reacción de metilación del PMLA con diazometano.

El poli(α -metil β ,L-malato) (PMLA-Me) es insoluble en agua y soluble en la mayoría de los disolventes orgánicos, siendo térmicamente estable por debajo de 250°C (Tabla 2). El PMLA-Me es un material muy cristalino con una temperatura de fusión alrededor de 150°C y con una transición vítrea alrededor de 41°C. Los datos preliminares de difracción de rayos-X y de electrones apuntan a una estructura rómbica constituida por cadenas en conformación helicoidal, no descartándose la presencia de más de una forma cristalina (Figura 8).

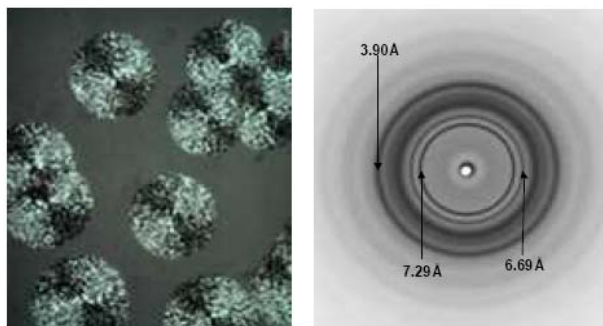


Figure 8. Esferulitas preparadas por evaporación de disolución de PMLA-Me en CHCl_3 (izquierda) y difracción de rayos-X de polvo (derecha).

(Figura reimpressa con permiso de John Wiley & Sons, Inc. de la Ref. [20]: Fernández *et al.*, “Low-Molecular-Weight Poly(α -methyl β ,L-malate) of Microbial Origin: Synthesis and Crystallization”, *Macromol. Biosci.* 2005; **5**: 172-176. Figuras 4 y 5, p. 175. ©2005 John Wiley & Sons, Inc.).

Ajustando el tiempo de reacción y la cantidad de diazometano que se añade, se puede controlar el grado de metilación que se alcanza. De esta manera es posible disponer de copolímeros de ácido málico-co-malato de metilo con propiedades intermedias entre los dos homopolímeros PMLA y PMLA-Me, habiéndose descrito la preparación de copolímeros con un 25, 50 y 75% de metilación.

Tabla 2. Propiedades del PMLA y sus ésteres metílicos [9].

Polímero	M_w	PD	Solubilidad H_2O	T_m (°C)	mT_d (°C)
PMLA	34.300	1,08	x	216	250
25%	32.600	1,25	x	174	228
50%	33.100	1,36	x	172	245
75%	34.200	1,28	-	171	250
PMLA-Me	34.100	1,44	-	148	251

PD= Polidispersidad

T_m = Temperatura de fusión

mT_d = Temperatura de máxima velocidad de degradación.

Estos copolímeros tienen pesos moleculares similares al del polímero de partida y presentan una microestructura en bloques cortos que están constituidos por secuencias homogéneas de ácido málico y malato de metilo. Todos los copolímeros son cristalinos con temperaturas de fusión en el intervalo de 170 a 175°C y su estabilidad térmica es algo inferior a la de los homopolímeros (Tabla 2). El carácter hidrofóbico-hidrofílico y la degradabilidad hidrolítica de los poli(ácido málico-co-malato de metilo) son fuertemente dependientes del porcentaje de metilación.

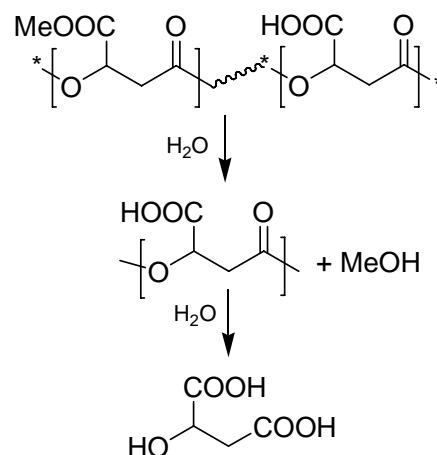


Figura 9. Mecanismo de hidrólisis de los ésteres metílicos del PMLA.

Sólo los copolímeros con porcentajes menores al 50% son solubles en agua y la reacción de hidrólisis es más rápida cuanto mayor es el

contenido en grupos carboxílicos (Figura 9). De acuerdo a lo reportado por Portilla-Arias *et al.* [9], el seguimiento del proceso de degradación por RMN revela que en primer lugar se escinde el grupo metilo lateral generando metanol y poliácido, y este último se hidroliza a continuación produciendo ácido L-málico.

4.2 Poli (β -Malato)s de Síntesis Química

Como se ha mencionado anteriormente en el Apartado 3.1, el poli(β -bencil malato) se prepara por polimerización de apertura de anillo para ser empleado como precursor de la síntesis del PMLA. La hidrogenolisis parcial del grupo bencilo de este polimalato permite también la preparación de copolímeros ácido málico-*co*-malato de bencilo con diferentes grados de bencilación.

La degradabilidad hidrolítica de los ésteres bencilicos del PMLA parece ser muy dependiente de la forma en que se presenta la muestra y de las condiciones de incubación. Mientras que la degradación *in vitro* de muestras macroscópicas tiene lugar a una velocidad que disminuye con el grado de bencilación, la degradación *in vivo* de nanoesferas ocurre en tiempos del orden de 5 meses, independientemente de cual sea el grado de esterificación del polímero. Estos resultados ponen en duda el efecto catalítico del grupo carboxílico lateral en el mecanismo de hidrólisis del grupo éster de la cadena principal, en contraste con lo que parece ocurrir en otros sistemas relacionados, como es el caso del ácido poliláctico [22].

El mismo procedimiento de síntesis basado en la ciclopimerización de malolactonas ha sido aplicado a la preparación de polimalatos de alquilo, específicamente del poli(β -malato de butilo), poli(β -malato de hexilo) y poli(β -malato de etiladamantilo). La degradación de nanopartículas de estos polimalatos ocurre mediante rotura estadística de la cadena principal con una velocidad de degradación que aumenta con la hidrofiliidad de copolímero. Todos estos compuestos presentan una buena biocompatibilidad y ausencia casi total de inmunogenicidad en cultivos celulares [23].

A partir de ácido aspártico y el 3-benciloxi-1-propanol, se han sintetizado y caracterizado diversos ésteres alquílicos del PMLA que incorporan la función hidroxilo como grupo 3-hidroxiopropil lateral (Figura 10).

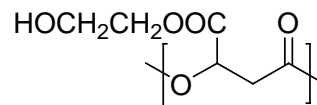


Figura 10. Fórmula química del poli(3-hidroxiopropil malato).

A pesar de que estos compuestos destacan por disponer de una nueva función activa no se ha llevado a cabo ningún estudio posterior referente a sus propiedades y aplicaciones [24].

La incorporación de unidades de ácido málico en cadenas de otros polímeros de propiedades biomédicas reconocidas, pero carentes de grupos químicos activos, permite la funcionalización de los mismos. Así, la copolimerización por apertura de anillos de L-lactida y β -bencil malolactona en presencia de octanoato de estaño con posterior hidrogenación de los grupos bencilo lleva a la obtención de los copoliácidos poli(L-láctico-*co*- β -málico). Estos copolímeros se han descrito con composiciones que varían desde un 8 hasta un 40% de ácido málico y sus pesos moleculares oscilan entre 17.000 y 34.000 Da. Como es de esperar, la hidrofiliidad de estos copolímeros aumenta con el contenido en ácido málico pero también disminuye su cristalinidad [25]. Los copolímeros que contienen alrededor de un 10% de ácido málico presentan propiedades mecánicas adecuadas para la construcción de “scaffolds” (Figura 11). Estos dispositivos se comienzan a degradar después de una semana de incubación con pérdida inicial de ácido málico.

El interés suscitado recientemente por este tipo de copolímeros es notable. El resultado es que se ha llegado a optimizar su síntesis y se les ha incorporado un segmento de polietilenglicol para formar terpolímeros MePEG-*b*-poli(DL-láctico-*co*- β -málico) con contenidos de ácido málico entre 8 y 90%. Estos copolímeros se han empleado para fabricar nanoesferas biodegradables de un elevado potencial de aplicaciones en el campo de la biomedicina [26].

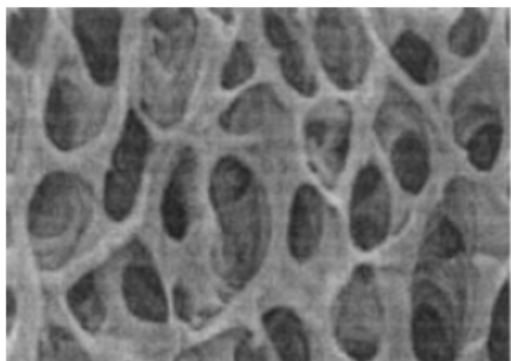
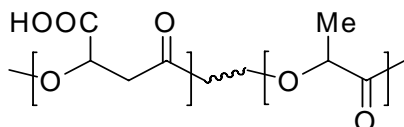


Figura 11. Material (scaffold) poroso, biodegradable y funcionalizado que ha sido fabricado con copolímero de ácido málico y ácido láctico, cuya estructura química se indica arriba.

(Figura reimpresa con permiso de Elsevier B.V. de la Ref. [25c]: He *et al.*, "Synthesis and Cell Affinity of Functionalized Poly(L-Lactide-co-β-Malic Acid) with High Molecular Weight", *Biomaterials* 2004; **25**: 5239-5247. Figura 9, p. 5245. ©2004 Elsevier B.V.).

Otra interesante aplicación de los copolímeros basados en el ácido málico es la estabilización y dosificación del factor de crecimiento fijador de heparina. Esto se logra mediante la síntesis de un terpolímero que consiste en una cadena principal de PMLA que tiene un 65% de grupos laterales carboxílicos, un 25% de sulfonatos y un 10% de butilos. La capacidad de este copolímero para facilitar la curación de heridas se ha puesto de manifiesto en la reparación de huesos craneales y de músculos de ratón. El copolímero fue capaz de imitar el efecto de los sulfatos de heparina, y aumentar la biodisponibilidad de los factores de crecimiento fijadores de heparina [27].

4.3 Complejos Iónicos del PMLA

Es bien sabido que la mezcla de polielectrólitos con tensioactivos de carga opuesta en disolución acuosa conduce a la formación de complejos iónicos estables.

Estos complejos se forman de manera espontánea debido a las interacciones hidrofóbicas del tensioactivo con el agua y a la atracción electrostática entre los iones de la cadena polimérica y los del tensioactivo. Los sistemas así formados, combinan las propiedades de los polímeros de partida con la capacidad de formar fases ordenadas

por parte de los tensioactivos. Cuando las cadenas laterales del tensioactivo son suficientemente largas, estas pueden cristalizar induciendo la formación de fases cristal-líquido (Figura 12).

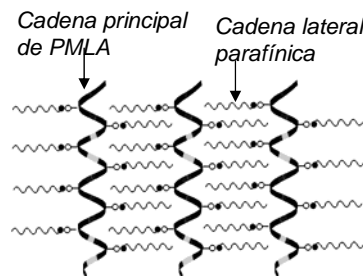


Figura 12. Esquema de la estructura supramolecular de los complejos polielectrólito-tensioactivo de cadena larga.

Tyrrell *et al.* [28] fueron los primeros en estudiar las posibilidades de complejos de PMLA y fosfolípidos naturales como membranas biomiméticas sensibles a los cambios de pH.

Más recientemente, estos sistemas se han explorado para preparar liposomas dispensadores de fármacos que son sensibles a cambios de pH, en este caso los complejos se preparan a partir de PMLA o copolímeros poli(ácido málico-co-malato de octilo) obtenidos por síntesis química y la L-α-dipalmitoilfosfatidilcolina (Figura 13). La presencia de los grupos alquilo es esencial para que se formen liposomas estables y para que la liberación del fármaco sea estimulable por el aumento de la acidez [29].

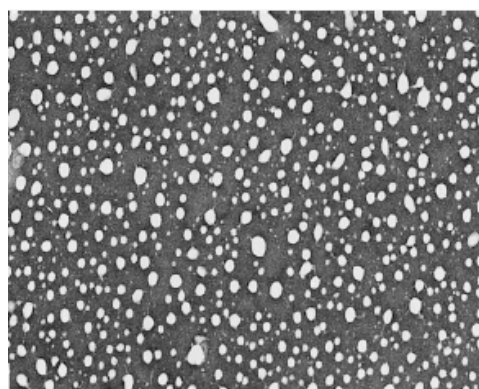


Figura 13. Micelas de PMLA y L-α-dipalmitoilfosfatidilcolina de tamaño inferior a 100 nm.

(Figura reimpresa con permiso de Elsevier B.V. de la Ref. [29]: Osanai y Nakamura, "Effects of Complexation Between Liposome and Poly(Malic Acid) on Aggregation and Leakage Behaviour", *Biomaterials* 2000; **21**, 867-876. Figura 3, p. 872. ©2000 Elsevier B.V.).

En estos últimos años se han estudiado con detalle los complejos estequiométricos preparados a partir del PMLA de biosíntesis y bromuros de alquil-trimetilamonio con grupos alquilo lineales de 14 a 22 átomos de carbono. La preparación de los complejos es un proceso simple y cómodo que permite disponer de estos compuestos con relativa facilidad (Figura 14).

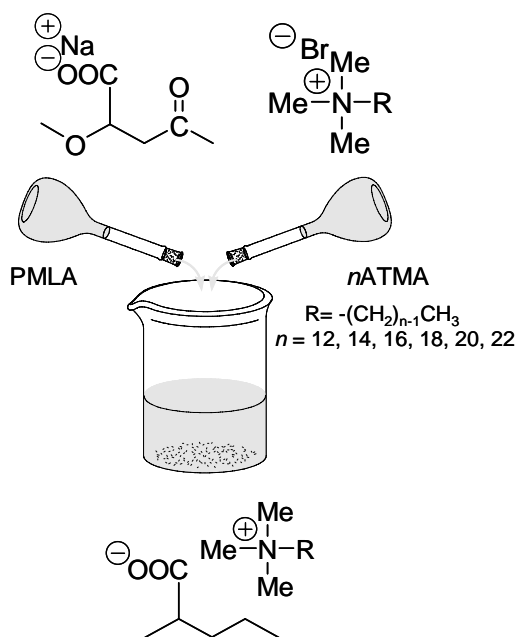


Figura 14. Método de preparación de los complejos de PMLA y tensioactivos catiónicos.



Figura 15. Micrografía óptica de polarización mostrando la textura de cristal líquido.

(Figura reimpressa con permiso de la Ref. [30a]: Portilla-Arias *et al.*, "Nanostructured Complexes of Poly(β ,L-malate) and Cationic Surfactants: Synthesis, Characterization and Structural Aspects", *Biomacromolecules* 2006; 7: 161-170. Figura 10, p. 169. ©2006 American Chemical Society).

Estos complejos tienen una arquitectura tipo peine, son insolubles en agua y solubles en disolventes como cloroformo, metanol y dimetilformamida. Los complejos con cadenas alquílicas de longitud igual o superior 16 átomos de carbono son capaces de adoptar estructuras nanométricas bifásicas con la fase parafínica cristalizada a temperatura ambiente y con temperaturas de fusión entre 30 y 70 °C. En el fundido el complejo adopta una estructura esméctica que se isotropiza calentándola por encima de 100°C (Figura 15) [30a].

El empleo de estos complejos en la preparación de discos para liberación controlada de fármacos se ha estudiado tomando como modelo la eritromicina, y evaluando la liberación del antibiótico a distintos pHs, temperaturas y cargas de fármaco. Se ha encontrado que los discos se degradan a través de un mecanismo de erosión superficial. Los perfiles de liberación son sigmoidales y el tiempo de liberación se puede ajustar a las necesidades farmacocinéticas escogiendo adecuadamente la longitud de la cadena del tensioactivo que se utiliza para la preparación del complejo (Figura 16) [30b].

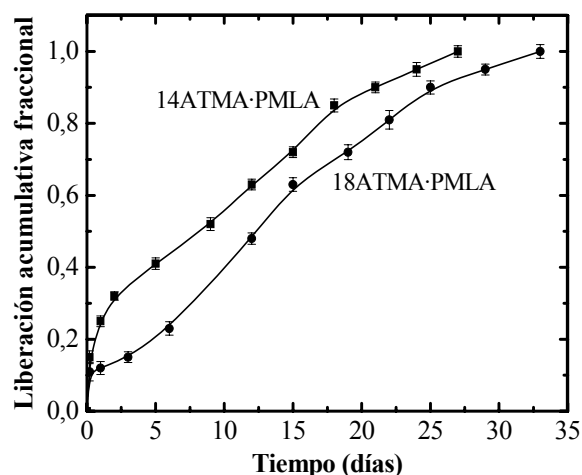


Figura 16. Liberación de eritromicina de discos de los complejos PMLA-nATMA.

(Figura adaptada y reimpressa con permiso de John Wiley & Sons, Inc. de la Ref. [30b]: Portilla-Arias *et al.*, "Ionic Complexes of Biosynthetic Poly(Malic Acid) and Poly(Glutamic Acid) as Prospective Drug-Delivery Systems", *Macromol. Biosci.* 2007; 7: 897-906. Figura 9, p. 904. ©2007 John Wiley & Sons, Inc.).

5. APLICACIONES BIOMÉDICAS

El diseño de dispositivos para transporte, almacenamiento y liberación de fármacos (sistemas DDS) capaces de actuar específicamente para el fin

deseado, constituye actualmente un reto tecnológico de excepcional interés en el campo de la medicina y la farmacia. Un sistema DDS ideal debe circular por el organismo durante el tiempo requerido por la enfermedad a tratar y sólo dispensar el fármaco en el lugar que se necesita. Para conseguir este resultado, se requiere una excelente biocompatibilidad, que su excreción renal sea lenta o inexistente, que su biodegradación se ajuste al tiempo de dosificación y que la liberación del fármaco este controlada por factores fisiológicos asociados al órgano o tejido afectado (Figura 17). Este conjunto de exigencias no es nada fácil de cumplir, de forma que el desarrollo de sistemas DDS está aún en sus albores, a pesar del impresionante esfuerzo que se viene dedicando a este tema desde hace más un par de décadas.

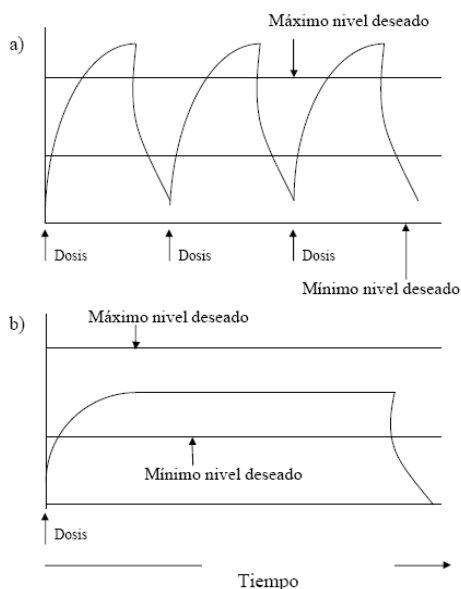


Figura 17. Esquema de liberación a) incontrolada; b) controlada de un fármaco.

Las micropartículas fueron los primeros sistemas DDS que se propusieron, pero hasta la fecha las presentaciones comerciales existentes son muy escasas. Sus aplicaciones son esencialmente quimioterapéuticas con administración subcutánea, intramuscular o intraperitoneal, ya que sus tamaños son excesivos para circular por vasos capilares y mas aun para penetrar en las células. Las nanopartículas salvan estas limitaciones pero son poco estables al ser captadas rápidamente por las defensas naturales del organismo. Por otro lado, dada la alta relación superficie/volumen, la cual favorece la difusión, resulta muy difícil mantener

una molécula pequeña encapsulada en la nanopartícula por tiempos largos, a menos que presente una gran afinidad por el encapsulante.

Diversos polímeros biodegradables, tanto sintéticos como naturales, se vienen utilizando en la preparación de sistemas DDS. Entre ellos destacan los poliésteres por su notable susceptibilidad a hidrolizarse en los entornos fisiológicos. De acuerdo a Panyam *et al.* [31], el ácido poli(láctico), el ácido poli(glicólico), la poli(ϵ -caprolactona) y sus *co*-polímeros son los poliésteres preferidos por el momento. Es precisamente en este campo de aplicaciones en el que el PMLA y sus derivados tienen un potencial de desarrollo destacable, dada su característica aventajada de disponer de la funcionalización adecuada para la modificación y el anclaje químico de fármacos. Así se han fabricado micelas hechas de PMLA modificado con grupos hidrofóbicos, dispositivos de complejos iónicos y fármacos polifuncionales de tercera generación mediante unión covalente directa de diversos compuestos a la cadena principal del polímero. A continuación se describen algunas de las potenciales aplicaciones mas sobresalientes propuestas hasta este momento, empleando ácido polimálico sintético o biosintético.

La clofazimina es una base débil de gran eficacia en el tratamiento de la tuberculosis (Figura 18), pero poco empleada debido a sus fuertes efectos secundarios sobre el aparato digestivo y la coloración de la piel.

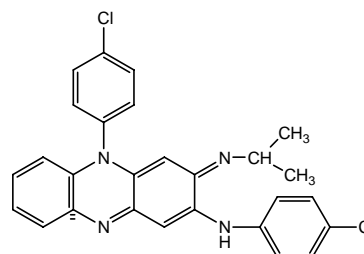


Figura 18. Fórmula química de la clofazimina.

Aprovechando las interacciones hidrofóbicas e iónicas entre el PMLA de síntesis química parcialmente esterificado con dodecanol presenta con la clofazimina, se han preparado agregados macromoleculares con una carga alta del fármaco, que permitieron la administración intravenosa de dosis terapéuticas empleando una pequeña cantidad de polímero transportador. De esta manera se observa que la clofazimina es capaz de mantener su actividad antibiótica en el pulmón mientras que los

efectos secundarios que suele presentar quedan minimizados [32].

La potencialidad del PMLA como vehículo de fármacos para tratamiento de células mieloblásticas cancerosas ha sido explorada empleando el citostático doxorubicina, un agente quimioterapéutico de gran utilidad y amplio espectro en el tratamiento de tumores. El conjugado empleado consiste en PMLA de síntesis, que ha sido parcialmente esterificado con grupos alquilo de 2, 7 y 12 átomos de carbono y que lleva doxorubicina unida mediante interacciones iónicas.

En este sistema, el fármaco se libera por mecanismos no enzimáticos y se fagocita más lentamente que cuando se suministra de manera directa. Cuanto más hidrófobo es el conjugado, mas se facilita la penetración del fármaco en el núcleo de la célula, incluso en aquellas de conocida resistencia a la permeación de la doxorubicina [33].

La utilización de PMLA de origen microbiano para estas aplicaciones se ha iniciado en estos últimos años. Mediante el método de fabricación de emulsión/evaporación se han preparado de forma controlada y reproducible, microesferas de PMLA de biosíntesis totalmente metilado que tienen 5-6 μm de diámetro (Figura 19).

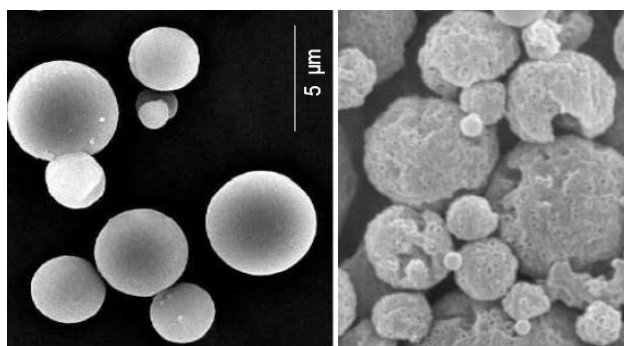


Figura 19. Evolución de la degradación hidrolítica de micropartículas fabricadas con PMLA-Me. Izquierda: micropartículas iniciales. Derecha: Degradadas a un peso molecular M_w del 50% del inicial.

(Figura reimpresa con permiso de John Wiley & Sons, Inc. de la Ref. [9]: Portilla-Arias *et al.*, “Synthesis, Degradability, and Drug Releasing Properties of Methyl Esters of Fungal Poly(β ,L-malic acid)”, *Macromol. Biosci.* 2008; **8**: 540-550. Figura 10, p. 549. ©2008 John Wiley & Sons, Inc.).

Estas microesferas presentan un tiempo de degradación superior a 20 días cuando se incuban en condiciones fisiológicas. Portilla-Arias *et al.* [9] comprobaron que las microesferas son adecuadas para encapsular de manera homogénea cantidades

muy considerables del antibiótico eritromicina, y que este se libera según un perfil sigmoidal que es independiente de la carga de antibiótico utilizada.

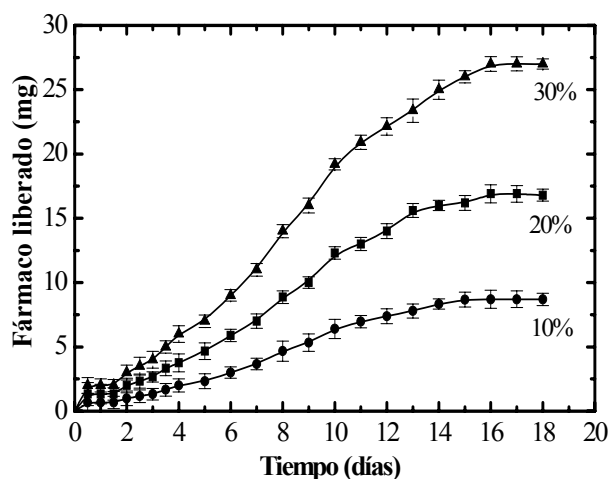


Figura 20. Curvas de liberación de eritromicina de micropartículas de PMMA-Me para diferentes cargas iniciales.

(Figura adaptada y reimpresa con permiso de John Wiley & Sons, Inc. de la Ref. [9]: Portilla-Arias *et al.*, “Synthesis, Degradability, and Drug Releasing Properties of Methyl Esters of Fungal Poly(β ,L-malic acid)”, *Macromol. Biosci.* 2008; **8**: 540-550. Figura 12, p. 549. ©2008 John Wiley & Sons, Inc.).

Un caso especialmente complejo en la dosificación de fármacos es la vectorización de péptidos y proteínas, ya que para que estos conserven su actividad biológica, es necesario que el dispositivo preserve su estructura y les proteja de la degradación enzimática.

Mediante el método de precipitación-diálisis es posible la preparación de nanopartículas de PMLA metilado en un 75% con un diámetro medio de 100 nm y un elevado potencial-Z negativo (Figura 21).

La aplicabilidad de estas nanopartículas como transportadoras de proteínas se ha evaluado empleando seis proteínas que difieren en peso molecular y punto isoeléctrico (BSA, β -lactoglobulina, α -quimiotripsina, mioglobina, lisozima y citocromo-c). Las proteínas se incorporaron a las nanopartículas mediante tres métodos distintos, encapsulación, adsorción física y fijación química. Los resultados indicaron que en los tres métodos, el factor que determina la cantidad de proteína que se incorpora a la nanopartícula es su punto isoeléctrico. La liberación de la proteína ocurre de manera similar en los tres casos y la quimiotripsina encapsulada retiene su actividad enzimática por más largo tiempo que cuando la

enzima se encuentra libre (Figura 22). Estos resultados ponen en evidencia el alto potencial de este polímero como transportador y estabilizador de proteínas [34].

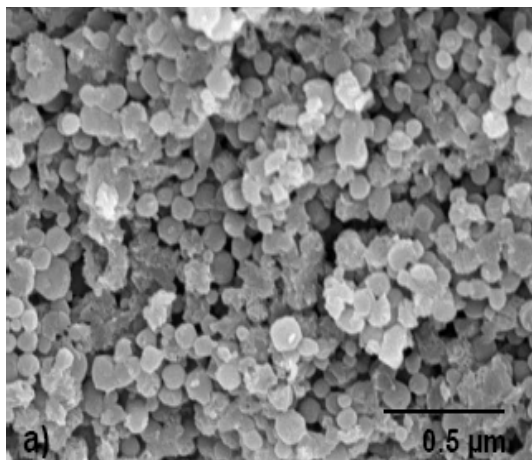


Figura 21. Nanopartículas de PMLA 75% metilado. (Figura reimpressa con permiso de John Wiley & Sons, Inc. de la Ref. [34]: Portilla-Arias *et al.*, “Biodegradable Nanoparticles of Partially Methylated Fungal Poly(β -L-Malic Acid) as a Novel Protein Delivery Carrier”, *Macromol. Biosci.* 2008; **8**: 551-559.. Figura 4, p. 455. ©2008 John Wiley & Sons, Inc.).

Un importante reto en el campo de la vectorización de fármacos es el desarrollo de nuevos vehículos transportadores para combatir el cáncer de cerebro. Estos sistemas deben alcanzar de forma eficiente las células cerebrales, para lo que necesitan superar la barrera hematoencefálica presente en el tejido nervioso central (BBB). Esta barrera protectora es altamente permeoselectiva impidiendo la penetración de los compuestos hidrófilos que pudieran estar accidentalmente presentes en el flujo sanguíneo. Este eficaz mecanismo de selección supone un obstáculo serio para la administración de fármacos a las células cerebrales. Empleando PMLA de biosíntesis se ha desarrollado un fármaco nanoconjugado llamado “Polycefín” (Figura 23) con capacidad para llegar al interior de las células tumorales de cerebro.

Mediante reacciones basadas en la activación previa del PMLA con *N*-hidroxisuccinimida y el empleo de 2-mercaptoetilamina como extensor es posible la incorporación de diversas especies químicas de distinta naturaleza y funcionalidad complementaria. Los experimentos *in vivo* llevados a cabo en humanos mostraron que Polycefín se liberó dentro de las células tumorales cerebrales por

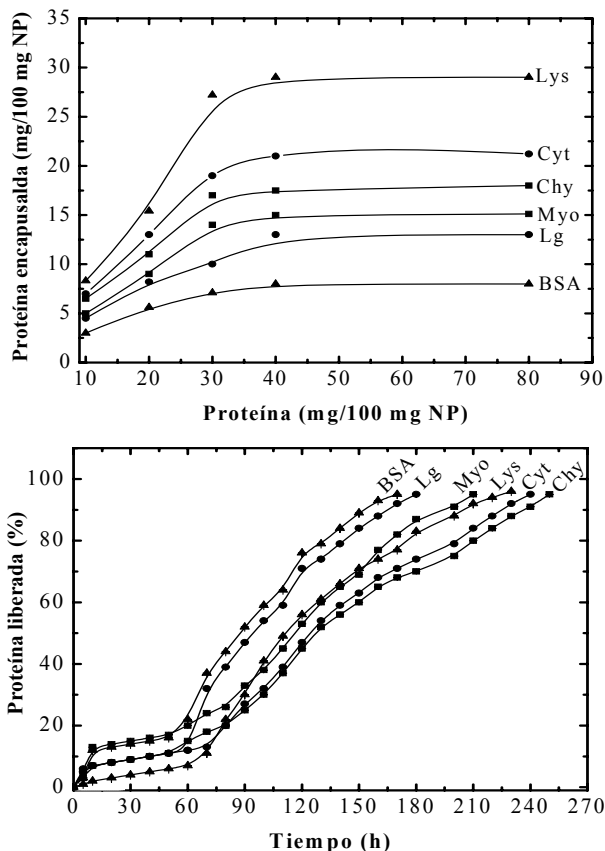


Figura 22. Curvas de almacenamiento (arriba) y de liberación (abajo) de las proteínas que se indican en nanopartículas de PMLA 75% metilado.

(Figura reimpressa con permiso de John Wiley & Sons, Inc. de la Ref. [34]: Portilla-Arias *et al.*, “Biodegradable Nanoparticles of Partially Methylated Fungal Poly(β -L-Malic Acid) as a Novel Protein Delivery Carrier”, *Macromol. Biosci.* 2008; **8**: 551-559.. Figura 5, p. 556 y Figura 8, p. 558. ©2008 John Wiley & Sons, Inc.).

endocitosis mediada por un receptor (Figura 24), y que fue capaz de inhibir la síntesis de laminina-8 [35]. La capacidad del Polycefín para atravesar la barrera BBS depende de su carácter hidrófobo, el cual viene determinado por el aminoácido que se injerta en el PMLA como bloqueante parcial de los grupos carboxílicos. La valina y la leucina son los aminoácidos empleados encontrándose que la penetración se favorece cuando la valina se reemplaza por un éster éflico de leucina [36].

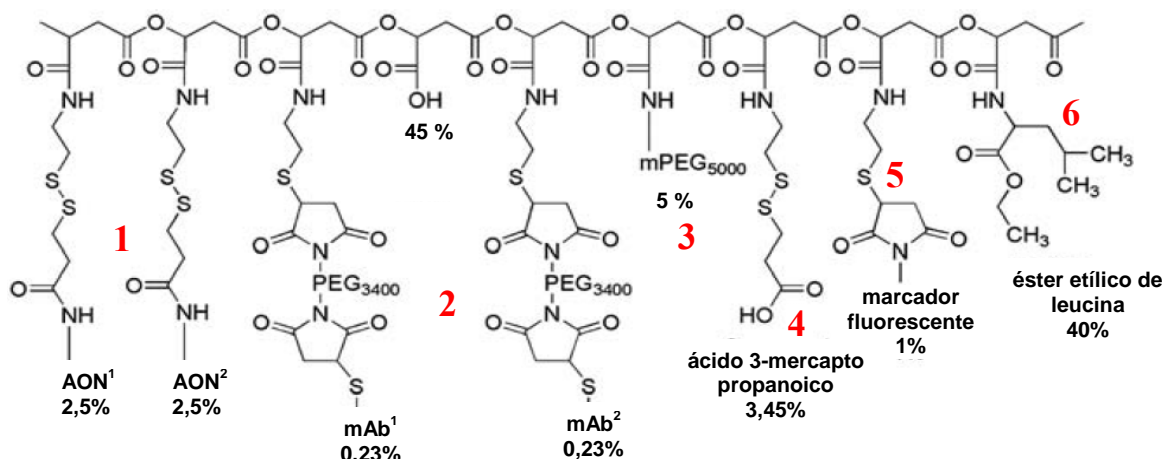


Figura 23. Fórmula química de Policefin. PMLA modificado un 55% con seis especies diferentes 1: Morfolinos (AON¹ y AON²) para inhibir la síntesis de laminina-8 mediante la terapia “antisense”. 2: Anticuerpos monoclonales mAb¹ y mAb² para dirigir el transportador a la célula. 3: Polietilenglicol de peso molecular 5.000 Da, para protección del conjugado en sangre. 4. ácido 3- mercaptopropanoico como espaciador del grupo carboxilo. 5: Dispositivo fluorescente para monitorear la trayectoria del polycefin una vez inyectado. 6: Ester etílico de leucina para conferir carácter hidrofóbico.

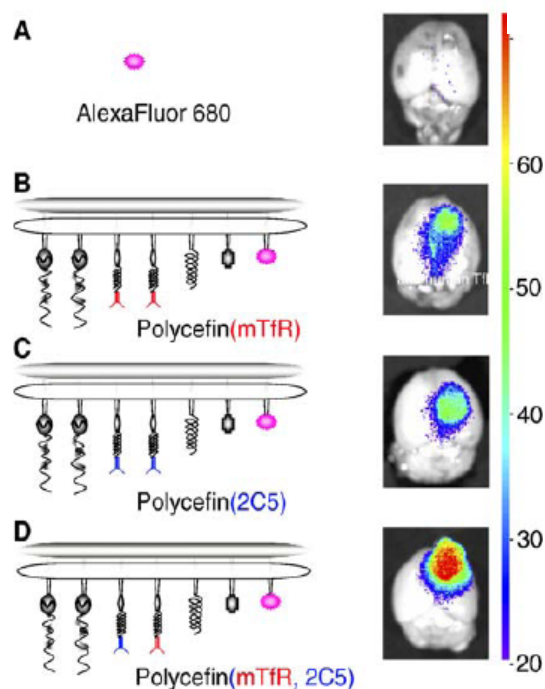


Figura 24. Seguimiento por fluorescencia de la concentración que alcanza el Polycefin en el glioma cerebral. A: solo con el compuesto fluorescente Alexa Fluor 680; B: con el anticuerpo mTfR; C: con el anticuerpo 2C5; D: con ambos anticuerpos.

(Figura reimpressa con permiso de Elsevier B.V. de la Ref. [36]: Fujita et al., “Brain Tumor Tandem Targeting Using a Combination of Monoclonal Antibodies Attached to Biopoly(β -L-Malic Acid)”, *J. Control. Release* 2007; **122**: 356-363. Figura 3, p. 360. ©2007 Elsevier B.V.)

6. CONCLUSIONES

El ácido poli(β ,L-málico) (PMLA) se obtiene a partir de una variedad de hongos, pudiendo producirse por biosíntesis en el laboratorio, aunque con ciertas limitaciones para la fabricación a gran escala. Se trata de un poliéster funcionalizado con grupos carboxilos susceptibles de ser modificados, aunque dichas modificaciones entrañan ciertas dificultades. El PMLA es un ácido débil soluble en agua y en ciertos disolventes orgánicos. Estudios preliminares revelan que, bajo las condiciones ensayadas, la conformación del PMLA es en ovillo estadístico. En estado sólido puede presentar una cristalinidad considerable. La degradación térmica se inicia cuando se rebasan los 200°C.

El PMLA puede ser utilizado en aplicaciones biomédicas y farmacéuticas dada su excelente biodegradabilidad y biocompatibilidad aunque existe una problemática en su conservación debido a la facilidad de hidrólisis de su enlace ester que ocurre espontáneamente incluso en condiciones suaves. Esta elevada susceptibilidad a la hidrólisis ha motivado la búsqueda de derivados de mayor resistencia.

Ya sea por metilación directa del PMLA o por síntesis química se ha obtenido diversos derivados del PMLA biocompatibles. La gama de derivados abarca los poli(β -alquil malatos), los copolímeros basados en ácido málico o los complejos iónicos del PMLA. Estos compuestos tienen un gran potencial en el desarrollo de la preparación de DDS. En este sentido se han llevado a cabo estudios en micropartículas, nanopartículas o discos de liberación controlada de fármacos con resultados muy satisfactorios. Actualmente el PMLA está siendo utilizado en la vectorización de fármacos para su aplicación en terapia anti-cáncer.

7. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la CICYT la ayuda económica prestada (Proyecto: MAT2006-13209-C02) y a CONACYT (México) por la beca predoctoral de J.A. Portilla-Arias.

8. REFERENCIAS

[1] Shimada K, Matsushirna K, Fukumoto J, Yamamoto T, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 1969; **35** (5): 619-624.
 [2] Fischer H, Erdmann S, Holler E, *Biochemistry* 1989; **28** (12): 5219-5226.
 [3] Holler E, Achhammer G, Angerer B, Gantz

B, Hambach C, Reisner H, Seidel B, Weber C, Windisch C, Braud C, Guérin, Ph, Vert M, *Eur. J. Biochem.* 1992; **206** (1): 1-6.
 [4] Rathberger K, Reisner H, Willibald B, Molitoris H-P, Holler E, *Mycol. Res.* 1999; **103** (5): 513-520.
 [5] Willibald B, Bildl W, Lee B-S, Holler E, *Eur. J. Biochem.* 1999; **265** (3): 1085-1090.
 [6] Valassi S, *Biosintesi, Struttura e Propietà del Poly(β -Malato): Un Novo Biopolimero de Microorganismi.* Tesina. Trieste (Italia): Universidad de Trieste, 1995.
 [7] Portilla-Arias JA, García-Alvarez M, Muñoz-Guerra S, *Estudio conformacional del ácido poli(β -L málico).* Resultados no publicados.
 [8] Portilla-Arias JA, García-Alvarez M, Martínez de Ilarduya A, Holler E, Muñoz-Guerra S, *Biomacromolecules* 2006; **7** (11): 3283-3290.
 [9] Portilla-Arias JA, García-Alvarez M, Martínez de Ilarduya A, Holler E, Galbis JA, Muñoz-Guerra S. *Macromol. Biosci.* 2008; **8** (6): 540-550.
 [10] Mathews CK, Van Holde KE, Ahern KG, *Bioquímica*, 3ra Ed. Madrid (España): Pearson Educación S.A., 2002.
 [11] Karl M, Holler E., *Eur. J. Biochem.* 1998, **251** (1-2): 405-412.
 [12] Domurado D, Fournié P, Braud C, Vert M, Guérin P, Simonnet F, *J. Bioact. Compat. Pol.* 2003; **18** (1): 23-32.
 [13] Kajiyama T, Kobayashi H, Tagushi T, Kataoka K, Tanaka J, *Biomacromolecules* 2004; **5** (1): 169-174.
 [14] Nakashima R, Okuda T, Okazaki M, Ouchi T, *Rep. Fac. Eng., Tottori Univ. Jpn.* 1977; **8**: 124-127.
 [15] Vert M, *Polym. Degrad. Stabil.* 1998; **59** (1-3): 169-175.
 [16] Guérin PH, Francillette J, Braud C, Vert M. *Makromol. Chem. Macromol. Symp.* 1986; **6**, 305-314.
 [17] Cammas-Marion S, Renard I, Langlois V, Guérin P, *Polymer* 1996; **37** (18): 4215-4220.
 [18] (a) Liu S-J, Steinbüchel A, *Appl. Microbiol. Biot.* 1996; **46** (3): 273-278. (b) Liu S-J, Steinbüchel A, *Biotechnol. Lett.* 1997; **19** (1): 11-14.

- [19] (a) Lee B-S, Holler E, *Appl. Microbiol. Biot.* 1999; **51** (5): 647-652. (b) Lee B-S, Holler E, *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; **193** (1): 69-74. (c) Lee B-S, Maurer T, Kalbitzer HR, Holler E, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1999; **52** (3): 415-420.
- [20] Fernández CE, Mancera M, Holler E, Bou J, Galbis JA, Muñoz-Guerra S. *Macromol. Biosci.* 2005; **5** (2): 172-176.
- [21] Fernández CE, Mancera M, Holler E, Galbis JA, Muñoz-Guerra S, *Polymer* 2006; **47** (19): 6501-6508.
- [22] Mauduit J, Boustta M, Vert M, *J. Biomat. Sci.-Polym. Ed.* 1996; **7** (3): 207-220.
- [23] Martínez Barbosa ME, Cammas S, Appel M, Ponchel G. *Biomacromolecules* 2004; **5** (1): 137-143.
- [24] (a) Barbaud C, Cammas-Marion S, Guérin P, *Polym. Bull.* 1999; **43** (4-5): 297-304. (b) Moine L, Cammas-Marion S, Amiel C, Guérin P, Sebille B, *Polymer* 1997; **38** (12): 3121-3127.
- [25] (a) He B, Bei J, Wang S, *Polymer* 2003; **44** (4): 989-994. (b) He B, Bei J, Wang S, *Polym. Advan. Technol.* 2003; **14** (9): 645-652. (c) He B, Wang Y, Bei J, Wang S, *Biomaterials* 2004; **25** (22): 5239-5247.
- [26] Wang L, Jia X, Liu X, Yuan Z, Huang J, *Colloid Polym. Sci.* 2006; **285** (3): 273-281.
- [27] Jeanbat-Mimaud V, Barbaud C, Caruelle JP, Barritault D, Langlois V, Cammas-Marion S, Guérin P, "Functionalized Polymers of Malic Acid Stimulate Tissue Repair Presumably by Regulating Heparin Growth Factors Bioavailability". En: *Biomedical Polymers and Polymer Therapeutics*. Chiellini E, Sunamoto J, Migliaresi C, Ottenbrite RM, Cohn D (eds.). New York (EE.UU.): Springer 2002, p. 243-251.
- [28] Tyrrell DA, Heath TD, Colley CM, Ryman BE, *Biochim. Biophys. Acta* 1976; **457**, 259-302.
- [29] Osanai S, Nakamura K, *Biomaterials* 2000; **21** (9): 867-876.
- [30] (a) Portilla-Arias JA, García-Alvarez M, Martínez de Ilarduya A, Holler E, Galbis JA, Muñoz-Guerra S, *Biomacromolecules* 2006; **7** (1): 161-170. (b) Portilla-Arias JA, García-Alvarez M, Martínez de Ilarduya A, Muñoz-Guerra S, *Macromol. Biosci.* 2007; **7** (7): 897-906.
- [31] Panyam J, Labhasetwar V, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 2003; **55** (3): 329-347.
- [32] Domurado D, Vert M, *J. Biomat. Sci.-Polymer Ed.* 2007; **18** (3): 287-301.
- [33] Abdellaoui K, Boustta M, Vert M, Morjani H, Manfait M. *Eur. J. Pharm. Sci.* 1998; **6** (1): 61-73.
- [34] Portilla-Arias JA, García-Alvarez M, Galbis JA, Muñoz-Guerra S, *Macromol. Biosci.* 2008; **8** (6): 551-559.
- [35] (a) Lee B-S, Fujita M, Khazenzon NM, Wawrowsky KA, Wachsmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Ljubimova JY, Holler E. *Bioconjugate Chem.* 2006; **17** (2): 317-326. (b) Ljubimova JY, Fujita M, Lee B-S, Khazenzon NM, Wachsmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Holler E. *NSTI-Nanotech.* 2006; **2**, 354-357. (c) Fujita M, Khazenzon NM, Ljubimov AV, Lee BS, Virtanen I, Holler E, Black KL, Ljubimova JY, *Angiogenesis* 2006; **9** (4): 183-191.
- [36] Fujita M, Lee B-S, Khazenzon NM, Penichet ML, Wawrowsky KA, Patil R, Ding H, Holler E, Black KL, Ljubimova JY, *J. Control. Release* 2007; **122** (3): 356-363.

Dr. Sebastián Muñoz Guerra

Catedrático de Ingeniería Química en la UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE CATALUÑA, UPC (España), especialidad Polímeros. Doctor en Química Orgánica por LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA y formación posdoctoral en las UNIVERSIDAD DE BRISTOL (Inglaterra), UNIVERSIDAD DE ENSCHEDE (Holanda) y en el CNRS de Strasbourg (Francia). Coordinador del Máster Oficial de la UPC y del Programa de Doctorado "Polímeros y Biopolímeros" y director de una veintena de Tesis Doctorales. Experto en síntesis, estructura y propiedades de polímeros biodegradables derivados de recursos naturales y biopolímeros biotecnológicos. Ha publicado alrededor 200 artículos en revistas indexadas y es autor de unas veinte patentes de su especialidad.