

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

*PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
FORMULACIONES LIPOSOMALES PARA
ADMINISTRACIÓN POR VÍA ORAL*

Tesis presentada para optar al título de
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Laura Graciela Hermida

Director: Prof. Dr. Carlos Bregni

Director adjunto: Prof. Dr. Ramon Barnadas i Rodríguez

Lugares de trabajo:

Cátedra de Farmacotecnia I, Departamento de Tecnología Farmacéutica, FFyB-UBA.

Centre d'Estudis en Biofísica-Unitat de Biofísica, Universitat Autònoma de Barcelona, España.

Instituto Nacional de Tecnología Industrial, INTI-Química.

AÑO 2006

A MI MADRE, MUCHOS AÑOS DESPUÉS...

"My roots can no longer support the massive foliage but the blossom is glorious!"

Alec D. Bangham, descubridor de los liposomas

"Little fatty vesicles of bilayer fame
protean and elusive, fragile all the same,
aloof and enigmatic beneath your many skins,
unyielding to the vigour of thousands of spins..."

Gregory Gregoriadis, descubridor de las aplicaciones de los liposomas para drug delivery

"Escribir es bueno, pensar es mejor.
La inteligencia es buena, la paciencia es mejor"

Extraído de "Siddharta", Hermann Hesse

"Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual,
estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitado de inexplicabilidad.
Nuestra tarea en cada generación, es recuperar algo más de tierra".

T.H. Huxley, 1887

Fa vint anys que tinc vint anys.
Vint anys i encara tinc força
I no tinc l'anima morta
I em sento bullir la sang.
I encara em sento capaç
De cantar si un altre canta...

Joan Manuel Serrat, 1984

AGRADECIMIENTOS

Este es el momento en el que el químico se pregunta si podrá hilar más de dos palabras sin insertar un gráfico o poner un subíndice en la fórmula de una sustancia. Pero por otro lado, tal vez sea la única oportunidad en la vida de escribir algo que se parezca a un prólogo. Además, los argentinos tenemos fama de saber manejar el lenguaje (hacer el verso, bah!). Entonces, allá vamos!

Para empezar, quiero agradecer a mi familia, que mucho ha tenido que ver con que este trabajo llegue a término. A mis padres, por haberme inculcado una escala de valores en la que la honestidad, el esfuerzo y el conocimiento compiten codo a codo por el primer puesto. En especial a mi madre, que en este momento estaría orgullosa contándoles a sus amigas que su hija iba a presentar la tesis. A mi marido, Guille, por no abandonarme en este mar de papeles, archivos y lágrimas. Debe quererme mucho, y yo a él. También le agradezco haberme alentado a viajar a España desde el primer momento en que surgió la oportunidad de la beca. Fue una movida importante la que protagonizamos los cuatro durante dos años, cambiando de casa, de ambiente, de lugar de trabajo, de colegio. Les agradezco a mis dos hijas, Camila y Florencia, por aceptar a una mamá demasiado ocupada, con tan poco tiempo para ellas. Ya que esto parece un *mea culpa*, aprovecho para pedirles disculpas por todas las notas del cuaderno de comunicaciones que no firmé, las reuniones de padres a las que no asistí y los minutos preciosos de su infancia que vi pasar desde mi escritorio, pegada a la computadora. Ya lo compensaré, lo prometo.

El hecho de estar presentando este trabajo a mi edad, apenas 41 añitos, no es para nada recomendable. Se trata de un esfuerzo grande que deja de ser individual para pasar a invadir todos los ámbitos: el familiar, el laboral, el núcleo de amigos, las actividades vocacionales. Sin embargo, las canas no son en vano, y la edad me ha convertido en una persona más reflexiva.

Y así, recordando, vienen a mi mente mis primeras experiencias en investigación, cuando recién salida del horno, digo... de Exactas, deseaba descubrir algo que fuera útil para la humanidad. Quiero agradecer al grupo excepcional con el que trabajé durante casi dos años en el Centro de Endocrinología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez, en especial a la Dra. Stella Campos, una excelente persona y un ejemplo a seguir para los que pretendemos dirigir grupos de trabajo. Nunca entendí cómo hacía para compatibilizar su vida de madre de tres hijos con sus tareas de investigadora full time y ser exitosa en ambos aspectos.

Luego llegaron los años más oscuros de los servicios analíticos, durante los cuales pensar en una tesis era una utopía. Como dice Alfredo Rosso, las hembras humanas también se toman su tiempo para el cuidado de sus crías, y así fue. Cuando aún ni soñaba con este presente, recuerdo a Liliana Valiente, actual directora de INTI-Química, contándome su deseo de hacer la tesis, a pesar de las condiciones adversas que la rodeaban. Hoy le agradezco su apoyo para poder terminar este trabajo y no repetir viejos modelos.

Debo agradecer también a una ex-directora de INTI-Química, Alicia Lagomarsino, por reubicarme en un área de desarrollo, cuando ya estaba agotada de tanto luchar con el HPLC, y

por autorizarme una pasantía en la Universidad Autónoma de Barcelona, donde tomé contacto por primera vez con las *"Little fatty vesicles of bilayer fame"*. Y aquí vienen los agradecimientos más íntimamente relacionados con esta tesis (esta tendencia a emplear la palabra "íntimamente" me ha jugado malas pasadas).

Le agradezco a Manel Sabés, porque fue el primero que, vía e-mail, me aceptó para trabajar con ellos en la UAB sin pedir nada a cambio. Incluso, una vez terminada la pasantía, me ofreció una beca por un año, para viajar con toda mi familia y hasta me alquiló el piso donde vivimos! A él se debe entre otras cosas, la financiación de gran parte del trabajo experimental de esta tesis. Siempre me pregunto si alguna vez podré retribuirle su generosidad.

Antes de viajar, apareció en escena mi director de tesis, que confió en que este bicho de Exactas, con muchas mañas adquiridas en INTI, iba a ser capaz de llevar a cabo una tesis. Le agradezco a Carlos Bregni su confianza, sus consejos, su visión integradora, su capacidad de análisis y de hacer parecer más simples las cosas que se me hacen imposibles.

Cuando llegué a la UAB, me encontré con este personaje tan especial que es mi director adjunto, un tipo brillante al que poca gente conoce tal como es (¿cómo es, Eulàlia?). El aportó su capacidad de planificación, observación y deducción, indispensables para el desarrollo del trabajo experimental. En este último tramo, tal vez el más difícil, le agradezco el esfuerzo dedicado a la corrección de este trabajo, las horas frente al "ordenador" marcando meticulosamente con **letra roja resaltada en amarillo**, las largas llamadas telefónicas discutiendo si el liposoma realmente existe o es una fantasía creada por Bangham y sostenida por Gregoriadis, que por algo sonrío con esa mirada pícara.

Si recuerdo los días en la UAB, aparecen personas que colaboraron conmigo en el trabajo experimental, o bien haciéndome los días más felices, o ambas cosas. Mi amiga Elodia, a la que siento tan cerca; Pep el isleño (y papá de Joan Josep), del que adoro su ironía y su carácter apacible; Mónica Companyo, que me ayudó siempre que lo necesitaba y más aún; Joan Manyosa, de quien heredé unos juegos de sábanas y algunas cosas más; Tony Morros, con su pulido acento argentino-catalán; Esteve Padrós, quien tanto se esforzaba por hablar en español delante de mí; el Dr. Frumento, un increíble joven argentino de más de 80 años; Mercé Yañez, tan amable como eficiente; Jose Piedra y su familia, especialmente su madre Consuelo, que cuidaron de mis hijas durante los veranos mejor que yo misma; los becarios de Biofísica, con los que compartíamos charlas y almuerzos: Víctor, que ya debe haber defendido su tesis, Marta, Alex, Anna, Xavi, los "de la Mireia", el genio de Víctor Lorenz, Natalia y muchos otros. Tampoco olvido a África, alguna vez volveremos a encontrarnos.

Quiero agradecer a todos los que colaboraron concretamente con los experimentos de esta tesis, por su idoneidad, su apertura mental y su amabilidad: a Agustina y Paqui, del Servicio de Cultivos Celulares del IBV; a Ignasi, de los Servicios Analíticos de la UAB; a Miquel, del Servicio de RMN de la UAB, y principalmente a Anna Roig, responsable de los espectros Mössbauer del Instituto de Materiales de Barcelona, a quien agradezco por su trabajo y por sus consejos. También a la gente de la Facultad de Farmacia de la UB (Universidad de Barcelona): Joan Estelrich, que nos permitió realizar las medidas de potencial Z en su laboratorio, y Jordi Hernández y Tere Montero, que me salvaron prestándome su fluorímetro cuando el de Biofísica quedó fuera de servicio.

No debo olvidar a quien autorizó que mi estadía de un año en la UAB, se prolongara un año más. Cuando noté que mi pedido comenzaba a circular de escritorio en escritorio, le escribí un mail directamente al presidente del INTI, Enrique Martínez, argumentando mi pedido según mis más profundas convicciones. Recuerdo que esto fue un viernes: el lunes ya tenía el trámite autorizado. Le agradezco a él por esta actitud que demuestra que realmente le interesa la formación del más valioso recurso con el que cuenta en el INTI.

Nuevamente en Buenos Aires, el contacto con las universidades fue fundamental para no perder el rumbo. Agradezco al grupo que ha formado durante años el Dr. Bregni, en especial a Adriana, por sus charlas (las personales y las públicas), a Diego, a Ricardo y al Dr. Nacuccio, por mostrarme en sus clases, que los liposomas pueden servir realmente para algo. Dentro de la misma Facultad de Farmacia, quiero agradecer a Beta Moglioni y a Graciela Moltracio, y pedirles nuevamente disculpas por haber terminado haciendo la tesis en tecnología farmacéutica y no en síntesis orgánica. También a las chicas de química analítica, por las que tengo un gran afecto, Silvia Lucangioli y Valeria Tripodi, que además corrieron los electroferogramas para la caracterización del bendito extracto de bilis. Y ellas en realidad, se formaron con una persona a la que aprecio mucho, la Dra. Carducci, a la que nos unen largas tardes de discusiones de resultados sobre las separaciones enantioméricas, allá por 1999.

En especial quiero agradecer al grupo de la UNQUI, con el que compartimos proyectos e ideales: "la colo", una joven y brillante investigadora, y su maravillosa jefa, una fuente inagotable de energía, ingenio y rigurosidad científica.

Por último, aunque no en mi corazón, mis compañeros de INTI. Empezando por el pasado, al que "me enseñó todo lo que sé" (Luciano *dixit*); a Fer (que agora mora no Brazil), Pablo Rouge y Leo Nardini, por los momentos inolvidables en los que tanto disfrutábamos de nuestro trabajo; a Graciela Wetzler, la mujer más íntegra que conozco.

Para el presente tengo un párrafo aparte. A nivel laboral, no existe una persona que me haya apoyado más que Vicky (perdón, Victoria). Ella no sólo me dio ánimo siempre sino que me reemplazó literalmente en todas mis funciones en el INTI, y creo que se desempeñó mejor que yo. Supongo que tendré la oportunidad de hacer lo mismo por ella cuando me necesite y espero estar a la altura de las circunstancias. También quiero agradecer a "las chichis", Sofía y Marta, por darme asilo físico y espiritual, y a Piloto (Diego) y Pilotito (Tito). Además, a los chicos del laboratorio de SLC, a los cuales descuidé bastante en este último tiempo, pero en lo que confío enormemente: César, María y Regina. Les agradezco especialmente estar a mi lado en los momentos difíciles, no lo voy a olvidar. Creo que este paso que doy hoy, va a ser beneficioso para ustedes también. No quiero olvidarme de Mónica, Sandra y Rodrigo, que me prestaron su oficina para aislarme en los últimos días durante la redacción de la discusión. Y a Chris, que me prestó su computadora e impresora, sin saber que se podría contaminar con un virosoma!

Aquí termina la "perorata" para evitar las cargadas de mis amigos catalanes, que no gozan del talento de la narración. Pido perdón a aquellos que no estén incluidos en esta lista por causa de mi endeble memoria, cuyo misterioso mecanismo para filtrar los hechos, me hace recordar sólo los buenos momentos.

ÍNDICE

	Página Nº
ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PRESENTACIÓN	2
1.2. FOSFOLÍPIDOS: UNIDAD ESTRUCTURAL DE LOS LIPOSOMAS	3
1.3. SISTEMAS FOSFOLÍPIDO-AGUA	5
1.3.1. Estructuras y fases	5
1.3.2. Temperaturas de transición	7
1.3.3. Incorporación de colesterol	8
1.3.4. Permeabilidad de la membrana	9
1.4. LIPOSOMAS: CLASIFICACIONES	11
1.4.1. Clasificación según su estructura física	11
1.4.2. Clasificación según sus aplicaciones	12
1.5. LIPOSOMAS: CARACTERIZACIÓN	15
1.5.1. Caracterización química	15
1.5.2. Caracterización física	17
1.5.3. Solubilización con tensioactivos	18
1.6. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS	22
1.7. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA	25
1.7.1. Sistemas no lipídicos de liberación controlada	26
1.7.2. Sistemas lipídicos de liberación controlada	27
1.8. LOS LIPOSOMAS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA	29
1.8.1. Liposomas por vía parenteral	29
1.8.1.1. Liposomas de larga circulación o Stealth	31
1.8.2. Liposomas por vía tópica	32
1.8.3. Tránsito intracelular	34
1.8.4. Productos comerciales	34
1.9. LIPOSOMAS POR VÍA ORAL	36

1.9.1. Tránsito gastrointestinal de sustancias o sistemas terapéuticos	38
1.9.2. Estabilidad de los liposomas en el TGI	39
1.9.3. Absorción de liposomas en el epitelio intestinal	42
1.9.4. Estudios farmacocinéticos con liposomas	48
1.9.5. Estudios farmacodinámicos con liposomas	50
1.9.6. Vacunas orales a base de liposomas	51
1.9.7. Aplicaciones nutricionales	53
1.9.8. Patentes de aplicación de liposomas para administración por vía oral	54
1.10. ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO	55
1.10.1. Estrategias nutricionales	55
1.10.2. Mecanismos de absorción de hierro	57
1.10.3. Terapéutica de la anemia por deficiencia de hierro	58
1.11. ESTUDIOS DE LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO	60
1.11.1. Estudios de solubilidad	61
1.11.2. Estudios de absorción	61
1.11.2.1. Estudios de absorción con hierro nativo	62
1.11.2.2. Estudios de absorción con hierro radiactivo	62
1.11.2.3. Estudios de absorción con isótopos estables	64
1.11.2.4. Estudios in situ	64
1.11.2.5. Estudios con células caco-2 y otras líneas celulares	64
1.11.2.6. Conclusiones sobre los estudios de absorción	65
1.11.3. Medidas de punto final	65
1.11.4. Modelos aritméticos	67
1.11.5. Conclusiones generales	68
2. OBJETIVOS	69
3. MATERIALES Y MÉTODOS	71
3.1. MATERIALES	72
3.1.1. Lípidos y fosfolípidos	72

3.1.1.1. Epikuron 200	72
3.1.1.2. Epikuron 200 SH	72
3.1.2. Sondas fluorescentes y quenchers	72
3.1.3. Geles para exclusión molecular	72
3.1.4. Reactivos generales	73
3.1.4.1. CHITOSAN Practical Grade	73
3.1.5. Soluciones y buffers	73
3.1.6. Productos comerciales	74
3.2. EQUIPAMIENTO	74
3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS	75
3.3.1. Determinación de fosfolípidos por el método de Stewart	75
3.3.1.1. Principio	75
3.3.1.2. Reactivos	75
3.3.1.3. Procedimiento	75
3.3.2. Determinación de lípidos mediante absorbancia UV-visible de las suspensiones de liposomas	76
3.3.2.1. Principio - Aplicaciones	76
3.3.2.2. Procedimiento	76
3.3.3. Determinación de HPTS por espectrofluorimetría	76
3.3.3.1. Principio - Aplicaciones	76
3.3.3.2. Cuantificación a pH 7,4 por excitación a 454 nm	77
3.3.3.3. Cuantificación por excitación en el punto isobéptico (417 nm)	78
3.3.4. Cuantificación de hierro mediante reacción con o-fenantrolina	79
3.3.4.1. Principio	79
3.3.4.2. Solubilización con Triton X-100	79
3.3.4.3. Método de la mezcla monofásica	80
3.3.5. Cuantificación de hierro en extractos celulares mediante absorción atómica en horno de grafito	81
3.3.5.1. Principio	81
3.3.5.2. Reactivos	81

3.3.5.3. Procedimiento	82
3.3.6. Determinación del grado de oxidación del hierro mediante espectrometría Mössbauer	82
3.3.6.1. Principio	82
3.3.6.2. Equipamiento	83
3.3.6.3. Procedimiento para liposomas con FeAA	83
3.3.6.4. Procedimiento para soluciones FeAA	84
3.3.7. Determinación del contenido de extracto de bilis (EB) por espectrofotometría UV-visible	85
3.3.7.1. Principio	85
3.3.7.2. Procedimiento	85
3.3.8. Determinación del contenido de sales biliares en extracto de bilis mediante electroforesis capilar (CE)	85
3.3.8.1. Principio	85
3.3.8.2. Reactivos	87
3.3.8.3. Procedimiento	87
3.3.9. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	88
3.3.9.1. Principio - aplicaciones	88
3.3.9.2. Reactivos	88
3.3.9.3. Procedimiento	88
3.3.10. Cuantificación de proteínas por el micrométodo del ácido bicinónico (BCA)	89
3.3.10.1. Principio - aplicaciones	89
3.3.10.2. Reactivos	89
3.3.10.3. Procedimiento	89
3.3.11. Cuantificación de quitosano en liposomas	89
3.3.11.1. Principio	89
3.3.11.2. Reactivos	90
3.3.11.3. Procedimiento	90
3.3.12. Determinación de la viscosidad cinemática de soluciones de quitosano	90
3.3.12.1. Antecedentes	90

3.3.12.2. Reactivos	91
3.3.12.3. Procedimiento	91
3.3.13. Determinación del grado de desacetilación del quitosano por H ¹ -RMN	91
3.3.13.1. Antecedentes	91
3.3.13.2. Principio	92
3.3.13.3. Reactivos	93
3.3.13.4. Procedimiento	93
3.4. MÉTODOS PREPARATIVOS	93
3.4.1. Formulación de los liposomas	93
3.4.1.1. Formulaciones convencionales	93
3.4.1.2. Formulaciones no convencionales	94
3.4.2. Preparación de liposomas multilamelares por dispersión mecánica	95
3.4.2.1. Liposomas SPC	95
3.4.2.2. Liposomas HSPC	95
3.4.2.3. Liposomas HSPC-Chol y HSPC/DC-Chol	95
3.4.2.4. Liposomas CHI	96
3.4.3. Preparación de liposomas mediante homogeneización a alta presión	96
3.4.3.1. Liposomas SPC	97
3.4.3.2. Liposomas HSPC	97
3.4.3.3. Liposomas HSPC-Chol	97
3.4.3.4. Liposomas HSPC/DC-Chol	97
3.4.3.5. Liposomas CHI	98
3.4.4. Homogeneización de soluciones de quitosano	98
3.4.5. Purificación de liposomas por columnas de exclusión molecular (SEC)	98
3.4.5.1. Columnas de sephadex G-25	99
3.4.5.2. Columnas de sephadex G-75 y G-100	99
3.4.5.3. Columnas de Biogel A-0,5m y A-15m	99
3.4.6. Purificación de liposomas por ultracentrifugación	100
3.4.6.1. Antecedentes	100

3.4.6.2. Procedimiento	100
3.4.7. Digestión in vitro de liposomas y muestras relacionadas	100
3.4.7.1. Antecedentes	100
3.4.7.2. Digestión de liposomas conteniendo HPTS para la determinación del volumen incorporado y diámetro medio	102
3.4.7.3. Digestión de liposomas conteniendo HPTS para la determinación del pH interno	102
3.4.7.4. Digestión de liposomas con FeAA	103
3.4.7.5. Digestión de soluciones FeAA	104
3.4.7.6. Digestión de productos comerciales conteniendo hierro	104
3.4.8. Evaluación de la absorción de hierro mediante cultivos celulares	104
3.4.8.1. Antecedentes	104
3.4.8.2. Cultivos celulares	105
3.4.8.3. Procedimiento	105
3.5. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS	106
3.5.1. Determinación del volumen acuoso interno de los liposomas y de la incorporación de HPTS y hierro	106
3.5.1.1. Determinación del volumen encapsulado	106
3.5.1.2. Determinación de la incorporación de HPTS y hierro	107
3.5.1.3. Procedimiento y cálculos	107
3.5.2. Determinación del pH interno de liposomas empleando HPTS	108
3.5.2.1. Principio	108
3.5.2.2. Calibración del pH con soluciones de HPTS	109
3.5.2.3. Calibración del pH con liposomas incubados con gramicidina	109
3.5.2.4. Determinación del pH interno en liposomas con HPTS durante la digestión <i>in vitro</i>	110
3.5.2.5. Determinación del pH interno en liposomas conteniendo hierro durante la digestión <i>in vitro</i>	110
3.5.3. Determinación del pH interno de liposomas empleando OG-514	111
3.5.3.1. Calibración del pH con soluciones de OG-514	111
3.5.3.2. Calibración del pH con liposomas SPC con gramicidina	112
3.5.3.3. Determinación del pH interno en liposomas SPC conteniendo OG-514 durante la digestión <i>in vitro</i>	112

3.5.4. Determinación del diámetro medio y distribución de diámetros mediante espectroscopía con detección heterodina	113
3.5.4.1. Principio	113
3.5.4.2. Procedimiento	116
3.5.4.3. Evaluación de diferencias entre lecturas	116
3.5.5. Solubilización de liposomas con Triton X-100 evaluada mediante espectrofotometría UV-visible	118
3.5.5.1. Principio	118
3.5.5.2. Reactivos	119
3.5.5.3. Ensayos preliminares	119
3.5.5.4. Procedimiento	119
3.5.6. Incubación de liposomas con extracto de bilis: monitoreo mediante espectrofotometría UV-visible	120
3.5.6.1. Principio	120
3.5.6.2. Reactivos	120
3.5.6.3. Ensayos preliminares	120
3.5.6.4. Procedimiento	121
3.5.6.5. Estudios a 37°C	121
3.5.7. Evaluación de la pérdida de la HPTS encapsulada en liposomas por efecto del extracto de bilis a 37°C evaluada mediante fluorimetría	122
3.5.7.1. Principio	122
3.5.7.2. Reactivos	122
3.5.7.3. Ensayos preliminares	122
3.5.7.4. Procedimiento	123
3.5.8. Caracterización de liposomas mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC)	124
3.5.8.1. Principio	124
3.5.8.2. Procedimiento	125
3.5.9. Determinación de formas liso de fosfolípidos por RMN de ³¹ P en fase orgánica	125
3.5.9.1. Principio	125
3.5.9.2. Reactivos	126
3.5.9.3. Procedimiento	127

3.5.10. Determinación del potencial Z	128
3.5.10.1. Principio	128
3.5.10.2. Procedimiento	128
3.5.11. Microscopía confocal	129
3.5.11.1. Principio	129
3.5.11.2. Procedimiento	129
3.6. MÉTODOS MATEMÁTICOS	130
3.6.1. Diseño multifactorial de experimentos	130
3.6.1.1. Principio	130
3.6.1.2. Diseño experimental	131
3.6.1.3. Evaluación del modelo	133
3.6.1.4. Selección de las variables	134
3.6.1.5. Procedimiento	134
4. RESULTADOS	136
4.1. RESULTADOS DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS	137
4.1.1. Estudio de interferencias en la cuantificación de fosfolípidos mediante el método de Stewart	137
4.1.2. Estudio de interferencias y rango lineal en la determinación de HPTS	137
4.1.2.1. Espectros de excitación y punto isobéptico de la HPTS	137
4.1.2.2. Filtro interno	138
4.1.2.3. Interferencia del extracto de bilis	140
4.1.2.4. Evaluación del efecto quenching en la fase interna de los liposomas	142
4.1.3. Determinación del contenido de extracto de bilis (EB) por espectrofotometría UV-visible	142
4.1.4. Determinación del contenido de sales biliares en el extracto de bilis mediante electroforesis capilar (CE)	143
4.1.5. Determinación de hierro con o-fenantrolina	144
4.1.5.1. Ensayos preliminares	144
4.1.5.2. Determinación de hierro en presencia de liposomas solubilizados con TX-100	145
4.1.6. Determinación de hierro en cultivos celulares por absorción atómica en horno de grafito	146

4.1.7. Estudio de interferencias en la determinación de proteínas	148
4.1.8. Estudio de interferencias y rango lineal en la cuantificación de quitosano	149
4.1.9. Determinación del grado de desacetilación del quitosano	150
4.2. RESULTADOS DE LOS MÉTODOS PREPARATIVOS	151
4.2.1. Optimización de la preparación de liposomas MLVs HSPC-Chol	151
4.2.2. Optimización de la preparación de liposomas convencionales con HPTS por homogeneización a alta presión	153
4.2.2.1. Liposomas SPC	153
4.2.2.2. Liposomas HSPC	156
4.2.2.3. Liposomas HSPC-Chol	161
4.2.3. Preparación y caracterización de liposomas conteniendo hierro	164
4.2.3.1. Estabilidad de soluciones FeAA	165
4.2.3.2. Preparación y caracterización de liposomas convencionales con FeAA	166
4.2.3.3. Preparación y caracterización de liposomas catiónicos con FeAA	167
4.2.3.4. Preparación y caracterización de liposomas aniónicos con FeAA	168
4.2.3.5. Preparación, caracterización y purificación de liposomas mucoadhesivos conteniendo FeAA	171
4.2.4. Homogeneización de soluciones conteniendo quitosano	176
4.2.5. Separación de liposomas de enzimas y extracto de bilis	176
4.3. SOLUBILIZACIÓN DE LIPOSOMAS	178
4.3.1. Solubilización de liposomas con Triton X-100	178
4.3.1.1. Liposomas HSPC	178
4.3.1.2. Liposomas SPC	182
4.3.1.3. Liposomas HSPC-Chol	183
4.3.2. Solubilización de liposomas con extracto de bilis	184
4.3.2.1. Ensayos preliminares	185
4.3.2.2. Liposomas SPC	186
4.3.2.3. Liposomas HSPC	188
4.3.2.4. Liposomas HSPC-Chol	189
4.4. ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA DE LIPOSOMAS CON HPTS DURANTE	191

LA DIGESTIÓN *IN VITRO*

4.4.1. Efecto del pH ácido sobre el volumen incorporado y la distribución de diámetros	191
4.4.2. Efecto de la digestión sobre el volumen incorporado y la distribución de diámetros	193
4.4.3. Efecto de la digestión sobre la permeabilidad de liposomas	195
4.4.4. Determinación del pH interno de liposomas y de su contenido en HPTS	197
4.4.4.1. Evaluación de interferencias de los liposomas	197
4.4.4.2. Elección del par de excitación para la calibración del pH	198
4.4.4.3. Calibración del pH	198
4.4.4.4. Optimización de la concentración de DPX, quencher de la HPTS	199
4.4.4.5. Determinación del pH interno y monitoreo al punto isobéptico en liposomas con HPTS	202
4.4.5. Determinación del pH interno en liposomas SPC empleando OG-514	204
4.4.5.1. Propiedades del OG-514 en solución	204
4.4.5.2. Estudios con OG-514 incorporado en liposomas	206
4.4.5.3. Determinación del pH interno en liposomas SPC	208
4.4.6. Determinación del contenido residual de HPTS en liposomas digeridos	209
4.4.7. Efecto de la digestión sobre el comportamiento termotrópico de los liposomas HSPC	210
4.4.8. Evaluación de la estabilidad química mediante ³¹ P-RMN	212
4.4.8.1. Ensayos preliminares	212
4.4.8.2. Cuantificación de formas liso en liposomas pre y post digestión	214
4.4.9. Efecto de la incubación a 37°C con extracto de bilis	215
4.5. ESTABILIDAD FISICOQUÍMICA DE LIPOSOMAS CON HIERRO ENCAPSULADO DURANTE LA DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i>	219
4.5.1. Efecto sobre el diámetro medio y las distribuciones de diámetros	219
4.5.2. Determinación del pH interno para liposomas con FeAA y HPTS	221
4.5.2.1. Ensayos preliminares	221
4.5.2.2. Calibración del pH	224
4.5.2.3. pH interno en liposomas con FeAA	225
4.5.3. Evaluación de la estabilidad química mediante RMN de formas liso	227

4.5.4. Determinación del grado de oxidación del hierro libre o incorporado en liposomas por espectrometría Mössbauer	231
4.5.4.1. Ensayos preliminares - Curva de calibración	231
4.5.4.2. Análisis de liposomas	233
4.5.4.3. Consistencia de los parámetros de ajuste	235
4.5.5. Estabilidad del hierro en solución frente a la digestión <i>in vitro</i>	236
4.6. EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE HIERRO ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS	237
4.6.1. Ensayos preliminares con cultivos de Caco-2	237
4.6.1.1. Efecto del REH y de los lavados	237
4.6.1.2. Efecto de la concentración de hierro en las siembras	239
4.6.1.3. Efecto de la eliminación del hierro insoluble	239
4.6.1.4. Efecto de la presencia de enzimas y sales biliares	240
4.6.2. Evaluación de la captación de hierro mediante cultivos de Caco-2	241
4.6.3. Observación de células Caco-2 incubadas con liposomas mediante microscopía confocal	244
5. DISCUSIÓN	246
5.1. EVALUACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	247
5.1.1. Caracterización del extracto de bilis	247
5.1.2. Determinación de hierro por absorción atómica en horno de grafito	248
5.1.3. Análisis de liposomas HSPC por calorimetría de barrido diferencial	250
5.1.4. Determinación del pH interno en liposomas	250
5.2. EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS PREPARATIVOS	252
5.2.1. Optimización de la preparación de liposomas MLVs HSPC-Chol	252
5.2.2. Optimización de la preparación de liposomas por homogeneización a alta presión	254
5.2.3. Preparación de liposomas con quitosano	261
5.2.4. Separación de liposomas de enzimas y extracto de bilis	267
5.3. ESTUDIOS DE SOLUBILIZACIÓN DE LIPOSOMAS	269
5.3.1. Solubilización con TX-100	269
5.3.2. Solubilización con extracto de bilis	275

5.3.3. Incubación de liposomas con extracto de bilis a 37°C	280
5.4. EFECTOS DE LA DIGESTIÓN <i>IN VITRO</i> SOBRE LOS LIPOSOMAS	286
5.4.1. Liposomas con HPTS	286
5.4.2. Liposomas con hierro	295
5.5. EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE HIERRO INCORPORADO EN LIPOSOMAS	298
5.5.1. Aspectos metodológicos	299
5.5.2. Absorción de hierro mediante cultivos de Caco-2	304
6. CONCLUSIONES	313
7. RESUMEN	318
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	321

ABREVIATURAS

AA:	Ácido ascórbico
BSA:	Bovine serum albumin (albúmina sérica bovina)
CE:	Capillary electrophoresis (electroforesis capilar)
Chol:	Colesterol
DC-Chol:	Dimetilamino-carbamoil-Colesterol
DA:	Degree of actetylation (grado de acetilación)
DDA:	Degree of deactetylation (grado de desacetilación)
DO:	Densidad óptica
DPPA:	Dippalmitoyl-phosphatidic acid (ácido dipalmitoil fosfatídico)
DPX:	p-xylene-bis-pyridinium bromide
DSC:	differential scanning calorimeter (calorimetría o microcalorimetría de barrido diferencial)
EB:	Extracto de bilis
FBS:	Fetal bovine serum (suero fetal bovino)
FeAA:	Solución acuosa de la mezcla sulfato ferroso con ácido ascórbico
HEPES:	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HPTS:	8-Hydroxy-1,3,6-pyrenetrisulfonic acid trisodium salt (piranina)
HSPC:	Hydrogenated soya phosphatidylcholine (fosfatidilcolina de soja hidrogenada)
LPC:	Lysophosphatidylcholine (lisofosfatidilcolina)
NTA:	Nitriloacetic acid (ácido nitriloacético)
pan/EB:	Solución pancreatina – extracto de bilis empleada en la digestión <i>in vitro</i>
PC:	Phosphatidylcholine (fosfatidilcolina)
pep/HCl:	Solución pepsina – ácido clorhídrico empleada en la digestión <i>in vitro</i>
SEC:	Size exclusion chromatography (cromatografía de exclusión molecular)
SEM:	Standard deviation of the mean (desviación estándar de la media)
SPC:	Soya phosphatidylcholine (fosfatidilcolina de soja)
TEER:	Transepithelial electrical resistance (resistencia eléctrica transepitelial)

1. INTRODUCCIÓN

1.1. PRESENTACIÓN

Las primeras observaciones sobre el comportamiento en medio acuoso de las lecitinas, datan de mediados del siglo XIX, cuando por primera vez se describieron fenómenos de hinchamiento provocados por la hidratación de estas sustancias (Lasic, 1993). En 1911, Otto Lehmann publica los primeros dibujos de las estructuras microscópicas que se observaban, a las cuales llamó "cristales fluidificados" y que fueron consideradas células artificiales.

Pero no fue sino hasta principios de los 60, cuando el científico británico A.D. Bangham encaró una serie de estudios sistemáticos que permitieron caracterizar las interacciones entre los lípidos y el agua (Bangham, 1963; Bangham et al., 1965; Bangham y Papahadjopoulos, 1966; Bangham et al., 1967; Bangham, 1968; Bangham y Bangham, 1968; Bangham y Haydon, 1968; Bangham, 1972a, b). Él y sus colegas demostraron por primera vez que la difusión de iones hacia el exterior de los cristales líquidos que se forman espontáneamente cuando se hidratan las lecitinas, es muy similar a la difusión de iones a través de las membranas biológicas, asociando este comportamiento a la formación de estructuras vesiculares con un interior acuoso. A partir de este momento, las estructuras denominadas liposomas se emplearon como modelo de membrana celular y proliferaron los estudios de biofísica, estructura y funciones de membranas.

La permeabilidad selectiva de estas vesículas, llevó al investigador británico G. Gregoriadis a mediados de los 70, a formular el concepto del liposoma como transportador de sustancias con actividad farmacológica, es decir como Sistemas de Liberación Controlada (Gregoriadis, 1976). Trabajos posteriores del mismo autor y otros colegas, establecieron la factibilidad de emplear los liposomas con enzimas, sustancias antitumorales y antimicrobianas, y también su habilidad de potenciar la respuesta inmune de antígenos encapsulados (Allison, 1974).

En los años siguientes, los liposomas fueron estudiados por numerosos grupos de investigación como vehículos para transporte y direccionamiento (targeting) de fármacos (Torchillin, 1985; Gregoriadis, 1988) y vacunas (Gregoriadis, 1990; Alving, 1991). Sin embargo, para que estas vesículas se convirtieran en eficaces sistemas de liberación, fue necesario el desarrollo de formulaciones que resultaran estables en medios biológicos y de metodologías que permitieran incorporar cantidades considerables de principio activo.

La producción industrial de formulaciones con liposomas se facilitó mediante el desarrollo de equipamiento para la preparación a gran escala, como los homogeneizadores de alta presión, empleados en forma casi exclusiva a nivel industrial. En la década de los '90, se patentaron métodos para la obtención de liposomas de larga circulación para su administración por vía parenteral. Algunos de ellos dieron lugar a la comercialización de productos con liposomas para distintas aplicaciones, como se comentará en el apartado 1.8.4.

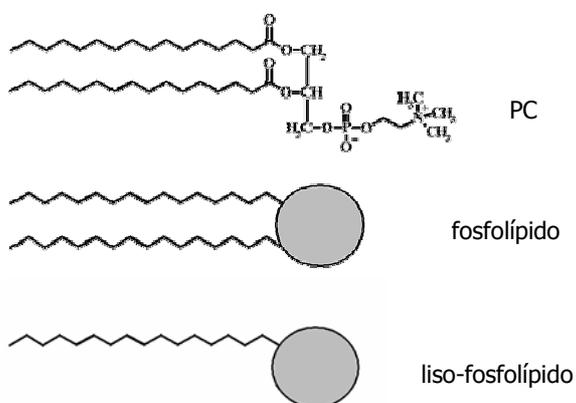
Storm y Crommelin resumen las razones del empleo de los liposomas como transportadores de fármacos (Storm et al., 1991). Por un lado, pueden direccionar un fármaco hacia un sitio determinado en el organismo, controlando su biodistribución; pueden prolongar la exposición al fármaco actuando como reservorios de liberación lenta ("depot"); son capaces de

proteger al activo de la degradación en el organismo; además, protegen al paciente de los efectos colaterales ocasionados por la distribución inespecífica del fármaco libre; en algunos casos pueden actuar simplemente mejorando la disolución de una sustancia insoluble para facilitar su administración; y también funcionar como adyuvantes de vacunas.

La consolidación de los liposomas como sistemas de liberación controlada se enmarca en el desarrollo de la nanotecnología farmacéutica, una rama de la ciencia en la cual se están volcando esfuerzos de numerosos grupos de investigación a nivel mundial. Si bien en la Argentina es un campo todavía poco explorado, se prevé una demanda del sector industrial en el mediano plazo, por lo tanto es importante contar con profesionales formados en estos temas que puedan responder a las necesidades de un país en vías de desarrollo.

1.2. FOSFOLÍPIDOS: UNIDAD ESTRUCTURAL DE LOS LIPOSOMAS

Los fosfolípidos son los componentes principales de las membranas celulares de los seres vivos.



Estructuralmente están compuestos por una molécula de glicerol que está esterificada en los carbonos C1 y C2 con dos cadenas de ácidos grasos, y un grupo fosfato en la posición C3, que puede o no estar unido a un grupo saliente. El grupo saliente más común en la naturaleza es la colina, y el fosfolípido obtenido se denomina fosfatidilcolina (PC), que es el más abundante en las membranas biológicas. En la Fig.1 puede verse la estructura química de la PC y un esquema de un fosfolípido del tipo PC, con su cabeza polar (glicerol + fosfato + grupo saliente) y sus colas hidrofóbicas. Debe señalarse que los enlaces químicos con el glicerol son susceptibles de hidrólisis, y cuando esta

reacción tiene lugar, se originan lo que se denomina liso-fosfolípidos o formas liso, es decir fosfolípidos con una única cadena hidrofóbica unida al glicerol (Fig.1, inferior).

Estrictamente un fosfolípido posee un dominio no polar, representado por las cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos de más de 12 átomos de carbono, un dominio de polaridad intermedia que corresponde al glicerol y sus ésteres, y una zona de alta polaridad representada por el fosfato unido al grupo saliente. Las sustancias que poseen dominios hidrofílicos e hidrofóbicos en la misma molécula se conocen como anfífilos.

La nomenclatura de los fosfolípidos está dada por la naturaleza del grupo saliente unido al fosfato. Este dominio hidrofílico también determina si el fosfolípido en cuestión tiene carga neta negativa, positiva, o se trata de un anfífilo con carga neta nula (Tabla 1). Como puede

observarse, los fosfolípidos más abundantes presentan carga negativa a pH fisiológico a excepción de la PC y la fosfatidiletanolamina (PE).

Tabla 1: Grupos salientes más comunes en la naturaleza, con los nombres de los fosfolípidos correspondientes. El asterisco (*) indica que se trata de la carga que presentan a pH fisiológico.

Grupo Saliente	Nombre del fosfolípido	Abreviatura	Carga (*)
-H	Ácido fosfatídico	PA	Negativa
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)^{3+}$	Fosfatidilcolina	PC	Anfifilo
$-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}^{3+}$	Fosfatidiletanolamina	PE	Anfifilo
$-\text{CHCOO}^-\text{NH}^{3+}$	Fosfatidilserina	PS	Negativa
$-\text{CH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$	Fosfatidilglicerol	PG	Negativa
$-\text{HC}_6\text{H}_5(\text{OH})_5$	Fosfatidilinositol	PI	Negativa

Es importante recordar que cuando se habla de fosfolípidos de origen natural, no se hace referencia a una única sustancia. Así, por ejemplo, el término fosfatidilcolina incluye una familia de moléculas que tienen en común el grupo fosfato unido a colina. Sin embargo la composición de ácidos grasos es variable y depende de la fuente del fosfolípido. En la Tabla 2 se observa la abundancia relativa de los ácidos grasos que componen la fosfatidilcolina proveniente de soja y de huevo (SPC y EPC respectivamente). Así por ejemplo, mientras que solo un 20% de los ácidos grasos de la SPC no presentan dobles enlaces, en la EPC el porcentaje de ácidos grasos saturados llega al hasta un 50%. Cabe aclarar que la abreviatura empleada es la convencional para ácidos grasos, en la cual el primer número indica el número de carbonos y el segundo el número de insaturaciones. Por ejemplo, 18:1 representa un ácido graso de 18 átomos de carbono con 1 doble enlace o insaturación, como el oleico.

Tabla 2: Composición en ácidos grasos de la fosfatidilcolina de de soja (SPC) y de huevo (EPC). Los datos fueron extraídos de R.R.C.New, 1990.

ÁCIDO GRASO		ABUNDANCIA RELATIVA (% p/p)	
Abreviatura	Identificación	SPC	EPC
16:0	Ácido palmítico	17,2	35,3
18:0	Ácido esteárico	3,8	13,5
18:1	Ácido oleico	22,6	26,8
18:2	Ácido linoleico	47,8	5,7
18:3	Ácido α ó γ - linolénico	8,6	0,2
20:4	Ácido araquidónico	-	1,3
20:5	Ácido all cis-eicosapentaenoico ó EPA	-	3,6
22:5	Ácido all cis-docosapentaenoico ó DPA	-	1,3
22:6	Ácido all cis-docosahexaenoico ó DHA	-	12,6

En los ácidos grasos de origen natural, todas las insaturaciones tienen geometría *cis* y no presentan conjugación. Como se verá en el apartado 1.3., el número y la geometría de las insaturaciones tienen influencia en el tipo de ensamblajes que se formen en solución acuosa y en el estado físico de los mismos a una cierta temperatura. También influirá en la estabilidad química de los fosfolípidos, resultando más estables aquellos que posean un menor número de dobles enlaces. Como es sabido, los alquenos son susceptibles a las reacciones de radicales libres en presencia de oxígeno y/o radiación UV, obteniéndose productos de degradación no deseados. Es por esto que frecuentemente se emplean fosfolípidos saturados, obtenidos a partir de los naturales mediante hidrogenaciones catalíticas, como por ejemplo la fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC). Estos productos resultan menos susceptibles a la oxidación que los productos insaturados.

Es frecuente observar que cuando se quiere caracterizar el comportamiento *in vitro* o *in vivo* de una formulación de liposomas se recurre a fosfolípidos sintéticos con una composición definida de ácidos grasos, como por ejemplo la dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) o la dioctanoilfosfatidilcolina (DOPE). También pueden adquirirse fosfolípidos asimétricos, es decir con distintos ácidos grasos en las posiciones C1 y C2. Se trata de materias primas generalmente más costosas que se emplean en la preparación de sistemas cuya composición es muy crítica. Los fosfolípidos sintéticos también suelen emplearse cuando la administración es parenteral, para evitar la presencia de trazas de alérgenos y/o pirógenos, que podrían estar presentes en los de origen natural.

Por el contrario, para formulaciones que se administraran por otras vías, como por ejemplo la vía oral, es interesante partir de productos naturales, que resultan más económicos y en los cuales la composición de ácidos grasos podría no ser crítica para su comportamiento *in vivo*. Debe tenerse en cuenta que hoy en día existen en el mercado fosfolípidos de origen natural altamente purificados y caracterizados adecuadamente.

Cabe mencionar que suele haber bastante confusión a la hora de elegir una materia prima de origen natural. El término "lecitina" puede tener distintas acepciones: en algunos casos se emplea como sinónimo de fosfatidilcolina, pero también está difundido su uso para extractos lipídicos de soja u otras fuentes, con contenidos de fosfatidilcolina que pueden ser tan bajos como un 30%. Se trata de productos parcialmente purificados, con altos contenidos de triglicéridos, de otros fosfolípidos (PE, PI, etc.) y de glicolípidos. El tipo de estructuras que se obtienen a partir de estas mezclas de sustancias generalmente no son de fácil caracterización, y los sistemas obtenidos no tendrán el comportamiento que se esperaría para vesículas de PC pura, lo cual podría llevar a conclusiones erróneas.

1.3. SISTEMAS FOSFOLÍPIDO-AGUA

1.3.1. Estructuras y fases

Los fosfolípidos presentan una solubilidad muy baja en agua, menor a 10^{-7} M. Por encima de esta concentración, las moléculas se organizan formando estructuras que dependen no solo de la concentración y de la temperatura, sino de la geometría de la molécula determinada por su estructura química. En la Fig.2 se observa cómo la forma molecular es clave

para la formación de estructuras complejas estables en solución. Por razones prácticas, se define el parámetro de empaquetamiento (P):

$$P = \frac{V}{a \times l}$$

donde V es el volumen molecular, a es el área transversal de la cabeza polar y l es la longitud de las cadenas hidrocarbonadas. El producto $a \times l$, por lo tanto, es el volumen del cilindro que obtendría a partir del área que cubre la cabeza polar. En el caso de la fosfatidilcolina, P es cercano a la unidad, ya que su geometría es aproximadamente cilíndrica. Pero en una forma lisa, la pérdida de una cadena hidrocarbonada resultará en una disminución del volumen molecular respecto al cilindro calculado, resultando en valores de P menores a la unidad. En algunos casos, como por ejemplo los fosfolípidos con dobles enlaces (geometría *cis*), las cadenas hidrocarbonadas pueden apartarse entre sí, dando lugar a cilindros ensanchados en su base o a áreas transversales menores ($P > 1$). Cada una de estas formas moleculares origina una organización característica.

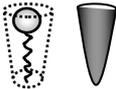
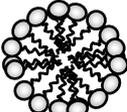
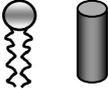
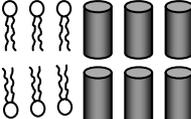
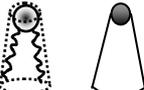
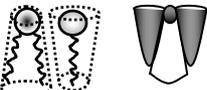
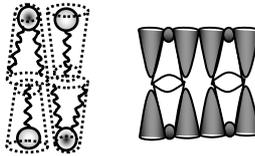
Tipo de lípido	Forma molecular	Organización	Fase
Jabones Detergentes Liso-fosfolípidos	 cono invertido	 micelar	Hexagonal isotrópica I
PC, PS, PI Esfingomielina Diacetilfosfato	 cilíndrica	 bicapa	Lamelar cúbica
PE insaturada PA (pH<3) PS (pH<4) Cardiolipina	 $P > 1$	 micelar	Hexagonal invertida II
Mezclas Liso PC-PE	 $P \sim 1$		Lamelar

Fig.2: Modelo de empaquetamiento geométrico de distintos anfifilos en agregados coloidales. Este modelo se basa en el parámetro de empaquetamiento (P) para predecir la forma de los agregados (Esquema provisto por Dra. Morilla, 2003).

Así, los fosfolípidos del tipo PC, cuando se mezclan con concentraciones de agua entre el 5 y el 45%, se alinean en bicapas planas para minimizar las interacciones entre el medio acuoso y las cadenas hidrocarbonadas, formando fases lamelares. Por encima del 45% de agua, las bicapas se cierran y forman liposomas, secuestrando parte del medio acuoso. El resultado es un

sistema disperso del tipo suspensión, constituido por un medio acuoso interno limitado por las bicapas y un medio acuoso externo.

Además del tipo de fosfolípido y de la proporción de agua, la formación de un tipo determinado de organización depende además de la temperatura; la PE insaturada, por ejemplo, que forma micelas (ver Fig.2), puede formar estructuras lamelares a temperaturas lo suficientemente bajas.

1.3.2. Temperaturas de transición

Según la temperatura, las membranas de lecitina pueden existir en diferentes fases y la transición entre ellas puede observarse mediante técnicas instrumentales, como por ejemplo la calorimetría de barrido diferencial (ver apartado 3.5.8).

Cuando la temperatura aumenta, una bicapa pasa de un estado altamente ordenado o gel sólido, a un estado de mayor desorganización o cristal líquido, en el cual las moléculas de fosfolípidos pueden moverse con mayor libertad. La temperatura a la cual coexisten igual

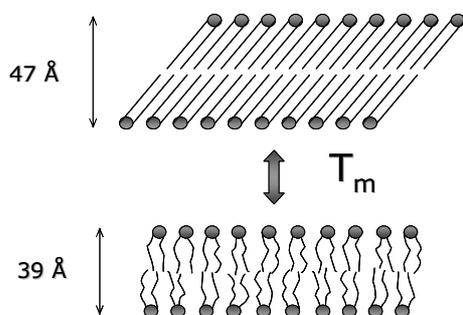


Fig.3: Transición entre la fase gel sólido y cristal líquido de una bicapa de fosfolípidos. T_m : temperatura de transición. Se indica además el espesor de la bicapa a temperaturas inferiores y superiores a T_m .

número de moléculas de fosfolípidos en estado gel sólido que en estado cristal líquido, se conoce como temperatura de transición de fases o T_m .

A nivel molecular, la transición de fases se puede explicar de la siguiente forma. A bajas temperaturas, los fosfolípidos se organizan en bicapas con sus cadenas hidrocarbonadas alineadas, lo cual favorece las interacciones hidrofóbicas entre ellas. En el caso de las fosfatidilcolinas, esta organización va acompañada por una inclinación (*chain tilt*) respecto al plano perpendicular a la membrana, que minimiza la repulsión entre los voluminosos grupos polares de la colina. El alto grado de orden de las cadenas

hidrocarbonadas, se debe a que los enlaces simples C-C adyacentes se encuentran en conformación *all-trans*.

Cuando la temperatura aumenta lo suficiente, los ácidos grasos tienden a adoptar otras conformaciones como las *gauche*, con lo cual disminuye el orden, la inclinación de las cadenas desaparece y el espesor de la bicapa disminuye (ver Fig.3), obteniéndose la fase cristal líquido.

El valor de T_m depende de la longitud de la cadena hidrocarbonada, de su grado de insaturación y de la naturaleza de la cabeza polar. El aumento de la longitud de cadena y del grado de saturación tiene como consecuencia un aumento en la T_m . Por ejemplo, las membranas obtenidas a partir de EPC, con aproximadamente 50% de las cadenas hidrocarbonadas insaturadas, presentan transiciones entre -15°C y -7°C dependiendo de la composición fosfolípida, por lo tanto se encuentran como cristal líquido a temperatura ambiente y a temperatura fisiológica. Por el contrario, las membranas que se obtienen a partir de fosfolípidos sin insaturaciones como DPPC, o bien lecitinas naturales hidrogenadas poseen transiciones por encima de los 40°C . Esto puede entenderse fácilmente si se recuerda la

estructura de un fosfolípido con una o más insaturaciones. Debido a la geometría *cis* de los dobles enlaces de las cadenas acílicas, existe una desorganización, aún a temperaturas bajas (ambiente o menor) debido a la dificultad para apilar eficientemente las cadenas hidrocarbonadas con dobles enlaces. Y este efecto es proporcional al número de insaturaciones, dando lugar a transiciones a muy bajas temperaturas.

Para la fosfatidilcolina en particular, la transición de gel a líquido no ocurre en un solo paso, sino que involucra dos transiciones: la principal y la pre-transición, generalmente unos 5°C por debajo de la principal.

Otro aspecto de una transición gel sólido – cristal líquido es la influencia de la cooperatividad entre los fosfolípidos de una bicapa. Se postula que aún antes de la temperatura de transición, las moléculas de fosfolípidos cooperan entre sí para ganar mayor libertad de movimiento, transfiriéndose energía unas con otras. Si la cooperación es tan eficiente que todas las moléculas experimentan la transición de fases en forma casi simultánea, se habla de una transición completamente cooperativa o de primer orden. Cuando por alguna razón, como por ejemplo la aparición de algún defecto en la bicapa que disminuya su ordenamiento, la cooperación no resulta tan eficiente y se obtienen transiciones de segundo orden que representan la transición de bloques de fosfolípidos o unidades cooperativas.

La temperatura de transición de fases tiene un efecto directo sobre la permeabilidad de las bicapas para distintos solutos. Así, una bicapa en estado gel tiene menor permeabilidad debido a su rigidez, que la misma bicapa en estado de cristal líquido. En particular, en el equilibrio de fases, la aparición de imperfecciones en los límites de los dominios entre las fases, pueden dar lugar a un aumento en la permeabilidad de la bicapa, favoreciendo la salida de sustancias incorporadas (Frezard, 1999).

1.3.3. Incorporación de colesterol

Los esteroides son componentes principales de la mayoría de las membranas naturales, siendo el colesterol el predominante en mamíferos. La incorporación de colesterol a las bicapas de fosfolípidos es uno de los factores que produce los cambios más notorios en sus propiedades.

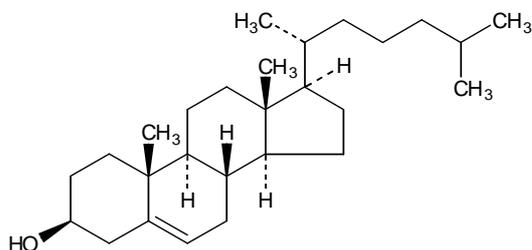


Fig.4: Estructura química del colesterol.

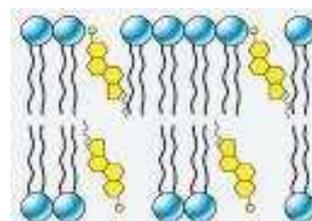


Fig.5: Esquema de la inserción del colesterol en bicapas de fosfatidilcolina.

Si bien no forma bicapas por sí mismo, el colesterol se puede incorporar en las membranas a relaciones molares tan altas como 2:1 de Chol/PC, si bien en las membranas naturales la relación Chol/PC es siempre menor a 1:1 (New, 1990). El colesterol, que también es un anfifilo, se inserta en la bicapa con su grupo OH hacia el exterior acuoso y su estructura

plana hidrofóbica entre las cadenas hidrocarbonadas. Por encima de cierta concentración de colesterol, cercana a 1:1 mol:mol, se pierde parcialmente la organización de las cadenas hidrocarbonadas que maximizaba su interacción. Pero por otro lado, los extremos de los ácidos grasos adquieren una mayor libertad de movimiento, con lo cual se logra un estado similar al cristal líquido pero ahora a bajas temperaturas. Este efecto se traduce como la pérdida de la temperatura de transición, en forma parcial o total según la concentración de colesterol.

La fluidez de la membrana cambia por efecto del colesterol tanto a temperaturas menores como mayores que la T_m . A temperaturas menores, aumenta la fluidez de la fase gel por su mayor desorden debido a la presencia del colesterol. Por el contrario, a temperaturas mayores que T_m , la reducción en la libertad de movimiento de las cadenas hidrocarbonadas lleva a la membrana a un estado de menor fluidez respecto de la bicapa sin colesterol.

1.3.4. Permeabilidad de la membrana

Los liposomas son membranas artificiales semi-permeables, por lo tanto la difusión de sustancias a través de ellas depende, entre otros factores, de la composición de la bicapa y de la estructura fisicoquímica de la sustancia en cuestión, del mismo modo que sucede con las membranas biológicas. Ya a fines del siglo XIX, E. Overton descubrió que las sustancias lipofílicas atravesaban mejor las células que las hidrofílicas, con lo cual la membrana servía como una barrera efectiva para sustancias hidrofílicas. La regla de Overton, que relaciona la permeabilidad con la solubilidad en lípidos, puede expresarse mediante la siguiente ecuación:

$$P = \frac{K \times D}{\Delta x}$$

Donde P es el coeficiente de permeabilidad para una sustancia (en cm/s), K es su constante de partición entre los lípidos y el agua (como por ejemplo octanol/agua), D su coeficiente de difusión y Δx el espesor de la membrana. Según esta ecuación, las moléculas muy hidrofílicas, como la glucosa, atravesarán la bicapa muy lentamente por tener una constante de partición pequeña. Las moléculas pequeñas con carga neutra, como el agua, al poseer una alta velocidad de difusión, tendrán altas permeabilidades a pesar de su bajo coeficiente de partición. Lo contrario ocurrirá para moléculas de alto peso molecular, con bajos coeficientes de difusión. Sin embargo, existen excepciones que llevaron a postular otros mecanismos para explicar comportamientos que no eran explicados por este modelo.

Los iones cargados requieren un tratamiento especial. Los protones (H^+) e hidroxilos (OH^-), por ejemplo, atraviesan las membranas en general rápidamente, contrariamente a los iones sodio y potasio que atraviesan las bicapas mucho más lentamente. Se ha postulado que la permeabilidad de los iones H^+ y OH^- era por lo menos cinco órdenes de magnitud mayor que la de cationes univalentes (Nichols y Deamer, 1980; Elamrani y Blume, 1983; Perkins y Cafiso, 1987). El coeficiente de permeabilidad calculado para los protones a través de bicapas neutras fue de $1,8 \cdot 10^{-5}$ cm/s y el de los hidroxilos fue de $3,8 \cdot 10^{-5}$ cm/s (Norris y Powell, 1990, 1992). Otros autores calcularon los coeficientes de permeabilidad para Na^+ y K^+ empleando una sonda fluorescente específica para estos cationes. Se hallaron valores tan bajos como $5 \cdot 10^{-13}$ cm/s para el potasio y de $6 \cdot 10^{-13}$ cm/s para el sodio (Venema et al., 1993). La permeabilidad de las

bicapas al Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} y otros cationes multivalentes es aún menor que para los cationes monovalentes, como podría esperarse considerando su mayor carga y radio de hidratación (Celis et al., 1974; Kaiser y Hoffmann, 1996).

Debe tenerse en cuenta que la introducción de cargas en las membranas puede alterar la permeabilidad de los iones. Por ejemplo, se ha comprobado que la presencia de carga negativa en la superficie de las bicapas aumenta la permeabilidad de los protones, e incrementa la selectividad de la membrana al transporte del K^+ respecto del Na^+ (Papahadjopoulos, 1971). También puede influir en la permeabilidad la composición iónica del exterior acuoso de la vesícula. De esta forma se demostró que la permeabilidad de los protones puede incrementarse sustancialmente en presencia del anión cloruro en la solución externa. Se postuló que en medios de pH tan bajo como el estomacal, los protones en presencia de cloruro, podrían permear a través de bicapas de fosfatidilcolina como moléculas de HCl, altamente permeables (Barreto y Lichtenberger, 1992).

La gran diferencia entre la permeabilidad de los iones H^+ y OH^- y los cationes univalentes estaría sugiriendo un mecanismo especial que facilitaría su movimiento a través de las bicapas. Hasta la fecha se han planteado dos mecanismos mediante los cuales una molécula o ión atraviesa una membrana. Uno es la difusión a través de la bicapa, que es aceptada para moléculas neutras y pequeñas como el agua. El otro es la permeación a través de poros transitorios que podrían formarse por fluctuaciones térmicas (Lawaczeck y Pitterich, 1988). Las entidades que logran atravesar la membrana por este mecanismo tendrían los mayores coeficientes de permeabilidad. Preparando bicapas de diferentes espesores, se estudió qué mecanismos intervenían en cada caso: si la permeabilidad era independiente del espesor, podría postularse un modelo de difusión mientras que en un modelo de poros la permeabilidad variaría con el espesor en forma exponencial (Paula et al., 1996). Se observó que los coeficientes de permeabilidad moléculas neutras como el agua, la urea y el glicerol, con valores cercanos a 10^{-6} cm/s, son prácticamente insensibles al cambio en el espesor de la bicapa, lo que explicaría un mecanismo gobernado por la difusión. Por el contrario, el coeficiente de permeabilidad para los H^+ depende del espesor en forma exponencial, lo cual podría ser explicado por un modelo de poros. Los cationes K^+ , con una permeabilidad mucho menor que los protones y las moléculas neutras, presentan un modelo bifásico, que podría explicarse mediante un mecanismo mixto según el espesor de la bicapa.

Los aniones tienen en general una muy baja permeabilidad a través de las bicapas, con la excepción del bicarbonato, que podría estar involucrado en el transporte de protones a través de la membrana. El anión bicarbonato tiene una permeabilidad de $4,3 \cdot 10^{-6}$ cm/s mientras que la del cloruro, por ejemplo fue calculada como $5,5 \cdot 10^{-11}$ cm/s (Toyoshima y Thompson, 1975).

La permeabilidad de las sondas fluorescentes empleadas normalmente para estudios *in vitro* es bastante variable. Se ha descrito que la fluoresceína y derivados tienen altas permeabilidades, mientras que la piranina o HPTS (ácido 8-hidroxipireno-1,3,6-trisulfónico) es una molécula sintética que resulta prácticamente impermeable a las bicapas, al menos por un mecanismo de difusión pasiva (Aguedo et al., 2001). Esto se debe a sus tres grupos sulfónicos que permanecen cargados en un amplio rango de pHs. Por el contrario, otras sondas como el Oregon Green, pierden su carga neta a pH ácido (menor que 2) con el consecuente aumento de su permeabilidad a través de las bicapas (Avnir y Barenholz, 2005).

Como se explicó en el apartado 1.3.3., el agregado de colesterol a las bicapas compuestas por fosfolípidos saturados, es factor que modifica la permeabilidad. Al eliminarse la temperatura de transición, las vesículas no presentan la permeabilidad máxima característica a T_m , lo cual minimiza la pérdida de material encapsulado.

También debe tenerse en cuenta que debido a tratarse de membranas semi-permeables, un gradiente de concentración entre el medio acuoso externo e interno, genera una presión osmótica, que podría llevar a la inestabilización del liposoma. Así, frente a una alta concentración de soluto encapsulado en un buffer diluido, la vesícula tenderá a hincharse y aumentará la permeabilidad del soluto hacia el exterior, pudiendo incluso llegar a la desintegración de la bicapa. Por el contrario, si la concentración de soluto es menor en el interior acuoso que en el exterior, el agua tenderá a salir de la vesícula, produciendo su deshidratación y finalmente su colapso.

1.4. LIPOSOMAS: CLASIFICACIONES

1.4.1. Clasificación según su estructura física

Además de su composición química, que determina propiedades como la fluidez, la densidad de carga y la permeabilidad, los liposomas pueden ser caracterizados por su forma y su tamaño. Según el método empleado en la preparación, pueden obtenerse desde pequeños liposomas unilamelares (SUVs o *small unilamellar vesicles*) hasta liposomas compuestos por múltiples bicapas concéntricas (MLVs o *multilamellar vesicles*).

Los SUVs son los liposomas más pequeños y resultan unilamelares debido a las restricciones estéricas que tienen lugar cuando la curvatura de la bicapa es muy pronunciada. El

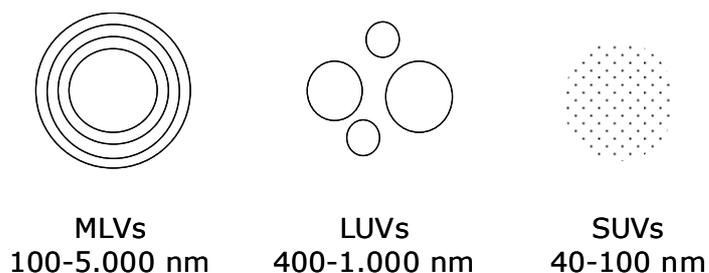


Fig.6: Clasificación de liposomas según su estructura física, indicando el rango de tamaños usual en cada clase. MLVs: *Multilamellar vesicles*, LUVs: *large unilamellar vesicles*, SUVs: *small unilamellar vesicles*.

límite de tamaño está dado por la composición lipídica, la fuerza iónica del medio, el método de preparación y la temperatura, entre los factores más influyentes. Las vesículas más pequeñas que pueden obtenerse son del orden de 15-25 nm. Los MLVs suelen ser poblaciones heterogéneas de vesículas en el rango de 100 a 5.000 nm, normalmente obtenidas cuando los fosfolípidos se hidratan durante el proceso de obtención, y

se aplica al sistema una baja cantidad de energía. Los LUVs (*large unilamellar vesicles*) son liposomas de gran tamaño pero compuestos por una sola bicapa y suelen emplearse cuando se pretende maximizar el volumen acuoso interno. La Fig.6 muestra esquemas de cada clase de liposomas.

Otro tipo de liposomas que se mencionan en la literatura son los REVs (*reverse phase evaporation vesicles*) y los DRVs (*dehydration-rehydration vesicles*). Los REVs son vesículas que

obtenidas mediante una metodología en fase reversa partiendo de una emulsión w/o, que generalmente tienen las características de los LUVs, es decir una única bicapa rodeando un gran espacio acuoso interno. Los DRVs son vesículas obtenidas por deshidratación de una mezcla de liposomas con la sustancia a encapsular, que luego se rehidrata para obtener la sustancia en el interior acuoso. La obtención de estas vesículas se describirá en el apartado 1.6.

1.4.2. Clasificación según sus aplicaciones

La clasificación tradicional para los liposomas según su aplicación comprende las siguientes clases: liposomas **convencionales**, liposomas **estéricamente estabilizados** o STEALTH®, **inmunoliposomas** y liposomas **catiónicos**.

Los liposomas **convencionales** son vesículas no funcionalizadas compuestas por fosfolípidos naturales o sintéticos, que pueden contener además otros lípidos como colesterol. Si bien sus aplicaciones son diversas, en su mayoría han demostrado ser ineficientes para aplicaciones parenterales, ya que se degradan en contacto con el torrente sanguíneo. Sin embargo, la característica de ser captados preferencialmente por los macrófagos del hígado o riñón, ha sido aprovechada para enviar antimicrobianos cuando estos macrófagos se hallan infectados por patógenos intracelulares (Schiffelers et al., 2001).

Los liposomas **estéricamente estabilizados**, también conocidos como peguilados o tecnología STEALTH, son liposomas preparados con un porcentaje entre 2,5 y 20% molar de fosfolípidos a los cuales se ha unido en forma covalente una cadena de polietilenglicol (PEG) de 2.000 a 5.000 Da de peso molecular. Como su nombre lo indica, "stealth" que se traduce como oculto o escondido, el recubrimiento de la superficie del liposoma con un polímero dificulta la opsonización y captación por macrófagos, confiriéndoles una alta estabilidad en plasma y largos tiempos de circulación, lo cual permite que extravasen hacia los tejidos en zonas de inflamación o en tumores sólidos, como se discutirá en el apartado 1.8.1.

Los **inmunoliposomas** han sido diseñados para poseer especificidad tisular o celular. En general se trata de vesículas con anticuerpos, fragmentos de anticuerpos u otras moléculas unidas en la superficie que le confieren la propiedad de unirse a un antígeno o receptor en forma específica. Por ejemplo, se ha visto que liposomas manosilados conteniendo el toxoide tetánico (TT) fueron eficientemente captados por las células dendríticas, despertando una respuesta inmune mucho mayor que liposomas convencionales conteniendo el TT (Copland et al., 2003). Un ejemplo de liposomas unidos a anticuerpos moleculares es el MCC-465, que encapsula doxorubicina. Se trata de un inmunoliposoma protegido con cadenas de PEG que terminan en fragmentos del anticuerpo monoclonal humano GAH. El sistema se encuentra atravesando ensayos clínicos para su aprobación (Matsumura et al., 2004). Recientemente han aparecido "reviews" sobre aplicaciones específicas de los inmunoliposomas, donde se muestra su habilidad para el transporte de fármacos hacia el cerebro (Schnyder y Huwyler, 2005) o su aplicación para alcanzar en forma específica los receptores de las células tumorales (Sapra et al., 2005).

Como ha quedado demostrado, los liposomas convencionales, que poseen carga neta neutra o negativa a pHs fisiológicos, resultan ineficientes para la transfección de material genético. El desarrollo de lípidos catiónicos que pueden ser incorporados en las bicapas de

liposomas fue la clave para lograr la incorporación de ácidos nucleicos con alta eficiencia. Los liposomas así obtenidos se conocen como **catiónicos** y algunas formulaciones de los mismos se encuentran atravesando ensayos clínicos. La variedad de lípidos catiónicos es muy grande, comercializándose desde moléculas de estructura similar a los fosfolípidos, hasta derivados del colesterol en los cuales el grupo β -OH ha sido derivatizado para obtener una molécula con carga positiva. Dentro del primer grupo, se encuentran algunos lípidos como DOTMA (dioleiloxipropil-trimetilamonio) y DOTAP ó N-(1,2-dioleil-dihidroxipropil)-N,N,N-(trimetilamonio), generalmente empleados en mezclas con DOPE (dioleil-fosfatidil-etanolamina). Las vesículas catiónicas obtenidas con estos lípidos pueden formar complejos con los ácidos nucleicos (lipoplexes), o bien pueden incorporar el material genético aumentando su protección, mediante tecnologías como Lipodine ® que permite obtener DRV_s (Perrie et al., 2002). La relativamente alta toxicidad de los fosfolípidos catiónicos, llevó a la síntesis de los derivados del colesterol, como el K-Chol, O-Chol y DC-Chol o dimetilaminoetano-carbamoil-colesterol (Gao y Huang, 1991), cuya estructura se muestra en la Fig.7.

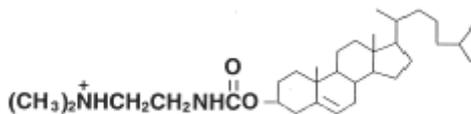


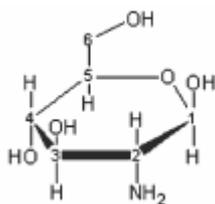
Fig.7: Estructura química del DC-Chol (colesterol-3 β -carboxiamidoetilen-N-hidroetilamina).

El DC-Chol, además de ser prácticamente atóxico, tiene un comportamiento similar al colesterol en su relación con los fosfolípidos, con lo cual pueden obtenerse liposomas catiónicos mediante los mismos métodos de preparación (Choi et al., 2001; Choi et al., 2004).

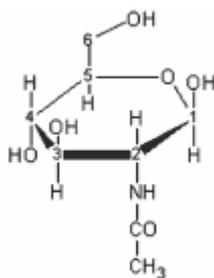
Sin embargo, esta clasificación tradicional no incluye la totalidad de las aplicaciones que han aparecido recientemente empleando liposomas u otros sistemas lipídicos. Con el objeto de solucionar algunos problemas como la inestabilidad de los liposomas *in vivo* y poder controlar la liberación de las sustancias incorporadas, surgieron nuevas clases de liposomas, que se mencionan brevemente a continuación.

Los liposomas **polimerizados** se preparan a partir de fosfolípidos insaturados como por ejemplo la 1,2-di (2,4-octadecadienoil) fosfatidilcolina (DODPC), que pueden unirse entre sí covalentemente en presencia de iniciadores de polimerización. Se están estudiando como alternativa para la administración de vacunas por vía oral, resultando más estables que los liposomas convencionales (Clark et al., 2002). La tecnología para la obtención de vesículas polimerizadas de 200 nm se encuentra registrada como Orasomas ®. También se han estudiado liposomas **con core polimerizado** conteniendo colágeno y carrageninas en su interior acuoso, para administración oral de citostáticos (Moutardier et al., 2003). Los liposomas **pH sensibles**, cuyas bicapas se inestabilizan a pHs ácidos, han sido empleados exitosamente para poder liberar su contenido al citoplasma una vez que se fusionan con los lisosomas en el interior celular (Morilla et al., 2005). Los liposomas **ultradeformables** se preparan en presencia de sustancias que actúan como activadoras de borde, como por ejemplo el colato de sodio, permitiéndoles curvaturas positivas y negativas sin que se vea afectada la estructura del liposoma. Tienen la propiedad de poder penetrar a través de poros 10 veces menores a su diámetro efectivo y se están empleando con éxito para administración transdérmica de numerosos fármacos como glucocorticoides (Cevc y Blume, 2004) y hasta DNA plasmídico (Lee et al., 2005).

Con el objetivo de explorar las vías de administración por mucosas, se obtuvieron diferentes **liposomas mucoadhesivos**, recubriendo la superficie de liposomas convencionales con polímeros que poseen propiedades mucoadhesivas como el quitosano. El quitosano es un



Monómero deacetilado



Monómero acetilado

Fig.8: Monómeros del quitosano: glucosamina (deacetilado) y N-acetilglucosamina (acetilado).

polímero natural hidrofílico extraído de crustáceos, que es soluble a pHs ácidos o levemente ácidos. Es biocompatible, biodegradable y de baja toxicidad (Hirano et al., 1988). Se obtiene por desacetilación parcial de la quitina, polímero de N-acetilglucosamina. Por lo tanto, resulta un copolímero con un porcentaje variable de monómeros acetilados (N-acetilglucosamina) y deacetilados (glucosamina) (ver Fig.8). El porcentaje o grado de desacetilación (DDA) de los productos comercializados suele estar entre el 55 y el 99%, dependiendo de la materia prima de partida y del proceso de obtención, mientras que los pesos moleculares de los productos purificados oscilan entre 150.000 y 1.500.000 Da.

Los primeros antecedentes de la obtención de liposomas cubiertos por quitosano datan de los 90 (Alamelu y Rao, 1991 ; Henriksen et al., 1994 ; Takeuchi et al., 1994). Ante la gran variedad de materias primas disponibles, fueron necesarios estudios sobre las propiedades mucoadhesivas de cada tipo de quitosano, para poder seleccionar el más adecuado según la aplicación. La mucoadhesividad fue estudiada *in vitro* empleando mucosa intestinal porcina y midiendo la fuerza de despegue de películas preparadas a partir del polímero (Lehr et al., 1992). El quitosano de alto peso molecular, en muchos casos denominado de alta viscosidad, presentó la mayor fuerza de despegue, por lo tanto sería el más mucoadhesivo.

En cuanto a las interacciones entre el quitosano y los liposomas, era de esperar que se adsorbiera en forma más eficiente a liposomas con carga negativa, ya que a pH 7 o menor, los grupos amino del quitosano parcialmente deacetilado se encuentran protonados, lo cual le confiere una carga neta positiva. De hecho, los primeros sistemas liposomas-quitosano incluían fosfolípidos con carga negativa para favorecer la adsorción del polímero (Takeuchi et al., 1996). Sin embargo, algunos estudios demostraron que existe una fuerte interacción entre el quitosano y las bicapas de DPPC (liposomas sin carga neta), evidenciada por una pérdida gradual de la cooperatividad en la transición de fases (apartado 1.3.2.), que era dependiente de la concentración del polímero (Fang et al., 2001). Se vio que esta interacción aumentaba a bajos pHs y con el peso molecular del quitosano, e impedía que el polímero fuera desorbido con los lavados o con la dilución. Otros investigadores obtuvieron incrementos similares en la mucoadhesividad cuando el quitosano fue adsorbido a liposomas neutros, positivos y negativos, respecto a sus homólogos sin recubrimiento (Galovic Rengel et al., 2002). Sin embargo los autores no realizan una cuantificación del quitosano adsorbido ni determinan el potencial Z de las vesículas recubiertas. Por lo tanto, según los resultados de los autores anteriores, la carga negativa del liposoma no parecería ser un requisito para una adsorción eficiente del quitosano.

1.5. LIPOSOMAS: CARACTERIZACIÓN

El comportamiento de los liposomas *in vitro* e *in vivo* está determinado por múltiples factores como su composición química, tamaño, lamellaridad, permeabilidad, el contenido de sustancia incorporada y su estabilidad. Por lo tanto es fundamental contar con métodos que permitan la caracterización fisicoquímica de los liposomas y sus productos de degradación. A continuación se hará un breve resumen de los métodos de análisis comúnmente empleados.

1.5.1. Caracterización química

La caracterización química de los liposomas se fundamenta en la cuantificación del contenido y del estado de los fosfolípidos y de la sustancia incorporada. Pero además resulta fundamental verificar el estado de los fosfolípidos, ya que de esto dependerá la integridad estructural de las membranas.

La cuantificación de fosfolípidos puede realizarse mediante métodos inespecíficos que determinan su contenido total, o métodos específicos que determinan la composición fosfolipídica. Los métodos específicos más empleados son la cromatografía en fase delgada o TLC (*thin layer chromatography*), que es un método semi-cuantitativo; la cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (AOAC, 1996) y la resonancia magnética nuclear (RMN) de ^{31}P que permite la determinación cuali-cuantitativa de mezclas de fosfolípidos (Meneses y Glonek, 1988). En cuanto a los métodos inespecíficos, los dos más empleados son el de Bartlett (Bartlett, 1959) y el de Stewart (Stewart, 1959). El primero consiste en la mineralización de los fosfolípidos para obtener fósforo inorgánico, que reacciona con fosfomolibdato de amonio y ácido aminonaftilsulfónico para dar un complejo que se determina espectrofotométricamente a 800 nm. Posee la ventaja de requerir una única curva de calibración para todas las composiciones fosfolipídicas, pero la desventaja de no poder aplicarse para liposomas preparados en buffer fosfato. El método de Stewart consiste en la formación de un complejo entre los fosfolípidos y el ferrotiocianato de amonio, que se extrae en cloroformo y se determina espectrofotométricamente a 475 nm. Su ventaja es que no interfieren los buffers fosfato, pero en este caso debe realizarse una curva para cada composición lipídica.

Como se expuso en el apartado 1.2., los fosfolípidos son susceptibles de ser degradados, fundamentalmente los que contienen una o más insaturaciones. Los fosfolípidos en general, pueden perder una de las cadenas acílicas cuando se produce la ruptura de la unión éster con el glicerol, por acción enzimática u otros agentes de degradación como el oxígeno, la luz UV y la presencia de trazas de metales de transición. Así se originan las formas liso, que conservan solo una cadena hidrocarbonada. Si estas formas liso alcanzan una concentración lo suficientemente elevada, el resultado es la inestabilización estructural de las bicapas, que pueden fusionarse, alterar su permeabilidad y eventualmente desintegrarse por la formación de micelas (Inoue y Kitagawa, 1974; Weltzien et al., 1976).

En cuanto a los fosfolípidos mono-insaturados, la oxidación se traduce en la formación de hidroperóxidos que se transforman espontáneamente en aldehídos. Los fosfolípidos con más de una insaturación se oxidan formando endoperóxidos y luego dienos o trienos conjugados, inexistentes en las cadenas hidrocarbonadas intactas.

Las formas liso pueden determinarse por los mismos métodos específicos mencionados para la determinación específica de fosfolípidos: TLC, HPLC o RMN de ^{31}P , ya que las señales correspondientes a las formas liso se resuelven de las correspondientes a los fosfolípidos que les dieron origen. También existen métodos para evaluar las formas de degradación correspondientes a las cadenas acílicas. Así, los hidroperóxidos se determinan mediante su reacción con triioduro de potasio y acetato de Cadmio, con los que se obtiene un complejo que se mide a 353 nm. Los endoperóxidos se cuantifican mediante su reacción con ácido barbitúrico (TBA para dar un complejo que absorbe a 532 nm). Pero el método más sencillo empleado para obtener un índice del grado de oxidación de las bicapas es el conocido como índice de Klein, en el cual se determina mediante un espectro en la zona ultravioleta las señales características correspondientes a dienos y trienos. Los fosfolípidos naturales, ya sean saturados o insaturados, poseen un pico de absorbancia al UV a muy bajas longitudes de onda (200-215 nm). Cuando se produce una reacción por radicales libres, los dobles enlaces se estabilizan por conjugaciones que antes no existían. La presencia de dos (dienes) o tres (trienos) dobles enlaces adyacentes, cambia el espectro UV de una solución alcohólica de los fosfolípidos, por la aparición de señales alrededor de los 230 y 270 nm respectivamente. Para tener una idea del grado de oxidación suele calcularse el índice de Klein, como:

$$\text{Índice de Klein} = \frac{A_{233}}{A_{215}}$$

donde A_{233} y A_{215} son las absorbancia a 233 y 215 nm respectivamente de una solución de fosfolípidos en etanol. Otra aproximación similar es el cálculo del grado de oxidación mediante:

$$\% \text{Oxidación} = \frac{A_{233}/30.000}{\text{conc. fosfato}} \times 100$$

donde A_{233} es la absorbancia a 233 nm, 30.000 es el coeficiente de extinción de los dienos (l/mol), y "conc. fosfato" es la concentración molar de fosfato presente en la muestra.

Para cuantificar la concentración de sustancia encapsulada para una concentración de fosfolípidos determinada, ésta debe separarse de la que no ha sido encapsulada. La purificación de liposomas de la sustancia no encapsulada suele hacerse mediante cromatografía de exclusión molecular o SEC, ya sea en columnas por gravedad o en minicolumnas por centrifugación con geles del tipo Sephadex. También se puede emplear la ultracentrifugación, pero deben hallarse las condiciones adecuadas según la composición del liposoma.

Una vez separada, deberá determinarse el contenido de sustancia por el método más adecuado, para lo cual los liposomas deberán ser solubilizados con un solvente o tensioactivo que permita obtener una solución de la sustancia a determinar. En cada caso deberá verificarse la ausencia de interferencias en la determinación, por la presencia de los liposomas solubilizados y los solventes o tensioactivos empleados.

1.5.2. Caracterización física

Uno de los aspectos más importantes en la caracterización de los liposomas es la distribución de tamaños. Se ha estudiado exhaustivamente la importancia de este parámetro en el comportamiento de los liposomas *in vitro* e *in vivo* (Nagayasu et al., 1999).

Años atrás era usual emplear técnicas de microscopía para la determinación del tamaño de los liposomas (Huang, 1969; Watts et al., 1978). En toda microscopía, las limitaciones principales están dadas por dos factores: los artefactos que se producen durante la preparación de la muestra y el error humano, ya que tanto la selección de los campos a estudiar como el tratamiento estadístico corren por cuenta del operador. En la Figuras 9, 10 y 11 se muestran ejemplos de liposomas analizados mediante las técnicas microscópicas que se explican a continuación.

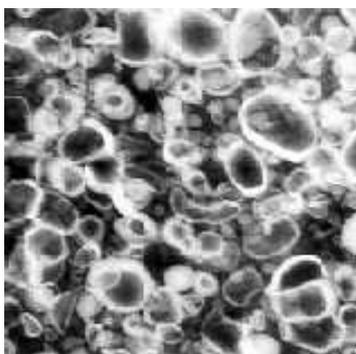


Fig.9: Liposomas preparados por tinción negativa observados mediante TEM (Dr. Barnadas, UAB).



Fig.10: Liposomas preparados por criofractura observados mediante SEM (Dra. Pilar García, UAB).

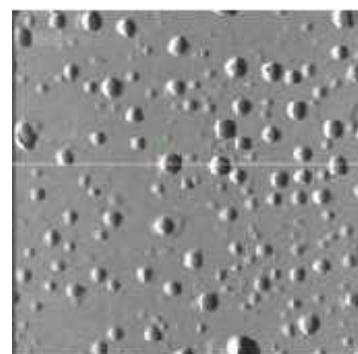


Fig.11: Liposomas observados mediante AFM (Ruozi et al., 2005).

La microscopía electrónica de transmisión (TEM; Fig.9), empleando el método de la tinción negativa, consiste en embeber los liposomas en una fina película con alta densidad electrónica, con lo cual las vesículas aparecen como áreas más brillantes sobre un fondo oscuro. Esta es una técnica muy sensible a los artefactos debido principalmente a la manipulación de la muestra durante su preparación. Por lo tanto su empleo hoy en día, está limitado a la observación de los liposomas y visualización de las bicapas.

Otra metodología que suele emplearse para la observación de liposomas es la criofractura (Fig.10). Esta técnica aporta menos artefactos durante la preparación de la muestra ya que las estructuras se congelan con nitrógeno líquido y luego son fracturadas mediante un micrótopo y observadas mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM).

Una de las microscopías que se está aplicando en la actualidad para liposomas es la microscopía de fuerza atómica (AFM; Fig.11), mediante la cual se pueden reconstruir imágenes tridimensionales y estudiar algunas propiedades mecánicas de los mismos (Mao et al., 2004). Ruozi et al hallaron una buena correlación entre los diámetros de liposomas catiónicos determinados por AFM y mediciones de los mismos obtenidas por espectroscopía de correlación fotónica (PCS), una de las técnicas más robustas para este análisis (Ruozi et al., 2005). Sin embargo debe tenerse mucho cuidado con la preparación de la muestra, ya que el tamaño y forma de los liposomas pueden verse alterados. También debe seleccionarse el modo de operación del equipo, para evitar la deformación de las estructuras flexibles de los liposomas.

La determinación del tamaño por técnicas espectroscópicas se basa en la dispersión de la luz producida por las partículas. Las variaciones de intensidad de esta dispersión, dependen, entre otros factores, del movimiento de las partículas, que a su vez es dependiente de su tamaño. Esta es la metodología más empleada para el control de calidad de formulaciones liposomales, por su simplicidad y confiabilidad; sin embargo debe tenerse en cuenta que los artefactos en la determinación pueden provenir del tratamiento matemático que realiza el equipo. Es fundamental, por lo tanto, la adecuada interpretación de los resultados obtenidos. También es importante la preparación de la muestra en cuanto a la magnitud de la dilución y el medio en que se realiza. En cada caso deberá verificarse que la manipulación de la muestra no altere la distribución de tamaños de la muestra original.

La calorimetría de barrido diferencial, cuyo principio se explicará en el apartado 3.7.10., puede emplearse para realizar una caracterización física que puede resultar complementaria a la determinación de diámetros por técnicas espectroscópicas. Se ha estudiado que las vesículas de mayor tamaño (LUVs) así como los MLVs mayores a 100 nm presentan transiciones completamente cooperativas o de primer orden, lo que da lugar a termogramas con señales muy estrechas. Esto puede explicarse por la gran eficiencia en la transferencia de energía entre las moléculas de fosfolípidos, lo que produce una transición en un rango muy pequeño de temperaturas, según lo expuesto en el apartado 1.3.2. Por el contrario, las vesículas pequeñas (SUVs) presentan una menor cooperatividad, por efecto del menor radio de curvatura sobre el grado de empaquetamiento. Esta menor eficiencia en el empaquetamiento de los fosfolípidos en los SUVs, podría disminuir las interacciones entre las mismas durante la transición, lo cual se traduce en bandas ensanchadas de menor intensidad (Ye y Biltonen, 1994). Por otro lado, también se ve afectada la posición de la señal, obteniéndose menores temperaturas de transición para las vesículas más pequeñas.

Otra de las metodologías para estudiar la estructura física de los liposomas es la resonancia magnética nuclear de ^{31}P en medio acuoso. Desde hace años se ha estudiado que distintas poblaciones de vesículas dan lugar a señales características en el espectro de RMN. Así por ejemplo, se obtienen señales anchas (anisotrópicas) para vesículas de tamaños medios o grandes y señales estrechas (isotrópicas) para SUVs. En el extremo, las micelas permiten obtener los espectros de líneas más estrechas, como fue demostrado mediante RMN de ^{31}P de mezclas PC/liso-PC entre 100:0 y 10:90 mol:mol respectivamente (Van Echteld, 1981). Esta técnica también puede ser empleada para estudiar el tipo de organización supramolecular. Así pueden diferenciarse las organizaciones de bicapas, que originan señales ensanchadas con hombros a campos menores, de organizaciones en fase hexagonal HII, que dan señales más estrechas con hombros a campos más altos que la señal principal (Gruner, 1992).

1.5.3. Solubilización con tensioactivos

El proceso de solubilización de liposomas con tensioactivos, ha sido objeto de un número considerable de investigaciones. El comportamiento de las mezclas acuosas de lípidos y surfactantes ha sido estudiado por investigadores de proteínas de membrana, tanto para la extracción de las mismas, como para su reconstitución, en modelos de membranas a base de formulaciones de liposomas (Rigaud et al., 1995). Por otro lado, la estabilidad de las

suspensiones de liposomas empleadas para la liberación controlada de sustancias con acción terapéutica, está relacionada con su resistencia a distintos tipos de surfactantes. Por ejemplo, en el caso de los liposomas diseñados para la administración por vía oral, es indispensable conocer el comportamiento del sistema frente a tensioactivos naturales, como las sales biliares (Hildebrand et al., 2004).

El término "solubilización" describe la transformación de las bicapas lipídicas en micelas mixtas, mediada por tensioactivos o detergentes, de ahí que también se denomine "micelización". Este proceso se estudia mediante diversas técnicas, si bien la más difundida es la turbidimetría, que consiste en monitorear la densidad óptica de las suspensiones de liposomas a medida que se transforman en micelas (Paternostre et al., 1988). Esta técnica presenta ventajas respecto a otras, ya que es un método simple y rápido, que emplea como único equipamiento un espectrofotómetro. Además, permite variar las concentraciones de fosfolípidos en un amplio rango y no requiere la separación entre vesículas y micelas. Sin embargo, no debería en principio ser empleada en forma exclusiva debido a que suelen aparecer artefactos, como por ejemplo la formación de agregados o la dificultad para detectar la solubilización total, que pueden llevar a una interpretación errónea de los resultados. Por lo tanto, suelen emplearse métodos complementarios para confirmar las etapas del proceso. Entre ellos se encuentran:

- Determinación de la distribución de diámetros mediante técnicas espectroscópicas (De La Maza et al., 1998)
- Resonancia magnética nuclear de ^{31}P , que permite calcular el porcentaje de micelización a través de la señal aguda de las micelas de fosfatidilcolina (Zuidam et al., 1995)
- Centrifugación, donde se analiza el contenido de lípidos solubilizados (como micelas) en el sobrenadante (Schnitzer et al., 2003)
- Microscopía electrónica con criofractura, mediante la cual pueden visualizarse las estructuras generadas a lo largo del proceso (López et al., 1998)

Los resultados de numerosos estudios realizados durante los años 70 y 80, llevaron a postular un modelo de tres etapas, que describe el comportamiento de las bicapas lipídicas en presencia de concentraciones crecientes de tensioactivos (Helenius y Simons, 1975; Lichtenberg et al., 1983).

En la Etapa I, el tensioactivo se reparte entre la bicapa lipídica y el medio acuoso, en el cual se encuentra en forma monomérica. Como se observa en la Fig.12, existe en esta etapa un equilibrio entre vesículas lipídicas puras y vesículas mixtas, que contienen cantidades variables de tensioactivo. La Etapa I finaliza cuando las bicapas lipídicas se encuentran saturadas con el tensioactivo. Este punto, generalmente caracterizado por un máximo en la densidad óptica o turbidez, está caracterizado por la concentración de detergente total que se denomina D_t^{sat} o bien D_t^{on} (por onset: comienzo de la solubilización), y a partir de ella se obtiene, para la concentración de fosfolípidos considerada, la máxima fracción molar que puede incorporar una bicapa lipídica conservando una estructura lamelar.

Debe aclararse que el aumento de la densidad óptica descrito es atribuido a distintos factores, según la fuente bibliográfica. De este modo, se ha postulado que el aumento podría deberse a la aparición de fenómenos de fusión y/o agregación masiva, lo cual permitiría explicar incrementos de hasta el 300%, hallados en liposomas SUVs incubados a temperatura

ambiente con TX-100 (Paternostre et al., 1988). En otros casos, aumentos moderados de la turbidez se atribuyen al aumento del diámetro debido a la inserción del tensioactivo en las bicapas (López et al., 1998). También se ha postulado la adsorción de micelas sobre la superficie de los liposomas, que sería un tipo de agregación heterogénea (Fu y Laughlin, 1980). Sin embargo, todos coinciden en que el perfil de solubilización en la zona de saturación está estrechamente vinculado a la estructura de las vesículas (SUVs, LUVs o MLVs), como se discutirá posteriormente (apartado 5.3.1.).

Por otro lado, si bien durante esta etapa no ocurre la solubilización, se ha demostrado que las perturbaciones que los tensioactivos ocasionan a la estructura de las bicapas, producen aumentos drásticos en la permeabilidad de las vesículas, generalmente asociados a la pérdida parcial de su contenido (Levy et al., 1990).

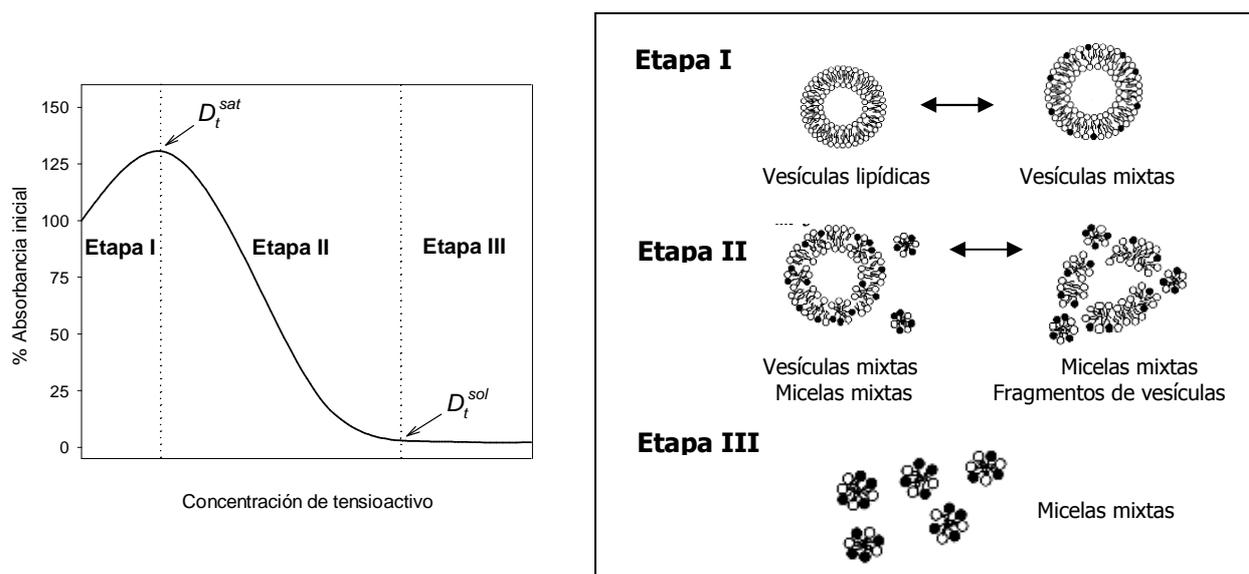


Fig.12: Perfil de solubilización para liposomas en presencia de un tensioactivo, monitoreado por turbidimetría. Se indican las etapas del proceso según el modelo de Lichtenberg, 1983 (izquierda). A la derecha se indican los equilibrios presentes entre las estructuras que caracterizan a cada una de las etapas.

Durante la Etapa II, se produce una transición entre las vesículas mixtas formadas por bicapas saturadas con detergente, y las micelas mixtas (saturadas con fosfolípidos), en las cuales se ha perdido la estructura lamelar. No se trata de una transición aguda, con lo cual para un rango de concentraciones de tensioactivo, las bicapas y las micelas coexisten en distintas proporciones. En esta etapa, como puede verse en la Fig.12, también se han observado estructuras irregulares atribuidas a fragmentos de bicapas (López et al., 1998).

Finalmente, la Etapa III comienza cuando las bicapas han sido completamente transformadas en micelas, cuyos diámetros son inferiores a los 20 nm, por lo cual se obtienen soluciones que, comparadas con las iniciales constituidas por liposomas, prácticamente son transparentes. Como se observa en la Fig.12, el parámetro que señala el comienzo de esta etapa es D_t^{sol} , definido como la concentración total de detergente necesaria para desplazar completamente el equilibrio hacia las micelas mixtas, a una determinada concentración de lípidos.

Para caracterizar el comportamiento de una formulación de liposomas frente a un tensioactivo a una temperatura determinada, se obtienen curvas de solubilización a concentraciones lipídicas crecientes, como se muestra en la Fig.13. Una vez establecidas las

concentraciones D_t^{sat} y D_t^{sol} para cada concentración, se grafican estos valores en función de la concentración lipídica correspondiente (L_1, L_2, \dots, L_n), obteniéndose dos curvas: una correspondiente a los liposomas saturados con detergente (curva "sat"), que delimita las Etapas I y II, y otra correspondiente a los liposomas solubilizados (curva "sol"), que delimita las Etapas II y III.

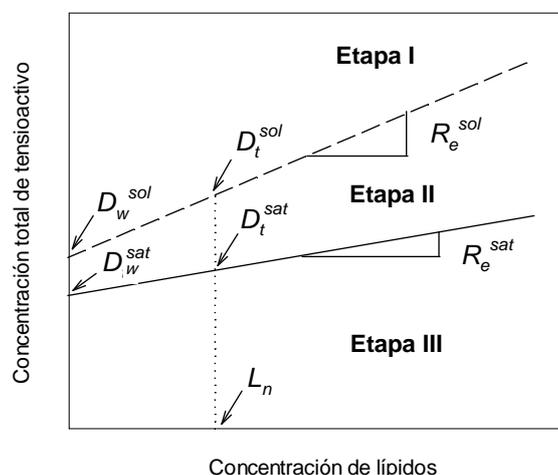
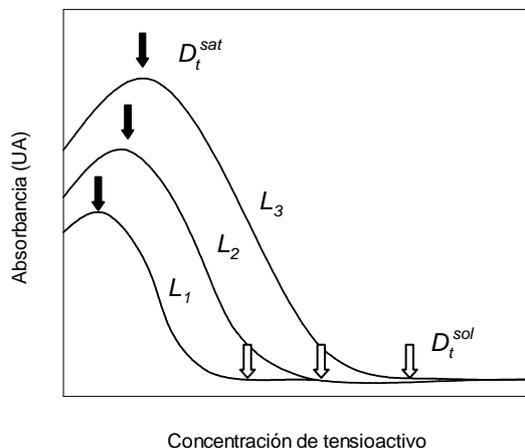


Fig.13: Perfiles de solubilización de liposomas con tensioactivo, obtenidos por turbidimetría a distintas concentraciones de lípidos (L_1, L_2 y L_3) y a una determinada temperatura. Se indican las concentraciones de tensioactivo D_{tsat} (flechas negras) y D_{tsol} (flechas blancas), definidas en el texto.

Fig.14: Diagrama que muestra el estado de las mezclas entre liposomas y tensioactivos en función de la concentración de sus componentes. Las rectas indican las concentraciones de saturación de las vesículas con tensioactivo (curva "sat"; línea continua) y para los puntos en que la solubilización es completa (curva "sol"; línea discontinua), obtenidas a partir de los perfiles de solubilización de la Fig.13. Se indican los parámetros que caracterizan el comportamiento del sistema a una determinada temperatura (ver definiciones en el texto).

Como puede verse siguiendo la línea punteada, a medida que la concentración de tensioactivo aumenta a una determinada concentración lipídica (L_n), se llega al valor D_t^{sat} , para ingresar a la Etapa II y luego al valor D_t^{sol} , a partir del cual la solubilización es completa (Etapa III).

A partir de estas curvas se calculan los parámetros que permiten caracterizar un sistema de liposomas e interpretar su comportamiento frente a un tensioactivo a una determinada temperatura:

- R_e^{sat} , pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de la curva "sat", es la relación efectiva tensioactivo/lípidos, que origina vesículas saturadas con tensioactivo.
- R_e^{sol} , pendiente de la recta de regresión obtenida a partir de la curva "sol", es la relación efectiva tensioactivo/lípidos, que origina micelas mixtas, una vez solubilizada la suspensión.
- D_w^{sat} , ordenada al origen de la recta de regresión obtenida a partir de la curva "sat", es la concentración monomérica del tensioactivo en la fase acuosa, en equilibrio con las vesículas saturadas con tensioactivo.
- D_w^{sol} , ordenada al origen de la recta de regresión obtenida a partir de la curva "sol", es la concentración monomérica del tensioactivo en la fase acuosa, en equilibrio con las micelas mixtas una vez solubilizada la suspensión.

Con respecto a los cocientes R_e , éstos pueden ser reemplazados por los parámetros D_t correspondientes, si se emplean concentraciones lipídicas iguales a 1 mM, lo cual se ha visto en algunos trabajos. Ambos cocientes dependen del tensioactivo empleado, de la composición de los liposomas, de la temperatura y de la fuerza iónica. Si bien los perfiles de solubilización obtenidos para distintos tipos de vesículas (MLVs, SUVs, LUVs) con una misma composición son muy diferentes, existen controversias con respecto a si los valores de R_e permanecen constantes.

Los parámetros D_w^{sat} y D_w^{sol} fueron considerados iguales en los primeros modelos de solubilización. Más tarde se hallaron diferencias que superaban el error experimental y llevaron a aceptar que ambos valores son distintos (Kim y Kim, 1991). Se ha visto además, que en general la D_w^{sat} es del mismo orden o levemente menor que la concentración micelar crítica (CMC) del detergente, y se considera como la CMC del tensioactivo en presencia de lípidos. En particular, cuando la cantidad de tensioactivo necesario para lograr la saturación es pequeña, es decir cuando R_e^{sat} es bajo, D_w^{sat} resulta prácticamente igual a la CMC (Lichtenberg et al., 2000).

Otro parámetro que puede ser calculado a partir de los obtenidos anteriormente es el coeficiente de partición del tensioactivo entre las bicapas y el medio acuoso. Asumiendo que se ha llegado al equilibrio de la distribución del tensioactivo a una determinada temperatura, y que la mezcla es lo suficientemente diluida como para comportarse como ideal, se puede estimar el coeficiente K (mM^{-1}) mediante el cociente $K=R_e^{sat}/D_w^{sat}$.

1.6. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

Como ya se ha visto los liposomas se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos se dispersan en un medio acuoso, como una forma de minimizar las interacciones de las cadenas hidrocarbonadas con el agua. El desafío de preparar liposomas no radica en el ensamblaje propiamente dicho, sino en conseguir vesículas de un tamaño y estructura determinada, que incorporen sustancias con alta eficiencia y que además permanezcan encapsuladas hasta llegar al sitio adecuado.

El método más sencillo y empleado frecuentemente en los trabajos experimentales es la preparación de un film de lípidos en un medio acuoso seguido de agitación mecánica. Consiste en disolver los lípidos en un solvente adecuado, como por ejemplo cloroformo o mezclas metanol-cloroformo, y luego evaporar el solvente de modo tal de obtener una película fina y homogénea sobre un soporte sólido como el interior de un balón. En algunos casos, en esta etapa se liofiliza para eliminar las trazas de solvente residual. Luego se agrega la solución acuosa y se agita en forma mecánica provocando el hinchamiento de los fosfolípidos hasta que se despegan de la superficie y forman los liposomas. El resultado es una mezcla de vesículas multilamelares con una distribución de tamaños heterogénea (MLVs), que suele emplearse como punto de partida para obtener otras suspensiones. Hoy en día se cuenta con fosfolípidos sólidos que pueden agregarse directamente sobre una solución acuosa y evitarse así el uso de solventes tóxicos. Sin embargo, las mezclas de fosfolípidos entre sí, o con otros lípidos como el

colesterol suelen requerir de solventes para asegurar una buena mezcla inicial entre los lípidos, que permita su distribución homogénea en la bicapa.

La sustancia a incorporar es agregada en el medio acuoso, si se trata de un compuesto hidrosoluble, o bien se disuelve en el solvente de disolución de los fosfolípidos, si se trata de un compuesto liposoluble. En este último caso, en ocasiones puede añadirse a las vesículas ya formadas, un pequeño volumen de una disolución de la molécula hidrofóbica en un medio orgánico.

A partir de los MLVs, el tamaño y el número de lamelas pueden modificarse mediante sonicación y extrusión, entre otros métodos. La sonicación consiste en impartir energía ultrasónica a la suspensión para reducir el tamaño de las vesículas, pudiendo en determinadas condiciones obtenerse SUVs. La técnica es efectiva pero no escalable, con lo cual se descarta para aplicaciones industriales.

La extrusión de MLVs consiste en forzar el pasaje de la suspensión de MLVs a través de membranas de policarbonato de poros definidos, siendo posible obtener liposomas con diámetros medios entre 800 y 50 nm según el diámetro de poro empleado (Olson et al., 1979). En algunos casos se requiere una extrusión a alta temperatura para fluidizar las bicapas. Las vesículas pueden forzarse a atravesar la membrana mediante extrusores manuales o neumáticos. También existen homogeneizadores de alta presión que se proveen con extrusores antes del colector de la muestra, con lo cual esta metodología puede formar parte de una obtención a escala piloto o industrial.

La obtención de LUVs (*large unilamellar vesicles*) generalmente se logra mediante el método de evaporación en fase reversa, de ahí que sean denominadas REVs (*reverse evaporation vesicles*). Este método debe su nombre a que las vesículas se obtienen por evaporación del solvente a partir de una emulsión W/O, en forma opuesta al resto de los métodos de obtención de liposomas. La emulsión, que contiene los lípidos disueltos en el solvente, es sonicada y rotaevaporada hasta obtener un gel semi-sólido que colapsa para dar mayoritariamente liposomas de gran tamaño unilamelares (Szoka y Papahadjopoulos, 1978). La desventaja de esta técnica es que no puede ser escalada con facilidad.

El método de obtención de liposomas por inyección de solvente consiste en la adición de una disolución de fosfolípidos en etanol a un medio acuoso en agitación, mediante una jeringa (Batzri y Korn, 1973). Las características de los liposomas obtenidos dependen de la velocidad de agregado de la solución etanólica y de la concentración de fosfolípidos. Si bien este método resulta fácilmente escalable, es difícil obtener un control adecuado en el agregado del etanol y lograr por lo tanto reproducibilidad en la obtención de vesículas de un tamaño determinado. Una variación de este método que se está empleando a nivel industrial son las mezclas fosfolípidos-etanol-agua, cuya producción ha sido registrada como Pro-Lipo S[®] (Perret et al., 1991). Consisten en mezclas homogéneas fosfolípidos/etanol/glicerol/agua, a partir de las cuales se obtienen liposomas mediante dilución acuosa y agitación moderada.

La obtención de DRVs o vesículas deshidratadas y rehidratadas (*dehydration and rehydration vesicles*) fue propuesta como nueva metodología hace muchos años (Kirby y Gregoriadis, 1984), si bien su más reciente aplicación a la incorporación de ADN fue registrada como tecnología Lipodine[™] (Perrie et al., 2002). Brevemente, consiste en preparar SUVs catiónicos por sonicación, agregar el ADN y liofilizar, obteniéndose así lamelas lipídicas en

íntimo contacto con el ADN. Al rehidratar en forma controlada se forman las vesículas que incorporan el material genético en su interior (DRV(DNA)).

El método mayormente empleado para la producción de liposomas a escala piloto e industrial es la homogeneización a alta presión, empleada para este fin desde hace dos décadas (Mayhew et al., 1984). El principio de estos homogeneizadores es la aplicación de gran cantidad de energía a suspensiones de fosfolípidos en agua, generalmente MLVs, de manera de obtener vesículas del tamaño requerido. La gran ventaja de estos equipos es la facilidad del escalado, ya que cada marca ofrece una familia de homogeneizadores que van desde modelos a escala laboratorio con pequeños volúmenes muertos hasta modelos a escala industrial, con una gran capacidad de producción (hasta 1.000 L/h).



Fig.15: Fotografía del Microfluidizer 100S (Unidad de Biofísica, Universidad Autónoma de Barcelona). Foto: Dr. Ramón Barnadas

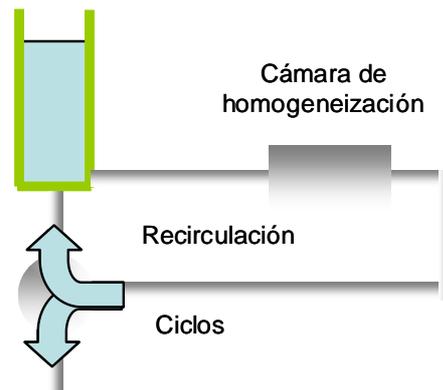


Fig.16: Esquema del Microfluidizer 100S. La selección de la válvula A permite operar recirculando la muestra procesada al reservorio de muestra o enviándola a un colector externo.

En la Fig.15 se muestra el Microfluidizer 110S, el más pequeño de los modelos de homogeneizadores de Microfluidics (Fig.12).

Como se observa en el esquema de la Fig.16, este homogeneizador consta de un reservorio para la suspensión inicial, que es impulsada mediante una bomba neumática a través de un prefiltro con poros de 5 μm , para luego entrar en la cámara de interacción donde el flujo se divide en dos partes. A continuación ambos flujos interactúan a alta velocidad y presión mientras circulan por microcanales cerámicos, donde se producen fenómenos de cavitación. Según la posición de la válvula A, la muestra procesada se dirigirá a un colector externo, si se trata de un proceso por ciclos, o volverá al reservorio de la muestra donde se mezclará con la muestra sin procesar, en un proceso por recirculación (ver apartado 3.6.5.). Además posee un serpentín que conecta el reservorio de la muestra con la cámara de interacción que puede ser termostatzado de forma tal que la muestra sea procesada a la temperatura deseada. El volumen mínimo a procesar es de unos 20 ml para el proceso en ciclos y unos 10 ml en el modo recirculación, y puede operar entre 3.000 y 23.000 psi (204 a 1.564 bar) a caudales entre 250 y 600 ml/min.

Los factores que regulan las características de los liposomas obtenidos por homogeneización a alta presión pueden ser instrumentales o depender de la muestra. En el primer caso, se debe tener en cuenta el número de ciclos o bien el tiempo de recirculación según el caso y la presión de homogeneización. En equipos que incluyan extrusores a la salida

de la muestra, o cámaras de homogeneización ajustables, también deberá contemplarse el tamaño de poro de la membrana del extrusor y la posición de la válvula que ajusta la cámara de homogeneización. En cuanto a los factores que dependen de la muestra deben considerarse la concentración y composición lipídica, la temperatura de la muestra, la fuerza iónica y la presencia de solventes (como el etanol).

Los métodos mencionados hasta este momento implican el agregado de la sustancia a incorporar antes del procesamiento, sin embargo no es la única estrategia posible. También pueden obtenerse liposomas mediante un proceso denominado "de carga activa" (active loading), en el que la sustancia de interés se agrega una vez preparados los mismos por alguno de los métodos descritos. Esta metodología fue la empleada para la preparación de los primeros productos comercializados a base de liposomas, entre otras cosas por los altos porcentajes de incorporación que pueden obtenerse. Se aplica a sustancias ionizables que pueden atravesar la bicapa después de que los liposomas están formados, como ciertas aminas lipofílicas entre las que se encuentra la doxorubicina. El método consiste en preparar liposomas en medio ácido y separarlos por SEC con un eluyente a pH neutro. Se agrega a los liposomas el principio activo, sin carga a pH neutro, que es capaz de ingresar al interior del liposoma por su elevada permeabilidad. Pero una vez que ingresa, el pH bajo del interior acuoso convierte al activo en una especie cargada que ya no puede permear hacia el exterior, ya que su carácter lipofílico se ve reducido. Por lo tanto la sustancia permanece en el interior del liposoma mientras que la diferencia de pH entre el compartimiento interno y externo se mantenga. Generalmente esto se logra incorporando una sustancia que produzca un efecto buffer en el interior acuoso y que no sea permeable a través de la bicapa, como el sulfato de amonio en el caso de la doxorubicina.

1.7. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

Un fármaco ideal debería ingresar al organismo en forma controlada tanto temporal como espacialmente. Esto implica tener un acceso directo al sitio de acción, evitando los tejidos sanos; permanecer el tiempo que sea necesario para ejercer su acción terapéutica y desaparecer del organismo una vez ejercida la misma. Lamentablemente éste no es el comportamiento de la mayoría de los fármacos de uso habitual.

Históricamente, el primer científico que se planteó como desafío controlar la actividad terapéutica de un fármaco fue el alemán Paul Ehrlich, a principios del siglo pasado. Su objetivo era desarrollar un medicamento que fuera efectivo contra la sífilis y tuviera además especificidad tisular, es decir que no afectara a otros órganos sanos. De esta manera introdujo el concepto de la "bala mágica" (magic bullet), una medicina direccionada al sitio de acción. A pesar de que no pudo evitar los severos efectos colaterales de su SALVARSAN, sentó un precedente importante en el desarrollo de los sistemas terapéuticos.

El complejo proceso que comprende desde el ingreso de un fármaco al organismo hasta la obtención de una respuesta terapéutica es estudiado por distintas disciplinas. La biofarmacia estudia la liberación, disolución y absorción de fármacos (LDA) a partir de una forma o un sistema terapéutico; la farmacocinética investiga su absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME), es decir los procesos que sufre el fármaco en el organismo a lo largo del

tiempo; y finalmente la farmacodinamia estudia la respuesta terapéutica. Según la sustancia, alguno/s de los pasos mencionados pueden resultar críticos para lograr los objetivos buscados. Una de las formas para conseguir mejoras en aspectos como la disolución, la absorción y el metabolismo, es la síntesis de derivados hidrófobos de las moléculas activas con mayor efectividad terapéutica. Este sería el caso de obtener un deriva original, con mayor permeabilidad a través de las membranas celulares, o bien un derivado hidrofílico que mejorara su disolución y distribución. Sin embargo, la vía sintética es costosa, prácticamente inviable para países en vías de desarrollo, y además requiere la realización de los estudios preclínicos y clínicos que se le exigen a una nueva entidad farmacológicamente activa.

Otra de las vías alternativas para mejorar los efectos terapéuticos de un fármaco disminuyendo sus efectos tóxicos es su incorporación a sistemas de liberación controlada (SLC). Este principio se conoce como "fármacos viejos en nuevas formulaciones" (*old drugs in new formulations*), e implica volver a emplear fármacos ya estudiados y con buena actividad terapéutica, pero descartados por sus efectos colaterales, como componentes de nuevos sistemas de administración.

La denominada Farmacia Galénica tiene como objetivos la transformación de principios activos en medicamentos fácilmente administrables al organismo y que proporcionen una respuesta terapéutica adecuada. Sin embargo, las formas farmacéuticas tradicionales no permiten controlar la absorción de los principios activos ni dirigirlos selectivamente al sitio de acción. El desarrollo de los SLC ha supuesto un importante avance en la tecnología farmacéutica, ya que permiten mejorar aspectos biofarmacéuticos, como podría ser aumentar la solubilidad de un principio activo insoluble; farmacocinéticos, como por ejemplo lograr mantener constante en el tiempo la concentración plasmática de un fármaco y farmacodinámicos, como por ejemplo los sistemas vectorizados. Todo esto se traduce en menores dosis, con mayor eficacia terapéutica y menores efectos colaterales.

Morilla y Romero proponen una clasificación de los SLC según su comportamiento *in vivo*, diferenciando los SLC convencionales y los SLC especiales (Morilla, 2003). Los SLC convencionales incluyen aquellas estrategias que solo permiten controlar la cinética de liberación de fármacos como por ejemplo las bombas osmóticas, los parches transdérmicos y los sistemas de implantes. Por el contrario, los SLC especiales comprenden en general ensamblajes moleculares a escala micro o nanométrica destinados a controlar tanto la cinética como el sitio de liberación. A continuación se hará una breve descripción de estos sistemas, clasificándolos en base a su composición (lipídica o no lipídica) y finalmente se profundizará en los liposomas como sistemas consolidados para la liberación controlada.

1.7.1. Sistemas no lipídicos de liberación controlada

Las micropartículas poliméricas constituyen uno de los SLC más difundidos y han sido empleadas con fines terapéuticos desde hace unos 20 años (Ogawa et al., 1988). Las micropartículas de polímeros biodegradables como el ácido poli-láctico-co-glicólico (PLGA) han llevado al desarrollo de productos de aplicación parenteral, como por ejemplo Lupron® y Zoladex®, que contienen péptidos biológicamente activos en una matriz polimérica. La característica de este tipo de sistemas es la obtención de perfiles de liberación con

concentraciones de fármaco que se prolongan en el tiempo (entre una semana y seis meses) según el peso molecular y la relación láctico/glicólico en el polímero. Si bien se los considera biocompatibles y no tóxicos, aún no se conoce fehacientemente la actividad biológica ni la toxicidad de sus productos intermedios de degradación, como tampoco la velocidad de degradación en cada sitio de acción. Otra desventaja de estos sistemas es el bajo pH que podría alcanzar la matriz polimérica cuando se degrada en un medio biológico para dar ácido láctico y glicólico. Un ejemplo de micropartículas de PLGA puede verse en la Fig.17.

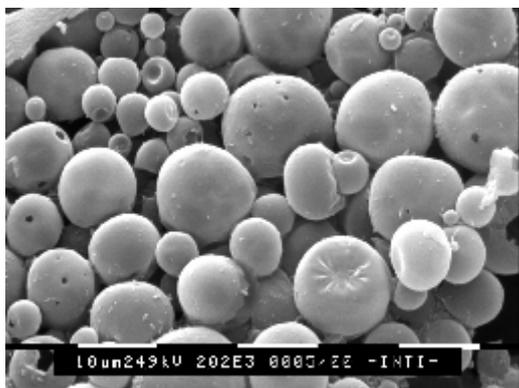


Fig.17: Micropartículas de PLGA (preparadas por V. Defain y L. Hermida, 2005).

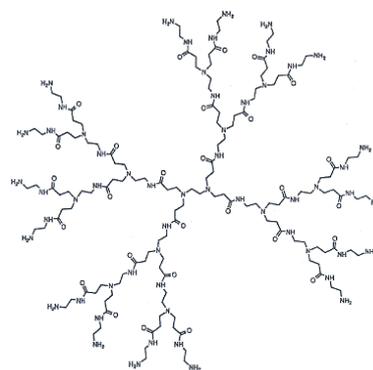


Fig.18: Estructuras de dendrímeros PAMAM G2 (segunda generación).

La necesidad de obtener sistemas particulados de menor tamaño para lograr mayores eficiencias terapéuticas, llevó al diseño de nanopartículas poliméricas. El espectro de aplicaciones es numeroso así como los polímeros empleados para su preparación. Resultan de interés especial las nanopartículas preparadas con polímeros naturales como el quitosano, que además poseen la característica de ser mucoadhesivas (Agnihotri et al., 2004).

Entre los SLC de última generación cabe mencionar a los dendrímeros (ver Fig.18). Estas macromoléculas globulares altamente ramificadas a partir de un núcleo, fueron descritas por primera vez hace 20 años, pero estos estudios versaban sobre su síntesis y caracterización fisicoquímica (Tomalia et al., 1984). Una vez que se desarrollaron y comercializaron dendrímeros biocompatibles como los PAMAM (poliamidoamina), las aplicaciones de estos SLC se diversificaron, ensayándose su efectividad como transportadores de material genético, vacunas, antivirales, antibacterianos y citostáticos (Gillies y Frechet, 2005). Sin embargo aún quedan muchas cuestiones por resolver como por ejemplo mejorar su estabilidad en la circulación sanguínea, estudiar su biodistribución y cuáles son los factores que controlan la liberación de la sustancia incorporada.

1.7.2. Sistemas lipídicos de liberación controlada

Los sistemas de liberación controlada a base de lípidos han sido largamente considerados los de menor toxicidad y los más versátiles. Entre ellos se encuentran las nanopartículas lipídicas sólidas, las emulsiones y microemulsiones, los sistemas micelares, los arqueosomas y los liposomas, de los que se hablará en el siguiente apartado.

Las emulsiones son sistemas binarios o ternarios que contienen gotas de una fase dispersa en otra continua, normalmente estabilizadas mediante surfactantes. Los tamaños de gota suelen estar entre 150 nm y 100 μ m. Las emulsiones pueden ser binarias W/O (W: agua; O: aceite) o bien O/W, o ser múltiples, como W/O/W ó O/W/O. Entre las aplicaciones más difundidas se encuentran los productos para nutrición parenteral como el Lipofundin ®.

Las microemulsiones son emulsiones con características particulares: su tamaño de gota es inferior a 100 nm por lo que se las conoce como emulsiones "transparentes", son ópticamente isotrópicas y termodinámicamente estables. Se preparan en presencia de altas concentraciones de surfactantes (15-30%) y suelen requerir co-surfactantes, que son en general alcoholes de cadena corta. Permiten solubilizar sustancias hidrofóbicas o hidrofílicas, aumentando su biodisponibilidad. Existen productos cosméticos comercializados a base de microemulsiones, como perfumes, productos capilares y pantallas solares, y también productos farmacéuticos como drogas antivirales e inmunosupresoras en formas líquidas. Curiosamente, las nanoemulsiones, que aún se encuentran en una etapa inicial de investigación, se definen como microemulsiones con un mayor tamaño de gota: entre 100 y 500 nm. Estos sistemas emplean menores concentraciones de surfactantes (1-3%) y los cosurfactantes son alcoholes de cadenas hidrocarbonadas más largas que los empleados en las microemulsiones.

Las nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) son similares estructuralmente a las emulsiones, solo que la fase oleosa que constituye el interior de la partícula es un lípido que se encuentra en estado sólido a temperatura fisiológica, como los mono, di o triglicéridos, ácidos grasos, esteroides o ceras. De esta manera se obtiene una liberación más lenta del principio activo incorporado cuando se pone en contacto con un medio biológico (Manjunath et al., 2005). La sustancia incorporada puede ubicarse según sus características fisicoquímicas en el core sólido, en la interfaz o en ambos sitios, dando lugar a diferentes perfiles de liberación. El punto crítico en su preparación es la obtención de la forma cristalina adecuada una vez que el producto solidifica por disminución de la temperatura, por lo tanto es indispensable una adecuada caracterización estructural. Se han estudiado numerosas vías de administración para las NLS, como la vía oral (Hu et al., 2004), la vía parenteral (Wissing et al., 2004) y fundamentalmente la vía tópica, que se ha empleado para vehicular numerosos principios activos (Muller et al., 2002 ; Santos Maia et al., 2002 ; Hu et al., 2005).

Otros sistemas coloidales muy relacionados con los liposomas son las micelas mixtas. Se obtienen cuando se agrega a las vesículas de fosfolípidos una concentración suficiente de sales biliares, dando lugar a dispersiones transparentes de unos pocos nanómetros de tamaño de partícula. Estos sistemas fueron diseñados imitando el mecanismo de absorción de los lípidos en el intestino, que implica la formación de micelas por efecto de los componentes de la bilis. Las micelas mixtas pueden administrarse por vía oral o parenteral y se comercializan algunos productos como por ejemplo el Konakion ® pediátrico (vitamina K en micelas mixtas).

Finalmente, los arqueosomas son vesículas que se obtienen a partir de lípidos extraídos de arqueobacterias. Estas bacterias crecen en ambientes con condiciones de temperaturas o concentración salina extremas, por lo que también se conocen como extremófilas. Para resistir estas condiciones, sus lípidos de membrana tienen características únicas. Se trata de cadenas hidrocarbonadas saturadas poliisoprenoides, unidas al glicerol mediante uniones éteres, lo cual les confiere una gran estabilidad. Cuando estos lípidos se purifican y se obtienen vesículas, las

bicapas muestran una alta desorganización aún a bajas temperaturas debidas a los grupos isoprenos, por lo tanto no se observan transiciones a temperatura ambiente o fisiológica. Los resultados obtenidos de estudios *in vitro* simulando las condiciones del tacto gastrointestinal indican su alto potencial como sistemas de liberación por vía oral (Patel et al., 2000).

1.8. LOS LIPOSOMAS COMO SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA

Los liposomas son probablemente los SLC más versátiles estudiados hasta la actualidad. Se han empleado para encapsular desde pequeñas moléculas con acción farmacológica hasta macromoléculas como proteínas o ácidos nucleicos. Las moléculas pueden acomodarse tanto en el interior acuoso, como insertarse en las bicapas, o bien formar complejos con liposomas, como es el caso de los complejos liposomas-ADN. Además, la propia estructura de los liposomas puede ser diseñada de modo tal de funcionar como efectivos sistemas terapéuticos para distintas vías de aplicación y distintas aplicaciones. Los liposomas por ejemplo, pueden vehiculizar una sustancia hacia un tumor o hacia una zona donde ocurra un proceso inflamatorio; pueden servir como depósito para la liberación lenta de fármacos de acción local; pueden mejorar la solubilidad de sustancias hidrofóbicas; pueden ser empleados para direccionar una sustancia hacia las células M presentes en las mucosas y relacionadas con el sistema inmunológico, entre otras aplicaciones.

Desde hace años se sabe que la eficiencia de los liposomas como sistemas de liberación controlada depende de una combinación de los siguientes factores: obtener buenos porcentajes de incorporación de las sustancias activas, retener la sustancia activa encapsulada en forma cuantitativa durante la ruta hacia su destino, poder controlar la velocidad de depuración (clearance) de las vesículas en distintos compartimentos del cuerpo, acceder al sitio de acción masivamente y ser finalmente captados por el órgano blanco o target. Para cumplir con estos objetivos se han desarrollado numerosos métodos de obtención (apartado 1.6.), se han empleado diversas composiciones de fosfolípidos incluyendo otros lípidos como el colesterol (apartado 1.3.3.) y se han diseñado estrategias para estabilizar el sistema y aumentar su especificidad por el sitio de acción.

A continuación se hará una descripción del estado del arte para los liposomas según la vía de administración, ya sea parenteral, tópica u oral.

1.8.1. Liposomas por vía parenteral

La vía de administración parenteral ha sido largamente estudiada para los liposomas, y las investigaciones realizadas culminaron en el desarrollo de productos que hoy en día se comercializan o están atravesando ensayos clínicos, como se verá en el apartado 1.8.4.).

Los liposomas ingresan al torrente sanguíneo cuando son inyectados por vía endovenosa (e.v.). Se cree que el resto de las rutas parenterales, como la intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.) o subcutánea (s.c.) funcionan como depósitos de vesículas desde donde se libera el fármaco. Una vez inyectados, la mayoría de las composiciones de liposomas convencionales son rápidamente inestabilizadas y desaparecen de la circulación por el efecto de

procesos biológicos relacionados. Uno de ellos es la adsorción de las proteínas plasmáticas HDL (lipoproteínas de alta densidad) sobre la superficie de los liposomas, mediado por interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, lo cual lleva a una rápida desestabilización estructural, que puede ocasionar la pérdida parcial o total de su contenido (Black y Gregoriadis, 1976; Scherphof et al., 1981; Roerdink et al., 1984). También ocurre la adsorción de opsoninas, que son proteínas que interactúan con receptores específicos de membranas de macrófagos y monocitos tisulares. Luego de este proceso conocido como opsonización, los liposomas quedan "marcados" por las opsoninas y son rápidamente fagocitados por los macrófagos (Scherphof, 1991). Dado que el 80% de los macrófagos fijos del organismo lo constituyen las células de Kupffer (CK) ubicadas en el hígado, cuando estos liposomas convencionales ingresan a la circulación sanguínea, son opsonizados y mayoritariamente secuestrados por las CK hepáticas y periportales, acumulándose en el hígado y en menor medida en el bazo y la médula ósea (Ishida et al., 2002).

Con la hipótesis de que la velocidad de clearance o desaparición de la circulación dependía de la magnitud de la adsorción de proteínas plasmáticas, comenzó a investigarse cuáles eran los factores que influían en la adsorción de las proteínas a los liposomas. Se vio que los SUVs, eran más estables que los liposomas de mayor tamaño ya que no eran eficientemente recubiertos por las opsoninas (Allen, 1981; Senior y Gregoriadis, 1982). También se concluyó que la presencia de altas concentraciones de colesterol en combinación con lípidos con altas T_m reducían la adsorción de las HDL (Tumer et al., 1983; Senior, 1987; Moghimi y Patel, 1988, 1989). Sin embargo, estas estrategias de estabilización estructural, no impedían que los liposomas fueran mayoritariamente captados por el sistema retículo endotelial (RES).

En este punto deben recordarse los procesos mediante los cuales los liposomas pueden alcanzar los blancos extravasculares. En condiciones fisiológicas, los únicos órganos que poseen endotelios discontinuos son el hígado, el bazo y la médula ósea. Esto significa que los vasos de estos órganos tienen poros de 100 a 200 nm que pueden ser atravesados por partículas menores a ese tamaño (Roerdink et al., 1984). Otros órganos presentan endotelios que se denominan fenestrados por poseer poros de alrededor de 50 nm, como por ejemplo la mucosa intestinal. Pero la mayor parte de los órganos de los mamíferos presenta un endotelio continuo, con poros muy pequeños, de unos pocos nanómetros, por lo tanto los liposomas difícilmente pueden escapar de la circulación y llegar hasta los órganos blanco.

Sin embargo, existen situaciones patológicas en las cuales la integridad de un endotelio se altera, generándose poros a través de los cuales sistemas particulados como los liposomas pueden atravesar los vasos y penetrar a un tejido determinado. La aparición de endotelios discontinuos puede darse como resultado de procesos inflamatorios y de algunos procesos tumorales (Jain, 1989). Esta permeabilidad incrementada representa una ventaja para favorecer la llegada de los liposomas a los blancos afectados. Pero aún en estas situaciones, los liposomas convencionales no tendrían un tiempo de circulación lo suficientemente largo como para acceder a un epitelio discontinuo y extravasarlo. Por lo tanto serían mayoritariamente capturados por los macrófagos hepáticos. Como se verá posteriormente, el hecho de que los liposomas convencionales sean rápidamente reconocidos por el sistema inmune, es la base de su aplicación como adyuvantes para la administración de antígenos.

1.8.1.1. LIPOSOMAS DE LARGA CIRCULACIÓN O STEALTH

A fines de los 80, se incrementaron los esfuerzos para diseñar liposomas que pudieran circular en el torrente sanguíneo el tiempo necesario para extravasar hacia los tejidos que presentaran un aumento localizado de la permeabilidad vascular. La estrategia de estabilización más exitosa desarrollada en ese momento fue la de unir covalentemente un polímero hidrofílico como el polietilenglicol (PEG), a algunos fosfolípidos constituyentes del liposomas para dar lugar a los liposomas "peguilados", "Stealth", o "estéricamente estabilizados" (ver Fig.19). El nombre

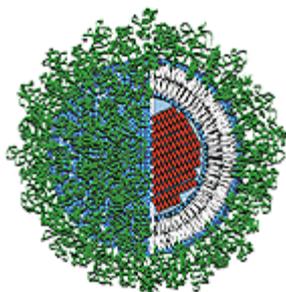


Fig.19: Esquema de un liposoma "Stealth", mostrando el interior acuoso con un cristal de doxorubicina (en rojo), alrededor la bicapa lipídica con sus cabezas polares (gris y azul) y las terminaciones de PEG (verde), que le confieren la estabilidad en el plasma.

Stealth, que puede traducirse al castellano como "oculto", se refiere a su capacidad de evadir el sistema inmune, mientras que su identificación como "estéricamente estabilizados" se refiere al mecanismo por el cual pueden permanecer tiempos largos en el torrente sanguíneo. Su prolongada circulación se debe a la presencia de la cadena hidrofílica del PEG, que dificulta la adsorción de las proteínas plasmáticas. Por lo tanto, se minimiza la desestabilización estructural por parte de las HDL así como la captación por el RES mediada por las opsoninas.

Generalmente se ha empleado PEG 2000 (2.000 Da de peso molecular) unido a fosfolípidos como diesteroilfosfatidiletanolamina (DSPE) o dipalmitoiletanolamina (DPPE), incorporados en la bicapa a una concentración media del 5% molar (Klibanov et al., 1990; Allen et al., 1991; Woodle y Lasic, 1992). También

han podido obtenerse otros fosfolípidos peguilados, con los cuales se obtuvieron vesículas con carga negativa, positiva o neutra (Webb et al., 1998). Por otro lado se estableció que el agregado de altas concentraciones de colesterol (por encima de 30% molar) era sinérgica a la acción del PEG, observándose vidas medias tan altas como 45 horas en humanos (Bedu-Addo et al., 1996).

Esta tecnología ha dado lugar a productos comercializados, el primero de los cuales fue la doxorubicina liposomal (ver Tabla 3, apartado 1.8.4.). La doxorubicina es una antraciclina citotóxica de alta efectividad para el tratamiento de tumores sólidos y leucemias, incluso forma parte del protocolo para el tratamiento del Sarcoma de Kaposi asociado al SIDA. Sin embargo, cuando es administrada como fármaco libre, tiene numerosos efectos colaterales, siendo la cardiotoxicidad el más riesgoso. Este efecto sobre el músculo cardíaco fue estudiado por primera vez hace unos 30 años (Guthrie y Gibson, 1977; Chlebowski, 1979) y desde ese momento se multiplicaron las estrategias para tratar de minimizarlo como por ejemplo la incorporación en liposomas convencionales (Rahman et al., 1982), cambios en los protocolos de administración (Lum et al., 1985), la síntesis de derivados con menor toxicidad (Danesi et al., 1993) o el empleo de sustancias auxiliares protectoras (Seifert et al., 1994).

Los liposomas de larga circulación fueron finalmente aprobados para su uso en humanos dado que existen evidencias farmacológicas y clínicas de su mayor eficiencia antitumoral y menor cardiotoxicidad (Orditura et al., 2004). La tecnología Stealth también se ha empleado

para la estabilización de inmunoliposomas (Allen et al., 1995), sin embargo las evidencias de inmunogenicidad de estas vesículas limita su aplicación (Harding et al., 1997).

A pesar de todas las ventajas de la tecnología Stealth, está demostrado que el PEG no es biodegradable, por lo cual su acumulación en los tejidos debida a la administración crónica de liposomas peguilados puede resultar tóxica. En efecto, se ha descrito el "síndrome de pies y manos", que consiste en la aparición de úlceras y/o erupciones en las extremidades (Gordon et al., 1995). Teniendo en cuenta esta limitación de la tecnología Stealth, surge otra estrategia de estabilización que fue registrada como tecnología Polyxen[®] y que consiste en el empleo de ácido siálico como polímero protector de los liposomas. Este polímero es un constituyente natural del organismo y es completamente biodegradable y no-inmunogénico aún cuando se une a proteínas (Gregoriadis et al., 2000).

También se ha estudiado la estabilización empleando otros ligandos, como por ejemplo palmitoilpululano, alcohol polivinílico, poloxamer y polivinilpirrolidona (Takeuchi et al., 1998).

Recientemente se han desarrollado formulaciones de liposomas no peguilados con una gran estabilidad plasmática evidenciada por sus altos tiempos de circulación (Daftary, 2004). Curiosamente se trata de liposomas convencionales, compuestos por HSPC, DPPC o DSPC con el agregado de colesterol en una relación 1:0,7 molar respectivamente, preparados con altas concentraciones de lípidos (suspensiones de 10 ml de hasta 1 mM lípidos, equivalente a 75 mg/ml). Según sugiere la patente, su composición lipídica los convierte en vesículas de elevada rigidez y baja permeabilidad. Cuando se aplicaron para la administración intravenosa de doxorubicina, estos liposomas resultaron más eficientes que el producto comercial Caelyx[®] (ver Tabla 3, apartado 1.8.4.) en la disminución del tamaño de tumores mamarios implantados en ratones. También se verificó su menor toxicidad respecto a los liposomas peguilados.

1.8.2. Liposomas por vía tópica

Los liposomas se han empleado para aplicaciones cosméticas desde 1986, cuando Christian Dior comercializó el primer producto cosmético que incorporaba estas vesículas (Capture). Posteriormente se confirmaron los efectos hidratantes y reconstituyentes de los liposomas vacíos sobre la piel (Lasic, 1993). Sin embargo su aplicación se extendió hacia los productos farmacéuticos por su capacidad de solubilizar sustancias liposolubles e hidrosolubles y su estructura anfipática (Weiner et al., 1994). En la actualidad existen numerosos productos cosméticos que declaran contener liposomas, pero en muchos casos se trata de mezclas de fosfolípidos con agua y otras sustancias lipídicas, con una escasa caracterización fisicoquímica. Por el contrario, los sistemas tópicos con liposomas para la administración de fármacos tienen un cuidadoso diseño que permite que las sustancias lleguen al sitio adecuado: la piel, en el caso de productos de acción local, o la circulación sistémica, en el caso de productos transdermales.

Las características de barrera física, química y mecánica de la piel, la convierten en un sistema muy eficiente para evitar la penetración de agentes externos, a pesar de su gran superficie y accesibilidad, que la convertirían en un sitio predilecto para la administración de fármacos.

Desde el punto de vista estructural, la piel consta de tres dominios bien diferenciados, que son, desde el más interno al más externo, la hipodermis, la dermis y la epidermis. Las

diferencias entre ellos se deben a su composición así como a su función biológica. La capa más externa de la dermis, que constituye la interfase con el medio externo, es el estrato córneo, que concentra numerosas funciones de barrera: controla la evaporación del agua trans-epidérmica o TEWL (*trans epidermal water loss*), protege contra injurias mecánicas, impide la captura de microorganismos, además de detener un alto porcentaje de la radiación incidente de rayos UV B. El estrato córneo está compuesto por células completamente queratinizadas llamadas corneocitos, que se hallan dispuestas en una matriz lípido-agua según una estructura que se asemeja a una pared de ladrillos unida por cemento. La matriz se estructura en capas intercaladas lípido-agua, y las capas lipídicas están compuestas principalmente por ceramidas, colesterol, ácidos grasos y triglicéridos. Esta verdadera barrera hidrofóbica tiene un espesor de unos 5 a 8 μm .

Según lo descrito, el acceso de un fármaco a los distintos estratos de la piel para el tratamiento de patologías cutáneas y más aún el acceso a la circulación por vía transdérmica es un verdadero desafío. Debido al gran atractivo de la vía tópica, se formularon cremas, emulsiones, geles, ungüentos y otros productos que además de solubilizar los principios activos contuvieran sustancias que aumentaran la penetración (*enhancers* o promotores).

La primera hipótesis planteada sobre las ventajas de los liposomas con respecto a las formulaciones tópicas convencionales fue la posibilidad de transportar al activo hasta la profundidad deseada, mediante una adecuada selección de sus características fisicoquímicas. Los primeros ensayos con corticoides incorporados a liposomas evidenciaron una mayor acumulación en dermis y epidermis con respecto a algunas formas semisólidas (Lasch y Wohlrab, 1986) y en algunos casos se hallaba una mayor respuesta terapéutica (Egbaria y Weiner, 1990). Posteriormente se observó que no todas las formulaciones con liposomas eran eficaces (Schreier y Bouwstra, 1994) y que los liposomas no penetraban hasta las capas más profundas de la piel. Otros investigadores propusieron que liposomas muy pequeños y flexibles podían atravesar la piel y llegar a la circulación (Paul et al., 1995). También existen trabajos que postulan que los liposomas convencionales podrían ser reemplazados por los transferosomas o liposomas ultradeformables para la aplicación tópica (Cevc y Blume, 2004).

Los factores que determinan la efectividad de los liposomas para aplicación tópica son tan numerosos, que en muchos casos los artefactos experimentales han llevado a conclusiones erróneas. Para obtener buenas correlaciones *in vitro* – *in vivo*, no solo deben tenerse en cuenta las variables que dependen de la formulación, sino también el sistema en el cual se realiza el experimento. Los resultados de los ensayos *in vitro* están influenciados por el origen de la piel, el tipo de aplicación, el equipamiento empleado para la evaluación, la dosis administrada, entre otros.

Hasta el día de hoy no se ha esclarecido completamente el mecanismo por el cual los liposomas ingresan a la piel y pueden atravesarla, y se asume que difícilmente los liposomas sean empleados en el futuro para la administración transdérmica de fármacos de acción sistémica. Sin embargo, su aplicación para el tratamiento de afecciones localizadas como procesos inflamatorios o infecciosos es inminente, como lo indica la comercialización del diclofenac liposomal (ver Tabla 3, apartado 1.8.4.).

1.8.3. Tránsito intracelular

Es importante conocer cuál será el destino de los liposomas una vez que lograron llegar al órgano blanco, ya que esta etapa también influirá en la efectividad terapéutica del sistema. En algunos casos los liposomas podrían actuar como depósitos de principios activos extracelulares como por ejemplo los liposomas estéricamente estabilizados; en otros casos, es necesario que transporten a las sustancias al interior celular y promuevan su liberación al citoplasma o al núcleo, según la aplicación.

Las interacciones que establecen los liposomas con las células del órgano blanco pueden ser las siguientes:

- Intercambio de lípidos y/o proteínas con las membranas celulares,
- Adsorción o unión,
- Fusión con la membrana celular,
- Internalización por endocitosis o fagocitosis, según el tipo de célula.

El ingreso de los liposomas por endocitosis es característico de células no fagocíticas, como por ejemplo las células tumorales o los enterocitos (células del endotelio intestinal). En el apartado 1.9.3. se profundizará sobre los procesos de absorción y transporte de liposomas a través del epitelio intestinal.

Una vez dentro de la célula, la ruta que siguen los liposomas es la endo-lisosomal. Esta ruta comprende una serie de procesos mediados por enzimas que degradan los componentes internalizados. Así, los fosfolípidos de liposomas convencionales son hidrolizados y reciclados y el fármaco encapsulado si no se ha degradado dentro del lisosoma, puede ser liberado y dirigirse al sitio de acción intracelular según su estructura química.

1.8.4. Productos comerciales

Uno de los mayores obstáculos para la transferencia de los liposomas del ámbito experimental a la producción industrial fue el llamado "problema de las tres S": *scaling-up* (escalado), *sterility* (esterilidad) y *stability* (estabilidad). A este problema podría agregarse la reproducibilidad en la obtención de liposomas, especialmente cuando se parte de materias primas de origen natural, que requieren una adecuada caracterización. En la actualidad podría afirmarse que esta situación está, como mínimo, bajo control.

La difusión de los homogeneizadores de alta presión con distintas capacidades de producción ha terminado con el problema que suponía el escalado de la preparación de liposomas. Además se cuenta con materias primas liofilizadas o secadas por spray que pueden dispersarse en soluciones acuosas mediante agitación por métodos convencionales.

La esterilidad se logra ya sea por filtración a través de membranas de 0,22 μm , aunque sólo es aplicable a liposomas menores a 200 nm, o bien realizando todos los procesos en condiciones de esterilidad.

La estabilidad tal vez sea el punto más crítico de una formulación liposomal. Existen numerosas estrategias para maximizar la estabilidad fisicoquímica de los liposomas: el agregado de antioxidantes, el empleo de fosfolípidos saturados, el agregado de colesterol, empleo de fosfolípidos cargados para evitar la agregación, la conservación en frío y atmósfera de nitrógeno,

entre otras. Pero la mayor estabilización de un producto liposomal se logra obteniendo un producto seco mediante liofilización en presencia de crioprotectores. En estos casos, es importante la selección del crioprotector así como de su concentración óptima, debiendo verificarse que el producto conserve sus características fisicoquímicas una vez liofilizado y resuspendido. De esta forma pueden obtenerse productos sólidos sumamente estables, que incluso pueden incorporarse a formas farmacéuticas convencionales, como cápsulas o comprimidos de liberación prolongada (Garsez et al., 1998a).

Durante los 80', las empresas pioneras en el lanzamiento de sistemas de liberación a base de liposomas fueron: The Liposome Company, Alza, Sequus, Liposome Technology, y Nexstar. Así se comercializaron las primeras formulaciones que incorporaron doxorubicina, anfotericina B, daunorubicina y los productos liposomales para terapia fotodinámica. A fines de los 90' se sumaron nuevas empresas como Biozone Labs, Delex Therapeutics, Lipoxen Technologies, Neopharm, SkyePharma, Novosom, LiPlasome Pharma, entre las más destacadas.

Algunas de estas compañías comercializan no solo productos, sino además tecnologías basadas en liposomas, que permiten incorporar distintos activos para una determinada aplicación, como por ejemplo: Lipospray ®, empleado para administración mucosal; Smarticles ®, empleado para vehiculización de ARN; Lipodine ®, que incorpora DNA en liposomas DRVs; Imuxen ®, en el cual se emplean liposomas como adyuvantes; Liplasomas ®, que son vesículas preparadas para citostáticos impermeables a las bicapas convencionales; Depofoam ®, un inyectable de liberación extendida; TCS ®, un sistema de transporte transmembrana para targetting intracelular, y los Virosomas ®, que además de poseer un antígeno de un virus contienen un componente fusogénico que facilita el ingreso del antígeno a las células blanco.

La Tabla 3 muestra los productos con liposomas comercializados hasta la fecha (Prestidge et al., 2005). Como puede observarse, la vía preferencial de administración es la parenteral intravenosa, la cual ha sido largamente estudiada (apartado 1.8.1.).

Tabla 3: Productos comerciales farmacéuticos a base de liposomas.

Principio activo	Producto	Administración	Acción terapéutica
Doxorubicina	Doxil – Caelyx – Myocet ⁽¹⁾	Intravenosa	Antineoplásico
Daunorubicina	Daunoxome	Intravenosa	Antineoplásico
Cytarabina	Depocyt	i.v., s.c. o intratecal	Antineoplásico
Porfímero sódico	Photofrin	Intravenosa	Citotóxico
Verteporfina	Visudyne ⁽¹⁾	Intravenosa	Citotóxico
Anfotericina B	Ambisome ⁽¹⁾	Intravenosa	Antimicótico
Virión de la hepatitis A	Epaxal ⁽¹⁾	Subcutánea	Vacuna
Antígeno de la gripe	Inflexal V ⁽¹⁾	Intramuscular	Vacuna
Morfina	DepoDur	Epidural	Analgésico opiáceo
Lignocaína	ELA-Max	Tópica	Anestésico local
Diclofenac	Surpass	Tópica	Anti-inflamatorio

⁽¹⁾ Indica los productos que son comercializados en el país.

Aún no se han lanzado al mercado productos de administración por vía oral (en el apartado 1.8.5. se mencionarán algunas patentes sobre productos administrados por esta vía), y aparecen los primeros productos por vía tópica, aunque de acción localizada.

Resulta interesante la aparición de productos para terapia fotodinámica (TFD), como el Photofrin y el Visudyne (ver Tabla 3). La TFD consiste en la aplicación de luz para lograr un efecto terapéutico. Para esto se administra un fotosensibilizante, se irradia con luz de una longitud de onda adecuada y esta sustancia da origen a una reacción de radicales libres que destruye las células donde se haya acumulado, por ejemplo células tumorales. La incorporación fotosensibilizantes a liposomas ha permitido que éstos llegaran a los blancos específicos y se acumularan en el sitio de acción, extravasando en zonas con epitelios fenestrados, tal como fuera explicado para sustancias antitumorales incorporadas en liposomas. De esta forma, concentrando el fotosensibilizante, logró minimizarse el daño en tejidos sanos, que era el factor limitante para la aplicación de la TFD.

Además de los productos comercializados, existen unos 50 productos liposomales atravesando fases clínicas de investigación. Entre ellos se encuentran: Lipotaxen (paclitaxel), Nyotran (nistatina), Aroplatin (platinos), ALTRA (ácido retinoico all-trans), Vincacine (vincristina), Kogenate (factor antihemofílico recombinante), Junovan (muramil tripéptido), prostaglandina E1, mitoxantrona, entre otros.

1.9. LIPOSOMAS POR VÍA ORAL

La vía oral es la ruta de administración preferida por su seguridad y sobre todo por la aceptación de los pacientes. Sin embargo, es la vía que presenta mayores inconvenientes desde el punto de vista biofarmacéutico, debido a que se debe sortear el ambiente agresivo presente en tracto gastrointestinal (TGI), soportando grandes cambios de pH, altas concentraciones de enzimas hidrolíticas, y surfactantes, como las sales biliares. Si esto ha sido posible, aún resta lograr una buena absorción a través del epitelio intestinal, hasta alcanzar la circulación y posteriormente el sitio de acción.

En el diseño de una formulación liposomal para la administración por vía oral, deben tenerse en cuenta numerosos factores que influyen en la eficiencia terapéutica y que son comunes a todos los SLC particulados:

- El tamaño.
- Las características superficiales.
- El método de preparación.
- La eficiencia de encapsulación.
- La estabilidad en los fluidos gastrointestinales y en la mucosa intestinal.
- La afinidad hacia el epitelio intestinal.
- El tiempo de residencia y la concentración en el sitio de absorción.
- La estabilidad intracelular si se pretende la llegada del liposoma intacto a la circulación.

Ya en 1976 comenzó a estudiarse el potencial de los liposomas para aumentar la biodisponibilidad de fármacos luego de su administración por vía oral (Patel y Ryman, 1976). Se pensó que este sistema podría solubilizar sustancias muy hidrofóbicas, o mejorar la absorción

de moléculas con baja permeabilidad y/o alto peso molecular. Si bien el primer desafío era evaluar si los liposomas soportaban el paso por el TGI, los ensayos de estabilidad *in vitro* muchas veces se realizaron en paralelo con ensayos *in vivo* para correlacionar la estabilidad hallada con la biodisponibilidad o la respuesta terapéutica.

Los primeros estudios realizados, emplearon la insulina como modelo de fármaco incorporado a liposomas por numerosas razones. Algunas de ellas son: la necesidad de una administración intravenosa frecuente de los pacientes insulino-dependientes; la inestabilidad de la insulina en el TGI lo cual limita su administración oral en formas farmacéuticas convencionales; la sencilla evaluación de su respuesta terapéutica mediante la determinación de la concentración de glucosa plasmática, y la existencia de modelos animales con diabetes inducida para monitorear la acción farmacológica.

A pesar de que los ensayos preliminares fueron realizados con insulina incorporada a liposomas con muy baja eficiencia (alrededor del 10%), los niveles de glucosa disminuían después de la administración intragástrica en ratas (Dapergolas y Gregoriadis, 1976). También se obtuvieron resultados promisorios con la administración por vía oral de liposomas con heparina y el factor VIII para el tratamiento de la hemofilia (Hemker et al., 1980 ; Ueno et al., 1982). En experimentos *ex vivo* con secciones de intestino, se observaba un gran incremento en el transporte a través del tejido, tanto del marcador fluorescente incorporado, como de los liposomas marcados (Bridges et al., 1978). Sin embargo, otros autores aseguraban que aún las formulaciones más estables podían ser inestabilizadas por la bilis y liberar su contenido antes de ser absorbidas (Rowland y Woodley, 1980). Trabajos posteriores dejaron la impresión de que los liposomas tendrían poco potencial para mejorar la absorción de sustancias encapsuladas después de la administración por vía oral (Deshmukh et al., 1981; Chiang y Weiner, 1987). Sin embargo hacia mediados de los 90, el descubrimiento de la captura de micro y nanopartículas por las Células M situadas en las Placas de Peyer del intestino delgado (ver apartado 1.9.3.), reavivó el interés en la administración de liposomas para inmunización por vía oral (Aramaki et al., 1993; Tomizawa et al., 1993; Cohen et al., 1994).

La frase de Rogers y Anderson: "*Oral Liposome drug delivery has been the subject of much cinism*" (Trad.: "La administración por vía oral de fármacos incorporados en liposomas ha sido objeto de mucho cinismo"), refleja la situación de fines del siglo pasado, que parecería prolongarse hasta la actualidad (Rogers y Anderson, 1998). Si bien no se comercializan a la fecha productos con liposomas para administración por vía oral, existen numerosas patentes de aplicación (ver apartado 1.9.8.) que sugerirían que existe un gran potencial para estos sistemas terapéuticos.

A continuación se describirán los procesos involucrados en el tránsito gastrointestinal (apartados 1.9.1.), se hará una revisión sobre los ensayos realizados para evaluar la estabilidad de los liposomas en el TGI (apartado 1.9.2.) y la absorción de los mismos en la mucosa intestinal (apartado 1.9.3.); y se mostrará una selección de estudios farmacocinéticos y farmacodinámicos realizados hasta la fecha (apartados 1.9.4. y 1.9.5.). También se mostrarán aplicaciones de vacunas por vía oral empleando liposomas (apartado 1.9.6.), algunas aplicaciones nutricionales (apartados 1.9.7.) y finalmente las principales patentes de aplicación surgidas en los últimos 10 años (apartados 1.9.8.).

1.9.1. Tránsito gastrointestinal de sustancias o sistemas terapéuticos

Una vez que ingresa en el organismo por la boca, un fármaco o un sistema terapéutico se encuentra con enzimas como la amilasa y la lipasa lingual, si bien el poco tiempo de residencia prácticamente impide que ejerzan alguna acción sobre la misma (Fig.20). En el estómago, por el contrario, se enfrenta a una gran dilución debida a la secreción de ácido clorhídrico del epitelio estomacal, que lleva el pH hasta valores tan bajos como 1 ó 2, pudiendo llegar a 3 o más si se hubieran ingerido alimentos previamente.

La principal secreción enzimática en este compartimiento es la pepsina, una proteasa con alta actividad a pH ácido; también se observa la presencia aunque en menor concentración,

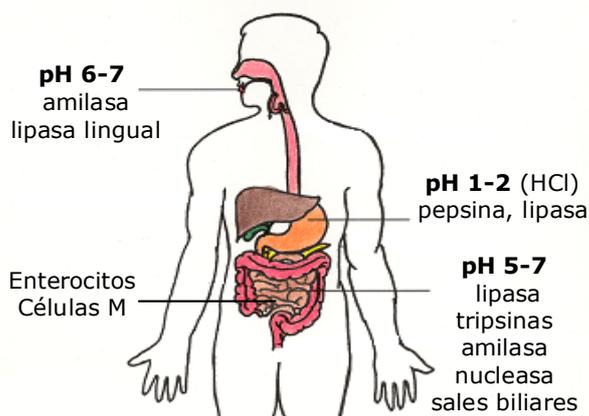


Fig.20: Esquema del tracto gastrointestinal, indicando el pH y las secreciones de cada compartimento.

de lipasa gástrica. En el tránsito desde el estómago hasta el intestino se produce un gran cambio de pH, desde el medio netamente ácido hasta pHs que van entre 5 y 7, dependiendo de la zona y de las condiciones fisiológicas. La alcalinización está dada básicamente por la secreción de bicarbonato proveniente del páncreas, al duodeno, la primera porción del intestino delgado. Esta zona recibe además, la secreción de numerosas sustancias cuya función fisiológica es la digestión de distintos tipos de alimentos, para facilitar su absorción.

Así, cuando llega al duodeno, el fármaco o sistema terapéutico se encuentra con enzimas que degradan lípidos (lipasas), hidratos de carbono (amilasas), proteínas (quimiotripsina), ácidos nucleicos (nucleasas), disacaridasas (disacáridos), peptidasas (péptidos), provenientes del páncreas así como del mismo intestino.

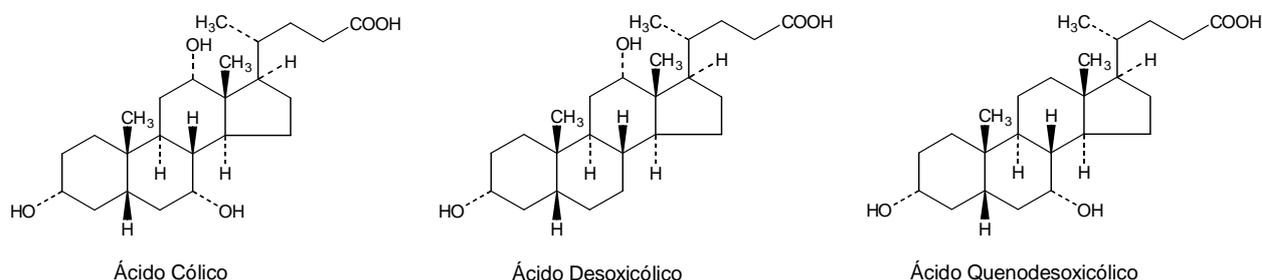


Fig.21: Estructuras químicas de los ácidos biliares más comunes en su forma libre (no conjugada): ácido cólico, desoxicólico y quenodesoxicólico.

Otra secreción fundamental que recibe el lumen del intestino delgado es la bilis, secretada por la vesícula biliar, cuya función es la disolución de los lípidos mediante la formación de micelas. La bilis está compuesta por una mezcla de sales sódicas compuesta por los ácidos cólico, desoxicólico y quenodeoxicólico, conjugados con los aminoácidos glicina y taurina (ver Fig.21), siendo los surfactantes fisiológicos presentes en el intestino delgado. La

concentración aproximada de sales biliares en el lumen intestinal humano está entre 3 y 45 mM en condiciones fisiológicas (Kararli, 1995), si bien en algunas situaciones o patologías, pueden alcanzar valores transitorios mayores (Nagata et al., 1988).

El parámetro que está relacionado con la acción surfactante de una sustancia es la concentración micelar crítica (CMC). La CMC se define como la concentración de surfactante a la cual comienzan a formarse las micelas e influye directamente en la solubilización de sustancias y sistemas terapéuticos como los liposomas. Si bien la bilis es una mezcla compleja de sales biliares conjugadas, las CMC de las sales biliares individuales puede dar una idea del poder tensioactivo de la mezcla. Así se han determinado valores de 14 mM para el colato de sodio, entre 2 y 6 mM para el deoxicolato de sodio y entre 10 y 15 mM para el taurocolato de sodio (New, 1990). Como se verá en el apartado 1.9.2., la estabilidad de los liposomas frente a las sales biliares será una de las claves a la hora de diseñar un sistema de administración por vía oral.

1.9.2. Estabilidad de los liposomas en el TGI

El mínimo requisito para que una formulación de liposomas sea apta para la administración por vía oral es la retención en su interior de una cantidad terapéutica del fármaco, durante su tránsito gastrointestinal hasta el sitio de absorción. En este apartado se describirán distintas formulaciones liposomales diseñadas para resistir la acción de los agentes de inestabilización de los liposomas a lo largo del TGI: el bajo pH estomacal, el cambio de pH entre el estómago y el intestino, la acción de las sales biliares y las enzimas pancreáticas.

Para sacar conclusiones sobre los primeros estudios realizados para evaluar la estabilidad de los liposomas en un medio gastrointestinal deben tenerse en cuenta numerosos factores. En muchos casos las metodologías empleadas sólo permitían obtener poblaciones heterogéneas de MLVs, raramente caracterizadas en cuanto a tamaño y lamellaridad. También debe considerarse si el trabajo muestra datos de incorporación de la sustancia y permeabilidad normal a través de bicapas, así como qué tipo de protocolo se emplea para evaluar la estabilidad en medios gastrointestinales.

Ya en 1980, se vio que los liposomas compuestos por mezclas DPPC:Chol (DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina) en relación 7:2 molar respectivamente ó DSPC:Chol (DSPC: diesteroilfosfatidilcolina) en relación 7:4 molar respectivamente presentaban la mayor estabilidad *in vitro* (Rowland y Woodley, 1980). Este fue uno de los primeros ensayos que demostraba la inestabilidad de los fosfolípidos insaturados respecto a los saturados en modelos de digestión *in vitro*. A continuación se analizará cada etapa del trayecto por el TGI y los agentes que podrían dejar sin efectividad a una formulación liposomal.

Existen dos gradientes de pH a considerar cuando un sistema de liposomas ingresa al sistema digestivo. El primero es el que se produce entre el interior acuoso, normalmente al pH neutro de la solución de preparación, y el medio estomacal que puede estar a un pH tan bajo como 1 ó 2. El segundo es el que se produce cuando los liposomas pasan del estómago al intestino, situación en la que se produce un cambio de pH de 10^5 a 10^6 unidades, que es el caso de pasar de pH 1,5 a pH 6,5 ó 7,5 respectivamente. Ambas situaciones podrían modificar la permeabilidad de las bicapas hacia las sustancias incorporadas, con lo cual podrían perder su

contenido, y/o aumentar su permeabilidad hacia aniones y cationes, con lo cual se modificaría su pH interno. Este último caso deberá ser necesariamente evaluado para sustancias que son inestables de determinados pHs, como por ejemplo los péptidos a pH ácido.

El efecto del pH ácido en la pérdida de contenido parecería depender de la composición de los liposomas. Liposomas compuestos por DPPC:Chol 7:2, que habían sido previamente considerados estables en condiciones similares a las del TGI, perdieron casi el 50% de la carboxifluoresceína incorporada cuando se incubaron a pH 2 durante 1 hora a 37° (Han et al., 1997). Por el contrario, los liposomas DSPC:Chol 7:2, solo perdían un 7,5% de la sonda. Otros estudios específicos sobre los efectos del pH en la estructura de las bicapas se realizaron sobre liposomas compuestos por lípidos de origen marino (Nacka et al., 2001b). La composición de estos liposomas era: 68% de PC, 23% de PE, 2% de PI (fosfatidilinositol), 2% de PS (fosfatidilserina), 1% esfingomiélin y un pequeño porcentaje de otros lípidos. Los liposomas se agregaban luego de la incubación a pH 2, pero no se evidenciaba un alto porcentaje de reacciones de oxidación ni hidrólisis, ni siquiera después de 24 horas. También se ha estudiado cómo varía el pH interno cuando vesículas con distinta composición fosfolípídica son sometidas a gradientes de protones que simulan los hallados en el TGI (Norris y Powell, 1990; Barreto y Lichtenberger, 1992).

Cuando los liposomas alcanzan el intestino, son sometidos a la acción de las sales biliares, componentes principales de la bilis. Como otros surfactantes, las sales biliares interactúan con los liposomas intercalándose en las bicapas y formando micelas mixtas, pudiendo incluso solubilizar las bicapas a concentraciones lo suficientemente elevadas. Existen numerosos estudios que muestran que los liposomas compuestos por lípidos insaturados en estado fluido, son inestables en soluciones de sales biliares a concentraciones fisiológicas y a temperaturas mayores que su T_m (O'Connor et al., 1985; Muller y Schuster, 1990). Más recientemente se vio que el agregado de colesterol a fosfolípidos insaturados no mejoraba la estabilidad frente a las sales biliares, según se demostró determinando la pérdida de carboxifluoresceína, en paralelo con la medición del tamaño de los liposomas (Kokkona et al., 2000). Por el contrario el agregado de colesterol a fosfolípidos con altas temperaturas de transición (DPPC y DSPC), retenían cantidades importantes de la sonda fluorescente y no variaba apreciablemente su tamaño, sugiriendo que la sonda podría salir a través de poros en las bicapas y no por micelización de las mismas.

Algunos investigadores ya habían observado que cuando la concentración de sales biliares en el lumen excedía su concentración micelar crítica (CMC), se formaban micelas mixtas. Sin embargo postulaban que esta solubilización resultaba beneficiosa para la incorporación de las sustancias como micelas mixtas, con tamaños de alrededor de 20 nm (Carey et al., 1983). Esta teoría sobre la acción favorable de las sales biliares en la absorción intestinal de sustancias incorporadas a liposomas también fue postulada por otros grupos investigación (Nagata et al., 1990 ; Fukunaga et al., 1991 ; Shoemaker y Nichols, 1992).

Sin embargo, la formación de micelas mixtas podría dar lugar la liberación del contenido del liposoma en el lumen intestinal, disminuyendo la eficacia del sistema. Un ejemplo de la pérdida de contenido en el TGI fue presentado por Arien et al. en respuesta al trabajo de Fukunawa et al., cuando administraron a roedores por vía oral, liposomas conteniendo calcitonina (Arien et al., 1993). Al incorporar indio radiactivo (^{111}In) a los liposomas hallaron un

alto porcentaje de la radiactividad en materia fecal durante las primeras horas post-administración, indicando que los liposomas se destruían en el lumen intestinal y liberaban su contenido en las heces.

La lipasa gástrica, presente en el estómago, es incapaz de digerir los fosfolípidos. Por el contrario, las fosfolipasas presentes en las secreciones pancreáticas, en especial la fosfolipasa A₂ (PLA₂), son un factor de inestabilización de los liposomas ya que hidrolizan los fosfolípidos que los constituyen, para dar ácidos grasos y formas liso (Shen et al., 2001). A raíz de este hecho se diseñaron sistemas para modificar la superficie de las bicapas e impedir las interacciones con enzimas. Los liposomas polimerizados (apartado 1.4.2.), cuyos fosfolípidos se encuentran unidos covalentemente, resultaron más estables a las fosfolipasas que los convencionales. Okada et al. describieron una retención del 70% para sacarosa o BSA incorporada a liposomas polimerizados después de 6 días de en condiciones que imitaban las del TGI (Okada et al., 1995). Sin embargo estos liposomas podrían presentar una cierta toxicidad debida a residuos provenientes de la reacción de polimerización.

También se prepararon liposomas microencapsulados con el objeto de protegerlos en el TGI. Se trataba de vesículas inmersas en redes poliméricas que impedían la interacción con macromoléculas y permitían sólo el ingreso de moléculas más pequeñas como las sales biliares (Dong y Rogers, 1992). Algunos polímeros naturales empleados para esta aplicación fueron con mezclas gelatina-acacia, y las microcápsulas se preparaban por el método de coacervación (Yeung y Nixon, 1988 ; Dong y Rogers, 1993).

Los liposomas peguilados también fueron evaluados como potenciales estabilizadores de péptidos, como la insulina, a lo largo del TGI. Iwanaga et al. los compararon con liposomas que presentaban terminaciones de mucina en su superficie y con liposomas convencionales (Iwanaga et al., 1999). Ambas formulaciones de liposomas recubiertos por polímeros habían resultado más eficientes que los convencionales en retener la insulina en el interior del liposoma a lo largo del TGI (Iwanaga et al., 1996). Por otro lado, los liposomas peguilados mostraron una mayor afinidad por el epitelio intestinal que los cubiertos por mucina y mucho mayor que los convencionales, evidenciada por un gran aumento en el tiempo de residencia. Este es otro de los ejemplos de la influencia de los fenómenos superficiales en el éxito de un sistema para administración oral.

Otra estrategia muy empleada con el objeto de estabilizar los liposomas en el medio gastrointestinal, y que tiene en cuenta la modificación de la superficie de la vesícula, es la adsorción de polímeros solubles en agua. Los primeros ensayos se realizaron con polímeros naturales como dextrano, pululano, manano y amilopectina anclados a los liposomas, obteniéndose vesículas con mayor estabilidad frente a la lisis enzimática y por lo tanto menor pérdida de su contenido (Sunamoto y Iwamoto, 1986). En forma similar, se prepararon liposomas cubiertos por polímeros semi-sintéticos como carboximetil-quitina (CM-chitin), o-palmitoilpululano (OPP) y colesterol derivatizado con pululano (CHP) o manano (CHM), y se incubaron a distintos pHs, en presencia o no de alguna sal biliar. En todos los casos se observaron liberaciones retardadas de las sustancias encapsuladas con respecto a los liposomas sin cobertura, lo cual sería un indicador de una mayor estabilidad (Dong y Rogers, 1991 ; Sehgal y Rogers, 1995). Sin embargo, se obtuvieron resultados contradictorios cuando se recubrieron liposomas de EPC con OPP, ya que la presencia de la cobertura polimérica parecía

promover una mayor pérdida de contenido en presencia de sales biliares (Sehgal, 1994). El hecho se atribuyó a un incremento excesivo de la fluidez en las bicapas formadas por fosfolípidos insaturados provocada por el polímero.

1.9.3. Absorción de liposomas en el epitelio intestinal

La absorción de sustancias o sistemas terapéuticos administrados por vía oral ocurre mayoritariamente en el intestino delgado. Para muchos fármacos administrados por la vía oral, la permeación a través del epitelio intestinal es el paso que limita la velocidad de absorción. El epitelio del intestino delgado tiene la particularidad de estar plegado formando vellosidades, que son proyecciones del tejido hacia el lumen, cubiertas por enterocitos y células productoras de mucus.

Los enterocitos son las células responsables de la absorción y constituyen el 90% de las células que forman el epitelio intestinal. Estas células poseen microvellosidades en su membrana apical o luminal (la que está en contacto con el lumen intestinal), denominadas "*brush border*" (borde en cepillo; ver Fig.17). La macro y micro estructura del epitelio intestinal formadas por vellosidades y microvellosidades respectivamente, tiene como consecuencia un aumento extraordinario de la superficie con capacidad de absorción.

La superficie de cada vellosidad presenta además, un número limitado de células secretoras de mucus, conocidas como de células de Goblet, intercaladas entre los enterocitos. El mucus es un fluido viscoso compuesto principalmente por proteínas altamente glicosiladas llamadas mucinas, suspendidas en una matriz de electrolitos. La zona central de cada monómero de las mucinas se encuentra saturada con oligómeros de ácido siálico, lo cual le confiere un carácter aniónico y una mayor resistencia a la proteólisis. La función del mucus es otorgar al epitelio intestinal una protección frente a agresiones mecánicas o químicas, además de capturar y eliminar material particulado y microorganismos. Se trata, por lo tanto de uno de los mecanismos de defensa inespecíficos que posee el TGI.

Debido a que el lumen del TGI está expuesto a microorganismos potencialmente patógenos, existen mecanismos de defensa específicos representados por zonas del epitelio denominadas "epitelio asociado al folículo" (FAE: *follicle associated epithelium*), que se especializan en capturar material particulado del lumen intestinal y transportarlo al tejido linfoide subyacente (Doe, 1989). Estas zonas fueron descritas por primera vez en el siglo XVII por el anatomista Hans Peyer, que observó engrosamientos del epitelio del íleo (segunda sección del intestino delgado), de unos pocos centímetros de longitud. Desde ese momento se conocieron como Placas de Peyer y posteriormente se descubrió que estas zonas del epitelio carentes de vellosidades recubrían folículos linfáticos pertenecientes al sistema inmune asociado al intestino (GALT o *gut-associated lymphoid tissue*) (Brandtzaeg y Bjerke, 1990). En la actualidad se suele denominar Placa de Peyer al folículo linfático propiamente dicho (ver Fig.22, izquierda) subyacente al FAE. Este epitelio está formado por enterocitos intercalados con algunas células escamosas conocidas como células M (*microfold*), que poseen un gran bolsillo basolateral conteniendo distintos elementos linfoides, como linfocitos, células dendríticas y macrófagos (ver Fig.22, derecha). Las células M desempeñan un papel fundamental como captadoras de antígenos, teniendo la capacidad de fagocitar y transportar material particulado

de hasta 10 μm . Estos mecanismos son fundamentales cuando lo que se pretende es generar una respuesta inmune a nivel de mucosas y/o sistémica (Mestecky, 1987 ; Russell y Mestecky, 1988).

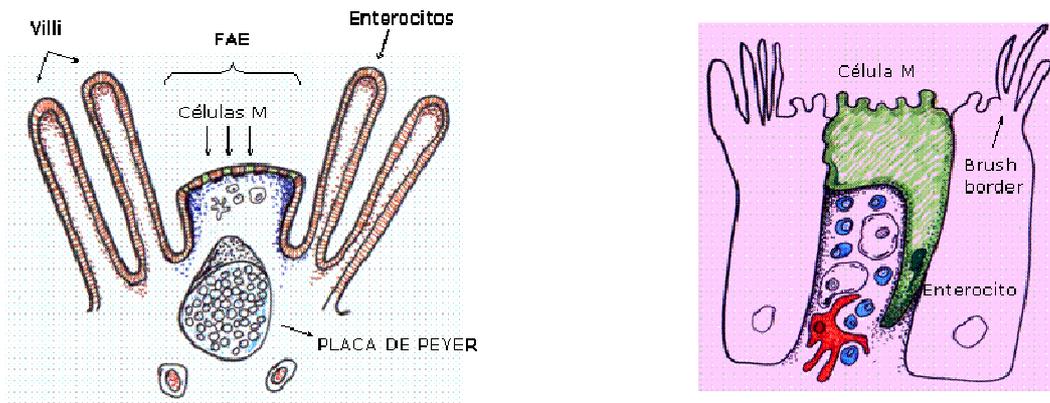


Fig.22: A la izquierda, esquema del epitelio intestinal, donde se observan los distintos componentes relacionados con el proceso de absorción de sustancias o sistemas terapéuticos como las vellosidades, tapizados por enterocitos, el FAE (follicle associated epithelium) con las células M (en verde) y la Placa de Peyer subyacente. A la derecha, esquema de una célula M, rodeada por dos enterocitos.

Si bien la captación de material particulado (como los liposomas) por las células M es muy eficiente, esta ruta no resultaría adecuada cuando el objetivo es la absorción de fármacos por vía intestinal, ya que los liposomas captados serían mayoritariamente fagocitados por células presentadores de antígenos antes de llegar a la circulación. Existen evidencias de que la captación de nano y micropartículas no solamente ocurre mediada por las células M asociadas al GALT, sino que también puede ocurrir a través de enterocitos normales (Florence, 1997).

Para este tipo de internalización existirían limitaciones respecto al tamaño de las vesículas, y se asume que debería estar por debajo de los 100 ó 200 nm (Gregoriadis, 1991 ; Jani et al., 1992). Por otro lado, existen evidencias del ingreso de micropartículas de poliestireno de hasta 2 μm a través del epitelio intestinal por endocitosis (Hodges et al., 1995).

El ingreso de liposomas por fagocitosis se realiza a través de las células relacionadas con el sistema inmune, como los macrófagos o las células M del intestino. En este caso, pueden ingresar a las placas de Peyer vesículas mayores de 100 nm y de hasta 10 μm (Eldridge et al., 1990). En general, se acepta que el tamaño de las partículas define el mecanismo de ingreso celular y el tipo de células que intervienen, como se muestra en la Tabla 4 (extraída de (O'Hagan, 1996).

Tabla 4: Mecanismos y sitios involucrados en la captación de partículas.

Sitio	Mecanismo	Tamaño de partícula
Enterocitos	Endocitosis	< 200 nm
Macrófagos intestinales	Fagocitosis	< 1 μm
Células M (Placas de Peyer)	Ingreso trans-paracelular	< 10 μm

El mecanismo de la absorción intestinal de los sistemas liposomales se estudió desde fines de la década de los '70 empleando distintos modelos experimentales. Los principales interrogantes que surgieron, algunos de los cuales aún se encuentran en estudio, fueron los siguientes:

- Si los liposomas eran capaces de ingresar a las células o simplemente permanecían en la superficie del epitelio intestinal, ejerciendo un efecto "depot".
- Si los liposomas podían ser transportados como tales a través del epitelio intestinal hacia la circulación.
- Si ese transporte era paracelular (entre las células, atravesando las uniones estrechas intercelulares) o transcelular (a través de la célula).
- En el caso de transporte transcelular, cuál era el mecanismo por el cual un liposoma podía ingresar a un enterocito.
- En el caso de no hallar liposomas intactos en la circulación, qué sucedía con los liposomas en el interior celular y en qué compartimiento era liberado su contenido.

El transporte de una sustancia a través de un epitelio polarizado puede ser paracelular o transcelular. El transporte paracelular fue observado por algunos investigadores mediante estudios histológicos, para material particulado (nanoesferas de 165 nm), y resultaba favorecido por defectos en la mucosa intestinal (Arahamian et al., 1987). Otros autores postularon que sólo era factible para moléculas con un peso molecular inferior a 400 Da, o menores a 1.000 Da en presencia de promotores de la penetración (See y Bass, 1993). Posteriormente se demostró que cuando las uniones estrechas entre células (*tight junctions*) estaban intactas, el transporte paracelular se hallaba impedido. Sin embargo, el empleo de sistemas de liberación conteniendo sales biliares como el taurocolato de sodio, que actúa abriendo dichas uniones, facilitaba el transporte paracelular y aumentaba la absorción (Johansson et al., 2002). Este modelo, a base de micelas de taurocolato, es la base del producto recientemente lanzado al mercado para la administración de insulina por la vía mucosal.

Teniendo en cuenta la ruta transcelular, un sistema particulado podría ingresar a los enterocitos por distintos mecanismos, si bien la endocitosis es el que ha sido mayormente estudiado para los liposomas. Una vez en el interior de los enterocitos, se ha propuesto que los liposomas seguirían la ruta endosomal, siendo degradados en los lisosomas donde liberarían su contenido. Las sustancias capaces de atravesar la membrana endolisosomal podrían alcanzar el citoplasma y luego atravesar la membrana plasmática serosal para acceder a la circulación. Otra posibilidad es que los liposomas pudieran atravesar la célula sin desintegrarse y alcanzar la circulación intactos.

Los primeros ensayos *in vitro* para elucidar los mecanismos de endocitosis para liposomas se realizaron empleando sacos o bolsas armadas con secciones de intestino de roedores en forma reversa (*everted gut sacs*), es decir con su cara serosal hacia el exterior acuoso y su cara luminal hacia el interior. Este procedimiento permitía incubarlos con los liposomas y medir luego el transporte a través del epitelio hacia el medio externo. Los primeros hallazgos con marcadores hidrofílicos radiactivos incorporados a liposomas, mostraron un gran incremento en el transporte respecto al marcador libre, hallándose además liposomas en el fluido externo, aunque en una pequeña proporción respecto a la concentración de incubación

(Bridges et al., 1978). En este caso el transporte era saturable y sensible a inhibidores metabólicos, sugiriendo un mecanismo de endocitosis en la captación.

Este ensayo fue reproducido posteriormente con liposomas DPPC-Chol, que previamente habían demostrado ser los más estables frente al pH, las enzimas y las sales biliares (Rowland y Woodley, 1980). Los liposomas no solo aumentaban significativamente la captación del marcador radiactivo, sino también su transporte, como lo demostraba la presencia de radiactividad asociada a liposomas en el fluido serosal (Rowland y Woodley, 1981). En efecto, el 50% de la radiactividad correspondiente de este fluido se encontraba en el pellet de la ultracentrifugación y se liberaba al sobrenadante mediante un tratamiento con TX-100. El mecanismo propuesto en aquel momento para la absorción de los liposomas por enterocitos, comprendía una unión débil de los mismos a las membranas de los enterocitos durante los primeros 20 minutos de incubación. Si las células eran lavadas antes de este período, no se hallaba absorción alguna. Si la incubación se prolongaba, la unión se fortalecía probablemente a través de un componente de membrana sensible a la tripsina y se producía la endocitosis.

Sin embargo, otros investigadores obtuvieron resultados diferentes empleando modelos animales. Cuando administraron inulina encapsulada en liposomas a ratones, no hallaron un aumento de su concentración ni en sangre ni en hígado, aún empleando los liposomas más pequeños y más resistentes a la digestión, y atribuyeron los resultados anteriores a artefactos del modelo empleado (Deshmukh et al., 1981).

Por lo tanto, el modelo de sacos intestinales revertidos fue posteriormente reemplazado por loops aislados de intestino con su vasculatura intacta perfundida, considerándose ésta una aproximación más fisiológica. Cuando este modelo se aplicó para ^{14}C -inulina y ^{125}I -PVP (polivinilpirrolidona) incorporadas a liposomas marcados con colesterol tritiado (Patel et al., 1985), se verificó que los liposomas intactos no llegaban a la circulación. Por el contrario, eran captados por la mucosa intestinal, digeridos intracelularmente y liberaban su contenido hacia el torrente sanguíneo como sustancias libres. También describieron que la absorción de liposomas era bifásica: comprendía un período muy lento de alrededor de 30 minutos, aparentemente relacionado con la captación y degradación de los liposomas, seguido de un rápido aumento en la velocidad de absorción. Las características de los perfiles de absorción dependían de la composición de los liposomas, hallándose una mayor rapidez para la degradación de liposomas pequeños compuestos por fosfolípidos saturados y con cadenas hidrocarbonadas de mayor longitud. Resultados similares habían sido descritos empleando un modelo de segmento de yeyuno *in situ* (Shwinke et al., 1984). A pesar de hallar altas velocidades de captación para liposomas DSPC:Chol 2:1 mol:mol marcados con ^{14}C , no se detectaban lípidos en la circulación sistémica. También se vio que cuando se modificaba la superficie de los liposomas con marcadores hidrofílicos como PEG, inulina o insulina, se suprimían las interacciones con el epitelio intestinal y la captación de estos liposomas, poniendo en evidencia la importancia de las características superficiales en la selección de una formulación de absorción entérica. Estos estudios preliminares mostraron contradicciones con posteriores hallazgos de Iwanaga et al. en 1997, que demostraron la afinidad de una superficie peguilada por la capa de mucina del epitelio intestinal.

Con el mismo criterio, se comprobó que algunas estrategias como aumentar la bioadhesividad y la mucoadhesividad de los liposomas podían favorecer las interacciones con la

mucosa intestinal. La bioadhesividad se define como la afinidad hacia cualquier componente biológico, como podría ser un receptor de membrana; mientras que mucoadhesividad se refiere a la afinidad hacia la mucosa, más específicamente hacia las mucinas presentes en ella. Ambas interacciones dan como resultado un mayor tiempo de residencia del sistema terapéutico en el TGI, lo que se traduce en una mayor captación por el epitelio, ya que la superficie de absorción resulta más accesible. La bioadhesividad en particular puede además inducir una respuesta celular como por ejemplo la endocitosis o incluso abrir las uniones estrechas entre células.

En el apartado 1.9.2. ya se habían mencionado el recubrimiento de liposomas con polisacáridos naturales como los mananos o los pululanos, para aumentar su estabilidad a lo largo del TGI. Estas sustancias también han sido empleadas para aumentar la captación intestinal, principalmente por el tejido linfoide. Liposomas de 400 nm conteniendo fosfatidilserina unida a manano aumentaron significativamente la absorción por las Placas de Peyer (Tomizawa et al., 1993).

La preparación de liposomas bioadhesivos tiene como ventaja que las vesículas pueden direccionarse hacia el tejido linfático (células M de las Placas de Peyer) o no linfático (enterocitos). Por ejemplo, se ha descrito que algunas lectinas de origen vegetal, como la denominada TL, direccionan las nanopartículas hacia los enterocitos (Florence et al., 1995), mientras que algunas toxinas conjugadas con liposomas, como la toxina colérica, se unen específicamente a receptores en las células M (Harokopakis et al., 1995).

El modelo *in vitro* más empleado en la actualidad para evaluar la absorción intestinal es el de las células de carcinoma de colon humano, Caco-2. A partir de los valores de permeabilidad obtenidos con estos cultivos puede predecirse qué porcentaje de un fármaco será absorbido *in vivo* (Artursson y Karlsson, 1991). Estas células provienen de un adenocarcinoma de colon moderadamente diferenciado y tienen la particularidad de diferenciarse espontáneamente en condiciones normales de cultivo, formando monocapas con uniones estrechas entre células polarizadas. Así, su superficie apical está equipada con las microvellosidades características de las células intestinales (Hidalgo et al., 1989).

Si bien estas células presentan todos los sistemas de transporte y enzimas típicos de los enterocitos (Sun et al., 2002), debe tenerse en cuenta que por tratarse de un carcinoma podría tener algunos mecanismos sobre o sub-expresados. Algunas diferencias de los cultivos de Caco-2 con respecto al epitelio intestinal normal son: una disminuida actividad metabólica, la ausencia de células M y la ausencia de células Goblet, que las priva del recubrimiento de la capa de mucina (Neuhoff, 2005).

Empleando cultivos de células Caco-2 sembradas en cámaras Transwell (ver apartado 5.5.1. Discusión), se determinó la captación y transporte de liposomas conteniendo hipericina, un antiviral natural con una muy baja solubilidad en agua. A pesar de que su inclusión en liposomas aumentó significativamente su solubilidad, no pudo detectarse el transporte a través de los cultivos, y sólo una muy baja captación por las células. El tamaño de los liposomas estaba entre 70 y 350 nm, y estaban compuestos por una mezcla comercial de fosfolípidos conteniendo un 80% de PC (Sattler et al., 1997). Cuando se incubaron liposomas modificados con residuos de óxido de polietileno - ácido fólico (FA-PEO) que incorporaban un marcador fluorescente con alto peso molecular y baja permeabilidad, se detectó una acumulación intracelular del marcador, respecto a los liposomas convencionales (Anderson et al., 1999).

Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que el modelo celular podría tener una mayor expresión de las proteínas específicas para residuos de ácido fólico.

Otros investigadores determinaron un aumento de 3,5 veces en la permeabilidad para calcitonina incorporada en liposomas respecto a calcitonina libre (Song et al., 2002). La suspensión de liposomas se obtenía *in situ*, cuando se reconstituía un sólido con proliposomas conteniendo calcitonina. La insulina también fue incorporada a liposomas convencionales o liposomas conteniendo promotores de la penetración, como el taurocolato de sodio. Se observó una permeabilidad incrementada a través de cultivos de Caco-2 para los liposomas con taurocolato respecto a los convencionales (Degim et al., 2004). Estos resultados correlacionaron con un descenso en los niveles de glucosa plasmática luego de administrar estos liposomas por vía oral a ratones normales. Un mecanismo factible podría ser la apertura de las uniones estrechas intercelulares por efecto de la sal biliar, según había sido estudiado con mezclas de insulina y taurocolato aplicadas a las monocapas celulares (Johansson et al., 2002).

Existe otro aspecto a considerar, que si bien no está relacionado con los mecanismos de absorción intestinal, tiene el efecto negativo de disminuir la concentración del fármaco en el enterocito por la expulsión hacia el lumen intestinal. Se trata de la resistencia multidroga o MDR, descrita comúnmente para explicar la resistencia de ciertas células tumorales a los tratamientos con un amplio espectro de fármacos antitumorales (Ford y Hait, 1993). Entre los numerosos mecanismos propuestos para explicar la MDR, el mejor caracterizado hasta la fecha es la expulsión de sustancias desde las células mediada por la glicoproteína P (P-gp). Esta proteína de membrana funciona como una bomba de eflujo ATP dependiente, que reduce la concentración intracelular de sustancias hasta niveles sub-terapéuticos (Shabbits et al., 2001). Si bien la P-gp se encuentra sobre-expresada en ciertos tumores, se expresa también en células de tejidos sanos, como por ejemplo en las microvellosidades de los enterocitos que cubre el epitelio del intestino delgado (Sikic, 1999). También expresan la P-gp los cultivos de células de carcinoma de colon humano (Caco-2), por lo que resultan un buen modelo para estudiar distintos mecanismos de la MDR.

Se han sintetizado bloqueantes de la P-gp de primera, segunda y tercera generación, apuntando a la mayor eficiencia y la menor toxicidad. Sin embargo, los liposomas han demostrado ser moduladores eficaces y no tóxicos de la MDR para numerosas aplicaciones. Se ha visto que los fosfolípidos podrían competir con el fármaco como sustratos de la P-gp, disminuyendo así la salida del mismo (Bosch et al., 1997). Incubando células Caco-2 con epirubicina incorporada a liposomas compuestos por DPPC y DPPE, se observó que aumentaba notablemente la acumulación intracelular del antitumoral respecto a los niveles hallados para la incubación con epirubicina libre (Lo, 2000). La pre-incubación con liposomas vacíos seguida de epirubicina libre producía el mismo incremento, demostrando el efecto inhibitor de los liposomas sobre la P-gp. Estos resultados se correlacionaban con un mayor transporte a través de los cultivos celulares, y con el incremento en la absorción determinado con secciones de yeyuno e íleo de roedores. Por lo tanto, la modulación de la MDR en el epitelio intestinal podría ser la clave para el tratamiento de tumores en el TGI mediante la administración oral de antitumorales incorporados a liposomas.

1.9.4. Estudios farmacocinéticos con liposomas

La absorción de un agente terapéutico incorporado a liposomas luego de su administración por vía oral es generalmente evaluada por su perfil en la circulación sistémica. El monitoreo de la concentración plasmática del mismo en función del tiempo formará parte de los estudios farmacocinéticos, una de las aproximaciones para estimar la biodisponibilidad del sistema evaluado. Los parámetros que suelen determinarse a partir de los perfiles "concentración plasmática vs. tiempo" son el área bajo la curva (AUC) y el tiempo al cual la concentración plasmática es máxima (T_{max}), es decir el tiempo en el cual la velocidad de absorción iguala a la velocidad de eliminación.

Se ha estudiado que la biodisponibilidad de los liposomas luego de la administración por vía oral depende de una serie de factores, muchas veces interrelacionados, como la composición de los liposomas, su carga y tamaño, la dosis administrada, la cantidad retenida en el sitio de acción, y la anatomía y fisiología del sitio de absorción.

El efecto del agregado de colesterol a los liposomas se estudió incorporando insulina radiactiva en liposomas, y midiendo la concentración de insulina, asociada o no a las vesículas, que aparecía en la vena porta 3 horas después de su administración por vía oral. Se observó que las formulaciones ricas en colesterol (alrededor del 50% molar respecto a la concentración de fosfolípidos) aumentaban la concentración de insulina en la vena porta con respecto a las pobres en colesterol (20% molar) (Das et al., 1988). También se vio un 60% de la insulina en plasma estaba asociada a liposomas ricos en colesterol, frente a sólo un 15% que permanecía asociada a liposomas pobres en colesterol.

El agregado de colesterol a altas concentraciones se combinó con el empleo de fosfolípidos saturados para la incorporación de ciclosporina A (CSA), uno de los inmunosupresores más eficientes (Al-Meshal et al., 1998). Los liposomas obtenidos se compararon con una microemulsión de CSA comercializada (Sandimmune Neoral ®) luego de la administración oral a conejos. A pesar de que el AUC de la microemulsión resultó mayor respecto a la hallada para los liposomas, éstos alcanzaron el pico máximo de concentración plasmática a los 50 minutos en comparación con las 4 horas requeridas por la microemulsión. La menor AUC obtenida para los liposomas podría deberse en parte a su gran tamaño (4 μm) que les conferiría una menor estabilidad. Investigaciones posteriores con CSA incorporada a liposomas preparados con lecitina de soja sin colesterol, mostraron resultados diferentes (Guo et al., 2001). En este caso, se hallaron valores similares de AUC y T_{max} para ambos sistemas, con lo cual la elección de los liposomas frente al producto comercial estaría justificada por su menor toxicidad. Las diferencias halladas respecto a los ensayos de Al-Meshal et al. podrían deberse a la composición de las vesículas (SPC sin colesterol), a su menor diámetro (78 nm) y a la presencia de una carga neta levemente negativa (potencial Z: -13 mV), verificándose la influencia de estos parámetros en la biodisponibilidad.

Otra estrategia empleada para aumentar la biodisponibilidad fue incorporar estearilamina (SA) en las bicapas para encapsular superóxido dismutasa (SOD). Su administración oral resultó en un aumento del 20% en la AUC respecto a la administración subcutánea (Regnault et al., 1996). La incorporación de ceramidas a la formulación se vio reflejada en un aumento relativo del 60% y una liberación sostenida con un T_{max} de 5 horas,

sugiriendo un efecto *depot*. Se halló una buena correlación entre este aumento y la disminución significativa de procesos inflamatorios en modelos animales tratados por vía oral.

La incorporación de vitaminas liposolubles a liposomas fue largamente estudiada con el objeto de mejorar su biodisponibilidad. Se observó por ejemplo, que cuando se incorporaban las vitaminas E (como α -tocoferol) ó D a liposomas con carga negativa en fase gel, es decir compuestos por lípidos saturados, se obtenían perfiles plasmáticos con mayores valores de AUC (Gregoriadis, 1989). También se vio la influencia de la carga cuando se incorporó una proteína, como la ovoalbúmina (PM: 45.000 Da), a liposomas con carga negativa: los valores de absorción reportados duplicaron los hallados para la proteína libre (Tsume et al., 1996). Para la vitamina BH₄, pobremente absorbida por vía oral, se observó un incremento del 50% en los niveles plasmáticos cuando era incorporada a liposomas compuestos por DSPC (Sawada et al., 1993). La vitamina E, como acetato de tocoferol, fue incorporada a liposomas compuestos por lípidos de origen marino, conteniendo fosfolípidos y ácidos grasos omega 3 (Nacka et al., 2001c). Los niveles linfáticos de vitamina E incorporada a estos liposomas después de la administración oral a roedores, duplicaron los niveles obtenidos después de la ingestión de una solución oleosa.

Como ya se describió para el caso de los liposomas con ciclosporina A, el tamaño de los liposomas generalmente influye en la biodisponibilidad. Liposomas compuestos por EPC y conteniendo zidovudina (AZT) fueron preparados con el objeto de atravesar la barrera hematoencefálica. La administración intragástrica de liposomas de 100 nm incrementó 35 veces los niveles de zidovudina en el cerebro respecto a la formulación de AZT convencional en dimetilsulfóxido (Amselem et al., 1995). Resultados similares se hallaron para liposomas conteniendo eritropoyetina humana recombinante (EPO), empleada para el tratamiento de anemias renales. La absorción fue significativamente mayor para REV's de 100 nm que para REV's de 200 nm, luego de su administración oral a roedores (Maitani et al., 1996). En este trabajo los autores postularon que al disminuir el tamaño de los liposomas, aumentaba la absorción intestinal.

En trabajos más recientes es frecuente emplear sales biliares incorporadas a liposomas como agentes que favorecen la absorción después de la administración por vía oral. La calcitonina de salmón (sCT), empleada para el tratamiento de enfermedades óseas como la osteoporosis, tiene una biodisponibilidad muy baja cuando es administrada por vía oral, por su inestabilidad en el medio gástrico, así como su baja absorción intestinal. Liposomas conteniendo sCT fueron preparados empleando mezclas de PC con taurocolato de sodio. Su administración a roedores por vía intra-duodenal, produjo un aumento de 7 veces en la biodisponibilidad respecto a una solución de sCT y de 3,5 veces respecto a liposomas sin taurocolato (Song et al., 2005).

La estrategia de recubrir los liposomas con sustancias bioadhesivas para administración oral también ha sido aplicada a estudios farmacocinéticos. La vancomicina, un potente antibiótico glicopeptídico, fue incorporada a liposomas conteniendo lípidos saturados y colesterol, unido o no a terminaciones de ácido fólico (FA-liposomas) (Anderson et al., 2001). La biodisponibilidad evaluada como AUC en roedores, fue de 3,9 y 12,5 veces superior para los liposomas convencionales y los FA-liposomas respectivamente, respecto a la vancomicina administrada como solución oral.

1.9.5. Estudios farmacodinámicos con liposomas

Para estudiar la efectividad de una formulación de liposomas por vía oral es de gran utilidad monitorear la respuesta terapéutica, como por ejemplo la disminución de la glucosa plasmática después de la administración de insulina. Estos estudios, que se conocen como farmacodinámicos, son más representativos de los procesos fisiológicos que los estudios farmacocinéticos, ya que no miden simplemente una concentración, sino un efecto terapéutico. Esto implica que la molécula incorporada debe llegar al sitio de acción con su actividad biológica intacta e inducir la respuesta esperada. No siempre es factible realizar estudios farmacodinámicos, en parte por la ausencia de modelos *in vivo* adecuados, como tampoco es sencilla su interpretación. Incluso existen ejemplos en los cuales un efecto farmacocinético no está acompañado de una respuesta farmacodinámica. Por ejemplo, cuando se administraron liposomas con insulina compuestos por mezclas equimolares de fosfolípidos saturados o insaturados con fosfatidilinositol (PI) o fosfatidiletanolamina (PE) a ratones con diabetes inducida, se obtuvo hiperinsulinemia en todos los casos. Sin embargo, la reducción del nivel plasmático de glucosa efecto de la insulina biológicamente activa, sólo se observó para liposomas compuestos por bicapas con altas T_m (Akhrem et al., 1995). Resultados similares se obtuvieron para insulina incorporada a liposomas DPPC:DPPE 1:1 mol:mol administrada por vía oral a ratas diabéticas. El incremento en el nivel plasmático de insulina correlacionó con el descenso en los niveles de glucosa sólo para esta formulación, llegando a valores cercanos al nivel basal encontrado en animales sanos (Kisel et al., 2001).

Como se había deducido a partir de algunos estudios farmacocinéticos, se vio que en general los lípidos saturados eran mucho más estables que los insaturados en el tracto gastrointestinal, principalmente debido a una mayor resistencia frente a las sales biliares. Sin embargo, Fukunaga et al. propusieron que una preparación de liposomas con calcitonina compuestos por EPC resultaba más eficientes en disminuir la concentración plasmática de calcio, que otra compuesta por DMPC o DPPC. La hipocalcemia incrementada luego de la administración de liposomas por vía oral se conoció como el "efecto Fukunawa" (Fukunaga et al., 1991).

Los esteroides derivados de la soja (SS), empleados como estabilizantes de bicapas en el medio gastrointestinal, fueron agregados a liposomas conteniendo insulina como sustitutos del colesterol, para obtener una disminución de la glucosa plasmática. Los liposomas compuestos por DPPC:SS (dipalmitoilfosfatidilcolina: *soybean sterols*) en relación 7:4 molar respectivamente, mostraron la mayor disponibilidad farmacológica, disminuyendo la glucosa en plasma hasta 21 h después de la administración por vía oral (Muramatsu et al., 1996). A pesar de esto, la biodisponibilidad con respecto a la insulina por vía intravenosa seguía siendo relativamente baja (31,6%). También se emplearon los SS en combinación con DPPC para preparar liposomas con eritropoietina humana recombinante (EPO) y mejorar su efectividad por la vía oral, determinándose la ganancia en peso corporal (Maitani et al., 1995) y el porcentaje de reticulocitos circulantes (Maitani et al., 1999). En el último caso se observó que aparecía un retardo de alrededor de 2 días en aparecer una respuesta farmacológica determinada como porcentaje de reticulocitos circulantes. Sin embargo, los altos niveles de reticulocitos

permanecían en plasma durante más tiempo respecto a la administración parenteral, indicando un efecto de liberación controlada de la EPO.

La estrategia de agregar sales biliares a los liposomas también fue aplicada a sistemas de vesículas mucoadhesivas conteniendo insulina. En este caso se prepararon liposomas conteniendo mezclas de fosfolípidos saturados (como DPPC), colesterol, metilcelulosa (como componente mucoadhesivo) con o sin el agregado de taurocolato de sodio. Se evaluaron los niveles de glucosa plasmática después de la administración oral de las distintas formulaciones a roedores. El nivel de glucosa en sangre para la administración de liposomas mucoadhesivos con taurocolato disminuyó en forma similar al obtenido después de una inyección intraperitoneal de insulina en solución (Degim et al., 2004).

También existen numerosos ejemplos en los cuales la respuesta terapéutica se ve incrementada cuando los liposomas son recubiertos por polímeros. La administración oral de liposomas de insulina cubiertos con quitosano produjo una disminución del 10% en la concentración de glucosa plasmática con respecto a la inyección s.c. de insulina en solución y una reducción en un factor de 5 respecto a la obtenida para liposomas sin recubrir con el polímero (Takeuchi et al., 1996). La reducción en la concentración de glucosa se prolongó en el tiempo (>12 h) probablemente a causa del aumento del tiempo de residencia en el sitio de acción debido a la mucoadhesividad del polímero. El quitosano fue comparado con el carbopol para evaluar su efectividad luego de la administración oral de calcitonina incorporada a liposomas recubiertos por estos polímeros (Takeuchi et al., 2003). El efecto farmacológico de la calcitonina liposomal fue 2,4 y 2,8 veces mayor para liposomas recubiertos con carbopol y quitosano respectivamente en comparación con liposomas sin recubrir, demostrando una mayor y más prolongada reducción en la concentración plasmática de calcio.

El recubrimiento de liposomas con polietilenglicol (PEG) y su administración por vía oral, también produjo una reducción del nivel de glucosa plasmática durante 8 horas, probablemente debida a la mayor estabilidad de los liposomas peguilados frente a las sales biliares (Iwanaga et al., 1999).

También se realizaron farmacodinámicos para albendazol incorporado a liposomas. Este antiparasitario, empleado habitualmente para el tratamiento de la hidatidosis, tiene una muy baja biodisponibilidad y presenta una absorción errática cuando es administrado por vía oral. El tratamiento con albendazol liposomal combinado con cimetidina mejoró los efectos terapéuticos respecto al mismo en forma libre (Wen et al., 1994), si bien se supone que en parte se debe a la acumulación linfática del antiparasitario.

1.9.6. Vacunas orales a base de liposomas

La incorporación de antígenos en liposomas para generar una respuesta inmune a través de la administración por vía oral, es uno de los grandes potenciales de los sistemas orales basados en liposomas. Esto se debe principalmente a que el epitelio intestinal es una de las vías de ingreso directo de los sistemas particulados al sistema inmune asociado al intestino (GALT) a través de las células M, en relación con las placas de Peyer. Esta acción de los liposomas como adyuvantes se conoce desde hace 30 años, cuando se emplearon por primera vez para encapsular el toxoide de la difteria (Allison y Gregoriadis, 1974). Para que estos resultados

tuvieran una utilidad industrial, debieron desarrollarse metodologías robustas y reproducibles para la obtención de liposomas con una incorporación eficiente del antígeno sin alterar su actividad, y que tuvieran además, distribuciones de diámetros estrechas y controladas. También fue necesario contar con los métodos que permitieran caracterizar los sistemas obtenidos, como por ejemplo los analizadores de partículas basados en la tecnología láser.

Por lo tanto se describieron numerosas aplicaciones a partir de los 90, la mayoría de las cuales mostraban la eficacia de los liposomas como adyuvantes para la inmunización oral. Algunos ejemplos son: la encapsulación de un antígeno del virus del herpes (Bowen et al., 1992); la unión de liposomas a la toxina colérica para inducir inmunidad en sangre y mucosas (Harokopakis et al., 1995); IgA monoclonal unida covalentemente a liposomas para lograr una especificidad hacia las células M (Zhou et al., 1995); ADN plasmídico incorporado a liposomas para despertar una respuesta inmune (Gregoriadis et al., 1997 ; Gregoriadis et al., 2002) y liposomas cubiertos por polisacáridos para la inmunización por vía oral (Venkatesan y Vyas, 2000).

Se ha evaluado el efecto de la composición lipídica de los liposomas en la eficacia de la adyuvancia. Algunos investigadores hallaron que solo liposomas conteniendo dimiristoilglicerol (DMPG), un fosfolípido con carga negativa, eran capaces de producir IgA secretoria e IgE e IgG circulatorias, siendo aún más eficaces que hidróxido de aluminio (alum) (Phillips et al., 1996). También el tamaño jugaría un papel fundamental. Habiendo determinado su captación por las Placas de Peyer (PP), Elridge et al. emplearon mezclas de vesículas de diferentes tamaños para modular la respuesta inmunológica (Eldridge et al., 1990). La selectividad de las PP en el procesamiento de los distintos liposomas permitió una respuesta inmunológica extendida luego de una única administración por vía oral.

Sin embargo, otros autores opinan que la gran diversidad de formulaciones liposomales empleadas con éxito estaría indicando que la adyuvancia no depende de una característica específica de la vesícula en cuestión, sino que estaría determinada por una compleja combinación de factores entre los cuales el antígeno también estaría involucrado (Gregoriadis, 1994). Tampoco sería un requisito la existencia de algún tipo de asociación entre los liposomas el antígeno, pudiendo acomodarse en el interior acuoso, intercalarse entre las bicapas o hallarse adsorbido electrostáticamente en la superficie.

Se han desarrollado además, estrategias para aumentar la estabilidad de los sistemas de inmunización en el TGI, como por ejemplo el agregado de tetróxido de osmio a la formulación, como estabilizador de membrana (Theakston et al., 1985). Con un objetivo similar, Childers y colaboradores administraron a seres humanos cápsulas con cobertura entérica que contenían una mezcla de liposomas liofilizados y antígeno (Childers et al., 1995). Demostraron que una vez liberado el contenido de la cobertura en el intestino, se formaban vesículas menores a 100 nm con el antígeno encapsulado y se lograba inducir inmunidad humoral.

Existen otros sistemas de liberación derivados de los liposomas y aplicados a estrategias de inmunización, como por ejemplo los coquelatos. Estos sistemas se preparan por precipitación de los fosfolípidos con una sal de calcio, obteniéndose láminas que luego se enrollan dando estructuras del tipo espiral, con un interior netamente hidrofóbico. Si bien no contienen prácticamente agua en su interior, incorporan proteínas y antígenos con gran eficiencia, y resultan muy estables en el tracto gastrointestinal. Se ha logrado por ejemplo inmunizar a

roedores frente al virus de la gripe durante 5 meses, con una única administración intranasal del antígeno incorporado a coquelatos (Mannino et al., 1998).

1.9.7. Aplicaciones nutricionales

Habiendo asistido al éxito de los liposomas en el campo farmacéutico y cosmético, la industria de suplementos dietarios ha comenzado a emplear liposomas que mejoren la performance de un producto en uno o más aspectos, como por ejemplo aumentar la solubilidad de una sustancia, controlar su liberación, mejorar la biodisponibilidad del ingrediente y evitar efectos no deseados en las características organolépticas de un alimento, entre otras. El creciente interés en las aplicaciones alimenticias se ve reflejado en la aparición de "reviews" (Porzio, 2004; Desai y Hyun, 2005).

Una aplicación que ha resultado de gran utilidad en la manufactura de quesos es la incorporación de enzimas en liposomas para reducir el tiempo de maduración y aumentar el desarrollo del sabor. Para varios tipos de quesos, la aplicación de cócteles de proteasas y lipasas incorporadas en liposomas, aceleró significativamente la proteólisis y lipólisis, acortando el tiempo de maduración respecto a los quesos tratados con enzimas libres (Kheadr et al., 2003).

La encapsulación de vitaminas en liposomas también ha sido empleada con fines nutricionales, en particular para aumentar la solubilidad de las liposolubles (Salle et al., 2005). La vitamina E, por ejemplo, suele emplearse para evitar la oxidación de aceites en emulsiones, pero con baja efectividad ya que los procesos oxidativos se inician en la fase acuosa, donde la vitamina es insoluble. Su incorporación a liposomas aumentó notablemente su eficiencia como antioxidante (Ruben y Larsson, 1985). La estabilidad del ácido ascórbico también resultó muy incrementada luego de su incorporación a liposomas, aún en presencia de sustancias oxidantes (Kirby et al., 1991).

La incorporación de calcio a liposomas se ha aplicado a la fortificación de leche de soja para obtener concentraciones mayores a las encontradas en leche de vaca (Hirotsuka et al., 1984). También se ha encapsulado sulfato ferroso en liposomas para la fortificación de leche vacuna con hierro (De Paoli y Hager, 1996). Los liposomas mostraron una biodisponibilidad similar a la del sulfato ferroso libre agregado a la leche, pero el producto liposomal mantuvo inalteradas las características organolépticas de la leche fortificada, como se explicará en el apartado 1.10.1. (Lysionek et al., 2002). Como una curiosidad puede mencionarse el hallazgo de liposomas en la leche materna, verificado mediante criofractura (Keller, 2001), como componentes microestructurales que podrían desempeñar el rol de aumentar la absorción de los nutrientes así como cumplir una función inmunogénica.

La incorporación del hierro hemínico a liposomas se ha aplicado en la fortificación de harinas. Se observó un efecto positivo en la estabilidad y características reológicas de las masas obtenidas y se investigaron las condiciones de cocción adecuadas para mantener el sistema funcional (Albaldawi et al., 2005).

La encapsulación de saborizantes generalmente se realiza mediante coacervación empleando polímeros naturales o mediante su encapsulación molecular con ciclodextrinas. Sin embargo, el empleo de liposomas permite que el sabor permanezca encapsulado aún después

de la dilución en agua, contrariamente a los otros sistemas. También han sido empleados para agregar sabor a los quesos, agregándolos directamente a la leche, y reduciendo las cantidades necesarias para lograr un mismo efecto.

Existen unos 50 suplementos dietarios en el mercado a base de liposomas, cuyos componente activos son vitaminas (A, B2, B12, E), coenzima Q10, extracto de Gingko biloba, equinácea, sulfato de glucosamina, extracto de semilla de uva, melatonina, hipericina, gluconato y sulfato de cinc, y sulfato ferroso, entre otros.

1.9.8. Patentes de liposomas para administración por vía oral

La gran cantidad de patentes sobre liposomas administrados por vía oral que aparecieron en los últimos 10 años podría servir como indicador del potencial de esta aplicación.

Los péptidos o proteínas como la calcitonina o la insulina han sido objeto de numerosos trabajos, algunos de los cuales fueron patentados. Se prepararon liposomas menores a 100 nm conteniendo fármacos peptídicos o proteicos con una incrementada biodisponibilidad por vía oral o mucosal (Mariko et al., 1996 ; Takeshi et al., 1996). Su composición incluía fosfolípidos saturados con el agregado de colesterol en relación 7:4 molar respectivamente. Otras proteínas, como por ejemplo la hormona de crecimiento, fueron incorporadas a liposomas polimerizados (Dean et al., 2000). Se prepararon microgránulos a base de proliposomas con un interior acuoso gelatinizado, previa liofilización de los mismos, que incorporaban insulina (Siling et al., 2000). También para mejorar la biodisponibilidad de la insulina por vía oral se prepararon liposomas híbridos preparados a partir de mezclas de fosfolípidos y surfactantes formadores de micelas (Kamioka et al., 2002). Otra estrategia para mejorar la estabilidad gastrointestinal de péptidos y aumentar su absorción fue la obtención de liposomas recubiertos con polisacáridos sulfatados (JP2003171262 2002).

Se patentaron numerosas formulaciones orales a base de liposomas que incorporan diversos fármacos, como por ejemplo seleginina, empleado para el tratamiento del mal de Parkinson (Mezei et al., 1997) y el anticoagulante heparina (Guinez et al., 2000), entre otras.

También se han patentado aplicaciones para obtener nuevas formas farmacéuticas, como por ejemplo liposomas liofilizados incorporados a comprimidos con cubierta entérica para mejorar la absorción intestinal de fármacos con baja permeabilidad (Garsez et al., 1998b), o una tecnología más sofisticada, que consiste en obtener un multiparticulado compuesto por liposomas liofilizados con insulina asociada a gelatina, que finalmente es incorporado a comprimidos con cubierta entérica (Siling et al., 2000). Los liposomas también han sido incorporados a cápsulas de gelatina blandas o duras, liofilizados o bien en solución, empleando materiales resistentes al agua (Keller, 2002). Otra manera de obtener liposomas en forma de polvo pero evitando la liofilización, consistió en incorporar en caliente algún material formador de gel, que solidifique a temperatura ambiente (Sall Zhan-P, 2003).

Las aplicaciones veterinarias de los liposomas por vía oral tendrían un futuro promisorio. Algunos agentes antibacterianos como la estreptomina, se han incorporado a liposomas para el tratamiento de infecciones de animales de granja, como las aves de consumo humano. Las ventajas consistieron en la reducción de efectos colaterales y en un efecto prolongado de la terapéutica, además de que los liposomas pudieron incorporarse a los alimentos (Kuzjakova et

al., 2000). Recientemente se patentó la tecnología de los proliposomas, presentada en el apartado 1.6., para administrar sustancias farmacológicamente activas a animales (Yatvin y Betageri, 2001; Betageri y Yatvin, 2005), algunas de las cuales son antioxidantes o antiinflamatorios (Yatvin, 2005).

En cuanto a las aplicaciones inmunológicas se patentaron liposomas polimerizados dirigidos a células M mediante residuos superficiales de lectinas (Chen y Langer, 2002), inmunoliposomas con antígenos o alérgenos anclados en la superficie (Ishizuno et al., 2004; Uchida y Mori, 2004).

Entre las invenciones más originales se encuentra la síntesis de nuevas sustancias anfífilas unidas a polímeros, que pueden incorporarse a bicapas a una cierta concentración, confiriéndoles una mayor estabilidad (Aneja, 2004).

1.10. ANEMIA POR DEFICIENCIA DE HIERRO

La anemia por deficiencia de hierro es un problema difundido alrededor del mundo, fundamentalmente en los países en vías de desarrollo, en los que afecta a un alto porcentaje de la población. Se calcula que unos dos billones de personas padecen este tipo de anemia en el mundo (Tapiero et al., 2001), que puede resultar de una dieta inadecuada para cubrir los requerimientos de hierro o de algún tipo de interferencia en la absorción del hierro. En la Argentina en particular, una investigación realizada por el Centro de Estudios sobre Nutrición Infantil, demuestra que la anemia afecta a un 50% de los niños menores de dos años, pese a ser uno de los mayores exportadores de carne vacuna (O'Donnell y Britos, 2002).

1.10.1. Estrategias nutricionales

Es difícil establecer criterios sobre los requerimientos dietarios de hierro, ya que dependen de la edad, el sexo y básicamente el estado nutricional del individuo. Pero además deben tenerse en cuenta otros factores. Por ejemplo, la dieta de una mujer embarazada rara vez cubre los requerimientos de hierro aunque su estado nutricional sea óptimo. Para establecer las necesidades reales, debería conocerse el estado de las reservas de hierro en cada individuo, ya que la administración de hierro en exceso puede ocasionar graves intoxicaciones. En general se asume que el requerimiento dietario de hierro para individuos sanos es de 1 mg/d en hombres adultos, de 1,4 mg/d en mujeres adultas y de 5-6 mg/d en mujeres embarazadas y niños en edad de crecimiento (Goodman y Gilman, 2003).

Aunque el contenido de hierro total de una dieta es importante, la clave en la absorción del hierro es la biodisponibilidad del hierro ingerido. El hierro hemínico, que constituye el 50% del hierro presente en los productos cárnicos, es absorbido más eficientemente (en un 15-35%) que el hierro no-hemínico (en un 2-20%) (Monsen et al., 1978b). Como el hierro no-hemínico constituye aproximadamente el 90% del hierro ingerido, debe prestarse atención a incrementar su absorción, que depende de numerosos factores como la presencia de inhibidores o promotores de la absorción, como se explicará en el apartado 1.10.2.

Las estrategias para combatir la anemia por deficiencia de hierro pueden ser o bien la administración diaria de hierro medicinal o la fortificación de alimentos con hierro. Los sistemas de salud pública generalmente proveen suplementos de hierro a mujeres embarazadas y a niños hasta el año de vida, que constituyen el principal grupo de riesgo. Fuera de este grupo, la estrategia más eficiente parecería ser la fortificación de alimentos, fundamentalmente si se tienen en cuenta los núcleos sociales sin acceso a los productos farmacéuticos.

Los suplementos dietarios intentan cubrir las deficiencias de la ingesta y/o absorción de hierro, y se calcula que deberían aportar en promedio entre 10 y 20 mg de hierro por día. Generalmente se eligen las formas de hierro más biodisponibles y menos tóxicas y se agregan a un alimento que en lo posible presente un balance positivo entre los promotores e inhibidores de la absorción (Uauy et al., 2002). Además debería tratarse de un alimento que se encuentre muy difundido entre los sectores de riesgo y que sea consumido en forma predecible, para poder evaluar adecuadamente los efectos de su suplementación. En Chile por ejemplo, la fortificación de leche vacuna con sulfato ferroso y ácido ascórbico resultó una medida muy eficiente en la lucha contra la anemia, como lo demuestran los trabajos que evaluaron los efectos de dicho programa nacional (Olivares et al., 1989). La fortificación de la leche vacuna tiene por un lado, la ventaja de estar ampliamente difundida entre los niños, y como desventaja, su alto contenido de calcio, uno de los inhibidores de la absorción de hierro.

En Argentina, De Paoli y Hager patentaron un producto conteniendo sulfato ferroso estabilizado con ácido ascórbico encapsulado en liposomas (De Paoli y Hager, 1996) para agregar a productos lácteos fortificados con hierro. Los autores reivindicaron distintas formulaciones preparadas a partir de fosfolípidos saturados o insaturados, con un contenido de hierro de por lo menos 15 mg/L (expresado como hierro elemental). El SFE-171, como se denominó al producto, fue evaluado mediante estudios en ratones (Boccio et al., 1995), estudios de estabilidad en leche (Boccio et al., 1996), estudios de toxicidad (Boccio et al., 1998), fue administrado a niños anémicos en un estudio piloto (Rapetti et al., 1997) o a individuos sanos (Uicich et al., 1999), y también se realizaron estudios preventivos con ratas (Lysionek et al., 2000). Los liposomas fueron agregados a la leche y ésta fue consumida como tal en forma de líquido o bien se obtuvo leche en polvo fortificada empleando el método convencional de secado por spray (Lysionek et al., 2002). Los resultados obtenidos parecerían indicar que el SFE-171 tiene una buena biodisponibilidad cuando es administrado como suplemento del producto lácteo. Por otro lado, se evitan las alteraciones organolépticas que aparecen cuando se adiciona a la leche sales de hierro sin encapsular, como el sabor metálico propio del hierro, además del sabor producido por la oxidación de algunos componentes de la leche.

Otros ejemplos de fuentes de hierro empleadas para la fortificación de alimentos son: el hierro elemental, generalmente adicionado a cereales y con una buena biodisponibilidad, y el edetato férrico, elegido por ser uno de los que menos altera las características organolépticas de los alimentos (Viteri et al., 1978). También se ha empleado, fumarato ferroso, citrato amónico férrico y pirofosfato férrico. Algunos autores han propuesto que el compuesto químico que contiene el hierro no tendría una gran influencia en la biodisponibilidad, pero sí la presencia de ácido ascórbico (Lynch y Stoltzfus, 2003). Hasta la fecha, el compuesto que se considera más biodisponible continúa siendo el sulfato ferroso.

A pesar de los esfuerzos a nivel nutricional, existen muchos tipos de anemia que por tener otro origen persisten aunque los requerimientos dietarios sean cubiertos. De esta manera se ha desarrollado tratamientos para combatirla, basados en el conocimiento de los mecanismos de absorción del hierro.

1.10.2. Mecanismos de absorción de hierro

Se cree que el control del balance del hierro en los seres humanos primitivos fue desarrollado para evitar la intoxicación con un exceso de hierro, lo que parece haber sido siempre una amenaza mayor que la deficiencia de hierro (Hallberg y Hulthen, 2002). El balance de hierro es la diferencia entre su requerimiento y su retención. Esta última depende de la ingesta de hierro y de la biodisponibilidad del mismo. El exceso de hierro se acumula como ferritina en el interior celular y funciona como reserva para situaciones en que por algún motivo disminuye el hierro biodisponible. El balance de hierro no está regulado por un mecanismo de excreción, sino por la absorción en el intestino delgado. Por lo tanto, la primera regulación se daría a nivel de los enterocitos, que limitan la entrada del hierro al torrente sanguíneo, como se verá posteriormente.

Se ha demostrado que el hierro hemínico es absorbido directamente como complejo hierro-porfirina donde se libera una vez en el interior celular (Wheby et al., 1970). Por el contrario, el hierro no-hemínico se absorbería en el epitelio intestinal por un mecanismo complejo en el que intervienen numerosos elementos. Desde hace años se sabe que el Fe^{2+} se absorbe con mayor eficiencia que el Fe^{3+} (Brise y Hallberg, 1962a). Hoy en día se postula que la mayor parte del hierro soluble que ingresa al organismo se oxida en el lumen intestinal para dar Fe^{3+} , se reduce a Fe^{2+} por acción de una ferrireductasa presente en las membranas de los enterocitos (McKie et al., 2001). Esta reducción sería necesaria para el transporte del Fe^{2+} hacia el interior celular mediado por una proteína de membrana transportadora de cationes divalentes (Gunshin et al., 1997). Poco se sabe sobre el tránsito intracelular del hierro absorbido, sólo que dependiendo del balance de hierro, éste pasaría a formar parte de la ferritina, o bien sería transferido hacia la membrana basolateral de los enterocitos. Se cree que el transporte hacia el exterior del enterocito estaría mediado por otra proteína (Ireg1) para luego pasar a la circulación donde es transportada por la transferrina (McKie et al., 2000). La transferrina es una proteína sérica que puede transportar uno o dos átomos de hierro.

La pregunta que muchos investigadores se hicieron en este punto, es cómo el organismo le informa al intestino sobre sus requerimientos de hierro. Algunos trabajos hablan de proteínas reguladoras de hierro (IRP: *iron regulatory proteins*), que favorecerían la síntesis de ferritina e inhibirían la de transferrina antes niveles altos de hierro (Tapiero et al., 2001). Otras investigaciones más recientes sugieren una regulación más compleja mediada por la hepcidina, un péptido sintetizado por el hígado cuyos niveles se veían aumentados cuando el balance de hierro era positivo (Pigeon et al., 2001). Una de las hipótesis aceptadas en la actualidad es que los hepatocitos poseen receptores sensibles al estado de saturación de la transferrina. Cuando es alto, es decir en un estado de exceso de hierro, los receptores promueven la síntesis de hepcidina. Este péptido llega por medio de la circulación hasta los enterocitos y disminuye la expresión de la proteína Ireg1, encargada del transporte del hierro

en la membrana basolateral. Por el contrario, en situaciones de balance negativo, el hepatocito detecta el vaciamiento de la transferrina e inhibe la síntesis de hepcidina (Frazer y Anderson, 2003). Según esta teoría, el hígado jugaría un rol central en la homeostasis de hierro.

Otro tema a considerar es el efecto de otras sustancias en la absorción del hierro. En este sentido son numerosos los estudios realizados sobre el efecto de factores dietarios en la biodisponibilidad del hierro. Los inhibidores más conocidos de la absorción son el ácido tánico, los fitatos presentes en los cereales, los polifenoles, el calcio (el único que también interfiere en la absorción del hierro hemínico), los fosfatos, el EDTA, algunas fibras y proteínas de la soja, entre los más conocidos. Por el contrario, las sustancias que favorecen la absorción son el ácido ascórbico, y las carnes principalmente las rojas. Los mecanismos por los cuales se favorece o desfavorece la absorción del hierro no están muy claros. El caso del ascórbico podría estar relacionado con la formación de un complejo con el Fe^{2+} o bien tendría la función de mantener el estado de oxidación para que permanezca como divalente (Hulthen et al., 1995). El aumento de la absorción del hierro no-hemínico producido por las carnes estaría dado por un factor aún no caracterizado que permanece inalterado en el polvo de carne pero desaparece cuando se aíslan las proteínas (Engelmann et al., 1998).

Ya en 1937, McCance y Widdowson afirmaban que "es casi imposible desarrollar una teoría para la absorción y excreción del hierro que no entre en conflicto con resultados publicados anteriormente". Parecería que esta afirmación sigue tan vigente hoy como entonces, y así lo demuestra la gran cantidad de trabajos que continúan tratando de hallar nuevos elementos que responden al hierro (IREs: *iron-responsive elements*) y de averiguar cuáles son los factores que regulan su actividad.

1.10.3. Terapéutica de la anemia por deficiencia de hierro

La respuesta de la anemia por deficiencia de hierro al tratamiento depende de varios factores, como la causa y severidad de la enfermedad, la presencia de otras enfermedades asociadas y la capacidad del paciente de tolerar y absorber el hierro medicinal. Una terapia efectiva se traduce en un aumento de la producción de glóbulos rojos y continúa hasta que el nivel de hemoglobina alcanza valores normales. El uso preventivo de la terapia con hierro debe estar reservado exclusivamente para los pacientes de alto riesgo (embarazadas y lactantes). El tratamiento puede ser por vía oral, la opción mayoritariamente elegida, o por vía parenteral, en los casos más severos o en caso de intolerancia al hierro oral.

La formulación de productos para el tratamiento de las anemias hierro dependientes ha tenido en cuenta los siguientes hechos (Goodman y Gilman, 2003):

- La absorción de las sales ferrosas (Fe^{2+}) a nivel intestinal es significativamente mayor que la absorción de las férricas (Fe^{3+}).
- La naturaleza de la sal ferrosa administrada parece no afectar la biodisponibilidad del hierro.
- Las sales férricas también pueden ser absorbidas en el intestino pero deben ser administradas como complejos solubles.
- Cuando la administración se realiza por la vía parenteral, no se requiere que el hierro se encuentre como bivalente y suelen emplearse complejos estables de Fe^{3+} .
- Algunas sustancias, como por ejemplo el ácido ascórbico, aumentan la absorción del hierro

cuando son administradas en forma conjunta.

Entre los compuestos de hierro comercializados para administración oral se encuentran las siguientes sales ferrosas: ascorbato, aspartato, carbonato, cloruro, ferrocolinato, fumarato, glicinsulfato, gluceptato, gluconato, lactato, oxalato, succinato, sulfato, tartrato. También se emplean algunas sales férricas como el citrato (amónico férrico) o el pirofosfato, y algunos complejos como el de hierro con proteínsuccinato. Para la vía parenteral suelen emplearse formulaciones de complejos de hidróxido férrico con dextranos, dextrinas parcialmente hidrolizadas, polimaltosa, EDTA y el muy difundido complejo con sorbitol y ácido cítrico. Cada uno de estos compuestos aporta un contenido de hierro según su estructura química.

Desde mediados de los 70 se discute si realmente la eficacia de los compuestos ferrosos es mayor que la de los férricos. Algunos autores afirmaban que los productos a base de hierro trivalente eran absorbidos en niveles similares y en algunos casos disminuían los efectos colaterales producidos por las sales ferrosas (Schmitz y Muller, 1971; Muller, 1974; Schafer y Forth, 1984). Un completo estudio realizado sobre 14 productos comerciales de administración oral confirmó que el Fe^{2+} es más biodisponible que el Fe^{3+} , y sugirió que las preparaciones con hierro trivalente no deberían ser empleadas para la administración por vía oral (Dietzfelbinger, 1987). Las formulaciones fueron evaluadas en individuos sanos mediante la determinación de las AUC, expresando los resultados como porcentajes con respecto al sulfato ferroso. Los productos fueron clasificados en tres grupos según su biodisponibilidad relativa (BR):

- Un primer grupo con valores de BR en el rango 47-100% correspondiente a formulaciones de liberación inmediata conteniendo Fe^{2+} .
- Un segundo grupo con valores de BR entre 31 y 46% correspondientes a formulaciones conteniendo Fe^{2+} pero de liberación retardada o sostenida.
- Un tercer grupo con valores de BR entre 6 y 30% correspondientes a formulaciones conteniendo Fe^{3+} .

Según los resultados obtenidos, las formulaciones más adecuadas para la administración por vía oral serían las de liberación inmediata que contienen hierro divalente. Las formulaciones de liberación modificada, recomendadas para reducir los efectos colaterales, resultan menos efectivas, tal vez porque no permanecerían el tiempo suficiente en el sitio de mayor absorción, que es el duodeno. Entre las preparaciones de hierro trivalente, la única excepción es una formulación de un complejo de hierro con citrato que presentó una buena biodisponibilidad (47%).

Las dosis medias de hierro empleadas para el tratamiento de la anemia por deficiencia de hierro suelen estar entre 120 y 200 mg de hierro por día, distribuidos en tres dosis. Cuando se trata de tratamientos preventivos, suele administrarse entre 15 y 60 mg de hierro por día. Generalmente, la dosis administrada es un compromiso práctico entre la acción terapéutica deseada y los efectos tóxicos. Más allá de la toxicidad que podría producir un exceso de hierro, los tratamientos por vía oral suelen provocar efectos colaterales en el tracto gastrointestinal que pueden llevar a suspender el tratamiento en algunos casos. Para contrarrestar los efectos negativos de la administración de grandes dosis de hierro, se han desarrollado formas farmacéuticas de liberación modificada, en forma de matrices o coberturas de liberación prolongada (Hermelin y Grimshaw, 2003). Este sistema permitiría liberar pequeñas cantidades de hierro en forma continua, con lo cual podrían disminuirse los efectos colaterales de los

productos de liberación inmediata. Debe tenerse en cuenta, según lo expuesto anteriormente, que estos sistemas podrían disminuir la biodisponibilidad del hierro administrado en el producto.

Hasta la fecha no se han hallado productos farmacéuticos conteniendo hierro en liposomas. Debe tenerse en cuenta que el contenido de hierro en una forma farmacéutica para el tratamiento de la anemia debería ser muy superior al contenido de hierro en un producto empleado para la fortificación de alimentos.

1.11. ESTUDIOS DE LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO

Cuando se habla de biodisponibilidad de un fármaco, generalmente se hace referencia a la fracción de la dosis que alcanza la circulación sistémica, cuantificada como el área bajo la curva (AUC). Pero cuando se estudia la biodisponibilidad de un elemento como el hierro, deben tenerse en cuenta otros factores. Una de las definiciones que mejor describe este caso es: "la biodisponibilidad del hierro es una medida de la fracción digerida, absorbida y metabolizada mediante las rutas biológicas normales" (Fairweather-Tait et al., 1987).

Para estudiar la biodisponibilidad del hierro existen numerosos modelos. La clasificación más simplificada para ordenarlos podría ser: estudios *in vivo* (con animales o seres humanos), *ex vivo*, *in vitro* (con o sin células) y modelos aritméticos. Pero una clasificación más conceptual es la que tiene en cuenta los procesos involucrados según la definición anterior (Wienk et al., 1999). Según este criterio, los estudios para evaluar la biodisponibilidad del hierro pueden clasificarse en:

- Estudios de solubilidad, que evalúan la fracción digerida o soluble.
- Estudios de absorción, que representan una medida del ingreso a la circulación sanguínea.
- Medidas de punto final, que determinan su incorporación en una entidad funcional.
- Predicción de la biodisponibilidad mediante modelos aritméticos.

En cuanto al empleo de animales como modelos para extrapolar resultados hacia los seres humanos, las opiniones resultan contradictorias. En particular los roedores han sido largamente estudiados, por resultar un modelo simple, económico y reproducible. Algunos autores postulan que la absorción de hierro determinada mediante estos estudios en ratas responden cualitativamente a los mismos factores dietarios que la absorción en humanos (Park et al., 1983). Por el contrario, otros piensan que la absorción de hierro en ratas es básicamente diferente ya que su metabolismo es notablemente diferente que el de los seres humanos. Así por ejemplo, el Fe^{2+} y Fe^{3+} se absorben en un nivel similar, lo mismo ocurre con la absorción de hierro hemínico y no-hemínico (Reddy y Cook, 1991). Además las ratas son capaces de sintetizar ácido ascórbico y poseen actividad de fitasa, con lo cual el agregado de ascórbico no sería necesario y los fitatos no resultarían inhibidores. Si bien el cerdo parecería un mejor modelo, aún no se han realizado los estudios suficientes para asegurarlo. Por lo tanto a la hora de emplear un modelo animal, debe tenerse un cuidado especial a la hora de extrapolar los resultados obtenidos.

A continuación se describirán los métodos más empleados en la actualidad, especialmente aquellos que permiten determinar la biodisponibilidad de suplementos de hierro, que están preparados en base a hierro no-hemínico.

1.11.1. Estudios de solubilidad

Los estudios de solubilidad se aplican exclusivamente al hierro no-hemínico. Como se mencionó en el apartado 1.10.2., el hierro hemínico se absorbe como tal y su biodisponibilidad no está influenciada por las condiciones gastrointestinales.

Estos estudios se basan en el concepto de que la fracción de hierro que se solubilice puede emplearse para estimar la fracción que en teoría resultaría biodisponible. Se sabe que a pHs mayores que 2, solamente puede estar en solución el catión divalente (Fe^{2+}). El catión trivalente (Fe^{3+}) sólo puede solubilizarse en presencia de concentraciones adecuadas de algún quelante; de otro modo precipita como hidróxido férrico. Por lo tanto el estado de oxidación del hierro y la presencia de sustancias que estabilicen el Fe^{2+} o formen complejos con el Fe^{3+} , serán los factores que influyan en los resultados de los estudios de solubilidad.

Generalmente los estudios de solubilidad se realizan *in vitro*, pero también pueden realizarse *in vivo* recolectando muestras de la digestión en seres humanos. Los ensayos *in vitro* consisten en someter a la muestra a una digestión simulada, centrifugar la muestra y analizar el contenido de hierro en el sobrenadante mediante cromógenos, absorción atómica o analizadores gamma, en el caso de utilizar ^{59}Fe .

Una mejor aproximación son los estudios de dializabilidad (Miller et al., 1981). Luego de la digestión en medio ácido se agrega una bolsa de diálisis conteniendo bicarbonato y se agregan sales biliares y pancreatina a la muestra en el seno de la solución. El hierro soluble difunde hacia interior de la bolsa de diálisis donde su concentración inicial es nula. Finalmente se analiza el contenido de hierro presente en el interior de la bolsa a un tiempo determinado. Este método resulta más fisiológico ya que introduce en el modelo el equilibrio de diálisis, habiéndose observado una buena correlación con ensayos *in vivo* en seres humanos (Forbes et al., 1989).

Los ensayos *in vivo* son menos frecuentes ya que requieren tomar muestras de los contenidos gástricos e intestinales. Por lo tanto se han realizado principalmente en roedores. Los ensayos consistían en remover el TGI unas 2 ó 3 horas después de una alimentación, centrifugar y analizar el hierro en el sobrenadante.

La principal limitación de los estudios de solubilidad es la imposibilidad de inferir sobre la absorción e incorporación del hierro. También debe tenerse en cuenta la dificultad que implica imitar una combinación compleja de procesos biológicos. El mayor desafío de estos estudios es, por lo tanto, simular un proceso *in vivo*. Como ventajas, puede mencionarse el bajo costo, la velocidad y la posibilidad de controlar todas las variables, lo cual lleva generalmente a una menor variabilidad que los ensayos *in vivo*.

1.11.2. Estudios de absorción

Es la clase de estudios que comprende la mayor variedad de metodologías. En cuanto a la especie a medir, puede emplearse hierro nativo, radioisótopos o bien isótopos estables. Pueden realizarse ensayos *in vivo*, *ex vivo* e *in vitro*.

1.11.2.1. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN CON HIERRO NATIVO

Los dos estudios más difundidos con hierro nativo son el balance químico y las medidas de hierro plasmático post-absorción. En muchos casos se eligen estos estudios para evitar someter a los individuos o animales a la radiación ionizante.

En los estudios de **balance químico** el contenido de hierro absorbido o retenido, se calcula en forma indirecta restando al hierro ingerido, el hallado en la materia fecal y en la orina. Normalmente la excreción urinaria de hierro es muy baja y puede despreciarse. Debe tenerse en cuenta que se obtienen valores muy pequeños, por lo que están sujetos a niveles mayores de incertidumbre.

Estos ensayos pueden realizarse con relativa facilidad en animales pequeños, alojándolos en jaulas metabólicas que permiten recoger cuantitativamente la materia fecal, lo que resulta el punto crítico de esta metodología. En seres humanos también es factible realizar estudios de balance químico y de hecho fueron los estudios más difundidos años atrás. En la actualidad se usan principalmente cuando se desea medir varios nutrientes en la misma muestra (Hunt et al., 1995). La recolección cuantitativa de la materia fecal en este caso, puede controlarse mediante marcadores como el óxido crómico, que es excretado en forma completa.

Algunas ventajas del estudio del balance químico son el estudio del efecto de la dieta completa, la posibilidad de realizar ensayos durante tiempos prolongados y poder analizarse muchos nutrientes simultáneamente. Como desventajas pueden mencionarse que los estudios son laboriosos y caros, que no se realiza una corrección por la pérdida de hierro endógeno que pudiera producirse (independiente del administrado), y además su gran variabilidad, especialmente cuando se realizan con seres humanos. Los ensayos con roedores tienen mucha menor variabilidad, pero debe recordarse que resultan poco extrapolables.

Las **medidas de hierro plasmático post-absorción** son las que tradicionalmente se emplean en farmacología para determinar la absorción de un fármaco, por lo tanto consisten en medir el AUC y/o la máxima concentración plasmática después de la administración. Esta técnica tiene grandes limitaciones ya que las cinéticas de absorción de hierro pueden ser muy diferentes entre distintas preparaciones, y no por eso reflejar la biodisponibilidad real. Los perfiles plasmáticos de hierro tienen una gran variabilidad intraindividuo a lo largo del día y también entre individuos, y estas variaciones que subyacen no pueden ser corregidas. Por lo tanto las medidas de hierro nativo en plasma sólo se realizan para comparar en forma semi-cuantitativa la biodisponibilidad de distintas preparaciones cuando se administran altas dosis de hierro (25-100 mg). Hoy en día prácticamente han sido reemplazadas por las medidas de hierro isotópico, como se describirá a continuación.

1.11.2.2. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN CON HIERRO RADIATIVO

El empleo de hierro marcado permite seguir la absorción independientemente de las fluctuaciones del hierro endógeno. Sin embargo deben tenerse en cuenta algunos factores relacionados con la preparación del material marcado. Para marcar un suplemento, el isótopo agregado debería estar en la misma forma fisicoquímica que el compuesto a evaluar o bien ser intercambiable con el hierro suplementado. Los radioisótopos del hierro son dos: el ^{59}Fe y el ^{55}Fe , que han sido empleados en numerosos ensayos con seres humanos (Hallberg, 1981).

Estos dos radioisótopos generalmente se comercializan como cloruro férrico en solución, también se comercializan otras sales marcadas pero los costos suelen ser altos.

Cuando se descubrieron los radioisótopos, el primer método que se desarrolló fue la **determinación de radiactividad en materia fecal y orina**. Este estudio es similar al balance químico con hierro nativo, con la ventaja que no está afectado por posibles pérdidas endógenas, por lo tanto los resultados son más representativos de la absorción real (Hisayasu et al., 1992). Un método alternativo a éste, es remover el tracto gastrointestinal de ratas después de la administración de una cantidad conocida de ^{59}Fe , justo antes de la excreción de la materia fecal. La diferencia entre la dosis aplicada y la hallada en el intestino y su contenido será una medida de la absorción (Shears et al., 1989).

Una de los estudios de absorción que solía considerarse de los más exactos es el conocido como **whole-body counting**, que podría traducirse como conteo corporal total. Consiste en administrar una dosis de ^{59}Fe y medir la radiactividad total en el cuerpo entre 1-5 horas después. Éste valor se toma como 100%. Luego de 10-14 días en seres humanos (Van Hoek y Conrad, 1961) ó 5-7 días en ratas (Field et al., 1960), se considera que se llega a un estado estacionario, en el que no se pierde más hierro marcado. La medición de la radiactividad en ese momento, dividida por el valor inicial y multiplicada por 100, es una estimación del porcentaje del hierro absorbido, luego de realizar las correcciones necesarias por el decaimiento isotópico. Hoy en día no es tan utilizada por el costoso equipamiento necesario, pero aún se prefiere con respecto a la determinación de radiactividad en material fecal. Como desventaja principal puede mencionarse que está basado en una sola administración, con lo cual los resultados corresponden a la absorción de una dieta o suplemento en un momento en particular, perdiéndose reproducibilidad.

Otro estudio realizado con radioisótopos es la **medición de radiactividad plasmática post-absorción**, en forma similar a los estudios con hierro nativo pero empleando ^{59}Fe . De esta manera, las variaciones diurnas de los niveles plasmáticos de hierro no interfieren en la determinación. Aún así, los resultados obtenidos no tuvieron una correlación muy buena con respecto a estudios más confiables como el *whole-body counting*. Por lo tanto sólo se emplean para comparaciones semicuantitativas entre distintas preparaciones conteniendo hierro y no para determinar la cantidad absoluta de hierro absorbido (Ekenved, 1976).

Un método menos difundido consiste en medir la **captación por mucosa** y la **transferencia por mucosa**, que se basa en la diferencia existente entre la cantidad de hierro asociado inicialmente a la mucosa intestinal y la que finalmente se absorbe. Para esto generalmente debe hacerse uso de otro radioisótopo que no es absorbido, como el ^{131}Ba , que se comportaría en forma similar al hierro que no se absorbe, ya que se excreta por exfoliación de células del epitelio intestinal. Por lo tanto el cociente $^{59}\text{Fe}:^{131}\text{Ba}$ inicial comparado con el presente en la materia fecal unos días después de la administración será un indicador de hierro absorbido (Boender y Verloop, 1969).

Finalmente, pueden mencionarse dos métodos que intentan determinar la verdadera absorción de hierro, teniendo en cuenta las pérdidas endógenas. Uno de ellos se conoce como **balance comparativo** y consiste en administrar el radioisótopo a un primer grupo por vía oral y a un segundo grupo por vía intravenosa. Después de 2-4 días se miden las curvas "concentración del isótopo vs. tiempo", de las cuales la correspondiente al grupo inyectado

tendrá la influencia de la pérdida endógena de hierro. Por lo tanto el cociente de las ordenadas al origen de estas curvas dará una medida del hierro realmente absorbido (Naylor y Harrison, 1995). El otro método es el conocido como **dilución isotópica**, y consiste en estimar la verdadera absorción midiendo la excreción del isótopo después de la inyección intravenosa, al mismo tiempo que se monitorea el balance químico en el mismo animal. Ensayos realizados demostraron que la pérdida endógena de hierro resultaba despreciable, lo cual no justificaba la realización de ensayos más complejos (Kreuzer y Kirchgessner, 1991).

1.11.2.3. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN CON ISÓTOPOS ESTABLES

El hierro nativo es una mezcla de cuatro isótopos con masa atómica 54, 56, 57 y 58, con abundancias relativas de 5,82; 91,66; 2,19 y 0,33 respectivamente. Para los menos abundantes es factible incrementar su proporción obteniendo una preparación de un isótopo estable del hierro. Estos isótopos no emiten radiación, pero pueden ser medidos en función de su masa. Por lo tanto el método de *whole-body counting* no es aplicable en este caso y los estudios se basan en el análisis de la materia fecal o en curvas plasmáticas, luego de transformarlos en radioisótopos (Fairweather-Tait et al., 1989) o bien mediante espectrometría de masa (Eagles et al., 1985). Debido a la ausencia de radiación ionizante, estos son los métodos de elección cuando se deben realizar estudios en niños o mujeres embarazadas.

1.11.2.4. ESTUDIOS IN SITU

Numerosos métodos han sido descritos para estudiar la absorción de hierro empleando segmentos aislados de intestino delgado. Estos métodos pueden clasificarse según el nivel de integridad estructural que se mantiene en el órgano después de su aislamiento. Por ejemplo, la absorción puede ser estudiada *in situ* mediante el uso de un segmento de intestino manteniendo la circulación sanguínea, o bien el segmento puede ser seccionado y conectado a una unidad de circulación y oxigenación, o ser cerrado como si fuese una bolsa del lado del reverso (*everted gut sacs*; apartado 1.9.3.), o también puede emplearse una lámina de tejido intestinal que es montada en un equipo bicameral (Forth y Rummel, 1973). Estos estudios generalmente se realizan en roedores, por lo tanto tienen la desventaja del cambio de especie. Además dependen de que se realice una correcta manipulación del órgano o tejido, asegurando que permanezca funcional durante el tiempo que dura el estudio.

1.11.2.5. ESTUDIOS CON CÉLULAS CACO-2 Y OTRAS LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares se encuentran entre los modelos más recientemente empleados y es considerado uno de los más eficientes en cuanto a relación costo-beneficio, para medir la acumulación y transporte del hierro.

Los cultivos de células Caco-2 se han empleado para estudios de absorción de hierro desde principios de los 90 (Alvarez-Hernandez et al., 1991). Ya en ese momento se obtuvieron los primeros cultivos con un bajo nivel de hierro intracelular, haciendo crecer las células en un medio pobre en hierro. De esta forma se emplearon como modelo de anemia *in vitro*, verificándose una mayor captación de hierro respecto a las células cultivadas con medios

normales. También se observó la absorción preferencial del Fe^{2+} respecto al Fe^{3+} , tal como sucede *in vivo* (Han et al., 1995) y una buena correlación entre la captación de Fe^{2+} y las medidas de absorción *in vivo* para diversas combinaciones de alimentos (Au y Reddy, 2000). Como ya se había descrito en el apartado 1.9.3., esta línea celular se diferencia espontáneamente exhibiendo muchas de las características de las células del epitelio intestinal humano. Tal vez sea por esto que resultan sensibles a los mismos inhibidores y/o favorecedores de la absorción que las células intestinales. Los cultivos de Caco-2 también permiten estudios *in vitro* del metabolismo del hemo, si bien aún no ha sido demostrado que posean un receptor para el grupo hemo.

Algunos estudios han combinado métodos de solubilidad (Garcia et al., 1996) y dializabilidad (Glahn et al., 1996) con el empleo de células Caco-2. En el primer caso, los sobrenadantes obtenidos por centrifugación de las muestras digeridas, fueron incubados con las monocapas y se evaluó la captación de hierro. En el segundo caso, se ubicó una membrana de diálisis entre las dos cámaras de una placa Transwell y las células sembradas en el fondo de la cámara inferior (ver diseños en apartado 5.5.1.). Mientras la digestión transcurría en la cámara superior, el hierro solubilizado ingresaba a través de la membrana de diálisis hacia el compartimiento inferior, donde era captado por las células.

Otras líneas celulares que también se han empleado han sido las HT-29, en particular para estudios de metabolismo de hierro, como por ejemplo el transporte transepitelial (Mikogami et al., 1994). También se han empleado las IEC-18 y las IEC-6, derivadas de las criptas del íleo, con una resistencia eléctrica transepitelial más similar a los enterocitos humanos que las Caco-2 (Ma et al., 1992).

1.11.2.6. CONCLUSIONES SOBRE LOS ESTUDIOS DE ABSORCIÓN

En resumen, un estudio de balance químico es el que mejor refleja la situación fisiológica pero es muy difícil de llevar a cabo con precisión en seres humanos. El uso de isótopos estables sería una mejora en ese sentido, pero se basan en una única administración y requieren igualmente la recolección de material fecal. Los radioisótopos permiten obtener resultados con una buena precisión pero requieren la exposición a la radiación. Además, tampoco aseguran la recolección completa de la materia fecal. El uso de animales simplifica la ejecución de los estudios pero introduce la variable de la diferencia de especies. Probablemente el conteo corporal total sea la medición más confiable, pero requiere el empleo de ^{59}Fe . El empleo de la respuesta plasmática así como modelos *in vitro* basados en secciones de intestino resulta limitado. Las células Caco-2 serían una de las herramientas más prometedoras, ya que permiten combinar estudios de solubilidad con estudios de absorción.

1.11.3. Medidas de punto final

Estas medidas se realizan para evaluar cual es la eficiencia de incorporación del hierro al organismo una vez que ha entrado en la circulación sistémica. Generalmente estos ensayos asumen que el hierro absorbido se incorpora primariamente a la hemoglobina (Hb), por lo tanto midiendo el contenido de Hb se puede inferir sobre cuánto hierro fue efectivamente

incorporado al organismo. También puede medirse el hematocrito, o bien la ferritina en suero como medida complementaria a la Hb. Como en realidad no se incorpora el 100% del hierro administrado a Hb, sino que existe una pequeña cantidad que es distribuida entre otros tejidos, se han desarrollado métodos con isótopos que permiten realizar esta corrección, como se verá posteriormente. Hoy en día se cree que los estudios de punto final resultan la mejor aproximación a la biodisponibilidad real.

Uno de ellos es el **bioensayo de saturación de la hemoglobina** (*Hb-repletion bioassay*), recomendado por la Asociación de Químicos Analíticos Oficiales (AOAC), que consiste en cuantificar el hierro incorporado a la hemoglobina empleando modelos animales. Este ensayo se realiza normalmente en ratas que han desarrollado anemia a causa de una dieta pobre en hierro, aplicada durante por lo menos 28 días. Se preparan seis grupos de animales comparables: a tres se les administra el compuesto en estudio a tres concentraciones diferentes y a los tres restantes, diferentes dosis de sulfato ferroso, que es empleado como referencia. Después de una dieta de 2 semanas, se mide el contenido de hemoglobina en cada grupo y se grafica la concentración de Hb en función de la concentración de hierro de la dosis administrada, para el analito y para la referencia. El cociente entre ambas pendientes es una medida de la biodisponibilidad y se conoce como valor biológico relativo o RBV (*relative biological value*).

Este ensayo también es conocido como el método curativo, ya que los animales están anémicos antes de la administración del producto a evaluar. Una variante del mismo consiste en evitar la dieta previa a la administración del producto. En este caso, los animales tienen un nivel de hierro normal y por lo tanto el ensayo se denomina preventivo (*prophylactic assay*) (Lysionek et al., 2002). En este caso se realiza la suposición de que el estado inicial de los animales es similar en cuanto a reservas de hierro.

Otra variante de este ensayo es medir la ganancia de peso como consecuencia de la cantidad de hierro consumido (Miller, 1982). Se trata de un ensayo sencillo pero no siempre se obtiene una buena correlación con la medición de Hb. Se ha aplicado a ratas (Rao y Jagadeesan, 1995), pollos (Pennell et al., 1975) y también cerdos (Howard et al., 1993). Éste último resulta un modelo muy promisorio para establecer correlaciones con los seres humanos, por la similitud entre ambas anatomías gastrointestinales y metabolismos. También se han realizado estudios en seres humanos para evaluar la biodisponibilidad durante períodos largos, pero en general no es muy empleado por la alta variabilidad hallada entre distintos individuos (Olszon et al., 1978).

Para obtener resultados más confiables e independientes de las variaciones de hierro endógeno se desarrollaron las **medidas de punto final con un radioisótopo**. Los primeros estudios se realizaron monitoreando la distribución final del ^{59}Fe administrado por vía oral a animales anémicos y midiendo la radiactividad en vísceras y sangre (Hahn et al., 1939). También se realizaron estudios en seres humanos, pero midiendo la radiactividad que aparecía en sangre dos semanas después de la administración oral del producto (Moore y Dubach, 1951). Estos estudios fueron descartados porque aún persistía la alta variabilidad entre individuos y porque no se tenía en cuenta el hierro que iba a formar parte de otros tejidos.

Fue así como aparecieron las **medidas de punto final con dos radioisótopos**, para corregir la cantidad de hierro absorbido no incorporado a Hb en las medidas de punto final. Existen dos métodos posibles para estos estudios; ambos usan los dos radioisótopos ^{55}Fe y ^{59}Fe , pero variando las vías de administración.

El primero de ellos fue descrito por primera vez por Saylor y Finch (Saylor y Finch, 1953) y consiste en administrar una cantidad conocida de ^{55}Fe por vía oral y otra de ^{59}Fe por vía intravenosa del mismo producto en forma simultánea. Se considera que la dosis intravenosa (^{59}Fe) formará parte de la Hb en un 100% en el tiempo final que se establezca (entre 10 y 15 días). Por lo tanto el cociente entre las concentraciones de ^{55}Fe y ^{59}Fe en sangre, corregido por la dosis de cada uno (en caso de que fueran distintas) resulta una estimación de la fracción de hierro incorporado a la Hb.

Otra forma de realizar este ensayo es administrar ambos isótopos por vía oral, lo que se conoce como el **método de doble isótopo** (Brise y Hallberg, 1962b). Se trata de un ensayo para comparar distintos suplementos entre sí en un mismo individuo. Por lo tanto, se administran ^{55}Fe en un producto, ^{59}Fe en otro producto al día siguiente y se determina el cociente de sus concentraciones plasmáticas 15 días después. Como ahora ambos valores están afectados por la distribución tisular, el efecto se elimina prácticamente al calcular el cociente. La gran ventaja de este método es que permite realizar la comparación en el mismo individuo, eliminando la variabilidad interindividual (Hallberg et al., 1997).

También se han empleado **isótopos estables** para las medidas de punto final, cuando la administración de radioisótopos no está admitida, como por ejemplo en niños (Fairweather-Tait et al., 1995). En este caso la actividad basal puede interferir, contrariamente al caso de los radioisótopos, por lo cual se emplean generalmente para evaluar altas dosis de hierro administradas. En general se emplea el método de doble isótopo con ^{57}Fe y ^{58}Fe (Kastenmayer et al., 1994).

Los estudios de doble isótopo tienen la gran ventaja de realizarse en seres humanos, evitando el problema de la extrapolación a partir de modelos animales, pero la desventaja es la exposición a la radiación ionizante. Otras desventajas en estos estudios son: la administración de una única dosis con la cual se evalúa la absorción en ese momento y la obtención de productos marcados o bien el agregado de isótopos que sean intercambiables con el hierro del producto a evaluar. Los estudios con isótopos estables tienen las mismas desventajas excepto la exposición a radiación. Además el hecho de no emplear radioisótopos impide combinar estos estudios con medidas de conteo corporal total, que suelen ser complementarias a los estudios de doble isótopo.

1.11.4. Modelos aritméticos

Los métodos aritméticos permiten predecir la biodisponibilidad del hierro a partir de una dieta; no son empleados para suplementos conteniendo hierro. Pueden clasificarse en dos grupos. El primero permite calcular la biodisponibilidad de una dieta entera, basándose en la concentración de hierro y la presencia de inhibidores y favorecedores de la absorción. El segundo emplea modelos matemáticos que se derivan de ensayos *in vitro* para predecir el impacto de un inhibidor o favorecedor en la biodisponibilidad del hierro en un producto.

El primer modelo presentado, conocido como el método Monsen, consiste en seleccionar algunos parámetros que caracterizan al alimento a evaluar, como por ejemplo el contenido de hierro hemínico y no-hemínico, el contenido de ácido ascórbico, el contenido de materia de origen animal, entre otros (Monsen et al., 1978a). Luego se extraen de tablas los valores de

esos parámetros y se estima mediante un modelo aritmético la biodisponibilidad del alimento completo, combinando adecuadamente los valores hallados. Este modelo incluye la absorción del hierro hemínico, pero no tiene en cuenta el efecto de inhibidores de la absorción. El otro método se basa en datos obtenidos de ensayos de solubilidad *in vitro*, por lo tanto poseen las mismas desventajas que un modelo *in vitro*, además de las inherentes al modelo matemático empleado (Wolters et al., 1993).

1.11.5. Conclusiones generales

Hasta la fecha no existe ningún modelo que combine todas las ventajas y no posea alguna limitación importante. Por lo tanto una posibilidad sería combinar distintas estrategias para obtener los resultados que mejor expliquen la biodisponibilidad real.

Para un relevamiento comparativo, los estudios de solubilidad serían adecuados. Los cultivos celulares parecen un modelo promisorio, permitiendo incluso integrar los estudios de solubilidad, pero aún hay poco camino recorrido para que el modelo resulte robusto. Los animales pueden ser útiles, pero ya se ha visto que la extrapolación de los resultados obtenidos puede no ser correcta en todos los casos. Estudios como la medición del llenado de hemoglobina, por ejemplo, pueden ser reemplazados y con una buena correlación, por estudios de solubilidad o dializabilidad combinados con ensayos de absorción con células Caco-2. Aunque la introducción de radioisótopos ha permitido grandes avances en la dilucidación de mecanismos de absorción, la exposición a la radiación sigue siendo una de las mayores desventajas y se puede prever que serán prohibidos en el mediano plazo. En este sentido, se espera que los isótopos estables puedan reemplazar a los radioisótopos en muchas de las aplicaciones, pero aún deben desarrollarse métodos adecuados para que su empleo sea difundido.

2. OBJETIVOS

El objetivo de esta tesis es preparar formulaciones de liposomas empleando materias primas y procesos transferibles a escala industrial, y evaluar su potencial para la administración de hierro por vía oral por medio de ensayos *in vitro*.

Los objetivos específicos planteados, a partir de los cuales se desarrollaron los experimentos, fueron los siguientes:

- Optimizar los procesos de obtención de las formulaciones liposomales en base a las características deseadas para las mismas, empleando como herramienta el diseño multifactorial de experimentos.
- Estudiar la estabilidad fisicoquímica de los liposomas obtenidos durante un proceso de digestión simulada *in vitro*.
- Estudiar la resistencia que presentan estos liposomas a la solubilización por sales biliares, para inferir sobre su comportamiento en condiciones fisiológicas.
- Establecer las metodologías adecuadas que permitan caracterizar exhaustivamente las formulaciones liposomales antes, durante y después de procesos de digestión *in vitro*.
- Incorporar una sal ferrosa a las formulaciones estudiadas para evaluar si los liposomas contribuyen a la estabilización de la especie reducida del hierro (Fe^{2+}), cuando es sometida a un proceso de digestión simulada. De este modo, se empleará una sal ferrosa como modelo de sustancia hidrosoluble fácilmente oxidable, principalmente, por efecto de los cambios de pH.
- Evaluar si la incorporación de hierro en las formulaciones de liposomas mejora la captación del mismo por cultivos de células intestinales, como una forma de estimar su absorción *in vitro*, evitando el empleo de modelos animales.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. Lípidos y fosfolípidos

El Epikuron 200 es una lecitina de soja con un contenido mínimo de fosfatidilcolina del 95%. El Epikuron 200 SH es una lecitina de soja hidrogenada que contiene un mínimo de 95% de fosfatidilcolina hidrogenada. Ambos fueron comprados a Degussa (Dusseldorf, Alemania). La sal sódica del ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPA) mín.99% fue adquirido a Lipoid (Ludwigshafen, Alemania) y el DC-colesterol (DC-Chol) mín.98% a Avanti Polar Lipids (Alabaster, Al, USA). El colesterol empleado (Chol) mín.95% fue comprado a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). A continuación se transcriben las especificaciones de los fosfolípidos empleados.

3.1.1.1. EPIKURON 200

- Índice de peróxidos: < 0,1
- Humedad: 0,33%
- Contenido de fosfatidilcolina: 95,6%
- Contenido de lisofosfatidilcolina: 1,0%
- Recuento total en placa: < 100/g
- Hongos, levaduras, enterobacterias y salmonella: no detectables

3.1.1.2. EPIKURON 200 SH

- Índice de yodo: 0,5
- Humedad: 0,40%
- Contenido de fosfatidilcolina: 96,0%
- Contenido de lisofosfatidilcolina: 1,8%
- Conteo total en placa: < 100/g
- Hongos, enterobacterias y salmonella: no detectable

3.1.2. Sondas fluorescentes y quenchers

La sal trisódica del ácido 8-hidroxi-1,3,6-pireniltrisulfónico (HPTS) fue obtenida de Kodak (Rochester, NY, USA). El ácido carbolílico Oregon Green 514 (OG-514) y el bromuro de p-xilen-bis-piridinio (DPX), quencher de la HPTS, fueron suministrados por Molecular Probes (Leiden, Holanda). El KI, empleado como quencher del OG-514, fue adquirido de Merck (Darmstadt, Alemania).

3.1.3. Geles para exclusión molecular

El Sephadex G-25 fue adquirido de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). El Biogel A-15m 200-400 mesh size fue adquirido a Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

3.1.4. Reactivos generales

El quitosano de caparazón de cangrejo (grado práctico), el sulfato ferroso heptahidrato 99%, el ácido ascórbico, el hidrosulfito de sodio, el ácido disulfónico de la batofenantrolina, la 1,10-fenatrolina monohidrato, el colorante Cibacrom Brilliant Red 3B-A, el extracto de bilis porcina, la pancreatina, la pepsina A de mucosa estomacal porcina, la gramicidina D, HEPES y la albúmina sérica bovina (BSA) fueron comprados a Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El tiocianato de amonio, el cloruro férrico hexahidratado, la glicina, el cloroformo, el metanol y el ácido nítrico Suprapure fueron suministrados por Merck (Darmstadt, Germany). El ácido nítrico (TraceSelect) para análisis de trazas, empleado para las diluciones de las muestras analizadas por espectrometría de absorción atómica, fue adquirido a Fluka (St. Gallen, Suiza). El kit Micro BCA empleado para la determinación de proteínas fue adquirido de Pierce (Rockford, IL, USA). El medio de cultivo empleado para los cultivos celulares fue RPMI 1640 con Glutamax-I (GIBCO cell culture systems) y el conservante empleado fue la mezcla PEF (penicillin/streptomycin/fungizone) ambos provistos por Invitrogen Ltd (UK). Los reactivos deuterados empleados para los análisis por resonancia magnética nuclear fueron: DCl 35% p/p de SIGMA-ALDRICH y D₂O Uvasol 99,96% p/p de MERCK. Los otros reactivos empleados son de grado analítico. A continuación se transcriben las especificaciones para el quitosano suministradas por el proveedor.

3.1.4.1. CHITOSAN (Quitosano) Practical Grade

- Mín. 85% deacetilado
- Viscosidad > 200 cP (solución al 1% en ácido acético 1%)
- Peso molecular: entre 190.000 y 375.000

3.1.5. Soluciones y buffers

- AA: solución acuosa de ácido ascórbico 0,1 M.
- AA-TX2: solución de ácido ascórbico 0,1M con el agregado de Triton X-100 a una concentración de 2 mg/ml.
- AA-TX10: solución de ácido ascórbico 0,1M con el agregado de Triton X-100 a una concentración de 10 mg/ml.
- AA-TX30: solución de ácido ascórbico 0,1M con el agregado de Triton X-100 a una concentración de 30 mg/ml.
- Buffer PBS : buffer fosfato 10 mM con NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM pH 7,4.
- Buffer T10 : TRIS 10 mM con NaCl 145 mM pH 7,4.
- Buffer T100: TRIS 100 mM con NaCl 145 mM pH 7,4.
- Buffer T100-TX2: Buffer T100 con el agregado de Triton X-100 a una concentración de 2 mg/ml.
- Buffer T100-TX10: Buffer T100 con el agregado de Triton X-100 a una concentración de 10 mg/ml.
- Buffer T100-TX30: Buffer T100 con el agregado de Triton X-100 a una concentración de 30 mg/ml.

- Buffer UPTAKE: HEPES 50 mM, NaCl 130 mM, KCl 10 mM, glucosa 5 mM, MgSO₄ 1 mM, pH 7,0.
- REH (reactivo específico para hierro): ácido disulfónico de la batofenantrolina (BPDS) 1 mM con hidrosulfito de sodio 3,4 mM en buffer PBS.
- Solución FeAA 1:2: solución acuosa de sulfato ferroso heptahidratado 0,24 M y ácido ascórbico 0,48 M (relación molar 1:2 respectivamente).
- Solución FeAA 1:5: solución acuosa de sulfato ferroso heptahidratado 0,24 M y ácido ascórbico 1,2 M (relación molar 1:5 respectivamente).
- Solución FeAA-CHI: solución FeAA 1:2 conteniendo hierro 0,24 M con el agregado de quitosano en una concentración de 2 mg/ml.
- Solución pan/EB: 20 mg pancreatina, 134 mg extracto de bilis porcina en 5 ml de NaHCO₃ 0,1M.
- Solución pep/HCl: 80 mg pepsina en 1 ml de HCl 0,1 N.
- Solución TX-100 2%: solución acuosa de Tritón X-100 al 2% p/v.

3.1.6. Productos comerciales

Los productos conteniendo hierro empleados para ensayos con cultivos celulares fueron adquiridos en farmacias. Se eligieron por ser de los más difundidos en el mercado farmacéutico español y se describen a continuación:

- FERRO-GRADUMET comprimidos filmtab, sulfato ferroso de liberación regulada (Ross): se trata de comprimidos con cubierta entérica, que liberan el principio activo una vez que el mismo ha salido del estómago, es decir a pH cercano al neutro. Contienen el equivalente a 150 mg de hierro elemental por comprimido. Se identificará como PC1.
- FERPLEX 40, hierro proteínsuccinato (Italfármaco): producto líquido que contiene un complejo de hierro (III) - proteínsuccinato que precipita a pH menor que 4 y se disuelve rápidamente con pancreatina a pH neutro. El contenido equivalente de hierro elemental es de 40 mg por vial (15 ml). Se identificará como PC2.
- FERRUM SANDOZ, gluconato de hierro II (Novartis): tabletas efervescentes conteniendo 25 mg de hierro (II) en forma de gluconato.

3.2. EQUIPAMIENTO

- Espectrofotómetro Varian UV-visible CARY 3Bio (Palo Alto, California, USA).
- Espectrofluorímetro Aminco modelo SLM 8000 (Urbana, IL). Está provisto de un sistema de termostatación y agitación magnética y de un "chopper" que permite el cambio de longitud de onda de excitación a una velocidad controlada.
- Espectrómetro de absorción atómica con horno de grafito Perkin-Elmer modelo 4100ZL (Wellesley, Massachusetts, USA).
- Espectrómetro Mössbauer de aceleración constante con fuente de ⁵⁷Co/Rh.
- Espectrómetro de resonancia magnética nuclear Bruker ARX-400 con una sonda de 5 mm QNP para ¹H/¹³C/³¹P/¹⁹F y una unidad de estabilización de temperatura Bruker VT-2000.
- Microcalorímetro de barrido diferencial Microcal MC-2 (Northampton, MA, USA).

- Capillary Ion Analyzer (Waters, Milford, MA, USA) equipado con software Millennium (Waters).
- Homogeneizador de alta presión Microfluidizer 110S (Microfluidics, Newton, Massachusetts, USA).
- Analizador de tamaño de partículas Microtrac UPA 150 (Montgomeryville, Pensilvania, USA).
- Zetasizer 4 Malvern Instruments Ltd. (Worcestershire, UK).
- pHmetro Metrohm 713 pH (Herisau, Suiza) con tres cifras decimales.
- Ultracentrífuga Sorvall Combi-Plus (Du Pont, USA) equipada con un rotor de ángulo fijo T-865.
- Microscopio óptico láser confocal LEICA TCS 4D (Leica, Heidelberg, Alemania), con 0,2 μm de resolución, láser de argón-kriptón con longitudes de onda de excitación de 488, 568 y 647 nm.

3.3. MÉTODOS ANALÍTICOS

3.3.1. Determinación de fosfolípidos por el método de Stewart

3.3.1.1. PRINCIPIO

Se basa en la determinación de la absorbancia en la zona del visible del complejo soluble en cloroformo formado por fosfolípidos en presencia de ferrotiocianato amónico (Stewart, 1959). Presenta la ventaja de que el fósforo inorgánico no interfiere en la reacción. La absorbancia del complejo formado, así como la longitud de onda del máximo de absorción, depende de la cabeza polar del fosfolípido empleado, por lo tanto se deben preparar curvas de calibración con el fosfolípido o mezcla de aquellos que se busca analizar.

3.3.1.2. REACTIVOS

- Reactivo de Stewart: 27,03 g/l de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 30,40 g/l de NH_4SCN en agua destilada (estable por varios meses).
- Cloroformo p.a.

3.3.1.3. PROCEDIMIENTO

Se colocan en tubos de vidrio con tapa de teflon 2 ml del reactivo de Stewart y 2 ml de cloroformo medidos con bureta. Se agregan las alícuotas de las muestras a analizar en un volumen que no supere el 5% del volumen acuoso total. A continuación se agitan con vórtex durante 30 segundos y se dejan 15 minutos en reposo hasta que se obtienen dos fases. Se retira la fase acuosa superior y se determina la absorbancia de la fase clorofórmica inferior al máximo de absorbancia determinado según la composición lipídica (alrededor de 470 nm). Los resultados se interpolan en una curva de calibración con los testigos de fosfolípidos preparados según el mismo procedimiento.

Las alícuotas de muestras y de testigos se calcularon de modo tal de no superar una concentración de 0,08 mg/ml de fosfolípido en la fase orgánica. El volumen máximo agregado fue de 0,1 ml. Si las alícuotas de testigo se agregaran a partir de una solución clorofórmica, deberá evaporarse el solvente en corriente de nitrógeno antes de adicionar los reactivos para no modificar el volumen final de cloroformo.

3.3.2. Determinación de lípidos mediante absorbancia UV-visible de las suspensiones de liposomas

3.3.2.1. PRINCIPIO - APLICACIONES

Se basa en la determinación de la absorbancia UV-visible de suspensiones liposomales a una longitud de onda entre 280 y 600 nm, por comparación con la absorbancia de la suspensión madre de concentración conocida. En realidad se trata de una absorbancia aparente o turbidez, producida por la presencia de vesículas en suspensión, comúnmente medida con un espectrofotómetro. La intensidad de la absorbancia obtenida depende de numerosos factores entre los que se encuentran la concentración de fosfolípidos y el tamaño de las vesículas. Por lo tanto debe emplearse exclusivamente para calcular la concentración de muestras provenientes de procesos que no impliquen modificaciones en la distribución de tamaños respecto de la muestra original.

En este trabajo se empleó para las siguientes aplicaciones: (a) la determinación del contenido de fosfolípidos en muestras diluidas a partir de una solución madre, empleando la solución usada en la preparación como diluyente y (b) la determinación del porcentaje de elución de liposomas por cromatografía de exclusión molecular, verificando la elución total de los fosfolípidos.

3.3.2.2. PROCEDIMIENTO

Se elige una longitud de onda entre 280 y 600 nm de modo tal de tener suficiente sensibilidad, pero ausencia de posibles interferencias provenientes de otros componentes de la suspensión. Como testigo se emplean diluciones de la suspensión madre de liposomas en el mismo medio acuoso de la preparación, con las cuales se obtiene la curva de calibración "absorbancia vs. concentración de fosfolípidos (mg/ml)" a la longitud de onda seleccionada. La magnitud de la dilución para la suspensión empleada como testigo es variable, dependiendo del tamaño de los liposomas y de la concentración inicial de lípidos. Las muestras se preparan de igual manera, realizando diluciones cuya absorbancia caiga dentro del rango de la curva de calibración.

3.3.3. Determinación de HPTS por espectrofluorimetría

3.3.3.1. PRINCIPIO - APLICACIONES

La Fig.23 muestra la estructura química de la HPTS, una molécula fluorescente con un grupo OH ionizable. La emisión de luz de esta molécula depende, entre otros factores, de

su concentración, del pH, de la longitud de onda de excitación y de la presencia en el medio de quenchers específicos. Como se ve en la Fig.24, el espectro de excitación de esta molécula depende del pH, presentando dos máximos locales (454 y 403 nm) y un punto isobéptico (417 ± 1 nm) en el cual los espectros se interceptan y la fluorescencia resulta independiente del pH. El máximo del espectro a 454 nm disminuye su intensidad a medida que el pH decrece, mientras que la intensidad del máximo a 403 nm aumenta al acidificar el medio.

La concentración de HPTS en las muestras de liposomas fue determinada mediante su emisión fluorescente utilizando soluciones estándar y excitando la molécula a 454 nm (máximo de emisión a pH neutro) o a 417 nm (punto isobéptico). En ambos casos debe asegurarse en primer lugar, que los liposomas no interfieran en la medida, ya sea solubilizándolos adecuadamente antes de la medición (ver apartado 3.5.5.), o bien diluyendo las muestras de manera que la dispersión de la luz causada por las estas vesículas no sea apreciable frente a la emisión de la HPTS.

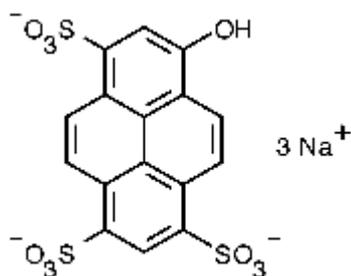


Fig.23: Estructura química de la HPTS (piranina).

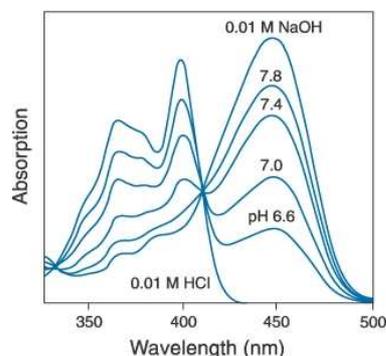


Fig.24: Espectros de excitación de la HPTS en solución (extraídos del Catálogo de Molecular Probes).

Debido al efecto del pH sobre la emisión, la cuantificación realizada excitando a 454 nm se llevó a cabo manteniendo un pH de 7,4 en todas las muestras y patrones mediante un buffer de concentración elevada (buffer T100). Este ensayo se empleó para la determinación del volumen acuoso incorporado en liposomas (apartado 3.5.1).

Cuando se utiliza la longitud de onda del punto isobéptico para la excitación de la sonda (417 nm), la sensibilidad de la lectura es algo menor que en el caso anterior y está algo más afectada por la dispersión de la luz que pueda tener lugar, ya que ésta aumenta al disminuir la longitud de onda. Sin embargo presenta la ventaja de ser independiente del pH. Es por este motivo que, combinada con un quencher, se empleó para evaluar la pérdida de HPTS contenida en liposomas durante la digestión *in vitro* o bien en presencia de concentraciones crecientes de extracto de bilis, y también para determinar la permeabilidad de las bicapas. En todos los casos se obtuvo una medida relativa de la cantidad de HPTS contenida en el interior de los liposomas.

3.3.3.2. CUANTIFICACIÓN A PH 7,4 POR EXCITACIÓN A 454 NM

Reactivos

- Buffer T10.
- Buffer T100.
- Solución Stock de HPTS 200 mM en buffer T10.
- Solución de calibración HPTS 500 μM , diluida en buffer T10, a partir de solución Stock HPTS 200 mM.
- Soluciones para solubilización de liposomas: AA 0,1 M con el agregado de Triton X-100 en concentraciones variables (Soluciones AA-TX2, AA-TX10 y AA-TX30, descritas en el apartado 3.1.5.).

Procedimiento

Se prepara una curva de calibración a partir de la solución HPTS 500 μM , diluyendo con buffer T100 hasta concentraciones entre 0,5 y 10 μM . Se preparan soluciones de las muestras de liposomas mediante el protocolo de solubilización correspondiente (ver 3.3.4.2.) empleando el buffer T100-TX adecuado para cada composición. La dilución de las muestras se realiza estimando su concentración, para que la lectura de fluorescencia se encuentre dentro del rango de la curva de calibración. Se lee la fluorescencia de la curva de calibración y de las muestras procesadas mediante un espectrofluorímetro en las siguientes condiciones:

- Temperatura de la cubeta: 25°C
- Longitud de onda de excitación: 454 nm
- Longitud de onda de emisión: 511 nm
- Voltaje de la muestra: 400 V
- Paso óptico: 1 cm

Se obtiene una curva de regresión "Fluorescencia 454 nm vs. concentración HPTS (μM)" y se interpolan en ella los valores obtenidos para la fluorescencia de las muestras.

3.3.3.3. CUANTIFICACIÓN POR EXCITACIÓN EN EL PUNTO ISOSBÉTICO (417 NM)

Reactivos

- Solución de DPX 200 mM.

Procedimiento

Una alícuota de la suspensión de liposomas conteniendo HPTS fue diluida hasta una concentración máxima de 0,5 mg/ml de lípido para evitar la interferencia causada por la dispersión de la luz. Se transfirió un volumen 3 ml de esta dilución a la cubeta del espectrofluorímetro y se dejó equilibrar entre 2 y 5 minutos a 37°C con agitación. Se leyó la fluorescencia en el espectrofluorímetro durante aproximadamente 2 minutos con las siguientes condiciones instrumentales:

- Excitación: 417 nm.
- Longitud de onda de emisión: 511 nm.
- Voltaje de la muestra: 500 V.
- Paso óptico: 1 cm.

A continuación se agregaron 150 μl de la solución de DPX y se determinó el nuevo valor de fluorescencia una vez que se obtuvo un valor estable. El cociente entre la

fluorescencia en presencia de DPX (corregida por la dilución) y la existente sin el quencher, indica la cantidad relativa de sonda en el interior de los liposomas o *% Encapsulación*:

$$\% Enc = \left(\frac{F_{DPX}^{HPTS}}{F^{HPTS}} \right) * 100$$

ecuación en la que:

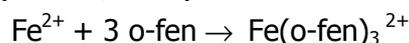
F_{DPX}^{HPTS} indica la fluorescencia de la muestra de liposomas conteniendo HPTS, y
 F^{HPTS} indica la fluorescencia de la muestra de liposomas conteniendo HPTS tras el agregado de DPX y corregida por la dilución efectuada.

En los casos en que se realizaron estudios cinéticos, se tomaron lecturas de la fluorescencia en presencia de DPX en los intervalos de tiempo convenientes y se calculó el % fluorescencia respecto al valor inicial.

3.3.4. Cuantificación de hierro mediante reacción con o-fenantrolina

3.3.4.1. PRINCIPIO

La reacción entre el hierro ferroso y la 1,10-fenantrolina (o-fen) para formar un complejo ha sido largamente empleada como un método sensible para la determinación espectrofotométrica de hierro (Sandell, 1959):



La absorptividad molar del complejo a 508 nm es 11,10 M⁻¹cm⁻¹. El hierro debe encontrarse en estado ferroso, por lo tanto es necesario agregar un agente reductor antes del desarrollo del color para asegurar que todo el hierro presente en la muestra se encuentre como Fe²⁺.

Para determinar la concentración de hierro en suspensiones de liposomas, éstas deben ser solubilizadas adecuadamente, para evitar la dispersión de la luz debida a las vesículas. Con este objetivo, se emplearon dos métodos basados en la reacción del hierro con la o-fen que difieren principalmente en la preparación de la muestra. A continuación se hace una breve descripción de los mismos.

3.3.4.2. SOLUBILIZACIÓN CON TRITON X-100

Reactivos

- Ácido ascórbico (AA) 0,1 M.
- Soluciones de solubilización (una para cada tipo de liposoma): AA 0,1 M con el agregado de Triton X-100 en concentraciones variables (Soluciones AA-TX2, AA-TX10 y AA-TX30, descritas en el apartado 3.1.5.).
- Solución de calibración: sulfato ferroso 2,4 mM en AA 0,1 M.
- Solución al 2% p/v de 1,10-fenantrolina en etanol 96%.

Procedimiento

Se solubilizaron alícuotas de liposomas con volúmenes entre 10 (liposomas purificados por SEC) y 150 μl (siembras de cultivos celulares) empleando soluciones AA 0,1 M con el agregado de Triton X-100 en las condiciones (tiempo y temperatura) halladas para cada tipo de liposoma, según se describe en el apartado 4.3.1. (Resultados). El volumen máximo para las alícuotas a pH 7,4, como las correspondientes a las siembras de los cultivos celulares, se fijó teniendo en cuenta que el pH del medio de incubación se mantuviera en 3,0, verificándose que el aumento del mismo llevaba a absorbancias menores a lo esperado.

Teniendo en cuenta que el volumen final fue de 1 ml, se estimó el volumen de muestra de modo tal que la concentración final de hierro estuviera dentro del rango de la curva de calibración. Se preparó una curva de calibración a partir de la solución de sulfato ferroso 2,4 mM, diluyendo con AA 0,1 M hasta concentraciones entre 12 y 48 μM . En el apartado 4.1.5. (Resultados) se estudiará el efecto de posibles interferencias en la curva de calibración. Se agregó a cada tubo, muestras y puntos de la curva de calibración, una alícuota de 10 μl de 1,10-fenantrolina 2% p/v, se agitó y se midió la absorbancia a 508 nm en un intervalo entre 15 y 120 minutos después. Se obtuvo la curva de regresión "Absorbancia a 508 nm vs. concentración de Fe^{2+} (μM)" y se interpolaron en ella los valores obtenidos para las muestras.

3.3.4.3. MÉTODO DE LA MEZCLA MONOFÁSICA

Es una modificación del método de Bligh-Dyer (New, 1990), empleado como una alternativa rápida al método de solubilización con Triton X-100. Consiste en solubilizar una alícuota de la suspensión de liposomas en una mezcla ácido ascórbico/cloroformo/metanol que por sus concentraciones relativas, resulta monofásica. Luego se agrega a la mezcla ácido ascórbico y cloroformo, separándose dos fases: la inferior (clorofórmica) que contiene los lípidos solubilizados y la superior (acuosa) que contiene el hierro en solución. El método requiere que la curva de calibración sea preparada en la mezcla monofásica y procesada del mismo modo que las muestras a analizar, para compensar cualquier posible pérdida de hierro durante el proceso de separación de fases.

Reactivos

- Mezcla monofásica: AA 0,1 M/cloroformo/metanol 10:10:21 v/v/v. Esta solución debe ser preparada en el día del ensayo.
- Solución de calibración: sulfato ferroso 2,4 mM en AA 0,1 M.
- Solución al 2% p/v de 1,10-fenantrolina en etanol 96%.

Procedimiento

Los liposomas se solubilizaron en 2 ml de la mezcla monofásica estimando las alícuotas de modo tal que la concentración de hierro estuviera comprendida en el rango de la curva de calibración. El volumen máximo de muestra añadido fue de 50 μl . Se preparó una curva de calibración a partir de la solución de sulfato ferroso 2,4 mM, diluyendo con la mezcla monofásica hasta concentraciones finales entre 12 y 48 μM . Se agregó a cada tubo 0,5 ml de ácido ascórbico 0,1 M y 0,5 ml de cloroformo. Se agitó y dejó en reposo hasta la separación de las fases. A 1 ml de la fase acuosa (superior) se agregó una alícuota de 10 μl de la solución de

1,10-fenantrolina y se midió la absorbancia a 508 nm en un intervalo entre 15 y 120 minutos después. Se obtuvo la curva de regresión "Absorbancia a 508 nm vs. concentración de Fe^{2+} (μM)" y se interpolaron en ella los valores obtenidos para las muestras.

3.3.5. Cuantificación de hierro en extractos celulares mediante absorción atómica en horno de grafito

La determinación de hierro por absorción atómica en horno de grafito se realizó en el Servicio de Análisis Químicos de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB). Se eligió esta metodología para la determinación de hierro en extractos de cultivos celulares por las siguientes razones:

- Permite el análisis de suspensiones conteniendo materia orgánica, sin necesidad de digestiones ácidas.
- Tiene una elevada sensibilidad, adecuada para los bajos niveles de hierro absorbidos por las células Caco-2.
- No requiere el empleo de sustancias radiactivas, como por ejemplo sales de ^{59}Fe .

A continuación se hará un breve resumen de la metodología.

3.3.5.1. PRINCIPIO

La espectrofotometría de absorción atómica se basa en la generación de átomos libres en fase gaseosa del elemento a analizar, que sean capaces de absorber la luz emitida por la fuente de radiación utilizada. Normalmente se emplea como fuente una lámpara de cátodo hueco o una lámpara de descarga sin electrodos. En espectrofotometría de absorción atómica de horno de grafito estos átomos se generan a partir de la introducción de la muestra en el horno (normalmente en fase líquida) y el posterior calentamiento de éste en diferentes etapas: la desolvatación, la pirólisis (eliminación de la mayor parte posible de la matriz de la muestra), hasta llegar a la etapa de atomización. En esta etapa el horno es calentado de manera muy rápida desde la temperatura a la que se ha pirolizado la muestra hasta la temperatura de atomización, que es característica de cada elemento, de manera tal de generar el mayor número posible de átomos del analito en fase gaseosa y en el estado fundamental. Las principales ventajas de la metodología basada en la atomización en horno de grafito respecto a la atomización producida en una llama son los mejores límites de detección que pueden obtenerse (según el elemento, pueden determinarse concentraciones del orden de los $\mu\text{g/l}$) y el volumen pequeño de muestra necesario para realizar el análisis (del orden de los microlitros). La desventaja de esta metodología respecto a la llama es su complejidad técnica y el tiempo requerido para el análisis de una muestra.

3.3.5.2. REACTIVOS

- Ácido nítrico 0,2% v/v en agua MilliQ.
- Solución stock de cloruro férrico 1.000 ppm ($\mu\text{g/ml}$) en ácido nítrico 3 % v/v.

3.3.5.3. PROCEDIMIENTO

Las muestras de extractos celulares fueron preparadas según lo descrito en el apartado 3.4.8.3. Luego del tratamiento con ultrasonido se obtuvieron suspensiones homogéneas que fueron diluidas adecuadamente en ácido nítrico 0,2% v/v. En función de la concentración de hierro estimada para las muestras, se inyectaron en el espectrómetro alícuotas entre 5 y 20 μl por duplicado. Se preparó una curva de calibración mediante la dilución de la solución stock de cloruro férrico 1.000 ppm en ácido nítrico 0,2% v/v para obtener concentraciones de hierro entre 25 y 100 ppm. La recuperación obtenida en la adición de patrón realizada sobre una muestra representativa indicó la ausencia de efecto de matriz en la determinación, por lo que la determinación se hizo mediante calibración externa.

3.3.6. Determinación del grado de oxidación del hierro mediante espectrometría Mössbauer

La determinación de la relación $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ por espectrometría Mössbauer se realizó en el Instituto de Ciencias de Materiales de Barcelona (ICMAB-CSIC). Esta relación fue empleada como indicador del grado de oxidación del hierro en muestras de liposomas y en soluciones de sulfato ferroso estabilizado con ácido ascórbico (FeAA) en relación 1:2 molar respectivamente (FeAA 1:2) ó 1:5 molar respectivamente (FeAA 1:5), antes y después de la digestión *in vitro*. Los valores obtenidos para liposomas sin digerir se emplearon como controles de la estabilidad del hierro liposomado frente al proceso de obtención de la suspensión. Los valores correspondientes a liposomas o soluciones FeAA digeridas muestran además la oxidación debida al proceso de digestión *in vitro*.

3.3.6.1. PRINCIPIO

La espectroscopía Mössbauer se fundamenta en la emisión y absorción nuclear resonante sin retroceso de fotones gama. Es una técnica extraordinariamente útil para el estudio de aspectos relacionados con la estructura electrónica de los sólidos como por ejemplo el enlace químico o el magnetismo, porque permite detectar variaciones de energía en los niveles nucleares provocados por el acoplamiento electromagnético entre la carga del núcleo y las cargas electrónicas que lo rodean. Por medio de la espectroscopía Mössbauer se obtiene el espectro de energías de los núcleos de un determinado isótopo en un material sólido. Se envían hacia la muestra rayos gamma modulados en energía y se registra la intensidad de radiación gamma transmitida en función de su energía.

A efectos prácticos, sólo ha sido posible aplicar la espectroscopía Mössbauer a muy pocos tipos de núcleos. La mayoría de equipos que se encuentran actualmente en funcionamiento se centran en el estudio de los núcleos de Fe, que además de ser un elemento fundamental como componente de materiales con aplicaciones magnéticas y estructurales, también tiene una gran importancia en muchas moléculas biológicas. El hierro tiene cuatro isótopos estables naturales: ^{54}Fe , ^{56}Fe (91,7%, el más abundante), ^{57}Fe (2,2%) y ^{58}Fe . De todos ellos, el ^{57}Fe es el único con espín ($-\frac{1}{2}$), que lo convierte en el núcleo excitable en este tipo de espectroscopía. La fuente de emisión de radiación contiene ^{57}Co , isótopo padre del ^{57}Fe , al que decae en aproximadamente el 90% de los casos, pasando al

estado excitado nuclear del ^{57}Fe ($s=+3/2$). Éste a su vez decae al estado fundamental ($s=+1/2$) produciendo una radiación gamma de 14,4 keV. Estos fotones pueden entonces ser absorbidos por el ^{57}Fe de la muestra. La relativamente baja abundancia del isótopo ^{57}Fe es el factor limitante de la sensibilidad de esta metodología.

Las aplicaciones en el área de la química son: información sobre los estados de oxidación y espín, la influencia de la electronegatividad de otros tipos de átomos coordinados con el Fe así como de las geometrías de las moléculas que contienen átomos de Fe.

3.3.6.2. EQUIPAMIENTO

Las mediciones se realizaron en un espectrómetro, construido en el ICMAB, de aceleración constante y con una fuente de $^{57}\text{Co/Rh}$, inicialmente con una actividad de 10 mCi. La fuente se mueve mediante un transductor siguiendo una función de velocidad triangular y la radiación gamma se detecta con un detector proporcional de gas, pasando por un discriminador y finalmente por un analizador multicanal de 512 canales. La calibración del sistema se realiza utilizando una lámina de hierro metálico de 25 μm de espesor. Los parámetros espectrales están dados en relación a este estándar a temperatura ambiente.

3.3.6.3. PROCEDIMIENTO PARA LIPOSOMAS CON FEAA

Los liposomas conteniendo FeAA (a una concentración de hierro de 0,24 M) fueron preparados según lo descrito en el apartado 3.4.1. y separados del FeAA no liposomado mediante cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 (ver apartado 3.4.5), empleando como eluyente ácido clorhídrico acuoso a pH 2, con el objeto de evitar la oxidación del Fe^{2+} . Los liposomas eluidos fueron ultracentrifugados según lo descrito en el apartado 3.4.6., para concentrar el hierro encapsulado hasta un valor detectable por el espectrómetro. Luego de separar el sobrenadante, se homogeneizó el pellet con una varilla y se llenó un portamuestras de aluminio libre de hierro de 6 mm de espesor (aproximadamente 1,2 ml de capacidad). Las muestras resultantes, correspondientes a liposomas sin digerir, se congelaron inmediatamente con N_2 líquido y se conservaron a -80°C hasta su análisis.

Las muestras de liposomas digeridos se obtuvieron separando por SEC según lo descrito, sometiendo la fracción de liposomas a la digestión *in vitro* (ver apartado 3.4.7.) y ultracentrifugando esta vez los liposomas digeridos. A partir de la centrifugación, se procedió según lo descrito para liposomas sin digerir.

Las muestras fueron analizadas a una temperatura de 80K, empleando un tiempo de adquisición variable según la concentración total de hierro (mínimo 24 horas). Para cada muestra se obtuvo el desplazamiento isomérico (δFe) respecto al hierro metálico, el desdoblamiento cuadrupolar (ΔE_q) y el ancho total de banda a media altura (Γ). Estos parámetros obtenidos a partir del ajuste de los valores experimentales del espectro Mössbauer, se analizaron para verificar que hubiera consistencia en los datos correspondientes a muestras similares. Además se calculó la fracción de cada sub-espectro, expresándose como porcentaje del área total. Cada sub-espectro corresponde a una especie de hierro, según su grado de oxidación y su entorno químico, y se indica como "site de

hierro". En la Fig.25 se muestra el proceso de integración de cada sub-espectro correspondiente a un site de hierro.

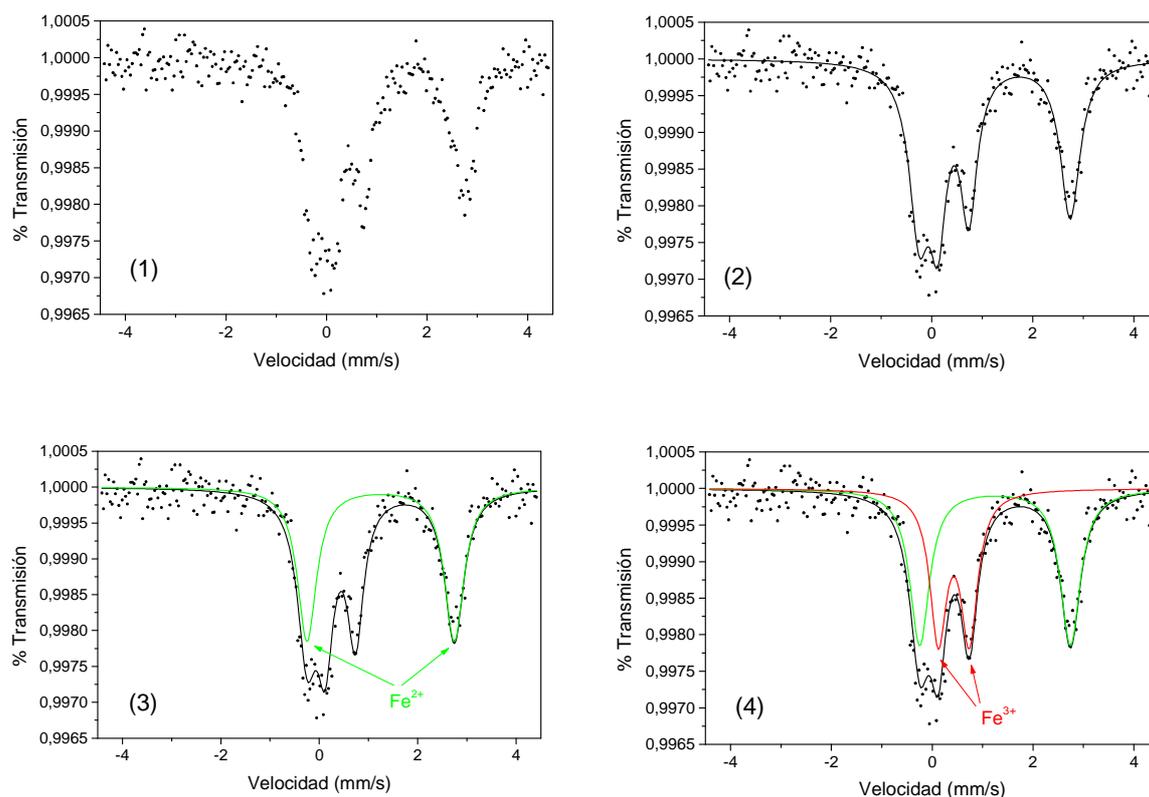


Fig.25: Proceso de integración de un espectro Mössbauer obtenido para una solución FeAA 24 mM. (1) Adquisición de lecturas de % transmisión, (2) cálculo de la envolvente global correspondiente a Fe^{2+} y Fe^{3+} , (3) cálculo de la envolvente del sub-espectro para Fe^{2+} y (4) cálculo de la envolvente del sub-espectro para Fe^{3+} .

3.3.6.4. PROCEDIMIENTO PARA SOLUCIONES CON FEAA

La digestión *in vitro* de soluciones de FeAA 1:2 se realizó para evaluar el grado de protección de los liposomas a la oxidación del Fe^{2+} incorporado respecto al hierro en solución. Como se ha visto en el apartado 3.3.6 (a), en el caso de los liposomas es necesario ultracentrifugar la muestra para, al sedimentar las vesículas, concentrar el hierro encapsulado y obtener una señal detectable en el espectrómetro Mössbauer. En el caso de las soluciones de FeAA, este proceso no es viable, ya que no se podría sedimentarse el hierro soluble. Por este motivo, se preparó una curva de calibración realizando la digestión *in vitro* de soluciones de FeAA 1:2 conteniendo 12, 24, 48 y 96 mM de hierro. El valor equivalente al FeAA encapsulado, alrededor de 2 mM, se estimó mediante extrapolación.

Las soluciones fueron digeridas según lo descrito en 3.4.7, enfriadas a 4°C para la inactivación de las enzimas y congeladas inmediatamente a -80°C en portamuestras de 6 mm de espesor hasta su análisis. Las soluciones digeridas se analizaron según lo descrito para liposomas, con tiempos variables de análisis según la concentración de hierro (hasta 96 horas para las muestras más diluidas).

3.3.7. Determinación del contenido de extracto de bilis (EB) por

espectrofotometría UV-visible

Esta determinación fue empleada como método rápido para cuantificar el porcentaje de elución del extracto de bilis (EB) por cromatografía de exclusión molecular, y evaluar la eficiencia de la separación con respecto a la fracción conteniendo los liposomas. Si bien no se trata de un método específico para este analito, permite su cuantificación en una matriz libre de interferencias.

3.3.7.1. PRINCIPIO

Se basa en la determinación de la absorbancia a 412 nm, correspondiente al máximo del espectro de una solución acuosa del extracto de bilis porcino. La cuantificación se realiza por comparación con soluciones del mismo extracto de concentración conocida. El espectro de absorbancia y el rango lineal para esta determinación se muestran en el apartado 4.1.3. (Resultados). Es indispensable que las muestras a analizar no contengan liposomas para evitar interferencias en la determinación por dispersión de la luz.

3.3.7.2. PROCEDIMIENTO

Se preparó una solución de extracto biliar porcino a una concentración de 10 mg/ml en NaHCO_3 0,1 N, a partir del cual se prepararon diluciones para obtener una curva de calibración a 412 nm. Las muestras analizadas fueron fracciones de sales biliares eluidas por SEC en Bio-Gel A-15m, libres de liposomas, obtenidas según lo descrito en el apartado 3.4.5.2. para la separación de liposomas del medio de digestión. Finalmente se obtuvo la curva de regresión "Absorbancia 412 nm vs. concentración EB (mg/ml)" y se interpolaron en la misma los valores de absorbancia obtenidos para las fracciones.

3.3.8. Determinación del contenido de sales biliares en extracto de bilis mediante electroforesis capilar (CE).

La determinación de la composición del extracto de bilis mediante electroforesis capilar se realizó en la Cátedra de Química Analítica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Esta caracterización se empleó para la interpretación de los resultados obtenidos en los estudios de solubilización con extracto de bilis (apartado 4.3.2. Resultados).

3.3.8.1. PRINCIPIO

La electroforesis capilar (CE) es una nanotécnica en la cual la separación de los compuestos se obtiene por migración diferencial de los mismos al aplicar un campo eléctrico en un capilar con solución de electrolito.

La CE se lleva a cabo en capilares de sílica fundida cuyos diámetros internos pueden ser de 25 a 75 μm y longitud de 30 a 100 cm. Las separaciones de los analitos tienen lugar debido a sus diferentes movilidades electroforéticas y al flujo electrosmótico (EOF) que se

produce al aplicar elevados voltaje. La selectividad está determinada por parámetros analíticos como la naturaleza del electrolito de corrida, la fuerza iónica y el pH.

El diseño básico de un equipo de CE consta de los siguientes componentes:

- Capilar de sílica fundida que posee un recubrimiento de poliimida que lo hace resistente.
- Fuente de poder: suministra el voltaje necesario (0-30kV).
- Reservorios: en los cuales se coloca el electrolito.
- Electrodo de platino.
- Introducción de la muestra: se efectúa por distintos modos como hidrostática, por vacío, por presión positiva o electrocinética. Generalmente tienen sistema automáticos (autosamplers) que permiten la inyección de volúmenes tan pequeños como nanolitros.
- Sistema de detección: la celda es el propio capilar, el cual en ese tramo, pierde el recubrimiento de poliimida. El sistema puede acoplarse a distintos detectores, como UV-visible, fluorescencia, espectrómetro de masa, etc.
- Temperatura: control de temperatura de trabajo de 10 a 60° C.

Existen numerosas ventajas de la CE sobre los métodos separativos tradicionales, como por ejemplo la HPLC. En primer lugar se requieren tiempos de análisis muy cortos (entre segundos y unos pocos minutos) con una resolución mucho mayor, llegando en algunos casos a más de un millón de platos teóricos. Pueden analizarse muestras con analitos de muy diferente peso molecular (desde pequeños iones hasta macromoléculas) y con diferentes propiedades fisico-químicas. En este sentido, su gran versatilidad puede lograrse modificando las condiciones de la corrida y/o empleando aditivos como solventes orgánicos, agentes quirales o agentes micelares, que son agregados al electrolito para modificar la selectividad. Por lo tanto no hay necesidad de contar con una batería de columnas analíticas. Otra ventaja es el bajo costo de las determinaciones, principalmente por el empleo de pequeños volúmenes de electrolito, pequeñas cantidades de reactivos, aditivos, etc. Además, al usar prácticamente sistemas acuosos o con muy bajos porcentajes de solventes orgánicos, se disminuye el costo que ocasiona la disposición de grandes volúmenes de metanol o acetonitrilo, como ocurre en la cromatografía líquida.

Tradicionalmente esta técnica se empleó para separar iones inorgánicos (Timerbaev, 2004), o moléculas orgánicas cargadas, como por ejemplo péptidos o proteínas (Bandilla y Skinner, 2004). La CE se difundió enormemente debido al proyecto "Genoma Humano", que ha dado lugar a una disciplina conocida como "genomics", en el cual ha sido la herramienta principal para la secuenciación de fragmentos de ADN (Zubritsky, 2002 ; Slater et al., 2003). También se está empleando para una disciplina post-genómica conocida como "proteomics", que consiste en la detección e identificación de proteínas de un material biológico u organismo (Cooper et al., 2004).

La limitación principal de esta técnica era que los analitos debían poseer carga, lo cual excluía muchas sustancias de interés, en especial algunas moléculas con actividad terapéutica, que eran analizadas por métodos cromatográficos. La cromatografía micelar electrocinética (MEKC) es un modo de la CE que permite separar sustancias neutras. Consiste en agregar un surfactante al buffer o electrolito de corrida a una concentración tal que forme micelas. De esta manera, moléculas neutras que no podían diferenciarse por su relación carga/masa, pueden separarse según su interacción con las micelas, que depende

de su estructura química. Se forma así una pseudo-fase estacionaria, con la cual cada molécula establece un equilibrio caracterizado por una constante de partición entre la fase micelar y la fase móvil. En algunos casos y en especial para mezclas complejas de sustancias, es necesario incorporar a la solución otras fases pseudo-estacionarias, como por ejemplo las ciclodextrinas. Estos son polisacáridos cíclicos que establecen interacciones hidrofóbicas con sustancias neutras. En este caso se habla de un método micelar electrocinético modificado por ciclodextrinas (MEKC-CD).

La composición de sales o ácidos biliares de un extracto puede determinarse por diferentes métodos analíticos. La cromatografía gaseosa, en especial acoplada a un detector de masa (GC-MS) tiene una gran especificidad y sensibilidad, pero es muy laboriosa ya que la muestra requiere un fraccionamiento, eliminar su conjugación, y ser derivatizada antes de la cromatografía. Por lo tanto su empleo ha quedado restringido exclusivamente al análisis de biliares en fluidos biológicos. El análisis también puede realizarse por cromatografía líquida de alta presión, preferentemente con detección de masa (HPLC-MS) o bien con detección UV o detector de fluorescencia, pero realizando una derivatización pre o post columna.

Teniendo en cuenta las ventajas comparativas de la CE respecto a otros sistemas separativos, se empleó la CE en su modalidad MEKC con detección UV para la cuantificación de ácidos biliares en el extracto de bilis porcina. En este caso, los ácidos biliares son componentes mayoritarios del extracto, por lo tanto no es necesario contar con un sistema de detección con mayor sensibilidad.

3.3.8.2. REACTIVOS

- Buffer: borato de sodio 10 mM, fosfato monosódico 10 mM ajustado a pH 7,0 con ácido fosfórico.
- Electrolito: SDS 50 mM en buffer borato-fosfato pH 7,0 con el agregado de beta-ciclodextrina (β -CD) 5 mM, hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HP- β -CD) 5 mM y acetonitrilo al 10%.
- Estándares de ácidos biliares SIGMA: cólico, quenodesoxicólico, desoxicólico, ursodesoxicólico y litocólico, tanto libres como conjugados con glicina y taurina, y ácido hiodesoxicólico.

3.3.8.3. PROCEDIMIENTO

La separación se realizó con un equipo de CE Capillary Ion Analyzer (Waters, Milford, MA, USA) en un capilar de sílica fundida sin cobertura de 60 cm de longitud y 75 μ m de diámetro interno (Waters). Se empleó un sistema electrocinético micelar modificado con ciclodextrinas (CD-MEKC), empleando las siguientes condiciones: inyección hidrostática durante 18 s, voltaje de 25 kV, temperatura de 30°C y detección UV a 185 nm (lámpara de mercurio).

Como solución estándar se empleó una mezcla de 10 ácidos biliares a una concentración de 2 mg/ml cada uno en metanol. A partir de esta solución stock, se realizaron diluciones entre 0,5 y 53 μ M en una solución conteniendo borato de sodio 1 mM, fosfato

monosódico 1 mM y un 20% de metanol. La muestra fue disuelta en metanol y luego se realizó una dilución en buffer.

3.3.9. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

3.3.9.1. PRINCIPIO - APLICACIONES

Se basa en la reacción de las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). Luego el cobre cataliza la oxidación de aminoácidos aromáticos que provoca la reducción del ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico (reactivo de Folin-Ciocalteu). Como resultado de la reducción del reactivo se forma un compuesto de molibdeno color azul intenso con una absorbancia máxima a 750 nm (Lowry et al., 1951). Este método es más sensible que el Biuret y es uno de los más comúnmente empleados. Como desventajas puede mencionarse su gran dependencia del pH (debe mantenerse entre 10 y 10,5), la cantidad elevada de sustancias que interfieren en la determinación (buffers, detergentes, aminoácidos, algunos lípidos, azúcares, etc) y el rango acotado de linealidad de la curva de calibración.

Esta determinación se empleó para la determinación del porcentaje de elución de enzimas digestivas luego de la separación de liposomas por SEC en Biogel A-15m. También intentó emplearse como método de cuantificación de proteínas en extractos celulares pero fue descartado por su elevada sensibilidad a interferencias como el Triton X-100 al 2% p/v empleado en la solubilización de las monocapas celulares.

3.3.9.2. REACTIVOS

- Soluciones Stock: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1% p/v (A), tartrato de sodio y potasio 2% p/v (B), hidróxido de sodio 0,2 M (C), carbonato de sodio 4% p/v (D).
- Reactivo de trabajo (WR): mezclar 49 ml de C y 49ml de D y agregar 1 ml de A, seguido de 1 ml de B. Este reactivo debe prepararse en el momento.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1:1 v/v en agua.
- Solución de calibración de albúmina sérica bovina (BSA) 2 mg/ml en agua.

3.3.9.3. PROCEDIMIENTO

Se preparó una curva de calibración diluyendo alícuotas de la solución de BSA 2 mg/ml hasta concentraciones entre 0,1 y 1 mg/ml, llevando a un volumen final de 500 μl . Las muestras fueron obtenidas según lo descrito en el apartado 3.4.4. y se tomaron alícuotas menores o iguales a 500 μl .

A cada tubo conteniendo muestra o estándar se agregaron 2,5 ml del WR y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregó 0,25 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu diluido. Se mezcló e incubó durante 60 minutos a temperatura ambiente para el desarrollo de color. Finalmente se determinó la absorbancia a 750 nm y se obtuvo una curva de regresión "Absorbancia 750 nm vs. concentración de BSA ($\mu\text{g/ml}$)" en la cual se interpolaron los valores de absorbancia correspondientes a las muestras.

3.3.10. Cuantificación de proteínas por el micrométodo del ácido bicinconínico (BCA)

3.3.10.1. PRINCIPIO - APLICACIONES

Se basa en la reducción de Cu^{2+} a Cu^{1+} por los enlaces peptídicos de proteínas en medio alcalino. El Cu^{1+} formado es detectado por el ácido bicinconínico (BCA), que forma un complejo púrpura con un máximo de absorción a 562 nm (Smith et al., 1985). El micrométodo desarrollado para esta reacción es altamente sensible, llegando a detectarse concentraciones de hasta 0,5 μg de proteína por ml. En general se ha visto que el método BCA es más tolerante que el Lowry en cuanto a la concentración de posibles interferencias, como por ejemplo las causadas por los tensioactivos que normalmente son empleados para la solubilización de las proteínas, como por ejemplo el Triton X-100.

En este trabajo se eligió el micro BCA para determinar el contenido de proteínas de los extractos celulares provenientes de cultivos de Caco-2, debido a que resultó muy poco sensible a las interferencias de la matriz, como se muestra en el apartado 4.1.5 (Resultados).

3.3.10.2. REACTIVOS

- Reactivo de trabajo (WR): 25 ml de reactivo A, 24 ml de reactivo B y 1 ml de reactivo C (Micro BCA, Pierce).
- Solución stock de albúmina sérica bovina (BSA) 2 mg/ml en agua.

3.3.10.3. PROCEDIMIENTO

Se preparó una curva de calibración en el rango 2 y 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a partir de la solución stock de BSA 2 mg/ml diluyendo con agua hasta un volumen final de 500 μl . Las muestras fueron preparadas según lo descrito para la obtención de extractos celulares (ver apartado 3.4.8.3.2.). Se tomó una alícuota tal que el valor de absorbancia previsto estuviera dentro del rango de la curva de calibración (generalmente de 2 μl) y se llevó a un volumen final de 500 μl . Se agregó a cada tubo 500 μl del WR y se incubó durante 60 minutos a 60°C. Luego de llevar a temperatura ambiente, se determinó la absorbancia a 562 nm. Se obtuvo una curva de regresión "Absorbancia 562 nm vs. concentración de BSA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)" donde se interpolaron los valores correspondientes a las muestras.

3.3.11. Cuantificación de quitosano en liposomas

Esta determinación se empleó para cuantificar el quitosano asociado a liposomas antes y después de procesos separativos.

3.3.11.1. PRINCIPIO

El quitosano es un efectivo adsorbente para colorantes. A pH ácido, los grupos amino protonados del quitosano actúan como sitios aceptores para los grupos aniónicos de ciertas sustancias, como el Cibacrom Brilliant Red 3B-A (CBR 3B-A). La formación de un complejo

entre el quitosano y el CBR 3B-A provoca un desplazamiento batocrómico del máximo de absorbancia del colorante en solución acuosa, obteniéndose un pico con absorbancia máxima a 569 nm, cuya absorbancia es proporcional a la concentración de quitosano en un rango determinado de concentraciones (Muzzarelli, 1998). Para la determinación de quitosano en liposomas, se empleó una modificación del método que consistió en el agregado de Triton X-100 para la solubilización de las bicapas. La evaluación de interferencias para este método se muestra en el apartado 4.1.6. (Resultados).

3.3.11.2. REACTIVOS

- Solución A (calibración): disolver 0,5 g quitosano en 50 ml de agua con 0,5 ml de ácido láctico. Llevar a 100 ml con agua destilada. Diluir con agua hasta una concentración de quitosano de 0,5 mg/ml.
- Solución B: 150 mg Cibacrom Brilliant Red 3B-A en 100 ml de agua destilada. Tomar 5 ml y llevar a 100 ml con Solución C.
- Solución C: buffer glicina-HCl 0,1 M pH 3,2.
- Solución TX-30: solución acuosa de Triton X-100 30 mg/ml (para solubilización de liposomas).

3.3.11.3. PROCEDIMIENTO

Se colocaron 370 μ l de solución TX-30 en tubos de 10 ml con tapa. Para la obtención de la curva de calibración, se agregaron alícuotas de solución A de modo tal de obtener concentraciones finales de quitosano entre 3 y 30 μ g/ml. Las alícuotas de muestra agregadas se calcularon estimando el contenido de quitosano, para obtener lecturas en el rango de la curva de calibración. El volumen máximo agregado para la solución A y las muestras fue de 250 μ l. El volumen se completó a 0,8 ml con solución C. Se calentaron los tubos durante 30 minutos a 55°C, para completar la solubilización de los liposomas. Se agregaron 3,2 ml de solución B, se agitó con vórtex y se determinó la absorbancia a 569 nm dentro de los 30 minutos siguientes (pasado ese tiempo la absorbancia aumenta por la aparición de un sólido en suspensión, que finalmente precipita). Se obtuvo una curva de regresión "Absorbancia 569 nm vs. concentración de quitosano (μ g/ml)" donde se interpolaron los valores correspondientes a las muestras.

3.3.12. Determinación de la viscosidad cinemática de soluciones de quitosano

3.3.12.1. ANTECEDENTES

Según lo expuesto en la Introducción (apartado 1.4.2.), el grado de mucoadhesividad del quitosano está relacionado, entre otros factores, con su peso molecular. Por otro lado, existen antecedentes que indican que el quitosano "grado práctico" (SIGMA) empleado en el presente trabajo tendría buenas propiedades mucoadhesivas, según lo determinado *in vitro* con mucosa intestinal porcina (Lehr et al., 1992). Por lo tanto se empleó este producto, cuyo

peso molecular está entre 190.000 y 375.000 Da, según lo declarado por el fabricante. Sin embargo, existen evidencias de la fragmentación del quitosano en medio acético diluido mediante homogeneización a presiones entre 20 y 100 MPa (Kasaai et al., 2003). Teniendo en cuenta que en este trabajo el polímero se agregó a los liposomas antes de la homogeneización a alta presión y en un medio con ácido ascórbico (pH aproximadamente 3), se empleó un método sencillo que permitiera inferir si existía algún cambio en el peso molecular del quitosano de partida. Por lo tanto se midió la viscosidad cinemática de soluciones FeAA con quitosano, antes y después de ser homogeneizadas en las condiciones aplicadas a los liposomas conteniendo el polímero, para determinar si el proceso ocasionaba algún cambio en este parámetro.

3.3.12.2. REACTIVOS

- Solución FeAA 1:2 conteniendo hierro a 0,24 M con quitosano 2 mg/ml (solución FeAA-CHI): disolver 1,69 g de AA en 16,98 g de agua destilada. Agregar 40 mg de quitosano y agitar a 40°C hasta disolución (aproximadamente 30 minutos). Agregar 1,33 g de sulfato ferroso heptahidratado y agitar unos minutos hasta disolución. El hierro se agrega una vez disuelto el quitosano para minimizar la oxidación del Fe²⁺ por adsorción a las partículas de quitosano no disueltas.

3.3.12.3. PROCEDIMIENTO

La viscosidad cinemática se midió con un viscosímetro Cannon-Fenske Serie 50 termostatzado a 40°C. La solución FeAA-CHI fue procesada por homogeneización a alta presión según lo descrito en 3.4.4., en las mismas condiciones que los liposomas conteniendo quitosano. Se midió la viscosidad de la solución antes y después de ser procesada, registrándose el tiempo empleado por la muestra en atravesar los dos aforos del viscosímetro. La viscosidad cinemática (V_c) se calculó según siguiente ecuación:

$$V_c = k \times t$$

donde k es la constante del viscosímetro a 40°C (0,003979 csk/seg) y t el tiempo en segundos.

3.3.13. Determinación del grado de desacetilación del quitosano por H¹-RMN

3.3.13.1. ANTECEDENTES

Como se ha explicado anteriormente (apartado 1.4.2. Introducción) muchas de las propiedades fisicoquímicas del quitosano, como la mucoadhesividad, dependen de su grado de desacetilación (%DA). En este trabajo, el quitosano se pone en contacto con liposomas cargados negativamente, con la intención de que este ensamblaje liposomas-quitosano interactúe con la superficie apical de las células intestinales. Por lo tanto resulta importante saber cuál es el %DA del producto empleado, ya que este parámetro se halla íntimamente

relacionado con ambas interacciones: liposomas con quitosano y liposomas-quitosano con células Caco-2. El quitosano grado práctico empleado en este trabajo presenta una especificación para el %DA poco exacta ($\geq 85\%$), por lo tanto se debió determinar el %DA seleccionando el método más adecuado.

Existen numerosas técnicas que han sido propuestas para determinar el %DA de quitosano, como por ejemplo la titulación, espectroscopía IR (probablemente la más estudiada), espectrofotometría UV mediante la primera derivada, análisis elemental, dicroísmo circular, permeación por geles y espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Sin embargo es esta última, la RMN- H^1 , la que presenta un mayor número de ventajas: es rápida, precisa y no requiere el empleo de un estándar de %DA conocido. La preparación de la muestra es simple, sin ser necesario secarla previamente ni pesarla con gran exactitud.

3.3.13.2. PRINCIPIO

Dado que el quitosano es un copolímero con un porcentaje variable de monómeros acetilados (N-acetilglucosamina) y deacetilados (glucosamina), el grado o porcentaje de acetilación (%DA) suele calcularse a partir del cociente entre el área de cada protón del acetilo (HAc) y uno de los dos protones vecinos al mismo en el monómero deacetilado (H2D o H1D), según se indica en la Fig.26.

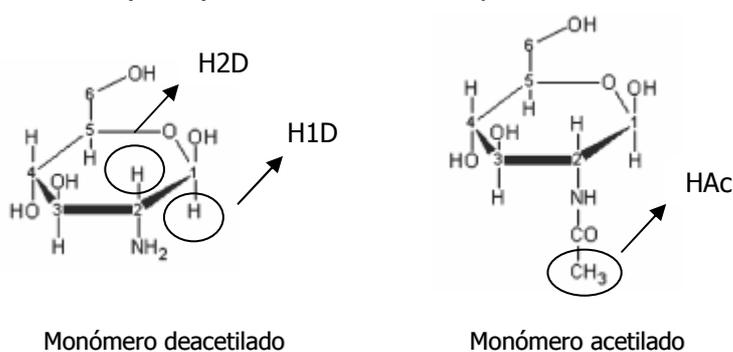


Fig.26: Monómeros del quitosano: glucosamina (deacetilado) y N-acetilglucosamina (acetilado). Se indican los protones de interés para la determinación del %DA y del %A: los protones H1D y H2D del monómero deacetilado y los HAc del monómero acetilado, correspondientes al grupo metilo ($-CH_3$).

Sin embargo existen diversas formas de calcular el %DA así como porcentaje de acetilación (%A) y el criterio de selección del tipo de cálculo suele ser el porcentaje de desacetilación estimado para la muestra en

cuestión. Según lo recomendado por la bibliografía para un valor nominal del %DA del 85%, en base a la resolución de las señales que se utilizan para la cuantificación, se emplean las siguientes fórmulas para el cálculo del %DA y %A:

Porcentaje de deacetilación	$\%DA = \left(\frac{H1D}{H1D + HAc/3} \right) \times 100$	(Lavertu et al., 2003)
Porcentaje de acetilación	$\%A = \left(\frac{HAc/3}{H2D} \right) \times 100$	(Kasaai et al., 2003)

3.3.13.3. REACTIVOS

- Agua deuterada (D₂O).
- Ácido clorhídrico deuterado (DCI).

3.3.13.4. PROCEDIMIENTO

La determinación del DDA para el quitosano empleado se realizó mediante una técnica de RMN-¹H validada (Lavertu et al., 2003). Brevemente, la muestra se preparó disolviendo a temperatura ambiente unos 30 mg de quitosano en 4,9 ml de D₂O y 0,1 ml de DCI. Los espectros RMN-¹H fueron adquiridos en un espectrómetro BRUKER ARX-400 cuya temperatura se mantuvo a 70 ± 0,1°C por medio de una unidad de estabilización Bruker VT-2000. Las muestras se colocaron en tubos de RMN de 5 mm, se hicieron girar a 20 Hz y se dejaron 10 minutos para alcanzar el equilibrio térmico. Las condiciones de adquisición fueron las descritas en la metodología validada. Los espectros ¹H RMN fueron procesados y analizados empleando el software XWinNMR v.3.1 (Bruker Analytik GmbH, Alemania) en una estación de trabajo SGI Indigo-2 (SGI, USA). La fase de cada señal se corrigió empleando la corrección automática de orden cero provista por el software. Las señales correspondientes a los distintos tipos de protones (H1D, H2D y HAc) se integraron y se calculó el porcentaje de desacetilación y de acetilación mediante las ecuaciones presentadas en el apartado 3.3.13.2. (%DA y %A).

3.4. MÉTODOS PREPARATIVOS

3.4.1. Formulación de los liposomas

El diseño de las formulaciones liposomales estudiadas se realizó en base a la evaluación de la bibliografía hallada para aplicaciones por vía oral, según lo descrito en la Introducción (apartado 1.9. Introducción). Se prepararon tres formulaciones de liposomas **convencionales**, teniendo en cuenta las composiciones lipídicas empleadas en estudios anteriores de administración por vía oral, y dos formulaciones **no convencionales**: una con lípidos catiónicos y otra con características **mucoadhesivas**. A continuación se describe la composición lipídica de las formulaciones preparadas y las sustancias incorporadas en cada caso.

3.4.1.1. FORMULACIONES CONVENCIONALES

- Liposomas formados por un 100% de fosfatidilcolina de soja (Epikuron 200) a una concentración lipídica de 25 mg/ml. Se indicarán como SPC a lo largo del texto.
- Liposomas constituidos por un 100% de fosfatidilcolina de soja hidrogenada (Epikuron 200 SH) a una concentración lipídica de 25 mg/ml. Se indicarán como HSPC a lo largo del texto.
- Liposomas compuestos por una mezcla de fosfatidilcolina de soja hidrogenada y colesterol en relación molar 3:2 respectivamente a una concentración total de lípidos de 25 mg/ml. Se indicarán como HSPC-Chol a lo largo del texto.

Las formulaciones **convencionales** se prepararon incorporando una de las siguientes sustancias o combinaciones de las mismas:

- La sonda fluorescente HPTS: estos liposomas fueron empleados para los ensayos de caracterización fisicoquímica de cada formulación. Se prepararon a una concentración de HPTS de 2 mM en buffer T10 (ver apartado 3.1.5.). En forma excepcional, los liposomas HSPC-Chol fueron preparados a una concentración de 10 mM de HPTS y 10 mg/ml de lípidos para los ensayos de microscopía confocal.
- Sulfato ferroso estabilizado con ácido ascórbico (FeAA 1:2 ó FeAA 1:5): estos liposomas fueron empleados fundamentalmente para los estudios de absorción del hierro con cultivos celulares, para la determinación del grado de oxidación por espectroscopía Mössbauer y para la determinación de la oxidación de fosfolípidos por RMN-H¹. Los liposomas conteniendo hierro se obtuvieron en dos soluciones: una compuesta por hierro 0,24 M como FeSO₄·7H₂O y ácido ascórbico (AA) 0,48 M resultando una relación molar 1:2 hierro/ácido ascórbico (FeAA 1:2), y otra conteniendo hierro 0,24 M como FeSO₄·7H₂O y AA 1,2 M resultando una relación molar 1:5 hierro/ácido ascórbico (FeAA 1:5). Esta última solución se preparó para estudiar el efecto de la concentración de AA en la prevención de la oxidación del Fe²⁺.
- La sonda fluorescente OG-514 (solo para liposomas SPC): se prepararon liposomas SPC incorporando OG-514 a una concentración de 50 µM en buffer T10 pH 7,4, que fueron empleados para la evaluación del pH interno de las vesículas.
- Buffer T10: se prepararon liposomas conteniendo únicamente buffer T10 pH 7,4. Estos liposomas exentos de sondas fluorescentes, hierro y ácido ascórbico, fueron empleados en los estudios de solubilización con Tritón X-10 y sales biliares. En particular los HPSC y HSPC-Chol también fueron empleados para estudios de calorimetría de barrido diferencial.

3.4.1.2. FORMULACIONES NO CONVENCIONALES

- Liposomas **catiónicos** compuestos por fosfatidilcolina de soja hidrogenada y DC-colesterol en relación molar 3:2 respectivamente, a una concentración total de lípidos de 25 mg/ml. Se indicarán como HSPC/DC-Chol a lo largo del trabajo.
- Liposomas mucoadhesivos compuestos por fosfatidilcolina de soja hidrogenada, colesterol y DPPA en relación molar 3:2:0; 3:2:0,3 y 3:2:0,6 respectivamente, a una concentración total de lípidos de 10 mg/ml. Durante la obtención de las vesículas, se agrega a la película constituida por esta mezcla lipídica, una solución de FeAA conteniendo quitosano a concentraciones de 2 y 4 mg/ml (ver preparación en el apartado 3.3.12.2.). Se indicarán como liposomas CHI a lo largo del trabajo. Ambas formulaciones se prepararon con la solución de FeAA ya que fueron especialmente diseñadas para estudios de captación de hierro mediante cultivos celulares. Para el caso particular de los ensayos de pH interno y pérdida de contenido durante la digestión se prepararon liposomas mucoadhesivos conteniendo la solución FeAA con el agregado de HPTS 2 mM. En la Tabla 5 se muestra un sumario de las formulaciones preparadas y las aplicaciones principales de cada una.

Tabla 5: Formulaciones liposomales estudiadas. (*) Sólo liposomas SPC.

Tipo de formulación	Nomenclatura	Sustancia incorporada	Aplicaciones principales
Convencional	SPC	-	Estudios de solubilización – DSC
		HPTS	Caracterización pre/post digestión
	HSPC	FeAA	Cultivos celulares – Mössbauer
	HSPC-Chol	FeAA + HPTS	pH interno de liposomas con hierro
		OG-514 (*)	pH interno de liposomas SPC
Catiónica	HSPC/DC-Chol	FeAA	Cultivos celulares y pH interno de liposomas con hierro.
Mucoadhesiva	CHI	FeAA + HPTS	Cultivos celulares y pH interno de liposomas con hierro.

3.4.2. Preparación de liposomas multilamelares por dispersión mecánica

La obtención de vesículas multilamelares (MLVs) fue el paso previo a la preparación de liposomas mediante homogeneización a alta presión. A continuación se describe el procedimiento empleado para cada formulación.

3.4.2.1. LIPOSOMAS SPC

La fosfatidilcolina de soja fue agregada a una solución acuosa de FeAA, HPTS ó OG-514 precalentada a 40°C. La suspensión se agitó mecánicamente unos 30 minutos hasta la obtención de una suspensión homogénea.

3.4.2.2. LIPOSOMAS HSPC

La fosfatidilcolina de soja hidrogenada fue agregada lentamente a una solución acuosa de FeAA o HPTS precalentada a 55°C. La suspensión se agitó mecánicamente unos 45 minutos hasta la dispersión total de los fosfolípidos.

3.4.2.3. LIPOSOMAS HSPC-CHOL Y HSPC/DC-CHOL

Para los liposomas HSPC-Chol, se demostró mediante estudios de calorimetría de barrido diferencial (DSC) que la adición directa de los lípidos a una solución acuosa, que resultaría el método más fácilmente transferible a escala industrial, era inadecuada para lograr la homogeneidad de la bicapa lipídica. Por lo tanto fue necesario preparar una película de lípidos según el método convencional. También se intentó reemplazar el uso de cloroformo, un solvente comúnmente empleado para solubilizar los lípidos, por etanol, un solvente de menor toxicidad. Sin embargo este solvente resultó poco eficiente en lograr la homogeneidad lipídica, como también se verá posteriormente en los estudios mediante DSC (ver apartado 4.2.1. Resultados). Por lo tanto los lípidos fueron disueltos en cloroformo y rotaevaporados a 40°C hasta obtener una película seca y homogénea en las paredes de un

balón. La película fue mantenida al vacío en un liofilizador durante dos horas para eliminar trazas de solvente. Finalmente se agregó la solución de FeAA o HPTS y se agitó vigorosamente mediante vórtex manteniendo la solución a 55°C. La agitación continuó hasta la desaparición total de la película y obtención de una suspensión homogénea. Las suspensiones de MLVs HSPC/DC-Chol se prepararon según lo descrito para los liposomas HSPC-Chol.

3.4.2.4. LIPOSOMAS CHI

La película de lípidos se preparó disolviendo los lípidos en una mezcla cloroformo/metanol en relación 2:1 v/v (la proporción del metanol es necesaria para solubilizar el DPPA) y rotaevaporando a 40°C hasta obtener una película seca y homogénea en las paredes de un balón. La película fue mantenida al vacío en un liofilizador durante dos horas para eliminar trazas de solvente. A la película de lípidos se le agregó la solución FeAA-CHI preparada según lo indicado en el apartado 3.3.12., o bien la solución de FeAA-CHI con HPTS 2mM en los casos señalados en 3.4.1. Se agitó en vórtex manteniendo la solución a 55°C hasta la dispersión total de la película de lípidos.

3.4.3. Preparación de liposomas mediante homogeneización a alta presión

Las suspensiones de MLVs obtenidas según lo descrito en el apartado 3.4.2., fueron homogeneizadas a alta presión en un Microfluidizer 110S (escala laboratorio) operando en un proceso por lotes (ciclos) o en continuo (recirculación). En el proceso por lotes, se establece el número de veces que la muestra en su totalidad pasa por la cámara de interacción. En el proceso en continuo, la fracción de la muestra que ha pasado por la cámara de interacción es recirculada al depósito que contiene el resto de la preparación. En este caso se establece, para un volumen dado de muestra, el tiempo que ésta será procesada. En general se obtiene mayor reproducibilidad para un proceso en lotes, ya que se asegura un tratamiento homogéneo de la muestra; mientras que en el proceso en continuo, según el tiempo elegido para el procesamiento, podría haber porciones de la muestra que hubieran pasado por la cámara de interacción un menor número de veces. En algunos casos, este fenómeno se pone en evidencia con la obtención de distribuciones de tamaños polidispersas. Por lo tanto, las formulaciones fueron mayoritariamente procesadas por lotes (ciclos), empleando un volumen mínimo de 20 ml. En el caso particular de los liposomas HSPC/DC-Chol se empleó el proceso en continuo (L4-P2,4) que permitió el procesamiento de un volumen menor (10 ml). Éste también fue utilizado en la preparación de liposomas HSPC empleados en estudios de solubilización con Triton X-100.

La nomenclatura que se empleará para designar a cada uno de los procesos es la siguiente: la letra C indicará que se trata de un proceso en ciclos y la L hará referencia a un proceso en lotes. Luego se indicará para C, el N° de ciclos o para L, el tiempo de procesamiento y finalmente la presión de trabajo precedida por una letra P. Así, por ejemplo,

L10-P0,8 indica un proceso por lotes durante 10 minutos a una presión de 0,8 bar; mientras que C5-P4 indica un proceso de cinco ciclos a 4 bar.

En el caso de los liposomas HSPC se ensayó la extrusión de las suspensiones obtenidas por membranas de poro definido de policarbonato (Nucleopore, Millipore, USA). El pasaje sucesivo de la suspensión por los poros de 800 nm de la membrana se realizó al menos tres veces, para intentar eliminar las poblaciones de liposomas por encima de los 1.000 nm. Como se trata de fosfolípidos con una temperatura de transición entre 50 y 55°C, se debió extrusionar a una temperatura superior, para lo cual se precalentó el soporte de la membrana antes de cada extrusión.

A continuación se indican las condiciones de procesamiento empleadas para la obtención de las distintas formulaciones. Las mismas fueron establecidas mediante la optimización del proceso según se describe en el apartado 4.2.2. (Resultados).

3.4.3.1. LIPOSOMAS SPC

Fueron procesados por 5 ciclos a 2,4 bar de presión de entrada (C5-P2,4) y a temperatura ambiente. En el apartado 4.2.2.1. (Resultados) se muestra la optimización de la obtención de estos liposomas. Además de estos liposomas, sobre los cuales se realizaron la mayor parte de los ensayos de caracterización, se prepararon suspensiones con otras características para estudios preliminares, como por ejemplo la solubilización con TX-100. En cada caso se indicarán las condiciones para su obtención.

3.4.3.2. LIPOSOMAS HSPC

Estos liposomas debieron ser procesados a una temperatura de 55°C, por 5 ciclos a 4 bar (C5-P4), la máxima presión de entrada estudiada. En el apartado 4.2.2.2. (Resultados) se muestra la optimización de la obtención de estos liposomas. Como además se ensayaron condiciones de recirculación para estos liposomas, se prepararon suspensiones de MLVs que fueron procesadas a distinta presión de entrada (0,8; 2,4 y 4 bar) durante tiempos variables según la presión. Se determinó el volumen medio por espectroscopía y se analizaron las distribuciones de diámetros obtenidas.

Para los estudios de solubilización se prepararon liposomas con distintas condiciones de homogeneización, para verificar la eficiencia de la solubilización en liposomas con diferentes características fisicoquímicas. En cada caso se indicarán las condiciones para su obtención.

3.4.3.3. LIPOSOMAS HSPC-CHOL

Fueron procesados por 5 ciclos a 2,4 bar de presión de entrada (C5-P2,4), como los liposomas SPC, pero requirieron trabajar termostatazando la muestra a 55°C. En el apartado 4.2.2.3. (Resultados) se muestra la optimización de la obtención de estos liposomas.

3.4.3.4. LIPOSOMAS HSPC/DC-CHOL

En este caso se empleó el modo recirculación que permitió preparar muestras de menor tamaño. Se procesaron 10 ml a 2,4 bar y 55°C, durante 4 minutos (L4-P2,4). En el apartado 4.2.3. (Resultados) se muestra un ejemplo de distribución de tamaños obtenida en estas condiciones.

3.4.3.5. LIPOSOMAS CHI

Estos liposomas fueron procesados a una temperatura entre 55 y 60°C, por 5 ciclos a 4 bar (C5-P4). En el apartado 4.2.3. (Resultados) se muestran ejemplos de distribuciones de tamaños obtenidas en estas condiciones.

3.4.4. Homogeneización de soluciones de quitosano

Este ensayo se realizó para evaluar si se producía una disminución en la viscosidad (ocasionada por una disminución en el peso molecular) del quitosano, al ser homogeneizado a alta presión en las mismas condiciones empleadas para los liposomas CHI. Para esto se preparó la solución de FeAA-CHI según lo descrito en 3.3.12.2., y se determinó la viscosidad cinemática (ver apartado 3.3.12.) antes y después de ser procesada 5 ciclos a 4 bar y una temperatura de 55°C.

3.4.5. Purificación de liposomas por columnas de exclusión molecular (SEC)

La separación entre los liposomas y las sustancias no incorporadas en su interior acuoso se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC). El objeto de esta separación fue determinar la encapsulación de las vesículas (expresada como porcentaje o como volumen encapsulado) y la obtención de suspensiones de liposomas aptas para realizar ensayos como la digestión *in vitro*, la incubación con cultivos celulares, el pH interno, la estabilidad de fosfolípidos por ³¹P-RMN, entre otros. El eluyente empleado y el volumen de elución dependieron del tipo de muestra procesada y del objetivo de la separación, y serán indicados en cada caso en particular. A partir de este momento se indicarán como **M0** las suspensiones de liposomas previamente a cualquier separación, es decir, aquellas que contienen tanto la sustancia no encapsulada (exterior acuoso) como la encapsulada en su interior acuoso. Se indicarán **M1** las muestras que solo contienen sustancias encapsuladas, es decir, que hayan sido sometidas a algún proceso separativo para la eliminación de la sustancia no encapsulada.

Se debe tener en cuenta que esta separación puede introducir variaciones en la distribución de tamaños de los liposomas eluidos. Por ejemplo, los liposomas mayores que 1 µm pueden quedar retenidos en la columna si el tamaño de partícula del gel es demasiado pequeño. En este sentido es conveniente por un lado, elegir un tipo de gel *medium* o *coarse*; por otro lado debe controlarse el porcentaje de elución de lípidos y/o la distribución de tamaños de los liposomas separados.

3.4.5.1. COLUMNAS DE SEPHADEX G-25

La purificación de liposomas empleando columnas PD-10 de Sephadex G-25 *medium* fue la técnica separativa mayormente empleada en este trabajo, teniendo en cuenta su estabilidad en un amplio rango de pH (de 2 a 13). Las columnas PD-10 empleadas poseen un diámetro interno de 1,5 cm y se llenaron con gel previamente hidratado hasta una altura de 5 cm. Los eluyentes fueron buffers u otras soluciones acuosas según cada caso. Los volúmenes de siembra variaron entre 0,5 y 1 ml, el volumen muerto estuvo entre 2 y 3 ml y los liposomas eluyeron en volúmenes entre 1,5 y 3 ml (la dilución mínima al pasar por una columna PD-10 fue 1/3).

Las columnas pudieron ser reutilizadas varias veces luego de lavados exhaustivos. En el caso de separación de liposomas con FeAA, el gel debió lavarse con AA 0,1M para eliminar el hierro oxidado insoluble. Luego se enjuagó con agua hasta reacción negativa con o-fen (ver 3.3.4.). Luego de la separación de liposomas conteniendo HPTS, fue necesario enjuagar las columnas con un mínimo de 50 ml de agua hasta obtener fluorescencia no detectable a 403 nm (ver 3.3.3.).

Para la purificación de mayores volúmenes de liposomas se emplearon columnas preparativas de 3 cm de diámetro interno por 9 cm de altura del gel, también conteniendo Sephadex G-25 *medium*. Esta técnica se aplicó fundamentalmente como paso previo a ensayos de digestión *in vitro* y a la determinación del grado de oxidación del hierro liposomado por espectroscopía Mössbauer. En este caso los volúmenes de siembra variaron entre 4 y 8 ml, el volumen muerto estuvo entre 12 y 16 ml y los liposomas eluyeron en unos 10-15 ml.

3.4.5.2. COLUMNAS DE SEPHADEX G-75 Y G-100

Se emplearon en los ensayos preliminares con el objeto de intentar separar los liposomas digeridos de las enzimas y las sales del extracto de bilis. El rango de pesos moleculares que permiten separar es de 3.000-80.000 para el G-75 y de 4.000-150.000 para el G-100. Hay que tener en cuenta que geles de mayor porosidad, requieren mayores tiempos de hidratación. En este caso, los geles G-75 y G-100 se hidrataron con la fase móvil según lo especificado por el fabricante: 24 horas a temperatura ambiente y 5 horas a 90°C respectivamente. Las columnas empleadas en estos ensayos fueron PD-10 de 1,5 cm (diámetro interno) x 5 cm (altura) y el eluyente fue buffer T-10.

3.4.5.3. COLUMNAS DE BIOGEL A-0,5M Y A-15M

La cromatografía en columnas de Biogel A-0,5m y A-15m ya había sido empleada exitosamente para separar liposomas de proteínas séricas (Chonn et al., 1991). Se trata de geles de agarosa ampliamente empleados para la separación de macromoléculas biológicas como proteínas, polisacáridos y ADN. El Biogel A-0,5m posee una concentración de agarosa del 10% y resulta adecuado para separar proteínas con pesos moleculares entre 5.000 y 500.000 Da, mientras que el A-15m, con un 4% de agarosa, separa pesos moleculares entre 50.000 y 15.000.000 Da.

En el presente trabajo se emplearon columnas PD-10 que fueron cargadas con Biogel con el objeto de separar los liposomas digeridos de las enzimas y las sales biliares, para evitar el contacto del medio digestivo con los cultivos celulares. En el apartado 4.2.8. (Resultados) se muestra la puesta a punto de la SEC en Biogel y se explican las razones que llevaron a descartar esta separación.

Debido a las características de empaquetamiento de estos geles fue necesario emplear eluyentes previamente desgasados y usar una bomba peristáltica para el control del caudal. El eluyente comúnmente empleado fue el buffer T-10 pH=7,4. Los volúmenes de siembra, muerto y elución de liposomas fueron similares a los empleados con columnas PD-10 de Sephadex G-25.

3.4.6. Purificación de liposomas por ultracentrifugación

3.4.6.1. ANTECEDENTES

La centrifugación en un campo gravitatorio alto o ultracentrifugación, fue empleada como paso previo a la determinación del porcentaje de oxidación del Fe^{2+} por espectrometría Mössbauer (apartado 3.3.6.). Además de permitir la obtención del hierro encapsulado en el interior acuoso de los liposomas, el contenido de hierro se concentró en un factor de aproximadamente 10. Generalmente los MLVs requieren tiempos de ultracentrifugación relativamente cortos, en especial si los liposomas contienen colesterol y más aún si se trata de lípidos saturados (hidrogenados) por debajo de su temperatura de transición, debido a que aumenta la densidad de las bicapas.

3.4.6.2. PROCEDIMIENTO

Las suspensiones se centrifugaron en tubos de policarbonato de 28 ml a 40.000 rpm, (115.600 x g para el tubo lleno) y 4°C. En el caso de liposomas SPC, el tiempo de centrifugación fue de 45 minutos, mientras que los liposomas HPSC y HSPC-Chol (que contienen lípidos saturados con o sin colesterol) fueron centrifugados durante 30 minutos. Se empleó una ultracentrífuga Sorvall Combi-Plus equipada con un rotor de ángulo fijo T-865.

3.4.7. Digestión *in vitro* de liposomas y muestras relacionadas

3.4.7.1. ANTECEDENTES

Existen numerosos modelos de digestión *in vitro* empleados para estudiar la estabilidad de liposomas en condiciones que imitan las gastrointestinales. La mayoría de ellos evalúa de forma independiente el comportamiento fisicoquímico de los liposomas frente a cada etapa digestiva en forma independiente. Son pocos los antecedentes de digestiones completas, en las que las vesículas se hallan sometidas a una sucesión de pasos digestivos, evaluándose el comportamiento final (Nacka et al., 2001a). Otro aspecto a tener en cuenta es la diversidad hallada para las condiciones de digestión en cuanto a la duración de cada etapa, el valor elegido para el pH estomacal e intestinal, el empleo de enzimas individuales o

de mezclas enzimáticas (como la pancreatina), la actividad enzimática en el medio de digestión, el tipo de sales biliares empleadas, etc. Existen ejemplos en los que se evalúa el efecto de pHs estomacales entre 1,5 y 2,5 (Nacka et al., 2001b). En este trabajo se realizaron estudios en los cuales se sometieron a los liposomas convencionales a pH2 durante 2 horas a 37°C, como una etapa previa a los estudios de digestión *in vitro*.

El origen de las sales o ácidos biliares presenta las mayores variaciones: se ha empleado deoxicolato de sodio (Kirilenko y Gregoriadis, 1993), mezclas cólico/desoxicólico 1:1 mol/mol (Freund et al., 2000), bilis humana simulada (SBH), preparada a partir de sales biliares en concentraciones conocidas (Patel et al., 2000) o bien extracto de bilis porcina o bovina desecada (Han et al., 1997). En cuanto a las concentraciones empleadas, se especifican valores entre 10 y 20 mM para mezclas de ácidos o sales biliares preparadas artificialmente, mientras que cuando se utiliza bilis animal, generalmente se indican concentraciones p/p o p/v, hallándose valores extremos de hasta 10% de bilis (Taira et al., 2004).

Cuando se orientó la búsqueda bibliográfica hacia la evaluación de la biodisponibilidad de productos conteniendo hierro mediante células Caco-2, se encontró una mayor homogeneidad en las condiciones de la digestión *in vitro*, ya que varios de ellos se basan en un mismo modelo de digestión *in vitro* previamente desarrollado (Miller et al., 1981). Las distintas metodologías emplean las siguientes condiciones:

- Tiempo: entre 1 y 2 hs para la digestión estomacal, y entre 0,5 (Au y Reddy, 2000) y 2 hs (Puyfoulhoux et al., 2001) para la digestión intestinal.
- Temperatura: 37°C (con agitación).
- Digestión estomacal: con pepsina en HCl a pH 2.
- Digestión intestinal: con una mezcla pancreatina – extracto de bilis. (porcino), ajustando el pH a 5 (Jovani et al., 2001); 5,5 (Garcia et al., 1996); 6 (Au y Reddy, 2000) o 7,5 con NaHCO₃ (Glahn et al., 1996).

Como se desprende del resumen anterior existe una cierta variabilidad en los tiempos empleados para cada etapa, en el pH de la etapa intestinal y también en las concentraciones de los reactivos empleados, aunque en menor grado que los modelos de digestión aplicados a liposomas.

Teniendo en cuenta que en el presente trabajo las muestras sometidas a digestión *in vitro* están constituidas por liposomas, los factores de este proceso que *a priori* pueden tener mayor influencia en la estabilidad de las vesículas son la concentración de sales biliares, debido a su capacidad de solubilizar las bicapas lipídicas, y el pH, que de ser ácido, podría hidrolizar los enlaces éster de los fosfolípidos. Además, en el caso de sales ferrosas encapsuladas en liposomas, debe tenerse en cuenta que un pH superior a 3 desencadena la oxidación del Fe²⁺. Según lo expuesto, éstos han sido los parámetros que más se han evaluado a la hora de establecer las condiciones de la digestión *in vitro*, consensuando las distintas condiciones empleadas en la bibliografía. Por lo tanto, se empleó una metodología basada en los trabajos de Au y Reddy, y de Jovaní et al, citados anteriormente. Las modificaciones respecto a dichos trabajos suponen un incremento de las condiciones adversas a la estabilidad de los liposomas y del Fe²⁺. Las condiciones empleadas en la digestión *in vitro* fueron:

- Digestión estomacal *in vitro*: 1h a pH 2 y 37°C, con agitación y en presencia de pepsina a una concentración de 1,88 mg/ml.
- Digestión intestinal *in vitro*: 1h a pH 6,5 y 37°C, con agitación y en presencia de extracto de bilis a 2 mg/ml y pancreatina a 0,29 mg/ml.

Las condiciones descritas anteriormente se aplicaron a diferentes tipos de muestras, excepto en las empleadas para la determinación del pH interno de los liposomas. En éstas, dado que para poder realizar las lecturas de fluorescencia la concentración de liposomas utilizada fue mucho menor, también lo fueron las concentraciones de los agentes digestivos. De esta manera se mantuvo una relación entre fosfolípidos y EB equivalente a la del resto de digestiones *in vitro* (realizadas a una concentración de fosfolípidos de 25 mg/ml). A continuación se describen los procedimientos específicos correspondientes a distintas aplicaciones.

3.4.7.2. DIGESTIÓN DE LIPOSOMAS CONTENIENDO HPTS PARA LA DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN INCORPORADO Y DIÁMETRO MEDIO

Estos liposomas no requieren una separación previa de la HPTS libre, es decir que se procesan las muestras M0, conteniendo HPTS 2 mM, que se encuentran en buffer T-10 pH 7,4.

Reactivos

- HCl 18,5 % p/v (dilución 1:1 v/v del HCl concentrado).
- Solución pep/HCl: 80 mg pepsina en 1 ml de HCl 0,1 N.
- Solución de NaHCO₃ 1 M.
- Solución pan/EB: 20 mg pancreatina, 120 mg extracto de bilis porcina en 5 ml de NaHCO₃ 0,1M.

Procedimiento

Transferir 5 ml de suspensión de liposomas M0 (25 mg/ml) a un erlenmeyer de 50 ml. Agregar 6,7 µl de HCl 18,5% y 120 µl de pep/HCl. Incubar 60 minutos a 37°C con agitación. Agregar 400 µl de pan/EB y luego ajustar el pH gota a gota con NaHCO₃ 1 M (aproximadamente 50 µl). Incubar 60 minutos a 37°C con agitación. Enfriar a 4°C para inactivación de las enzimas.

3.4.7.3. DIGESTIÓN DE LIPOSOMAS CONTENIENDO HPTS PARA LA DETERMINACIÓN DEL pH INTERNO

La determinación del pH interno de los liposomas requiere la eliminación previa de la HPTS no encapsulada por SEC en Sephadex G-25 eluyendo con buffer T-10 pH 7,4 (muestras M1). Para evitar la turbidez de la muestra original, que interfiere en la medición de la fluorescencia, la fracción de liposomas M1 se diluyó con el mismo buffer hasta una concentración de lípidos de aproximadamente 0,5 mg/ml. La digestión se realizó en la cubeta del espectrofluorímetro a una temperatura de 37°C con agitación. Se describirán en este

apartado exclusivamente las condiciones digestivas. En el apartado 3.5.2.4. se detallará el procedimiento para la determinación del pH interno.

Reactivos

Se emplean los mismos reactivos que en el apartado 3.4.7.2.

Procedimiento

Transferir 3 ml de suspensión de liposomas M1, obtenida por SEC y diluida hasta una concentración de lípidos de 0,5 mg/ml, a una cubeta de fluorescencia de 1 cm de paso óptico termostata a 37°C. Dejar equilibrar durante 5 minutos. Agregar 4 µl de HCl 18,5% y 1,6 µl de pep/HCl. Incubar 60 minutos. Agregar 5,3 µl de pan/EB y 30 µl NaHCO₃ 1 M. Incubar 60 minutos.

3.4.7.4. DIGESTIÓN DE LIPOSOMAS CONTENIENDO FeAA

Estos liposomas requieren la separación previa del hierro no encapsulado por SEC (muestras M1), empleando Sephadex G-25 y HCl acuoso a pH 2 como eluyente. Esta necesidad quedó establecida en ensayos preliminares de digestión *in vitro*, utilizando liposomas con FeAA en el medio externo (muestras M0) y siguiendo el mismo protocolo que el empleado para liposomas con HPTS. En estos ensayos previos, la alta concentración de ácido ascórbico y la formación de compuestos insolubles de hierro a pH 6,5 dificultaban el ajuste de pH y, en los casos en que era necesario, la posterior separación por SEC. Por lo tanto se descartó la digestión *in vitro* de soluciones con alta concentración de hierro no encapsulado.

La digestión de liposomas conteniendo FeAA se realizó como etapa previa de los siguientes ensayos: la cuantificación del grado oxidación del Fe²⁺ por espectroscopía Mössbauer, la evaluación de la estabilidad de fosfolípidos por RMN-³¹P, la absorción de hierro por células Caco-2 y el monitoreo del pH interno de los liposomas con FeAA. La digestión se realizó en cada caso con un volumen de muestra determinado por los requerimientos de los ensayos post digestión.

Reactivos

- HCl acuoso pH 2.
- Solución pep/HCl: idem apartado 3.4.7.2.
- Solución de NaHCO₃ 1 M.
- Solución pan/EB: idem apartado 3.4.7.2.

Procedimiento

Se obtuvieron liposomas conteniendo hierro encapsulado (M1) por SEC en columnas PD-10 o preparativas de Sephadex G-25, empleando HCl pH 2 como eluyente. Por cada 5 ml de muestra M1 con una concentración aproximada de lípidos de 10 mg/ml, se agregaron 48 µl de pep/HCl. Se incubó 60 minutos a 37°C con agitación. Se agregaron 160 µl de pan/EB (por cada 5 ml de muestra) y luego de ajustar el pH gota a gota con NaHCO₃ 1M hasta pH

6,5 (aproximadamente 130 µl), se incubó 60 minutos a 37°C con agitación. Finalmente se enfrió a 4°C para la inactivación de las enzimas.

3.4.7.5. DIGESTIÓN DE SOLUCIONES FeAA

Se realizó la digestión *in vitro* de dos tipos de preparaciones conteniendo FeAA. Por un lado se digirieron las disoluciones de FeAA utilizadas para la obtención de la curva de calibración de los ensayos por espectroscopía Mössbauer, cuyas concentraciones estuvieron comprendidas entre 12 y 96 mM de Fe, como se describió en el apartado 3.3.6. El otro tipo de preparaciones incluye las soluciones de FeAA 1:2 conteniendo hierro a una concentración entre 2 y 4 mM utilizadas como referencia para la incubación de cultivos celulares en los ensayos de absorción de hierro.

Alícuotas de 5 ml de estas soluciones fueron digeridas según lo descrito para liposomas conteniendo FeAA en el apartado 3.4.7.4.

3.4.7.6. DIGESTIÓN DE PRODUCTOS COMERCIALES CONTENIENDO HIERRO.

Los productos comerciales conteniendo hierro, identificados como PC1, PC2, PC3 fueron digeridos según lo descrito para soluciones FeAA en el apartado 3.4.7.5. Se partió de una concentración de hierro de 2 a 4 mM sin alterar la forma farmacéutica. Para los comprimidos, por ejemplo, se agregó un volumen suficiente de la solución pep/HCl para alcanzar esa concentración, manteniendo la integridad del mismo para que la digestión simulara lo que ocurre *in vivo*. La suspensión resultante una vez completada la digestión del PC1, debió ser centrifugada durante 15 minutos a 15.000 rpm, para eliminar el precipitado amarronado que se obtuvo a pH 6,5.

3.4.8. Evaluación de la absorción de hierro mediante cultivos celulares

Esta metodología se empleó con el objeto de estudiar la absorción de hierro a partir de las formulaciones de liposomas preparadas, empleando un modelo *in vitro*. Los cultivos celulares fueron incubados con liposomas sin digerir o digeridos, con soluciones FeAA y con productos comerciales conteniendo hierro.

3.4.8.1. ANTECEDENTES

Como ya se describió en la Introducción (apartado 1.11.2.5.), las células Caco-2 han sido usadas desde hace más de una década como sistemas *in vitro* para estudiar la captación y absorción de hierro (Alvarez-Hernandez et al., 1991), mostrando una buena correlación con los ensayos de biodisponibilidad del hierro en humanos (Au y Reddy, 2000).

Numerosos trabajos determinan tanto la captación (la fracción de hierro que entra y permanece en la célula) como el transporte de hierro (la fracción que *in vivo* pasaría a circulación atravesando la cara basal de la célula). Para evaluar el transporte, suelen emplearse las bicámaras Transwell (cuyo esquema se muestra en el apartado 5.5.1.), en las cuales las células se ubican sobre una membrana que separa dos cámaras. La cuantificación

del hierro se realiza en la solución de la cámara inferior y en general es muy baja respecto al contenido de hierro captado por las células, con lo cual es necesario emplear radioisótopos para su análisis. En este trabajo sólo se midió la captación de hierro, por lo tanto las células se sembraron en placas convencionales de 6 wells.

El cultivo de células Caco-2 se realizó en el Servicio de Cultivos Celulares de la Universidad Autónoma de Barcelona, por lo tanto se describirá brevemente el protocolo de siembra, describiendo con más detalle el ensayo para determinar la absorción de hierro.

3.4.8.2. CULTIVOS CELULARES

Las células Caco-2 se adquirieron a la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC N° 86010202). Las células se hicieron crecer en frascos de cultivo de 75 cm² en medio RPMI 1640 con Glutamax-I suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y un 1% de PEF (penicilina/estreptomicina/fungizona). Después de llegar al 80% de confluencia, fueron tripsinizadas y sembradas en placas de 6 wells (9,5 cm²/well) a una densidad de 8.000 células/cm². Las células se utilizaron para los ensayos entre los repiques 54 y 57. Las condiciones de incubación fueron 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂. Se realizaron evaluaciones microscópicas para determinar que las células llegaban a confluencia entre los días 5 y 6 después de sembradas. En ese momento se realizó el primer cambio de medio, y a partir de entonces se renovó cada 2 días. Los experimentos se realizaron entre los días 12 y 15 después de sembradas.

3.4.8.3. PROCEDIMIENTO

Estos ensayos se realizaron según el protocolo que se describe a continuación. El medio de cultivo fue aspirado y las monocapas celulares se lavaron dos veces con 1 ml de buffer UPTAKE precalentado a 37°C. A continuación, se incubaron durante 1 hora a 37°C con 1 ml de liposomas conteniendo FeAA digeridos o sin digerir, soluciones FeAA (control), solución AA 200 µM, productos comerciales digeridos, o buffer uptake (blanco sin hierro), dependiendo del experimento. Cada solución o suspensión se ensayó como mínimo por duplicado (dos wells). En el caso de las soluciones de FeAA, el rango de concentraciones de hierro en los medios de incubación, varió entre 20 y 280 µM.

En el caso de las muestras no digeridas, en las que el hierro no ha experimentado ningún proceso oxidativo, éstas se diluyeron de manera de obtener la concentración de hierro deseada en los medios de incubación. Las soluciones de FeAA digeridas (con el consecuente cambio en el estado de oxidación del hierro), se diluyeron teniendo en cuenta la concentración de hierro antes de la digestión y por lo tanto, pasando por alto la posible precipitación de especies de Fe³⁺. En las incubaciones realizadas con liposomas sometidos a digestión, la dilución necesaria para realizar la incubación se efectuó teniendo en cuenta la concentración de hierro en las muestras obtenidas por SEC (M1) antes de la digestión. Finalmente, estas muestras digeridas antes de la incubación se diluyeron teniendo en cuenta la concentración inicial de hierro, como en el caso de las soluciones de FeAA digeridas. El procedimiento descrito permite comparar la eficacia de las diferentes preparaciones a partir de una misma dosis inicial de hierro previa a la digestión. De esta manera los resultados

indicarán cómo modifica la digestión la capacidad de las formulaciones para aportar hierro a las células del cultivo.

Una vez concluida la incubación, los medios fueron aspirados y descartados. Las células se lavaron una vez con 2 ml de buffer PBS, y luego con 1 ml de un reactivo específico para eliminar el hierro (REH) adsorbido a las células en forma inespecífica. El REH se dejó 10 minutos en contacto con las monocapas y éstas se lavaron finalmente dos veces con 1 ml de buffer PBS. Se solubilizaron con un 1ml de solución de Tritón X-100 al 2% y se sonicaron durante 10 segundos hasta obtener una suspensión homogénea, que fue congelada a -20°C hasta su análisis por espectrometría de absorción atómica.

Los valores de concentración en mg Fe /ml se corrigieron por la concentración proteica de cada well, para obtener valores de μFe / mg proteína. Finalmente se hallaron los promedios de replicados y la SEM (desviación estándar del promedio).

3.5. MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS

3.5.1. Determinación del volumen acuoso interno de los liposomas y de la incorporación de HPTS y hierro.

3.5.1.1. DETERMINACIÓN DEL VOLUMEN ENCAPSULADO

En el presente trabajo es importante tener una estimación del volumen acuoso encapsulado en los liposomas (generalmente expresado como l/mol de lípido o ml/mg de lípido), ya que al incorporar una sustancia hidrosoluble como el Fe^{2+} , el mayor rendimiento de dicha incorporación se obtendrá al maximizar el volumen del interior acuoso de las vesículas.

Una de las metodologías más habituales para determinar el volumen acuoso interno de los liposomas se basa en determinar qué cantidad de una sustancia hidrosoluble, de concentración conocida, está contenida en su interior. El producto de dicha cantidad por el inverso de su concentración proporciona el volumen acuoso contenido en los liposomas.

En muchos casos, la secuencia de procesos experimentales necesaria para obtener el resultado es la siguiente:

- Purificación de los liposomas conteniendo material encapsulado mediante algún método separativo.
- Determinación del contenido de la sustancia en la fracción de liposomas (M1).
- Determinación del contenido total de lípidos en la fracción de liposomas (M1).
- Cálculo del volumen acuoso incorporado (l/mol) como cociente entre los datos anteriores.

Esta secuencia será apropiada siempre y cuando durante la purificación de los liposomas no tenga lugar una pérdida del marcador encapsulado, lo cual es especialmente cierto para aquellas sustancias de muy baja permeabilidad a través de las bicapas lipídicas. El método separativo ideal, por lo tanto, debería ser rápido, diluir lo mínimo posible la muestra original y no afectar al contenido de los liposomas.

Por lo tanto, el volumen incorporado (expresado en l/mol o ml/mg lípido) se obtiene midiendo la concentración de la sustancia marcadora y la de lípidos en la fracción de

liposomas (M1), suponiendo que durante el proceso de separación la concentración de esa sustancia en el interior acuoso es la misma que en la muestra inicial. En el presente trabajo esta suposición se aplicó para liposomas conteniendo HPTS, una sustancia con muy baja permeabilidad a través de bicapas (Kamp et al., 1995; Fernandez y Politi, 1997), y empleando como eluyente para la separación por SEC el mismo buffer de preparación.

3.5.1.2. DETERMINACIÓN DE LA INCORPORACIÓN DE HPTS Y HIERRO

Es esencial medir la cantidad de material encapsulado dentro de los liposomas, ya que los efectos observados experimentalmente, como por ejemplo la absorción de hierro por células Caco-2, serán en su mayoría dosis dependientes.

En el caso de los liposomas conteniendo FeAA, el porcentaje de encapsulación se obtuvo después de separarlos del material no encapsulado mediante SEC empleando HCl acuoso a pH 2 como eluyente (primera etapa de la digestión *in vitro*). En estas condiciones, y debido al cambio de pH y de la fuerza iónica del medio, no se puede afirmar que no se modifique la encapsulación del hierro durante el proceso de separación, por lo que las concentraciones de este catión determinadas en la fracción liposomal no deben aplicarse al cálculo del volumen incorporado. Pero los valores de concentración obtenidos sí que indican la cantidad de hierro contenida en los liposomas (mg hierro/mg lípido) inmediatamente después de la separación efectuada y, por ejemplo, son absolutamente necesarios a la hora de planificar los ensayos de absorción de hierro por células Caco-2, o para determinar si durante la digestión *in vitro* tiene lugar alguna pérdida del hierro encapsulado. Las mismas consideraciones son aplicables a los liposomas conteniendo HPTS utilizados como modelo para estudiar su respuesta frente a los procesos digestivos.

3.5.1.3. PROCEDIMIENTO Y CÁLCULOS

La purificación del material encapsulado se realizó mediante SEC en Sephadex G-25 según lo descrito en el apartado 3.4.5. Luego, en el caso de contener HPTS, se determinó el su contenido en la fracción de liposomas (M1) mediante el método descrito en el apartado 3.3.3.2., solubilizando las vesículas con el buffer T100-TX adecuado. Para los liposomas conteniendo FeAA, se determinó el contenido de hierro en la fracción liposomal (M1) mediante el método descrito en el apartado 3.3.4., solubilizando las vesículas con la solución AA-TX adecuada (apartado 3.3.4.2.) o mediante el método de la mezcla monofásica (apartado 3.3.4.3.). El contenido de fosfolípidos en M1 se determinó por el método de Stewart según lo descrito en el apartado 3.3.1. En el caso de las muestras que contenían colesterol (lípido no detectable mediante el ensayo de Stewart), la concentración total de lípidos se calculó a partir del valor obtenido para los fosfolípidos y de la relación en peso teórica entre los componentes. Finalmente se calculó el volumen incorporado (V_i) o el porcentaje de incorporación ($\%Inc$), mediante las siguientes ecuaciones:

$$V_i = \frac{[A]_{M1}}{[F]_{M1} \times [A]_{M0}} \qquad \% Inc = \frac{[A]_{M1} \times [F]_{M0} \times 100}{[F]_{M1} \times [A]_{M0}}$$

donde $[A]_{M1}$ es la concentración de la sustancia encapsulada (HPTS o FeAA) en la fracción de elución (M1) obtenida por SEC, $[A]_{M0}$ es la concentración total de la misma sustancia en la muestra original (M0), y $[F]_{M1}$ y $[F]_{M0}$ son las concentraciones de lípidos en M1 y M0 respectivamente.

3.5.2. Determinación del pH interno de liposomas empleando HPTS

Esta determinación resulta de gran interés en este trabajo por dos motivos: uno general, que está relacionado con el efecto del pH sobre la estabilidad de cualquier sustancia incorporada en el interior acuoso de un liposoma, y otro particular, que hace al comportamiento de una sal ferrosa con el cambio de pH. Para responder al primer caso, se realizaron estudios de pH interno en los liposomas convencionales que incorporan HPTS. En cuanto al segundo caso, tanto los llamados liposomas convencionales como los mucoadhesivos, fueron preparados con la solución FeAA pero incorporando además la sonda HPTS. La determinación del pH interno en estos casos permite estudiar la influencia del mismo sobre el grado de oxidación del Fe^{2+} incorporado.

3.5.2.1. PRINCIPIO

El pH interno en liposomas fue determinado empleando HPTS, la sonda fluorescente cuya determinación fue descrita en el apartado 3.3.3. Como se mencionó anteriormente, esta sustancia es sensible al pH y además posee una muy baja permeabilidad a través de las bicapas lipídicas. Su empleo como indicador de pH se basa en que sus formas ionizada y no ionizada presentan distintos espectros de excitación. Su pK_a de 7,41 la convierte en un buen indicador a pHs cercanos al neutro, sin embargo puede emplearse hasta pH 4,6; como se estudiará en el apartado 4.4.4.2. (Resultados). El método empleado (*ratioetric method*) consiste en medir la relación entre la fluorescencia emitida a 511 nm cuando la sonda es excitada alternativamente a 403 nm, el máximo de excitación de la forma no ionizada predominante a pH ácido, y a 454 nm, el máximo de absorción de la forma ionizada predominante a pH mayor que 7 (Norris y Powell, 1990; Barreto y Lichtenberger, 1992; Ziegler y Penefsky, 1993). Esta relación se indicará como R454/403 a lo largo del trabajo.

Como pasos previos a la determinación del pH del interior acuoso de los liposomas, se debe separar la suspensión inicial por SEC para obtener una muestra de la sonda encapsulada (muestra M1), diluirla de modo de evitar la dispersión de la luz por interacción con las vesículas lipídicas, y agregar un quencher de la HPTS en la fase acuosa externa, para garantizar que toda la fluorescencia medida corresponde a la sonda contenida en la fase acuosa interna. El quencher empleado fue el DPX, comúnmente elegido para la HPTS (Barreto y Lichtenberger, 1992; Ziegler y Penefsky, 1993).

La calibración del pH se realizó determinando el cociente R454/403 a diferentes pHs, medidos con un pHmetro, en soluciones con distintas concentraciones de HPTS y en

suspensiones de liposomas con añadidos de gramicidina D. Este péptido induce la formación de canales en las bicapas lipídicas, llevando a un rápido equilibrio del pH entre el medio acuoso externo y el medio contenido en las vesículas (Jyothi et al., 1990).

El pH interno en muestras de liposomas se determinó durante la digestión *in vitro*, llevada a cabo en la cubeta del espectrofluorímetro, como se describirá a continuación.

3.5.2.2. CALIBRACIÓN DEL PH CON SOLUCIONES DE HPTS

Reactivos

- Solución stock de HPTS 200 mM en buffer T10 pH 7,4 (ver apartado 3.3.3.).
- Soluciones de calibración HPTS 0,5; 1 y 2,5 μ M diluidas a partir de la solución stock de HPTS 200 mM.
- HCl 0,1 N ó NaOH 0,1 N.

Procedimiento

Se colocaron 3 ml de la solución de calibración de HPTS en la cubeta del espectrofluorímetro. Se ubicó un electrodo de pH conectado a un pHmetro dentro del líquido, evitando perturbaciones en el haz de luz. Se dejó equilibrar durante 5 minutos a 37°C con agitación magnética. Las condiciones instrumentales se ajustaron como se describe:

- Excitación: se alterna entre 403 y 454 nm.
- Longitud de onda de emisión: 511 nm.
- Voltaje de la muestra: 500 V.
- Paso óptico: 1 cm.

Se registran valores de R454/403 y el pH para agregados de HCl o NaOH que produzcan cambios de 0,5 unidades de pH aproximadamente. Se agregan alícuotas variables entre 0,2 y 5 μ l de HCl ó NaOH, para obtener pHs entre 4,0 y 7,8. Finalmente se grafica "log R454/403 vs. pH" y se obtiene el rango lineal, pendiente y ordenada al origen para cada concentración de HPTS.

3.5.2.3. CALIBRACIÓN DEL pH CON LIPOSOMAS INCUBADOS CON GRAMICIDINA

Reactivos

- Liposomas SPC conteniendo HPTS preparados según lo descrito en 3.4.3. y separados por SEC.
- Solución de gramicidina 5 mM en etanol 96%.
- HCl 0,1 N.

Procedimiento

Los liposomas conteniendo HPTS (M1) se diluyeron en buffer T10 hasta una concentración de 0,4 mg/ml. Se agregó una alícuota de solución de gramicidina tal que la relación gramicidina a lípido final fuera igual a 0,05:1 p/p. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Se colocaron 3 ml de la suspensión de liposomas en la cubeta del espectrofluorímetro y se procedió según lo descrito para soluciones de HPTS

(apartado 3.5.2.2.). Con los datos obtenidos se graficó "log R454/403 vs. pH" y se compararon los parámetros de esta recta con los obtenidos para soluciones de HPTS.

3.5.2.4. DETERMINACIÓN DEL pH INTERNO EN LIPOSOMAS CON HPTS DURANTE LA DIGESTIÓN *IN VITRO*

Reactivos

- Solución de DPX 200 mM.
- HCl 18,5 % p/v.
- Solución pep/HCl: 80 mg pepsina en 1 ml de HCl 0,1 N.
- Solución de NaHCO₃ 1 M.
- Solución pan/EB: 20 mg pancreatina y 120 mg extracto de bilis porcina en 5 ml de NaHCO₃ 0,1 M.

Procedimiento

Los liposomas conteniendo HPTS 2 mM (muestras M0) se purificaron por SEC en Sephadex G-25 empleando buffer T10 pH 7,4 como eluyente. La suspensión así obtenida (muestra M1) se diluyó posteriormente en el mismo buffer hasta una concentración final de lípidos de 0,5 mg/ml. Se transfirió un volumen 3 ml de esta suspensión a la cubeta del espectrofluorímetro y se dejó equilibrar durante 5 minutos a 37°C con agitación. Según lo descrito para soluciones de HPTS (apartado 3.5.2.2.), se registró el cociente R454/403 hasta obtener estabilidad en la lectura. Se agregó una alícuota de 180 µl de solución de DPX, para eliminar la fluorescencia de la HPTS que pudiera permear al exterior acuoso y posibles restos no eliminados por SEC. Se sometió la muestra a la digestión *in vitro* según lo descrito en el apartado 3.4.7.3, monitoreando el R454/403 a lo largo de las 2 hs de la misma. En determinados instantes de este período, se interrumpió la adquisición para cuantificar el porcentaje de HPTS permeada a través de las bicapas, según lo descrito en el apartado 3.3.3.3. Durante el procedimiento debieron tomarse las siguientes precauciones:

- Agregar los reactivos lentamente, evitando turbulencias en el seno de la solución.
- Trabajar en la oscuridad durante el agregado de los reactivos para no interrumpir la adquisición de R454/403.

Luego de obtener el perfil de R454/403 en función del tiempo, se transformaron los valores de R454/403 en valores de pH, mediante los parámetros de la recta de regresión "log R454/403 vs. pH" obtenida para las soluciones de HPTS y/o liposomas con gramicidina. Finalmente se obtuvo el gráfico "pH vs. tiempo", representativo de la variación del pH interno durante la digestión *in vitro*.

3.5.2.5. DETERMINACIÓN DEL PH INTERNO EN LIPOSOMAS CONTENIENDO HIERRO DURANTE LA DIGESTIÓN *IN VITRO*

Teniendo en cuenta la influencia del pH en la oxidación del Fe²⁺, resultaba de sumo interés determinar el pH interno de liposomas conteniendo FeAA durante el proceso de digestión. Como indicador de pH nuevamente se empleó la HPTS añadiéndola a una concentración final de 2 mM a la solución FeAA 1:2 utilizada en la obtención de los liposomas.

Se prepararon liposomas según lo descrito en el apartado 3.4.1., y se separaron de las sustancias no encapsuladas por SEC empleando HCl acuoso a pH 2 como eluyente. Se diluyeron en la misma solución ácida hasta una concentración final de lípidos de 0,5 mg/ml. Por lo tanto fue innecesario ajustar el pH a 2 al comienzo de la digestión. Finalmente se determinó el pH interno en función del tiempo tal como ha sido descrito para liposomas de HPTS (apartado 3.5.2.4.).

3.5.3. Determinación del pH interno de liposomas empleando OG-514

Como se mencionó previamente, la sonda HPTS permite la determinación de pHs comprendidos entre 7,4 y 4,6. Para obtener valores de pH menores se empleó el ácido carboxílico del Oregon Green 514 (OG-514; ver Fig.27). Esta sonda fluorescente es un derivado fluorado de la carboxifluoresceína con una elevada fotoestabilidad (Delmotte y Delmas, 1999). La introducción de grupos captadores de electrones en la carboxifluoresceína produce una disminución del pK_a del grupo fenólico hasta valores entre 4,4 y 4,7, adecuado para funcionar como indicador para pH ácido. En la Fig.28 se muestran los espectros de excitación de soluciones de OG-514 0,05 μM a pH 6,92; 4,21 y 3,07.

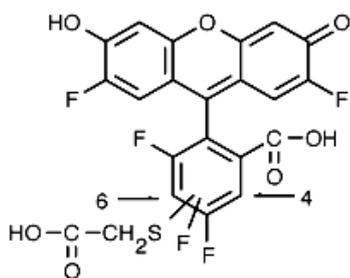


Fig.27: Estructura química del OG-514.

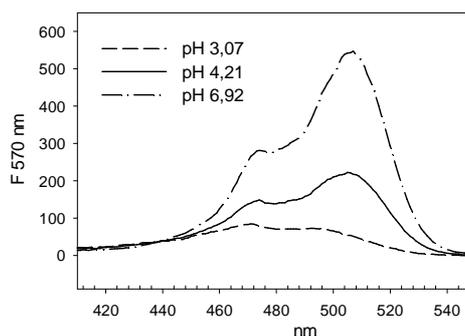


Fig.28: Espectros de excitación del OG-514 en solución.

Para determinar el pH interno se empleó la relación de fluorescencia por excitación a dos longitudes de onda (*ratiometric method*, ver apartado 3.5.2.). En este caso el cociente más sensible al cambio de pH por debajo de 4,6 es el par 510nm/450nm monitoreando la emisión a 570 nm (Lin et al., 1999). Se verificó que el rango lineal para "log R510/450 vs. pH" se verifica entre pH 4,6 y 2,8, y que la fluorescencia producida por la sonda que atraviesa la bicapa hacia el medio externo, es eliminada por el efecto del pH ácido (ver apartado 4.4.5. Resultados). A continuación se describe la calibración del pH con soluciones de OG-514, el pH interno con liposomas conteniendo gramicidina D y el pH interno en liposomas SPC durante la digestión *in vitro*.

3.5.3.1. CALIBRACIÓN DEL PH CON SOLUCIONES DE OG-514

Reactivos

- Solución stock de OG-514 10 μM en buffer T10 pH 7,4.
- Solución de calibración OG-514 0,03 μM diluidas en buffer T10 pH 7,4 a partir de la

solución stock 10 μM .

- HCl 0,1 N.

Procedimiento

Se colocan 3 ml de la solución de OG-514 0,03 μM en la cubeta del espectrofluorímetro. Se ubica un electrodo de pH dentro del líquido, evitando perturbaciones en el haz de luz. Se deja equilibrar durante 5 minutos a 37°C con agitación magnética. Las condiciones instrumentales se ajustan como se describe:

- Excitación: se alterna entre 450 y 510 nm.
- Longitud de onda de emisión: 570 nm.
- Voltaje de la muestra: 700 V.
- Paso óptico: 1 cm.

Se registraron valores de R510/450 y pH para agregados de HCl 0,1 N que produjeran cambios de 0,5 unidades de pH aproximadamente. Se agregaron alícuotas variables entre 5 y 0,2 μl de ácido, desde el pH inicial (neutro) hasta pH 2,0. Se graficó "log R510/450 vs. pH" y se obtuvo el rango lineal, la pendiente y la ordenada al origen.

3.5.3.2. CALIBRACIÓN DEL PH CON LIPOSOMAS SPC CON GRAMICIDINA

Reactivos

- Liposomas SPC conteniendo OG-514 a una concentración de 50 μM preparados según lo descrito en 3.4.1.1. y separados por SEC (M1).
- Solución de gramicidina D 5 mM en etanol 96%.
- HCl 0,1 N.

Procedimiento

Los liposomas conteniendo OG-514 (M1) se diluyeron en buffer T10 hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Se agregó una alícuota de solución de gramicidina D tal que la relación gramicidina a lípido final fuera igual a 0,05:1 p/p. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente con agitación. Se colocaron 3 ml de la suspensión de liposomas en la cubeta del espectrofluorímetro y se procedió según lo descrito para soluciones de OG-514 (apartado 3.5.3.2). Con los datos obtenidos se graficó "log R510/450 vs. pH" y se compararon los parámetros de esta recta con los obtenidos para la solución de OG-514.

3.5.3.3. DETERMINACIÓN DEL PH INTERNO EN LIPOSOMAS SPC CONTENIENDO OG-514 DURANTE LA DIGESTIÓN *IN VITRO*

Este ensayo se realizó para determinar la caída inicial del pH interno cuando los liposomas de SPC son sometidos a un pH externo de 2 en la digestión *in vitro*, y de este modo completar los valores proporcionados por la HPTS. Por lo tanto solo se midieron los primeros minutos de la digestión *in vitro*.

Reactivos

- Solución de KI 5 M: pesar 0,83 g de KI y llevar a 1 ml con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 M (estabilizador

del ioduro).

- HCl 18,5 % p/v.
- Solución pep/HCl: 80 mg pepsina en 1 ml de HCl 0,1 N.

Procedimiento

Los liposomas conteniendo OG-514 (M0) se purificaron por SEC en Sephadex G-25 empleando buffer T10 pH 7,4 como eluyente. La suspensión así obtenida (muestra M1) se diluyó en el mismo buffer hasta una concentración final de lípidos de 0,5 mg/ml. Se transfirieron 3 ml de esta suspensión a la cubeta del espectrofluorímetro y se dejó equilibrar durante 5 minutos a 37°C con agitación. Se registró el cociente R510/450 hasta obtener una lectura estable de la fluorescencia. Se agregó una alícuota de 150 µl de solución de KI 5 M, para eliminar la fluorescencia del OG-514 que pudiera permear al exterior acuoso y posibles restos no eliminados por SEC. Se agregaron 4 µl de HCl 18,5 % y 1,6 µl de solución pep/HCl y se monitoreó el cociente R510/450 durante 10 minutos.

Luego de obtener el perfil de R510/450 en función del tiempo, se transformaron estos valores en pH, mediante los parámetros hallados para la recta de regresión "log R510/450 vs. pH" obtenida en los apartados 3.5.3.2. y 3.5.3.3. Finalmente se obtuvo el gráfico "pH vs. tiempo", a partir del cual se estudió la variación del pH interno durante la etapa inicial de la digestión *in vitro* para liposomas SPC.

3.5.4. Determinación del diámetro medio y distribución de diámetros mediante espectroscopía con detección heterodina.

Esta determinación fue una de las herramientas utilizadas para caracterizar las vesículas lipídicas antes, durante y después de procesos de digestión *in vitro*. También se empleó en los estudios de solubilización de liposomas con sales biliares.

3.5.4.1. PRINCIPIO

Las técnicas espectroscópicas son mayoritariamente empleadas en la actualidad para medir el diámetro de los liposomas, ya que implican una mínima manipulación de la muestra, disminuyendo así la aparición de artefactos en la medición. Generalmente la preparación de la muestra solo requiere su dilución, si bien debe tenerse en cuenta la composición y concentración del diluyente, y la magnitud de la dilución, para la obtención de mediciones confiables. Los métodos espectroscópicos analizan las características de la luz dispersada que se origina cuando un haz de luz monocromática interacciona con las vesículas en suspensión. Los instrumentos de análisis basados en esta tecnología se fundamentan en dos tipos de detección: la heterodina, en la cual se analiza la radiación dispersada respecto de la incidente, y la homodina o PCS (*photon correlation spectroscopy*), en la cual el tratamiento matemático se realiza, únicamente, a partir de la luz dispersada por la muestra. En el presente trabajo se empleó la detección heterodina o análisis del espectro de frecuencias, cuyo principio se describe brevemente a continuación.

Como consecuencia del movimiento de las vesículas, la luz dispersada sufre un desplazamiento de la frecuencia original que depende de la velocidad (y por lo tanto del

tamaño) de las vesículas. Debido a que esta diferencia es demasiado pequeña para ser medida en forma directa, el detector evalúa la interferencia que tiene lugar al interactuar ambos haces: el incidente y el dispersado. Los datos "intensidad vs. tiempo" acumulados son convertidos en "intensidad vs. frecuencia" mediante la transformada de Fourier, obteniéndose una función que se relaciona con la distribución de diámetros de la muestra. La única restricción que se aplica durante el procesamiento de los datos es que las partículas analizadas se desplazan según las leyes del movimiento browniano. Es por este motivo no se requiere ningún parámetro que valore hasta que punto los cálculos se adecuan a las características de la muestra, como sucede con los instrumentos de PCS, los cuales suelen proporcionar un índice que evalúa la bondad de este ajuste (índice polidispersión).

Los resultados obtenidos pueden expresarse mediante diferentes distribuciones de tamaños: en número, en volumen (o masa) y en área. Teóricamente, en una distribución en número el resultado es equivalente al que se obtendría mediante, por ejemplo, microscopía electrónica (en el caso de que en ésta no existieran artefactos). Por lo tanto, en cada intervalo de clase del correspondiente histograma se representa en las ordenadas el porcentaje (en número) de partículas comprendido en un rango de diámetros determinado. En el caso de una distribución en volumen, cada punto o barra de la distribución representa el porcentaje del volumen total ocupado por partículas de ese rango de diámetros. Análogamente, cuando la distribución es en área, los intervalos de clase representan el porcentaje del área total que corresponde a las vesículas de un rango de diámetros determinado.

Como estadísticos globales del análisis suelen emplearse el diámetro medio y la desviación estándar. El diámetro medio se calcula de acuerdo con el tipo de distribución considerado, como se muestra en las ecuaciones (a), (b) y (c):

$$(a) \quad mV = \frac{\sum V_i d_i}{\sum V_i}; \quad (b) \quad mn = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i}; \quad (c) \quad mA = \frac{\sum V_i}{\sum \left(\frac{V_i}{d_i} \right)}$$

Donde mV , mn y mA son el volumen promedio, el número promedio de partículas y el área promedio de la distribución respectivamente, V_i es porcentaje en volumen en un canal determinado, d_i es el valor del diámetro del canal considerado y n_i es el porcentaje de partículas en un canal determinado.

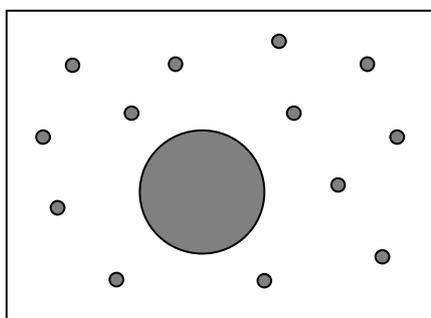
Para poblaciones de vesículas homogéneas o monodispersas, se obtienen valores de mV , mn y mA similares, mientras que para distribuciones heterogéneas o polidispersas ambos promedios pueden resultar muy diferentes. Con el objeto de distinguir poblaciones homogéneas de heterogéneas, se emplea el cociente entre diámetros de diferentes distribuciones o dispersión de la población (d), que se define en la siguiente ecuación:

$$d = \frac{mn}{mV}$$

Donde mn es el diámetro medio correspondiente a la distribución en número y mV , el diámetro medio correspondiente a la distribución en volumen para la misma muestra.

Valores de d cercanos a la unidad implican una elevada homogeneidad de la distribución de diámetros. Cuanto más heterogénea sea la distribución menores serán los valores de d , ya que el mV se halla sobreestimado por la presencia de vesículas de mayor tamaño, mientras que el mn estará influenciado por la presencia de un gran número de vesículas pequeñas. Respecto a la desviación estándar que proporciona el equipo empleado, ésta indica el intervalo con centro en el diámetro promedio que incluye al 68% de la población, por lo que debe ser interpretada como un indicador de la amplitud de la distribución estudiada.

Para ejemplificar lo dicho, puede considerarse el caso de una distribución heterogénea como la que se muestra en la Fig.29, con solo una partícula de gran tamaño y numerosas partículas pequeñas. La distribución en número da un valor para el diámetro de 106 nm y el bajo valor de la anchura indica que parecería una distribución homogénea. Esta contradicción aparece porque la distribución en número subestima la partícula de gran tamaño, que es minoría numérica frente a las pequeñas.



Distribución	Promedio \pm anchura
En número	106 \pm 5
En área	699 \pm 503
En volumen	1013 \pm 60
Polidispersión (d)	0,105

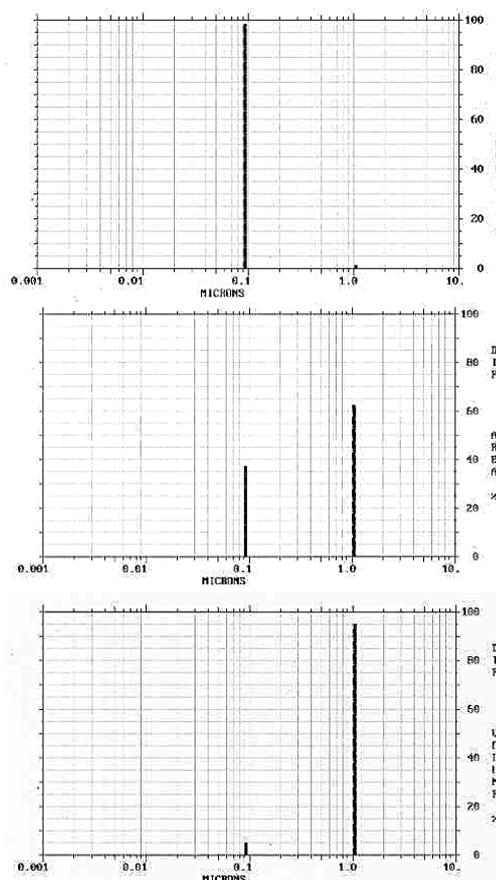


Fig.29: Comparación entre distintas distribuciones de tamaño de partícula (en número, en área, en volumen), para una muestra heterogénea modelo.

En el extremo opuesto, la distribución en volumen parece indicar que se trata de una distribución bastante homogénea pero esta vez formada por partículas grandes (mayores a los 1.000 nm). Esto ocurre porque esta distribución subestima el volumen ocupado por partículas pequeñas, despreciable frente al gran volumen de la única partícula grande. ¿Cómo se resuelve esta paradoja? O bien observando la distribución en área, que evidencia la heterogeneidad, o calculando el índice de dispersión (d), que en el ejemplo tiene un valor muy inferior a la unidad.

3.5.4.2. PROCEDIMIENTO

Para la medición de las muestras se empleó un analizador de partículas Microtrac UPA 150, que cuenta con una celda de acero inoxidable (volumen mínimo: 1,2 ml) que puede ser termostatazada hasta una temperatura de por lo menos 65°C.

Las muestras se diluyeron en su medio acuoso hasta una concentración que proporciona un índice de carga entre 0,1 y 0,2. Este índice es una medida de la concentración de muestra adecuada para la medición que depende de las características de los liposomas, como el número de bicapas, la carga eléctrica neta y el volumen encapsulado. La viscosidad y el índice de refracción del medio se suponen iguales a los del agua y son introducidos en cada caso según la temperatura de trabajo. Normalmente se midió a temperatura ambiente, sin embargo los estudios de solubilización de liposomas requirieron el empleo de temperaturas mayores, como se verá en el apartado 3.5.6. También se realizaron mediciones a 37°C para estudios de digestión *in vitro*.

Los parámetros de adquisición de datos se fijaron de acuerdo a estudios previos (Barnadas-Rodríguez, 1999) y se enumeran a continuación:

- Tiempo de lectura: 10 minutos
- Índice de refracción de fosfolípidos: 1,49
- Densidad de los liposomas: 1,01 g/cm³
- Tipo de partículas: esféricas

Los resultados se expresaron principalmente como distribuciones en volumen, por ser ésta la distribución que se halla en relación directa con el volumen incorporado para sustancias hidrosolubles. Sin embargo en algunos casos se empleó el diámetro medio de la distribución en número (mn) para la obtención de la dispersión de la población (d), definida anteriormente.

3.5.4.3. EVALUACIÓN DE DIFERENCIAS ENTRE LECTURAS

Esta metodología se aplicó para determinar la variabilidad entre lecturas de una misma muestra antes de un tratamiento (variabilidad INTRA-ensayo) y compararla con la variabilidad entre las lecturas obtenidas antes y después de dicho tratamiento (variación ENTRE-ensayos).

Al ser valores promedio, las diferencias en el diámetro y anchura media de liposomas sometidos a algún tratamiento pueden no indicar, por sí solos, la existencia real de cambios en la distribución de tamaños. Esta limitación pierde relevancia si los resultados se acompañan del correspondiente histograma, pero también puede resolverse si se cuantifican las diferencias en cada canal entre los análisis realizados.

A continuación se describen las etapas seguidas para obtener estas variaciones:

(a) En primer lugar se obtienen 3 lecturas de una misma muestra antes y después del tratamiento, registrándose los valores de cada canal que proporciona el analizador.

(b) Para obtener la variabilidad INTRA-ensayo se procede como sigue:

1. Se restan los valores de cada canal entre pares de lecturas PRE-tratamiento y se registran los módulos de estas restas correspondientes a cada canal. Estos son los valores residuales por canal.

2. Se calcula la sumatoria de los valores residuales y se promedian las 3 sumatorias.

Este valor promedio es un indicador de la variabilidad de la lectura debido al propio error del analizador. Ya que los análisis siempre representan el porcentaje de vesículas en cada canal de lectura, el valor máximo que puede alcanzar este indicador es de 200, el cual correspondería a la diferencia entre dos lecturas que no tienen ningún canal en común. En el caso en que dos lecturas sean exactamente iguales, el resultado sería de 0.

(c) Para obtener la variabilidad ENTRE-ensayos se procede como sigue:

1. Se restan los valores de cada canal entre pares de lecturas PRE-tratamiento y post-tratamiento y se registran los módulos de estas restas (valores residuales por canal).

Tabla 6: La primera columna (diámetros) indica los canales del analizador (en μm). Se indican los resultados de dos análisis para liposomas SPC PRE-tratamiento (Nº26 y 27) y POST-tratamiento (Nº28), así como los módulos de las restas por canal entre las lecturas Nº26 y Nº27 y entre las lecturas Nº26 y Nº28 (valores residuales).

diámetros	26	27	/26-27/	28	/26-28/
0,0032	0	0	0	0	0
0,0038	0	0	0	0	0
0,0045	0	0	0	0	0
0,0054	0	0	0	0	0
0,0064	0	0	0	0	0
0,0076	0	0	0	0	0
0,009	0	0	0	0	0
0,0107	0	0	0	0	0
0,0128	0	0	0	0	0
0,0152	0	0	0	0	0
0,0181	0	0	0	0	0
0,0215	0	0	0	0	0
0,0255	0	0	0	0	0
0,0304	0	0	0	0	0
0,0361	0,38	0	0,38	0	0,38
0,043	5,4	1,27	4,13	2,12	3,28
0,0511	6,71	6,18	0,53	6,6	0,11
0,0608	5,58	6,07	0,49	5,83	0,25
0,0723	4,88	5,76	0,88	5,25	0,37
0,0859	4,51	5,5	0,99	5,08	0,57
0,1022	4,44	5,34	0,9	5,22	0,78
0,1215	4,63	5,29	0,66	5,51	0,88
0,1445	5,01	5,32	0,31	5,8	0,79
0,1719	5,43	5,36	0,07	6,03	0,60
0,2044	5,69	5,32	0,37	6,27	0,58
0,2431	5,57	5,17	0,4	6,66	1,09
0,2891	5,03	4,91	0,12	7,24	2,21
0,3437	4,19	4,59	0,4	7,75	3,56
0,4088	3,25	4,17	0,92	7,63	4,38
0,4861	2,41	3,64	1,23	6,39	3,98
0,5781	1,84	3,09	1,25	4,55	2,71
0,6875	1,62	2,69	1,07	2,94	1,32
0,8176	1,74	2,48	0,74	1,88	0,14
0,9723	2,26	2,46	0,2	1,25	1,01
1,1562	3,25	2,63	0,62	0	3,25
1,375	4,44	2,87	1,57	0	4,44
1,6352	4,86	2,93	1,93	0	4,86
1,9445	3,83	2,6	1,23	0	3,83
2,3125	2,22	2,02	0,2	0	2,22
2,75	0,83	1,41	0,58	0	0,83
3,2703	0	0,93	0,93	0	0
3,8891	0	0	0	0	0
4,6249	0	0	0	0	0
5,5	0	0	0	0	0
6,5406	0	0	0	0	0

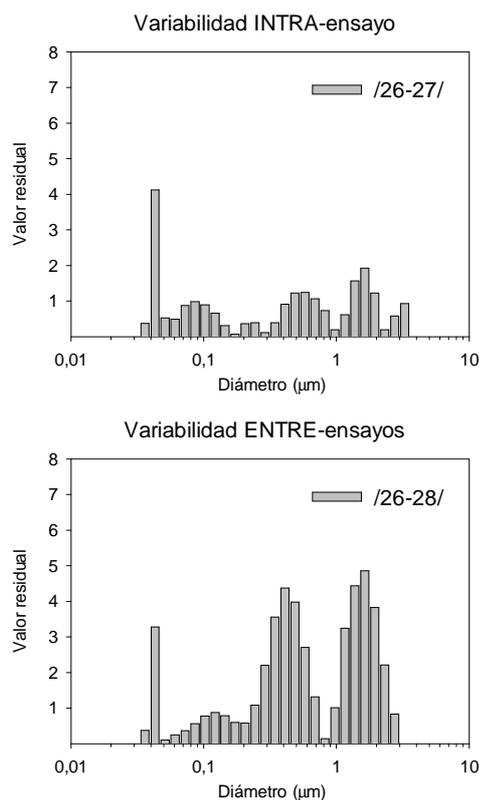


Fig.30: Gráficos de los valores residuales por canal para análisis de liposomas SPC sometidos o no a pH 2 durante 2 hs a 37°C. La variabilidad INTRA-ensayo corresponde a la diferencia entre dos lecturas PRE-tratamiento (nº 26 y 27). La variabilidad ENTRE-ensayo se ha obtenido mediante la diferencia entre una lectura PRE-tratamiento (nº 26) y otra POST-tratamiento (nº 28).

2. Se calcula la sumatoria de los valores residuales y se promedian las 9 sumatorias obtenidas (combinaciones de 3 x 3). Obviamente, los valores máximo y mínimo son los mismos que los indicados en el caso de la variabilidad INTRA-ensayo.

El promedio de las sumatorias es un indicador de la variabilidad por efecto del tratamiento, y debe compararse con el valor INTRA-ensayo. En el caso en que los valores INTRA-ensayo y ENTRE-ensayos no presenten diferencias significativas, no puede atribuirse al tratamiento ningún efecto sobre la distribución de tamaños de la población de liposomas.

A modo de ejemplo, la Tabla 6 presenta algunos resultados obtenidos con liposomas SPC a los que se ha expuesto 2 horas a 37°C a un pH 2. Se muestran los valores por canal

para dos lecturas PRE-tratamiento (Nº 26 y 27) y los valores residuales correspondientes a la resta por canal entre las lecturas Nº 26 y 27, con los que se calculará la variabilidad INTRA-ensayo. También se muestran los valores por canal de una lectura post-tratamiento (Nº 28) y los valores residuales correspondientes a la diferencia entre las lecturas Nº 26 y 28, que dará lugar a uno de los valores de la variabilidad INTRA-ensayos (el otro correspondería a la diferencia entre las lecturas Nº 27 y 28). En este ejemplo presentado se aprecia claramente que la variabilidad ENTRE-ensayos es mayor que la INTRA-ensayo, como se desprende de los gráficos de los valores residuales (Fig.30).

3.5.5. Solubilización de liposomas con Triton X-100 evaluada mediante espectrofotometría UV-visible

El objetivo principal de este ensayo fue hallar las condiciones de solubilización de las suspensiones de liposomas con TX-100, de modo tal que se transformen en soluciones ópticamente transparentes que permitan cuantificar el contenido de HPTS o de hierro. Para una concentración determinada de lípidos, las variables estudiadas han sido la concentración de tensioactivo, el tiempo y la temperatura.

3.5.5.1. PRINCIPIO

En el ensayo se miden, a una temperatura determinada, los cambios en la absorbancia en la región del visible de una suspensión de liposomas al añadirle una determinada cantidad de Triton X-100. Cuando la concentración del tensioactivo es suficiente, la absorbancia disminuye por la formación de estructuras más pequeñas que los liposomas, como las micelas mixtas. Las cinéticas de la interacción entre el tensioactivo y los liposomas (curvas "absorbancia vs. tiempo") se registran para cada una de las concentraciones de Triton X-100 empleadas hasta que la absorbancia resulta constante (estado estacionario). A partir de estas curvas se calcula la mínima concentración de tensioactivo que provoca una disminución de la absorbancia hasta el 2% del valor inicial, o bien hasta obtener una lectura por debajo del límite de detección ($\leq 0,01$ UA). Dicha concentración es la necesaria para solubilizar completamente los liposomas a una determinada concentración de lípidos y temperatura.

La longitud de onda elegida para la determinación fue 511 nm, máximo de emisión de la HPTS, lo cual asegura la ausencia de interferencias en la determinación de HPTS una vez que los liposomas son solubilizados con Triton X-100.

En cuanto al contenido de lípidos en las muestras, se han estudiado concentraciones generalmente por debajo de 1 mg/ml. Como las condiciones de solubilización también dependen del tipo de vesículas involucradas, se prepararon MLVs y SUVs de distintos diámetros para verificar que las condiciones halladas resultaran válidas en todos los casos.

3.5.5.2. REACTIVOS

- Soluciones Stock de Triton X-100 al 10% y 30% p/v en agua.
- Buffer T10 pH 7,4.

3.5.5.3. ENSAYOS PRELIMINARES

Para los estudios de solubilización se empleó un espectrofotómetro Varian UV-visible CARY 3Bio, provisto de 6 posiciones para muestras y 6 para referencias, cada una con termostatación variable y agitación magnética.

Los ensayos que debieron realizarse para fijar las condiciones iniciales para cada formulación de liposomas fueron los siguientes:

- Determinación de la concentración máxima de lípidos: se diluyó la suspensión de liposomas preparados en buffer T10 pH 7,4 (ver apartado 3.4.1.1.) hasta que su concentración proporcionara una absorbancia a 511 nm menor que 1. Esta fue la concentración de la muestra de partida.
- Determinación de la concentración mínima de Triton X-100: para ello se agregaron a la suspensión de liposomas incubada a una determinada temperatura, alícuotas variables de la solución de Triton X-100 30% p/v. Transcurridos 10 minutos tras cada adición, se leyó el valor de la absorbancia a 511 nm. Se estableció a qué nivel se obtenía un cambio significativo de dicha absorbancia respecto al valor inicial. Esta concentración de tensioactivo fue considerada la de partida para una formulación de fosfolípidos determinada.
- Determinación de la temperatura: en los casos en que no se evidenció una disminución de la absorbancia, aún en presencia de altas concentraciones de Triton X-100, se repitieron los ensayos anteriores aumentando la temperatura por encima de la T_m de los fosfolípidos de la muestra. Se obtuvo así la temperatura para realizar los estudios de solubilización.

3.5.5.4. PROCEDIMIENTO

Luego de los ensayos preliminares, se transfirieron 3 ml de la dilución de la muestra a cada una de las 6 cubetas que se ubicaron en las posiciones de las muestras y 3 ml de buffer a cada una de las 6 cubetas que se ubicaron en las posiciones de las referencias. Se dejó equilibrar a la temperatura seleccionada durante 10 minutos con agitación. Se agregaron alícuotas de la solución de Triton X-100 al 10 ó 30% p/v (según la formulación de liposomas), con un volumen máximo de 300 μ l. Se registraron curvas "Absorbancia a 511 nm vs. tiempo" fijando la adquisición de datos en los valores:

- SBW (ancho de banda)= 1 nm
- Average time (tiempo de lectura)= 0,4 s
- Dwell (tiempo que tarda en cambiar de una a otra celda)= 2 s
- Cycle (tiempo que tarda en regresar a la primera celda)= 60 s

Se continuó el monitoreo hasta obtener una absorbancia constante durante 5 minutos.

3.5.6. Incubación de liposomas con extracto de bilis: monitoreo mediante espectrofotometría UV-visible.

Este ensayo se realizó para estudiar la resistencia de los tres modelos de liposomas convencionales (SPC, HPSC y HSPC-Chol) a la solubilización con las sales biliares presentes

en el extracto de bilis porcina (EB). Los resultados del mismo permiten evaluar para distintas concentraciones de lípidos, qué tipo de estructura predomina para una concentración determinada de EB: liposomas, micelas mixtas u otras (ver apartado 1.3.1., Introducción). También resultó de interés, evaluar los efectos de distintas concentraciones de EB sobre las distintas formulaciones de liposomas, pero esta vez incubando en las condiciones de la digestión *in vitro*, es decir, durante 1 hora a 37°C.

3.5.6.1. PRINCIPIO

En este ensayo se miden los cambios en la absorbancia al visible de una suspensión de liposomas a medida que aumenta la concentración del extracto de bilis porcina (EB) empleado en los ensayos de digestión *in vitro*. Se omitió el agregado de pancreatina, que sí se realizaba en los ensayos de digestión, para evaluar exclusivamente el efecto de las sales biliares. Tal como se describiera para la solubilización con Triton X-100 (apartado 3.5.5.), se obtuvieron series de curvas "absorbancia vs. tiempo" para cada concentración lipídica variando la concentración del extracto de bilis.

3.5.6.2. REACTIVOS

- Soluciones acuosas de extracto de bilis: EB1 conteniendo 34 mg/ml; EB2 conteniendo 67 mg/ml; EB3 conteniendo 104 mg/ml. Las soluciones se preparan por disolución a 40°C.
- Buffer T10 llevado a pH 6,5.
- Diluciones de las suspensiones de liposomas en buffer T10 pH 6,5, preparadas con el objeto de estudiar el efecto del EB al mismo pH de la digestión *in vitro*.

3.5.6.3. ENSAYOS PRELIMINARES

Para los estudios de solubilización con EB se emplearon las mismas condiciones que las descritas en el apartado 3.5.5 (solubilización con Triton X-100) a excepción de la longitud de onda. En este caso, la longitud de onda elegida fue de 600 nm, buscando un compromiso entre la sensibilidad, que para las suspensiones de liposomas aumenta al disminuir la longitud de onda, y la interferencia del EB, el cual presenta un máximo de absorbancia a 412 nm.

Los ensayos que debieron realizarse para cada formulación con el objeto de fijar las condiciones iniciales fueron los siguientes:

- Determinación del rango de la concentración de lípidos: se prepararon diluciones a partir de liposomas preparados en buffer T10 pH 6,5 (ver apartado 3.4.1) tales que la absorbancia a 600 nm estuviera comprendida en el rango 0,2-1 UA.
- Determinación del rango de concentraciones de EB: a la serie de diluciones anteriores se agregaron alícuotas de alguna de soluciones de EB (EB1, EB2 o EB3 según el tipo de liposomas) de modo tal que produjeran una disminución significativa de la absorbancia a 600 nm respecto del valor inicial. A partir de esta concentración de EB, se estimaron las alícuotas adecuadas para completar el estudio a ambas concentraciones extremas.
- Determinación de la temperatura: en los casos en que no se evidenció una disminución de

la absorbancia aún en presencia de altas concentraciones de EB, se repitieron los ensayos anteriores aumentando la temperatura por encima de la T_m de los fosfolípidos de la muestra. Se obtuvo así la temperatura a la cual se realizarán los estudios de solubilización para cada formulación.

- Uso de referencias: para eliminar el efecto de la absorbancia del EB, como referencia de las muestras se utilizaron disoluciones de EB en buffer T10 pH 6,5 a la misma concentración que la muestra correspondiente. Previamente se verificó que las soluciones de referencia no experimentaran variaciones en la absorbancia a 600 nm a lo largo del tiempo y a la temperatura de trabajo en cada caso. Para esto se monitoreó la absorbancia a 600 nm de soluciones de EB en el rango de concentraciones de trabajo, empleando como referencia el buffer T10 a pH 6,5.

3.5.6.4. PROCEDIMIENTO

Luego de estos ensayos preliminares se transfirieron entre 2 y 3 ml de la dilución de la muestra a cada una de las 6 cubetas que se ubicaron en las posiciones de las muestras. Se agregó el mismo volumen de buffer a las 6 cubetas de referencia. Se dejó equilibrar a la temperatura seleccionada durante 10 minutos con agitación, tanto en las muestras como en las referencias. Se agregaron alícuotas de las soluciones EB1, EB2 y EB3 (según la formulación y la dilución de la misma), con volúmenes entre 10 μ l y 1.000 μ l, tanto a las muestras como a las referencias. Los rangos de concentraciones de EB en cubeta fueron los siguientes:

- Para SPC: 0-6 mg/ml
- Para HSPC: 0-15 mg/ml
- Para HSPC-Chol: 0-30 mg/ml

Para mantener una concentración de lípidos constante en las 6 celdas (con alícuotas de EB variables), se agregó agua destilada para llevar al mismo volumen final.

Se registraron curvas "Absorbancia a 600 nm vs. tiempo", hasta la obtención de una absorbancia constante durante 5 minutos.

3.5.6.5. ESTUDIOS A 37°C

Se procedió según lo descrito en 3.5.6.4. sólo que las muestras se incubaron durante 1 hora a una temperatura de 37°C, para evaluar el efecto del EB en las condiciones de la digestión *in vitro* tanto de concentración como de temperatura.

3.5.7. Evaluación de la pérdida de la HPTS encapsulada en liposomas por efecto del extracto de bilis a 37°C evaluada mediante fluorimetría.

Este ensayo permite monitorear el contenido de HPTS que permanece dentro de los liposomas luego de la incubación durante 1 hora a 37°C con diferentes concentraciones de EB.

3.5.7.1. PRINCIPIO

La determinación se realiza de forma análoga a la descrita en el apartado 3.3.3.3., es decir, midiendo la fluorescencia de la HPTS en el punto isobéptico antes y después del agregado de DPX. Como se ha descrito previamente, la disminución de la fluorescencia después del agregado del quencher es función de la cantidad de sonda que ha salido de los liposomas, que podría ser consecuencia de la incubación con EB. Debido a que la fluorescencia en el punto isobéptico depende de la concentración de la sonda y de la presencia de un quencher en el seno de la solución, la adición de DPX asegura que la fluorescencia obtenida proviene exclusivamente de la sonda remanente en el interior acuoso del liposoma, a una temperatura y fuerza iónica constantes.

La evaluación de la permeabilidad de los liposomas en presencia de EB se basa en la metodología explicada en el apartado 3.3.3.3., sin embargo presenta algunas diferencias significativas respecto a la misma. En primer lugar, las disoluciones de EB interfieren con la emisión de la HPTS ya que presentan fluorescencia y, además, también actúan como quencher de la sonda. En segundo lugar, la incubación de los liposomas con determinadas concentraciones de EB origina en ellos importantes cambios estructurales que modifican la dispersión de la luz inicial de las suspensiones. De esta manera, la luz detectada por el espectrofluorímetro puede estar afectada por estas alteraciones del tamaño de los liposomas. Ambos fenómenos hacen que sea necesaria una serie de correcciones a la hora de calcular el cociente entre la fluorescencia de las muestras con y sin DPX.

3.5.7.2. REACTIVOS

- Columnas de Sephadex G-25 en las que se haya verificado la ausencia de fluorescencia residual.
- Buffer T10 llevado a pH 6,5.
- Soluciones acuosas de extracto de bilis: EB1 conteniendo 34 mg/ml; EB2 conteniendo 67 mg/ml; EB3 conteniendo 104 mg/ml.
- Solución de DPX 200 mM.

3.5.7.3. ENSAYOS PRELIMINARES

En todos los casos, las condiciones instrumentales son las descritas en el apartado 3.3.3.3.

Debido a las propiedades detectadas en el EB, previamente al estudio de permeabilidad debieron realizarse los ensayos que se mencionan a continuación:

- Estudio de la fluorescencia intrínseca del EB: caracterización de la emisión del EB por excitación a 417 nm (punto isobéptico de la HPTS).
- Estudio del efecto de filtro interno del EB sobre la HPTS: se realizó mediante el agregado de alícuotas crecientes de EB a distintas concentraciones de HPTS.
- Evaluación del efecto del quencher DPX sobre el EB: se llevó a cabo mediante agregados de DPX a las concentraciones de EB empleadas.
- Evaluación de las posibles interferencias causadas por los liposomas: se efectuó midiendo dispersión de la luz causada por las mezclas de liposomas con EB con o sin agregado de DPX.

3.5.7.4. PROCEDIMIENTO

Los liposomas conteniendo HPTS se purificaron por SEC en Sephadex G-25 con buffer T10 pH 6,5 como eluyente. La fracción de liposomas, muestra M1, fue diluida en el mismo buffer hasta una concentración de lípidos de 0,40 mg/ml para liposomas SPC y HSPC, y de 0,22 mg/ml para liposomas HSPC-Chol, confirmando la concentración lipídica mediante el método de Stewart (apartado 3.3.1). Cada dilución se distribuyó en tubos conteniendo de 2 a 2,5 ml y se incubaron a 37°C. A cada serie de tubos se agregaron alícuotas crecientes de EB hasta concentraciones finales de 5 mg/ml para liposomas SPC y hasta 10 mg/ml para liposomas HSPC y HSPC-Chol. Se completó con agua destilada hasta un volumen final de 3 ml. De la misma forma se procedió con muestras de liposomas sin HPTS que luego fueron empleados como blancos del ensayo.

Luego de 60 minutos de incubación a 37°C, se transfirió cada disolución a una cubeta del espectrofluorímetro y se registró la fluorescencia al punto isobéptico durante aproximadamente 2 minutos. Luego se agregaron 150 µl de solución de DPX (dando lugar a una dilución de 3/3,15) y se continuó la adquisición hasta la obtención de un valor de fluorescencia estable. Se calculó el porcentaje fluorescencia residual (% F_R) como el porcentaje de fluorescencia al punto isobéptico luego del agregado de DPX respecto a la fluorescencia previa al agregado, según la siguiente expresión:

$$\% F_R = \left(\frac{(F_{DPX}^{HPTS} - F_{DPX}) * C_{DPX}^{FI}}{(F^{HPTS} - F) * C^{FI}} \right) * 100$$

En la cual:

- F^{HPTS} indica la fluorescencia de la muestra conteniendo HPTS;
- F indica la fluorescencia (dispersión y emisión de EB) del blanco correspondiente;
- C^{FI} corresponde al factor de corrección del efecto de filtro interno del EB en preparaciones sin DPX;
- F_{DPX}^{HPTS} indica la fluorescencia de la muestra conteniendo HPTS con agregado de DPX corregida por la dilución;
- F_{DPX} indica la fluorescencia del blanco correspondiente con agregado de DPX corregida por la dilución;
- C_{DPX}^{FI} corresponde al factor de corrección del efecto de filtro interno del EB en preparaciones con agregado de DPX.

Finalmente se obtuvieron gráficos “% Fluorescencia residual vs. concentración”.

3.5.8. Caracterización de liposomas mediante calorimetría de barrido diferencial (DSC).

Esta herramienta analítica se empleó con dos fines: determinar la desaparición de la transición gel sólido – cristal líquido en liposomas conteniendo colesterol y estudiar los posibles cambios de la transición de fase inducidos por la digestión *in vitro*. Las determinaciones mediante DSC se realizaron exclusivamente para formulaciones conteniendo lípidos saturados: HSPC y HSPC-Chol, ya que las bicapas compuestas por lípidos insaturados no proporcionan señal.

3.5.8.1. PRINCIPIO

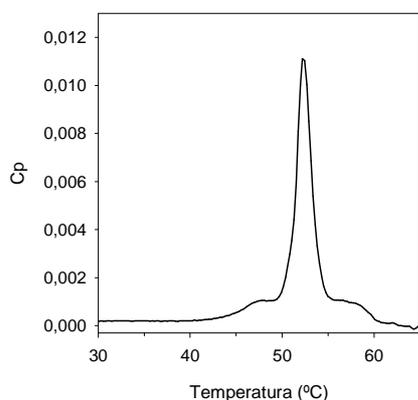


Fig.31: Termograma obtenido por DSC de una muestra de liposomas HSPC. Temperatura de transición: 52,2°C.

Un microcalorímetro de barrido diferencial (DSC) monitorea la absorción de calor por una muestra de liposomas, como consecuencia de una transición entre dos fases, mientras aumenta la temperatura. El equipo está provisto de una celda donde se ubica la muestra y una celda de referencia que contiene el medio de la muestra. A medida que transcurre el experimento ambas celdas son calentadas a una velocidad constante, de modo de ser mantenidas a la misma temperatura, monitoreándose la diferencia de calor entregada entre ambas. Cuando ocurre una transición de fase endotérmica, para que la temperatura sea la misma en las dos celdas la cantidad de calor entregada a la celda de la muestra

debe ser superior a la aportada a la celda de referencia. Este calor adicional es registrado como una señal que es convertida a un gráfico del cambio de la capacidad calorífica en función de la temperatura o termograma, como el que se presenta en la Fig.31.

Matemáticamente, el proceso se puede expresar mediante las siguientes ecuaciones:

$$\frac{\text{calor}}{\Delta \text{tiempo}} = \frac{q_{\text{muestra}} - q_{\text{referencia}}}{\Delta t} = \frac{q}{\Delta t} = \text{flujo de calor en la celda de muestra}$$

$$\frac{\text{incremento de temperatura}}{\text{tiempo}} = \frac{\Delta T}{\Delta t} = \text{velocidad de calentamiento}$$

$$\frac{q/\Delta t}{\Delta T/\Delta t} = \frac{q}{\Delta T} = C_p = \text{capacidad calorífica}$$

Donde $q/\Delta t$ es el flujo de calor aportado a, o cedido por la muestra y $\Delta T/\Delta t$ es el incremento de temperatura por unidad de tiempo, es decir la velocidad de calentamiento. El cociente entre $q/\Delta t$ y $\Delta T/\Delta t$, proporciona el calor dividido por el incremento de temperatura,

que es la capacidad calorífica de la muestra en el rango de temperaturas considerado (C_p). Instrumentalmente se registran los cambios de C_p en función de la temperatura de la celda.

Para transiciones de primer orden, como las transiciones gel sólido – cristal líquido de las vesículas lipídicas, la temperatura de transición (T_m) es aquella en la que el cambio en la capacidad calorífica (ΔC_p) alcanza su máximo. Como se ha explicado previamente (apartado 1.5.2. Introducción), tanto la T_m como la anchura de la señal son parámetros característicos de una formulación liposomal, teniendo influencia su composición lipídica y características estructurales como su tamaño y lamelalidad. En la Fig.32 se muestra un ejemplo de barrido calorimétrico para una muestra de liposomas HPSC preparados según lo descrito en el apartado 3.4.3. El máximo de la ΔC_p se obtiene para una temperatura de 52,2°C, que es la temperatura de transición de las bicapas lipídicas que componen la muestra de liposomas.

3.5.8.2. PROCEDIMIENTO

Se empleó un Microcalorímetro de barrido diferencial Microcal MC-2 (Northampton, MA, USA).

Las muestras de liposomas HSPC y HSPC-Chol conteniendo únicamente buffer T10 pH 7,4 fueron preparadas según lo descrito en el apartado 3.4.1. Se diluyeron alícuotas de las preparaciones en el buffer hasta una concentración aproximada de lípidos de 2 mg/ml y se inyectaron en la celda del DSC evitando la incorporación de burbujas. Se analizaron entre 25 y 80°C a una velocidad de calentamiento de 90°C/hora. Los termogramas se registraron por triplicado, empleando los correspondientes al buffer como blanco. Los datos fueron exportados a un programa de cálculo y se obtuvieron gráficos " ΔC_p vs. temperatura".

3.5.9. Determinación de formas liso de fosfolípidos por RMN de ^{31}P en fase orgánica.

Esta determinación se realizó para evaluar la estabilidad química de las formulaciones liposomales frente a la digestión *in vitro*, mediante la cuantificación de las formas liso que se originan por degradación de los fosfolípidos.

3.5.9.1. PRINCIPIO

La lisofosfatidilcolina (LPC) es el mayor producto de hidrólisis de la fosfatidilcolina (PC) en el cual se ha perdido una de las dos cadenas de ácidos grasos por desesterificación. Durante las digestiones *in vitro*, la hidrólisis podría desencadenarse por efecto del pH ácido o bien por la acción de la fosfolipasa A, presente en la pancreatina. Por lo tanto ambas etapas de la digestión *in vitro* podrían promover la aparición de formas liso a partir de los fosfolípidos que forman los liposomas. Como ya ha sido estudiado, elevadas concentraciones de formas liso inestabilizan los liposomas, que finalmente pueden transformarse en micelas (Van Echteld, 1981).

Uno de los métodos para cuantificar el contenido de lisofosfolípidos es la cromatografía líquida de alta performance (HPLC), pero tiene algunas desventajas. La más importante, ya que puede ser fuente de errores en la cuantificación, es el hecho de que en

los fosfolípidos naturales es difícil relacionar el área de la señal con la cantidad absoluta de formas liso. Esto ocurre porque la absorptividad del fosfolípido cambia con el número de insaturaciones, y no puede asegurarse que después de la hidrólisis, este número no haya variado, ya que depende de qué cadena de ácidos grasos haya quedado retenida. Otro método disponible es la cromatografía en capa delgada (TLC), aunque los resultados obtenidos son cualitativos o a lo sumo semi-cuantitativos. En consecuencia, se prefieren los métodos que permitan la detección y cuantificación a través del grupo fosfato.

En este trabajo se aplicó el método de Meneses y Glonek, que consiste en una extracción de los fosfolípidos y de sus formas liso a partir de una muestra de liposomas, seguida del análisis de ambos tipos de sustancias por resonancia magnética nuclear empleando una sonda para el núcleo ^{31}P (Meneses y Glonek, 1988). En un experimento de RMN de ^{31}P de fosfolípidos, la posición o desplazamiento químico depende fundamentalmente de la naturaleza de la cabeza polar del fosfolípido y del número de cadenas de ácidos grasos. De este modo, por ejemplo, se obtiene una señal para PC y otra para LPC, habiéndose demostrado que en ciertas condiciones éstas se separan de señales provenientes de otros fosfolípidos y sus formas liso (Glonek, 1998). Por lo tanto, un parámetro clave para la cuantificación es obtener una buena resolución en el espectro, para lo cual se emplean reactivos específicos en la preparación de la muestra. Por un lado la extracción en presencia del complejante EDTA, permite la remoción de cationes polivalentes que interfieren en la determinación. Además, el empleo del reactivo conteniendo cesio (cloroformo-metanol-Cs-EDTA), formaría un complejo de coordinación con el fosfato del fosfolípidos que, prevaleciendo sobre otras interacciones, produciría un estrechamiento de la señal, que es lo que se observa en los experimentos.

Cabe aclarar que el grado de hidrogenación de las cadenas acíclicas de los ácidos grasos no influye en la señal obtenida en RMN de fósforo, por lo tanto se obtiene el mismo desplazamiento químico para SPC que para HSPC.

3.5.9.2. REACTIVOS

- Reactivo EDTA-K 0,4 M pH 6: pesar 11,69 g de EDTA y disolver en unos 40 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6 con solución saturada de KOH y llevar a un volumen de 100 ml.
- Reactivo EDTA-Cs-metanol 0,2 M pH 6: pesar 5,845 g de EDTA y disolver en unos 40 ml de agua destilada. Ajustar el pH a 6 con solución saturada de CsOH y llevar a un volumen de 100 ml. Mezclar 1 ml de esta solución con 4 ml de metanol por cada 5 ml de reactivo a preparar.
- Cloroformo p.a.
- Metanol p.a.

3.5.9.3. PROCEDIMIENTO

Se transfirió 1 ml de muestra de liposomas (antes o después de ser digeridos) a un frasco de vidrio con tapa de teflon. Se agregó 1 ml de reactivo EDTA-K 0,4 M pH 6, 2 ml de CHCl_3 y 4,2 ml de metanol, y se agitó durante 30 minutos a temperatura ambiente en el

frasco cerrado. Se agregaron 2 ml de agua y 2 ml de CHCl_3 y se dejó separar las dos fases durante unos minutos. La fase superior (acuosa) fue descartada y la fase remanente (clorofórmica) llevada a sequedad con nitrógeno. Al residuo seco se agregaron 0,8 ml de CHCl_3 y 0,2 ml de CDCl_3 y se agitó con vórtex. Finalmente se agregó 1 ml del reactivo EDTA-Cs-metanol 0,2 M pH 6 y se mantuvo a -20°C hasta el análisis.

Los espectros RMN fueron adquiridos en un espectrómetro Bruker ARX-400 operando a 161.98 MHz para ^{31}P , empleando un magneto de 9,4 T y una sonda QNP sintonizada a la frecuencia de resonancia del fósforo. La temperatura se mantuvo a $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ mediante una unidad de estabilización Bruker VT-2000. Las muestras se colocaron en tubos de RMN de 5 mm y se hicieron girar a 20 Hz. Los espectros ^{31}P -NMR se registraron con desacoplamiento protónico de banda ancha, que se logró mediante una secuencia de pulsos compuesta Waltz-16 aplicada durante la adquisición de la señal. Los valores de desplazamiento químico se obtuvieron fijando la señal de PC a -0.84 ppm, según lo descrito por Glonek.

Las condiciones de adquisición fueron las siguientes: una secuencia formada por un pulso de radiofrecuencia para ^{31}P de $3,3 \mu\text{s}$ de duración (60°), seguido por la adquisición de la señal, y un intervalo de recuperación entre ciclos de 2 seg. La señal es el resultado de la acumulación de 256 barridos, más 2 barridos descartados al inicio de la adquisición para conseguir condiciones de estado estacionario. El tiempo de adquisición de cada barrido fue de 1,36 seg. El ancho de banda espectral irradiado fue de 6024,1 Hz (37,2 ppm) y la FID se digitalizó con 8.192 puntos complejos. El tiempo total de adquisición por espectro fue aproximadamente de 15 minutos.

Los espectros fueron procesados y analizados empleando el software XWinNMR v.3.1 (Bruker Analytik GmbH, Alemania) en una estación de trabajo SGI Indigo-2 (SGI, USA). La fase de cada señal se corrigió empleando la corrección automática de orden cero provista por el software. Las señales de fosfolípidos y lisofosfolípidos se integraron y el porcentaje de cada sustancia se obtuvo por normalización de áreas. Las señales de PC y LPC se integraron y el porcentaje de LPC se obtuvo por normalización de áreas.

3.5.10. Determinación del potencial Z

Esta determinación se realizó, por un lado, para caracterizar los liposomas CHI y HSPC/DC-Chol y verificar su carga neta positiva, aún después de la separación mediante SEC. Esta carga superficial favorecería su interacción con la mucina presente en la superficie apical de las células intestinales empleadas para la evaluación de la absorción de hierro. Por otro lado, se empleó como herramienta en la puesta a punto de los métodos preparativos y separativos para liposomas CHI.

3.5.10.1. PRINCIPIO

Físicamente, una partícula cargada altera la distribución de iones en el medio que la rodea. Por ejemplo, si está cargada negativamente, genera a su alrededor una capa de cationes, que se conoce como doble capa eléctrica y que, en mayor o menor grado,

acompaña a la partícula en sus movimientos. Esta bicapa está formada por una región interna o capa de Stern, en la cual los iones están unidos fuertemente, y una región difusa, donde la fuerza de interacción es menor y existe un intercambio de iones con el seno de la solución. El potencial Z es el potencial existente en el denominado "plano de cizalla", situado prácticamente al final de la capa de Stern, y que se caracteriza porque en su interior están situadas las moléculas de agua que se desplazan conjuntamente con la vesícula. El potencial Z puede ser negativo o positivo, según la carga neta de la partícula, y depende principalmente del pH y de la conductividad dada por la concentración de iones del medio. Por lo tanto, para interpretar un valor de potencial Z deben estar definidas las condiciones en las que fue adquirido.

Como consecuencia de todo esto, el potencial Z resulta un buen índice de la magnitud de la interacción entre partículas en un medio determinado, pudiendo ser empleado para optimizar la formulación de suspensiones y emulsiones, y para predecir su estabilidad.

3.5.10.2. PROCEDIMIENTO

Se empleó un equipo Zetasizer 4, Malvern Instruments Ltd.; Worcestershire, UK). El equipo fue verificado mediante el análisis de partículas de látex con un potencial Z conocido.

Las muestras de liposomas debieron ser diluidas antes de la medición en agua MilliQ para proporcionar una señal que estuviera dentro del rango recomendado por el fabricante. De este modo los liposomas CHI y HSPC/DC-Chol, y las soluciones conteniendo quitosano requirieron una dilución 1/1.000 v/v.

Cada muestra se midió por triplicado con un tiempo de adquisición de 3 minutos. Se registraron los valores de Potencial Z, de anchura (width), que es una medida de la dispersión de la distribución de potenciales de la muestra, y de KCps (kilocuentas por segundo) que representa la señal que se origina en el detector.

3.5.11. Microscopía confocal

La microscopía confocal permitió visualizar interacciones entre liposomas y células Caco-2 *in situ*, sin necesidad de manipular las células, lo cual podía alterar su morfología. Se observó la posible interacción de liposomas HSPC-Chol y CHI conteniendo HPTS con los cultivos celulares. Estos ensayos se realizaron en el Servicio de Microscopía de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB).

3.5.11.1. PRINCIPIO

El microscopio confocal es un microscopio óptico que incorpora dos diafragmas: un diafragma de iluminación, generalmente de tamaño invariable y localizado tras la fuente luminosa, y un diafragma de detección, de tamaño variable, situado delante del fotodetector. La utilidad de este diafragma de detección es eliminar la luz proveniente de planos superiores e inferiores al plano focal, aumentando con ello la claridad y resolución de la imagen correspondiente al plano seleccionado. Esta capacidad de obtener secciones ópticas,

es la característica principal y exclusiva del microscopio confocal. La obtención de secciones ópticas de mayor o menor espesor está determinada por una combinación entre el diámetro del diafragma de detección, la apertura numérica del objetivo y de la longitud de onda de la luz utilizada.

A continuación se describe su funcionamiento en forma simplificada. Un haz de láser es dirigido a un punto concreto del plano focal. La luz reflejada por la muestra o la fluorescencia emitida, es dirigida y captada por un fotodetector, una vez que atraviesa el diafragma y un prisma que descompone la luz emitida en un espectro de longitudes de onda. Delante de cada fotodetector se incorpora una rendija que selecciona el rango del espectro deseado, permitiendo ajustar la detección a voluntad para cada experimento. La imagen focal se obtiene tras rastrear la muestra con el láser (*scanning*). Las imágenes obtenidas son siempre imágenes digitales: Los fotodetectores transforman la señal lumínica en una señal eléctrica que mediante el sistema informático acoplado, se traduce en un píxel. Cada píxel proporciona información referente a la localización tridimensional del punto excitado, así como la intensidad lumínica de dicho punto.

Una de las principales aplicaciones de la microscopía confocal es la expresión y localización de moléculas en dos o tres dimensiones permitiendo reconstrucciones tridimensionales, tanto de cultivos celulares, como de preparados histológicos. En el caso de cultivos celulares, la observación no requiere ningún tratamiento previo de la muestra, que usualmente es fuente de artefactos en los resultados obtenidos.

3.5.11.2. PROCEDIMIENTO

Se empleó un microscopio óptico láser confocal LEICA TCS 4D (Leica, Heidelberg, Alemania), con una resolución de 0,2 μm y dos longitudes de onda de excitación: 488 y 568 nm. La detección se realizó mediante una ventana en el rango 500-530 nm.

Las células Caco-2 fueron sembradas en placas especiales para microscopía confocal e incubadas entre 12 y 15 días según lo descrito en el apartado 3.4.8.

Se prepararon liposomas HSPC-Chol incorporando HPTS a una concentración de 10 mM. Se separaron mediante SEC en Sephadex G-25 empleando buffer UPTAKE como eluyente para obtener la fracción de liposomas M1. Se agregó 1 ml de M1 a una placa de células Caco-2, previamente lavadas 2 veces con buffer UPTAKE para eliminar la fluorescencia proveniente del medio de cultivo, y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se volvió a lavar dos veces con buffer UPTAKE para eliminar la sonda no asociada a las células, encapsulada en liposomas o libre, descartando el sobrenadante de la incubación y los lavados. Se registraron imágenes de distintos campos y a diferentes planos en el eje z.

También se prepararon liposomas CHI conteniendo FeAA 1:2 con el agregado de HPTS a una concentración final de 2 mM. Los liposomas (M0) se separaron mediante SEC en Sephadex G-25 empleando AA 0,48 M como eluyente para obtener la fracción de liposomas (M1). Se agregó 1 ml de M1 a una placa de células Caco-2, previamente lavadas 2 veces con buffer UPTAKE, y se incubó durante 1 hora a 37°C. Se volvió a lavar dos veces con buffer UPTAKE y se procedió a la observación.

Como blanco para la evaluación de la autofluorescencia de las células, una de las placas fue lavada dos veces con buffer UPTAKE, incubada durante 1 hora a 37°C en 1 ml del mismo buffer y nuevamente lavada dos veces. El cero de intensidad de la fluorescencia se ajustó con respecto a la intensidad proveniente de estas células blanco, cuya fluorescencia intrínseca era muy baja.

3.6. MÉTODOS MATEMÁTICOS

3.6.1. Diseño multifactorial de experimentos

Este procedimiento se empleó para optimizar la preparación de liposomas convencionales (SPC, HSPC y HSPC-Chol) mediante homogeneización a alta presión, con el objeto de obtener la mayor información posible realizando un número mínimo de experimentos.

3.6.1.1. PRINCIPIO

El diseño multifactorial empleado en el presente trabajo está basado en el libro de Deming y Morgan (1987). Para comenzar, se elige un modelo empírico para el estudio de la optimización de la preparación de los liposomas. Según un modelo de este tipo, los datos experimentales permiten obtener una ecuación que describe en forma aproximada el comportamiento del sistema. Es decir, el objetivo no es estudiar el sistema en profundidad, sino predecir su comportamiento.

Cuando se realiza un análisis empírico de un sistema afectado por varios factores o variables, no es necesario mantener uno constante mientras se varía el resto, sino que es posible variar todos simultáneamente, y mediante un análisis matemático, hallar los parámetros que mejor se ajusten a los datos experimentales, para obtener las ecuaciones que caracterizan al sistema. Este procedimiento es lo que se conoce como diseño factorial.

Muchos modelos empíricos son del tipo lineal. Esto significa que las ecuaciones que predicen el comportamiento de los sistemas son polinomios compuestos por términos aditivos que incluyen constantes y variables. Uno de los polinomios más empleados para describir un sistema con dos variables (x e y) es el correspondiente al modelo polinómico de segundo orden, que se muestra en la *Ecuación 1*.

$$z = b_0 + b_{1x}x + b_{1y}y + b_{2x}x^2 + b_{2y}y^2 + b_{xy}xy + r \quad \text{Ec.1}$$

Donde b_0 corresponde al valor de z cuando las variables x e y se encuentran en el nivel cero; b_j indica que se trata de la constante i correspondiente a la variable j , y r se denomina el residual de la ecuación, un término que tiene en cuenta tanto el error experimental como la falta de ajuste del modelo.

El empleo de este polinomio supone que el sistema puede describirse como una combinación de los siguientes tipos de función:

- Lineal o interacción de primer orden, representada por las siguientes ecuaciones:

$$z = b_0 + b_{1x}x \quad \text{ó} \quad z = b_0 + b_{1y}y$$

- Cuadrática o interacción de segundo orden, representada por las siguientes ecuaciones:

$$z = b_{2x}x^2 \text{ ó } z = b_{2y}y^2$$

- Cruzada, representada por la siguiente ecuación:

$$z = b_{xy}xy$$

La solución de la *Ecuación 1* requiere un número suficiente de ecuaciones independientes a partir de las cuales se obtienen los valores de las constantes b_{ij} . Por lo tanto, una vez elegidos los factores que se quieren variar, se pueden realizar n experimentos con diferentes combinaciones de niveles de cada factor, y así obtener una serie de relaciones en las cuales las incógnitas son las constantes b_{ij} .

$$z_1 = b_0 + b_{1x}x_1 + b_{1y}y_1 + b_{2x}x_1^2 + b_{2y}y_1^2 + b_{xy}x_1y_1 + r_1$$

$$z_2 = b_0 + b_{1x}x_2 + b_{1y}y_2 + b_{2x}x_2^2 + b_{2y}y_2^2 + b_{xy}x_2y_2 + r_2$$

Y así sucesivamente hasta obtener n ecuaciones:

$$z_n = b_0 + b_{1x}x_n + b_{1y}y_n + b_{2x}x_n^2 + b_{2y}y_n^2 + b_{xy}x_ny_n + r_n$$

La obtención de las constantes b_{ij} , una vez realizados estos n experimentos y obtenidos por lo tanto los valores experimentales de $z_1 \dots z_n$, es rápida mediante un programa que realice este tipo de cálculos. El paso siguiente es ver qué experimentos realizar para el ajuste deseado y determinar si el mismo es lo suficientemente bueno.

3.6.1.2. DISEÑO EXPERIMENTAL

Cada diseño factorial se caracteriza por un número mínimo de experimentos independientes, que consisten en combinaciones entre las variables a distintos niveles. Para minimizar los errores y aumentar la precisión, los niveles se fijan en forma equidistante y centrados con el origen. El rango en el cual se mueve cada variable lo fija el investigador, según su conocimiento del sistema, y luego las mediciones se realizan en los puntos equidistantes distribuidos en ese rango.

Los diseños más empleados para sistemas de dos variables son: el de 2 niveles (cuadrado), el de 3 niveles (estrella), y el compuesto (cuadrado + estrella). En el de 2 niveles sólo se realizan experimentos a dos niveles para cada variable. El número mínimo de experimentos (f) para obtener las soluciones del sistema de ecuaciones está dado por la relación $f = m^k$, donde m indica el número de niveles de las variables y k el número de variables involucradas. Por lo tanto f será igual a $2^2=4$. Las combinaciones entre x e y son las representadas en la Fig.32 (izquierda).

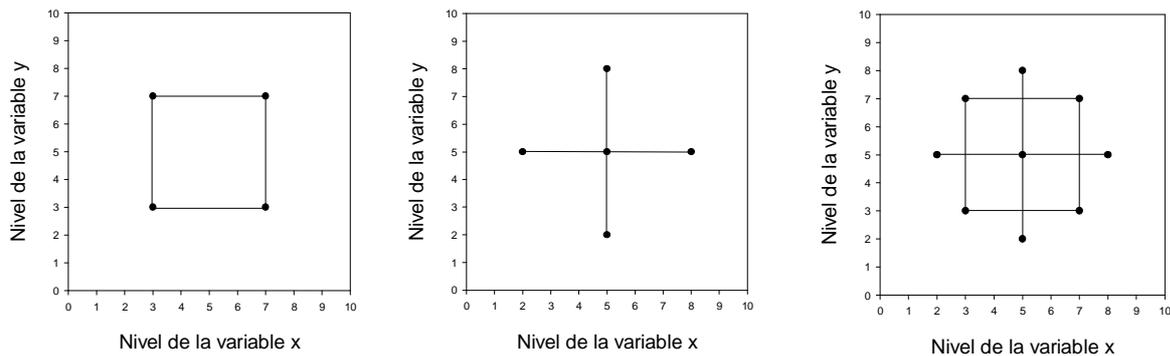


Fig.32: Combinaciones de variables para un diseño cuadrado de 2 niveles con 2 variables (izquierda); para un diseño estrella de 3 niveles con 2 variables (centro) y para un diseño compuesto central "cuadrado + estrella" con 2 variables (derecha).

Por lo tanto, si se estudia el rango comprendido entre 3 y 7, los 4 ensayos que se realizarán corresponderán a combinaciones (nivel de x : nivel de y) iguales a: (3:3), (3:7), (7:3) y (7:7). Para este diseño, el modelo lineal que más se ajusta al conjunto de resultados obtenidos es $z = b_0 + b_{1x}x + b_{1y}y + b_{xy}xy + r$. Por lo tanto, se estudian los efectos de primer orden y el cruzado.

Para estimar los efectos de segundo orden en sistemas con k variables, se emplean los diseños en estrella, que proporcionan $f = 2k + 1$ combinaciones de variables. Para el caso de 2 variables, $f = 2 \cdot 2 + 1 = 5$, y el modelo lineal que más se ajusta incluye términos de primer y segundo orden: $z = b_0 + b_{1x}x + b_{1y}y + b_{2x}x^2 + b_{2y}y^2 + r$. Las combinaciones entre x e y son las representadas en la Fig.32 (centro).

El diseño compuesto es el resultado de la unión de los dos modelos anteriores. En el caso en que los centros coinciden se denomina compuesto centrado. En la Fig.32 (derecha), los puntos muestran las posiciones de los experimentos en el caso de un sistema con 2 variables. Este tipo de diseño permite obtener los parámetros de polinomios completos de segundo orden como el presentado en la Ecuación 8. El número mínimo de experimentos (f) aconsejado en este caso está dado por la relación $f = 2^k + 2k + 1$, con lo cual para $k=2$ (2 variables) se deberán realizar 9 experimentos.

3.6.1.3. EVALUACIÓN DEL MODELO

Una vez elegido el diseño experimental, obtenidas las respuestas experimentales del sistema y hallados los parámetros de la ecuación empírica propuesta, se obtienen superficies de respuesta que permiten interpolar valores no estudiados para combinaciones de las variables y predecir el comportamiento del sistema en un nuevo punto.

Pero aún resta establecer procedimientos que indiquen si los resultados son aceptables. En primer lugar debe determinarse en qué grado las variables estudiadas tienen influencia en las respuestas del sistema, es decir, si existe una relación entre el nivel de una

variable y el correspondiente nivel de la respuesta observada. Si se cumple lo anterior, a continuación cabe preguntarse si el modelo matemático elegido es el más adecuado, de manera que sus predicciones no se alejen demasiado de los resultados experimentales.

La primera cuestión se evalúa mediante la determinación del coeficiente de determinación múltiple (R^2) y/o su raíz cuadrada, el coeficiente de correlación múltiple (R). R^2 , que varía entre 0 y 1, cuantifica la influencia de las variables incluidas en el modelo matemático en las respuestas experimentales observadas. Cuando R^2 se aproxima a 0, no puede afirmarse que las variables del modelo expliquen la respuesta. Lo contrario sucede en el caso en que su valor sea próximo a 1.

Para responder al segundo interrogante se valora la falta de ajuste del modelo elegido, comparando sus predicciones con el error experimental propio del sistema. Esto requiere necesariamente la introducción de replicados, preferentemente repartidos por igual en el rango estudiado (aunque una alternativa posible es realizar un triplicado en los puntos correspondientes al punto central de la estrella). Para una combinación de variables determinada, el error experimental está dado por la diferencia entre los valores experimentales obtenidos y su media, mientras que la falta de ajuste del modelo está representada por la diferencia entre esta media experimental y el valor que predice el modelo. Para esta evaluación se emplea el análisis de la varianza (Anova) para modelos lineales, debiendo obtenerse la varianza para cada una de las dos diferencias mencionadas anteriormente. Si el cociente entre ambas no supera un valor crítico tabulado (test de significación del modelo), el modelo es estadísticamente correcto. En este caso las diferencias entre sus predicciones y las medias experimentales correspondientes se justifican plenamente por el error experimental. En caso contrario, la respuesta prevista por el modelo matemático propuesto se aleja más de lo que es justificable por el error experimental.

Cabe destacar que en algunos casos, en que los errores experimentales son muy pequeños, este test puede llevar a rechazar el modelo por su imprecisión. En estos casos es el experimentador quien debe juzgar si estas diferencias afectan desde un punto de vista práctico a su trabajo. Así por ejemplo, podría ser que en determinadas condiciones un modelo predijera una encapsulación de un fármaco en liposomas del orden del 15 %, mientras que los resultados experimentales proporcionaran una media de 18 ± 1 %. Esta diferencia puede resultar irrelevante a efectos prácticos y también en el caso en que, para el resto de condiciones de trabajo, el modelo continúe dando valores próximos a las medias experimentales. Por lo tanto, aunque el test de significación del modelo pueda indicarnos que el elegido no es el más apropiado, las circunstancias particulares pueden indicarnos lo contrario (Deming, 1987).

Los estadísticos que se calcularon para validar el modelo fueron F_{regr} y F_{mod} . Estos valores calculados a partir de los datos de las superficies de respuesta, deben compararse con un valor tabulado de la distribución de Fischer (F_{crit}), a un nivel de significación determinado y teniendo en cuenta los grados de libertad en cada caso. Se considera que el modelo explica el comportamiento del sistema si se cumplen las siguientes condiciones:

$F_{\text{regr}} > F_{\text{crit}}$ (en este caso los factores explican los cambios en el sistema)

$F_{\text{crit}} > F_{\text{mod}}$ (en este caso las diferencias entre la previsión del modelo y el valor del sistema se explican por la variabilidad del propio sistema)

3.6.1.4. SELECCIÓN DE LAS VARIABLES

De las posibles variables que *a priori* pueden afectar las características de las formulaciones de liposomas obtenidas por homogeneización a alta presión, se eligieron dos para realizar los experimentos a distintos niveles. Habiendo establecido un proceso por lotes, las variables seleccionadas (pares x,y) fueron el número de ciclos y la presión de entrada. El resto de los factores se mantuvo constante: la temperatura, la concentración de lípidos y la fuerza iónica del medio. La respuesta (z) del sistema a la variación de estas variables se evaluó mediante el análisis del diámetro medio obtenido por el analizador de partículas y el volumen incorporado. Los niveles de las variables elegidas se distribuyeron de acuerdo a un diseño de cuadrado centrado con estrella, realizando triplicados en todos los puntos de la estrella.

3.6.1.5. PROCEDIMIENTO

Se obtuvieron suspensiones de MLVs según lo descrito en el apartado 3.4.2. con una concentración final de lípidos de 25 mg/ml y de HPTS de 2 mM en buffer T10.

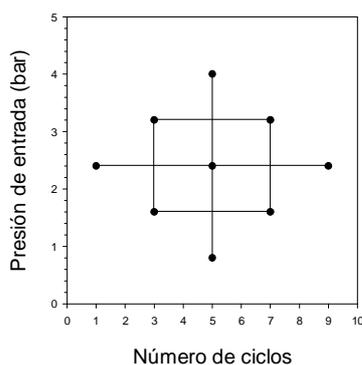


Fig.33: Combinación de variables en un diseño compuesto central con 2 variables (cuadrado + estrella).

Se fijaron los rangos de variación de las variables seleccionadas: el número de ciclos varió entre 1 y 9, y la presión de entrada entre 0,8 y 4 bar. El diseño de cuadrado centrado con estrella empleado se muestra en la Fig.33.

Los liposomas SPC fueron homogeneizados a alta presión en un Microfluidizer 110S según este diseño a temperatura ambiente, mientras que los HSPC y HSPC-Chol fueron procesados a 55°C.

Sobre las suspensiones de liposomas obtenidas, se realizaron los siguientes ensayos que dieron lugar a las respuestas del sistema:

- Determinación del diámetro medio por espectroscopía (apartado 3.5.4.).
- Determinación del volumen acuoso interno (apartado 3.5.1.): mediante purificación de liposomas por SEC en Sephadex empleando buffer T10 como eluyente (apartado 3.4.5.), y cuantificación, en la fracción M1 obtenida, de la HPTS por fluorimetría (apartado 3.3.3.2.) y de los fosfolípidos por el método de Stewart (apartado 3.3.1.).

Los valores de volumen acuoso interno y diámetro medio obtenidos para cada par de variables (número de ciclos, presión de entrada) se ingresaron en el programa SYSTAT 50. Se fijó como modelo un polinomio de segundo orden como el de la *Ecuación 8* y el programa calculó los coeficientes b_{ij} que mejor caracterizaran la superficie experimental. A partir de ellos se obtuvieron las superficies de respuesta "diámetro medio vs. presión vs. ciclos" y "volumen interno vs. presión vs. ciclos" para las tres formulaciones de liposomas convencionales. Finalmente se obtuvo el coeficiente de determinación múltiple (R^2), el de correlación múltiple (R) y los factores que permitieron decidir si el ajuste era adecuado o no.

4. RESULTADOS

4.1. RESULTADOS DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS

4.1.1. Estudio de interferencias en la cuantificación de fosfolípidos mediante el método de Stewart

Previamente a la aplicación de este ensayo para el cálculo del volumen incorporado en liposomas conteniendo HPTS, se verificó que la sonda no interfiriera en la cuantificación de fosfolípidos mediante el método de Stewart. Para llevar a cabo esta evaluación se prepararon soluciones acuosas conteniendo 100 y 500 μM de HPTS en buffer T10, y liposomas HSPC preparados con o sin HPTS 2 mM. Las muestras fueron tratadas según lo descrito en el apartado 3.3.1. y cuantificadas mediante una curva de calibración preparada con alícuotas crecientes de una solución de HSPC en cloroformo 1,5 mg/ml (Fig.34). La Tabla 7 muestra los resultados obtenidos.

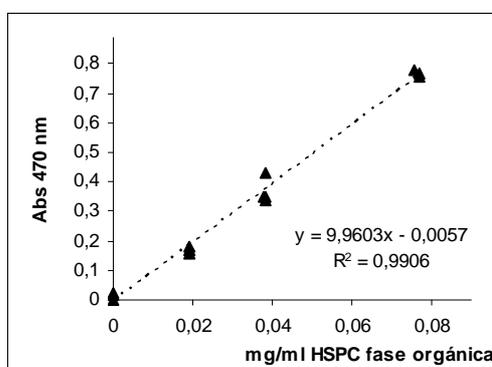


Fig.34: Curva de calibración ($n=3$) para distintas concentraciones de HSPC obtenida mediante el ensayo de Stewart (apartado 3.3.1.).

Tabla 7: Evaluación de la interferencia de HPTS en la determinación de fosfolípidos mediante el ensayo de Stewart ($n=3$). Se muestran las concentraciones halladas para distintas muestras a partir de la curva de calibración de la Fig.20.

Muestra	Concentración HSPC extrapolada (mg/ml)
Blanco	0,059 \pm 0,019
HPTS 100 μM sin HSPC	0,051 \pm 0,001
HPTS 500 μM sin HSPC	0,054 \pm 0,003
Liposomas HSPC sin HPTS	17,17 \pm 3,25
Liposomas HSPC con HPTS	15,70 \pm 0,93

Se observa que la sonda fluorescente agregada a la máxima concentración a la que podría estar presente en un ensayo de Stewart (500 μM) no interfiere en la concentración de HSPC calculada, obteniéndose un nivel similar al blanco. También se obtienen valores similares para suspensiones de liposomas conteniendo o no HPTS. Se concluye de este experimento que la sonda fluorescente no interfiere en el ensayo de Stewart.

4.1.2. Estudio de interferencias y rango lineal en la determinación de HPTS

En este apartado se describen los estudios que se realizaron para establecer las condiciones de trabajo en los ensayos de fluorescencia con HPTS. De este modo se halló el rango lineal para la cuantificación de HPTS, en solución o incorporada a liposomas, a distintas longitudes de onda y se determinaron las interferencias causadas por el extracto de sales biliares (EB).

4.1.2.1. ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y PUNTO ISOSBÉTICO DE LA HPTS

Para conocer los máximos de excitación así como el punto isobéptico de la HPTS, se obtuvieron espectros de excitación de la sonda a distintos pHs. En la Fig.35 se observa una serie de espectros obtenidos para una solución de HPTS 1 μ M, inicialmente a pH neutro, que fue gradualmente acidificada mediante el agregado de alícuotas de HCl. Se observa claramente la dependencia del espectro de excitación con el pH. Así, a pH 5,11 por ejemplo, la HPTS tiene un máximo a 403 nm, mientras que a pHs superiores, aparece un máximo secundario a 454 nm, que va aumentando con el pH. El punto isobéptico se obtuvo a partir de los puntos de intersección de las curvas representadas en la Fig.35. La Fig.36 muestra una ampliación de la zona de intersección.

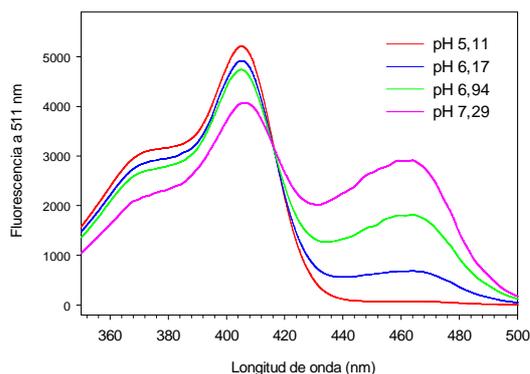


Fig.35: Espectros de excitación obtenidos para una solución de HPTS 1 μ M sometida a cambios de pH entre 5,11 y 7,29. Longitud de onda de emisión: 511 nm.

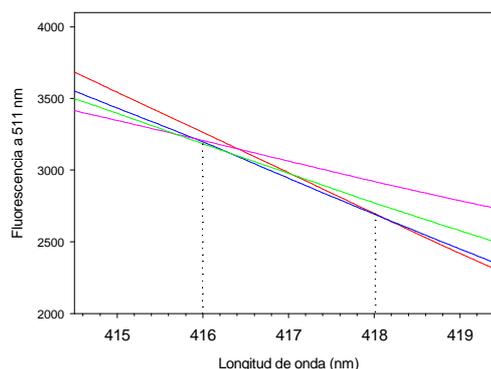


Fig.36: Ampliación de la zona de intersección de los espectros de excitación de la Fig.35. Las líneas de puntos indican el rango de longitudes de onda dentro del cual se produce la intersección entre las distintas curvas.

Como se ha mencionado (apartado 3.3.3.3), este punto corresponde a la longitud de onda a la cual la fluorescencia de la HPTS es independiente del pH. Se observó que debido al error experimental, la intersección se produce en un rango entre 416 y 418 nm, por lo tanto se ha considerado 417 ± 1 nm como la longitud de onda y el rango correspondientes al punto isobéptico.

4.1.2.2. FILTRO INTERNO

Para determinar el rango lineal de las curvas "Fluorescencia a 511 nm vs. concentración" debió estudiarse el efecto de filtro interno de la sonda HPTS. Este efecto, que se debe a la absorción de la luz por la sonda, depende de la concentración de la sonda y del paso óptico. A medida que aumenta la concentración de HPTS, la luz incidente es absorbida en mayor grado por ésta y resulta insuficiente para excitar toda la sonda en solución, con lo cual disminuye la intensidad de emisión, que normalmente se mide en el centro de la cubeta y en dirección perpendicular (90°) al haz incidente. En la Fig.37 se observa que el efecto de filtro interno para una cubeta de 1 cm de paso óptico, comienza a evidenciarse a concentraciones mayores que 65 μ M. La Fig.38, que grafica los valores de fluorescencia obtenidos para concentraciones de HPTS entre 2 y 65 μ M, demuestra que el efecto comienza en realidad a concentraciones menores. Para un paso óptico de 1 cm se observa una disminución de la linealidad aún por debajo de los 65 μ M. La disminución del paso óptico de 1 cm a 0,2 cm, amplía el rango lineal de la curva

“Fluorescencia a 511 nm vs. concentración”, como se desprende de la recta de regresión calculada para 0,2 cm.

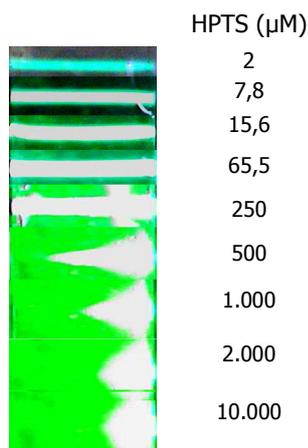


Fig.37: Fotografías de soluciones de HPTS de concentraciones crecientes en una cubeta de 1 cm de paso óptico, a 25°C. Excitación: 454 nm. Emisión: 511 nm. La fuente de luz se sitúa a la derecha de la fotografía

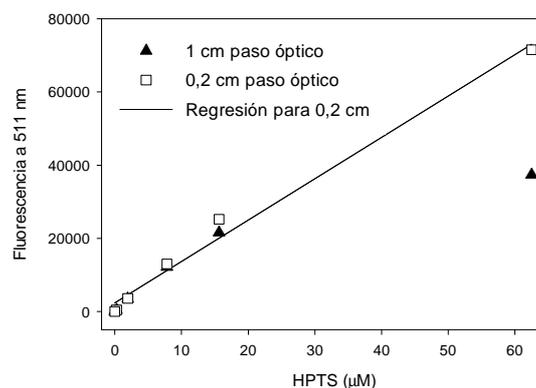


Fig.38: Gráficos de la fluorescencia de HPTS a 511 nm (excitación a 454 nm) en el rango de concentraciones entre 2 y 65 μM para distintos pasos ópticos. La línea continua es la recta de cuadrados mínimos obtenida para un paso óptico de 0,2 cm

Para obtener los rangos lineales correspondientes a las longitudes de onda de interés, se determinó la emisión fluorescente a 511 nm mediante la excitación a 403 nm, 417 nm y 454 nm de soluciones de HPTS entre 0,2 μM y 10 mM en buffer T10 (pH 7,4), a una temperatura de 25°C y empleando una cubeta con un paso óptico de 1 cm. En la Fig.39 pueden observarse las curvas “Fluorescencia a 511 nm vs. concentración de HPTS” para las tres longitudes de onda, y el gráfico correspondiente al cociente R454/403, que se empleará posteriormente para el

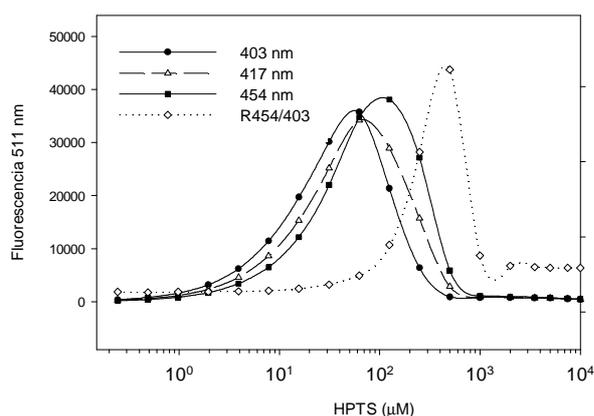


Fig.39: Variación de la fluorescencia de emisión a 511 nm con la concentración de HPTS a distintas longitudes de onda de excitación a pH 7,4. Se representa en línea punteada la variación del R454/403 con la concentración de HPTS.

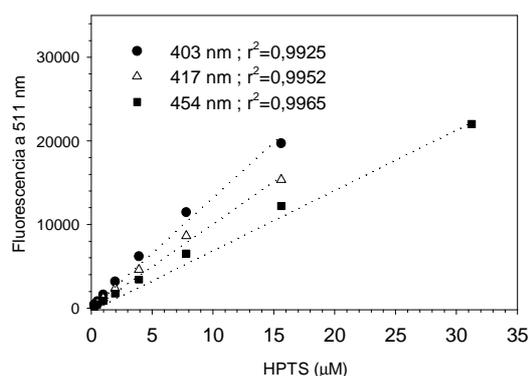


Fig.40: Gráficos de fluorescencia a 511 nm para bajas concentraciones de HPTS para distintas longitudes de onda de excitación. Las líneas punteadas señalan el alcance de la zona lineal para cada caso.

cálculo del pH interno. Se observa cómo la intensidad de fluorescencia aumenta a concentraciones bajas de HPTS hasta llegar a un máximo que se encuentra ligeramente desfasado para las distintas longitudes de onda. A partir de esa concentración, la fluorescencia disminuye por el efecto de filtro interno. También puede verse que el R454/403 permanece

constante hasta una concentración de HPTS de 15 μM , con lo cual éste es el límite superior de concentración para poder emplear este cociente en la determinación del pH interno. La Fig.40 se confeccionó a partir de los valores hallados para la Fig.39, representando únicamente las concentraciones de HPTS inferiores a 30 μM . Se observa que tanto para 403 como 417 nm, existe buena linealidad hasta una concentración de HPTS de 15 μM , mientras que para 454 nm la zona lineal se extiende hasta los 30 μM . Por lo tanto se confirma una buena linealidad para el cociente R454/403 hasta 15 μM de HPTS.

Por lo tanto el límite superior para la cuantificación de HPTS a una longitud de excitación de 454 nm es de 30 μM para cubetas de 1 cm de paso óptico y de 60 μM para 0,2 cm. Para la determinación del pH interno se tomará como límite superior una concentración de 15 μM .

4.1.2.3. INTERFERENCIA DEL EXTRACTO DE BILIS

La evaluación de las interferencias del extracto de bilis (EB) en la determinación de la fluorescencia de la HPTS, fue necesaria para validar la metodología mediante la cual se estudió la pérdida de sonda encapsulada por efecto del EB (apartado 4.4.9.). En este ensayo debió cuantificarse la HPTS por excitación en el punto isobéptico (independiente del pH) en presencia del EB, de los liposomas y del quencher de la HPTS, el DPX. Como se verá, todos estos factores modifican la emisión fluorescente de la HPTS, pero su efecto puede conocerse y por lo tanto, corregirse. En este apartado se muestran los ensayos realizados para establecer los factores de corrección que han llevado a la ecuación correspondiente al porcentaje fluorescencia residual ($\%F_R$, apartado 3.5.7.4., Materiales y Métodos).

El primer factor estudiado fue la fluorescencia intrínseca del EB, caracterizando su emisión mediante la excitación a 417 nm, el punto isobéptico de la HPTS. Como puede verse en la Fig.41, el EB a una concentración de 6,7 mg/ml presenta una elevada intensidad de fluorescencia a 511 nm (F511), la longitud de onda a la cual se determina la HPTS. La Fig.42 muestra el análisis de la variación de la F511 por excitación a 417 nm para concentraciones crecientes de EB. En esta figura se diferencian dos zonas: una a bajas concentraciones de EB (menores a 6 mg/ml), en la cual la fluorescencia es proporcional a la concentración y otra, a concentraciones mayores, en la que se observa un claro efecto de filtro interno.

Debido a que en los ensayos mencionados (apartado 4.4.9.) se utiliza un quencher, el DPX, también se obtuvo la emisión fluorescente del EB en función de la concentración en presencia de DPX 10 mM. Como se observa en la Fig.43, el quencher de la HPTS produce una leve disminución de la fluorescencia del EB.

Por lo tanto, resulta evidente que, en función de su concentración, el EB interfiere en la medida de la fluorescencia de la HPTS de dos maneras: en primer lugar, al presentar fluorescencia, incrementa el número de cuentas por segundo detectadas. En segundo lugar, y para determinadas concentraciones, presenta un efecto de filtro interno que disminuye la señal de la fluorescencia total.

Para corregir el primer efecto en las muestras de liposomas con HPTS incubadas con diferentes concentraciones de EB (en presencia o no de DPX), resulta necesario realizar un blanco con EB a la misma concentración (con o sin DPX) para conocer qué fracción de la fluorescencia de la muestra es debida al aporte del EB.

Debe tenerse en cuenta que, como fuera mencionado en el apartado 3.5.7., el EB origina importantes cambios estructurales en los liposomas que modifican la dispersión de la luz, alterando la luz detectada por el espectrofluorímetro e interfiriendo en la determinación de

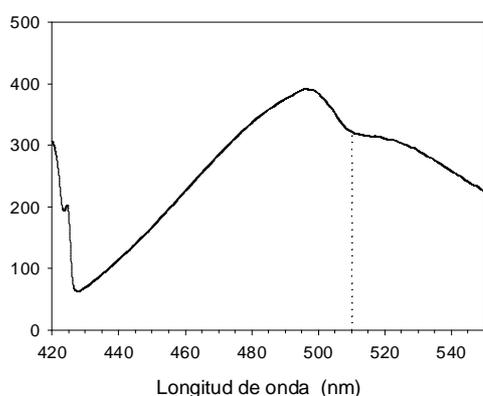


Fig.41: Espectro de emisión (excitación a 417 nm) correspondiente al extracto de bilis en buffer T10 pH 6,5 a una concentración de 6,7 mg/ml. Se indica en línea punteada la intensidad de fluorescencia a 511 nm.

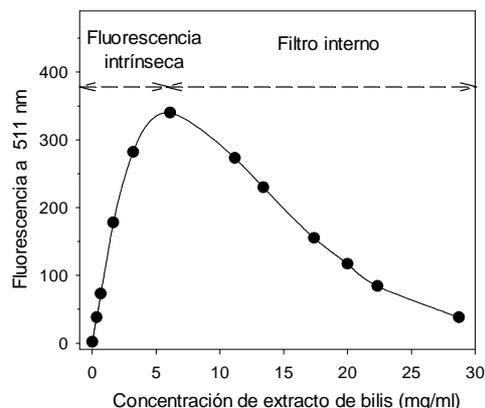


Fig.42: Variación de la fluorescencia a 511 nm (excitación a 417 nm) en función de la concentración de EB, a pH 6,5.

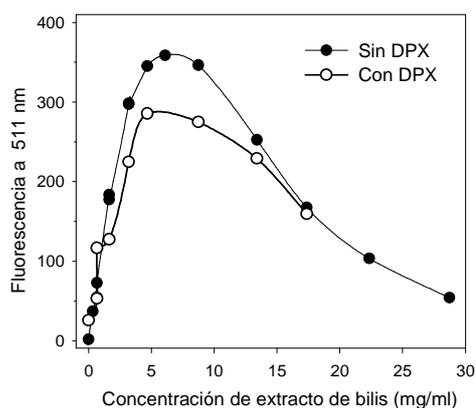


Fig.43: Variación de la fluorescencia a 511 nm (excitación a 417 nm) en función de la concentración de EB, a pH 6,5, en presencia o no de DPX a una concentración de 10 mM.

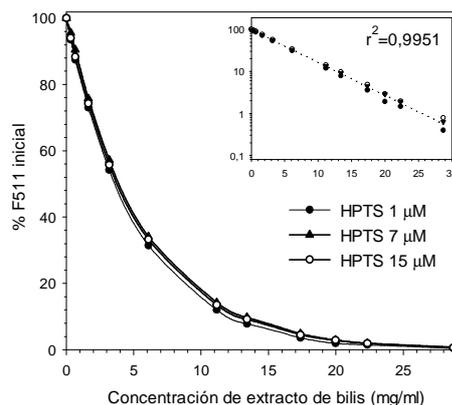


Fig.44: Efecto del EB sobre la fluorescencia de la HPTS a tres concentraciones en buffer T10 pH 6,5. En el inserto se muestra la representación de las tres series de puntos escala semilogarítmica y la recta de regresión obtenida así como su coeficiente de correlación (r^2).

la HPTS (ver apartado 4.4.9.). Por lo tanto, todos blancos de EB deben ser preparados con liposomas sin HPTS e incubarse en las mismas condiciones que las muestras (añadiendo o no DPX según corresponda). La substracción del valor de fluorescencia obtenido con estos blancos a la fluorescencia de las muestras corresponde, por tanto, a la emisión fluorescente de la HPTS afectada, según la concentración del EB, por el efecto de filtro interno.

Para corregir el segundo efecto del EB (la atenuación fluorescente debida al filtro interno del EB) se caracterizó su acción en soluciones de HPTS de diferentes concentraciones. La Fig.44 muestra los cambios en la fluorescencia en dichas disoluciones debidos, únicamente, al efecto de filtro interno causado por el EB. Para ello se representa en el eje de ordenadas el % de la

fluorescencia inicial una vez sustraída la fluorescencia intrínseca del EB (la primera corrección indicada anteriormente). Como puede apreciarse, los cambios en la fluorescencia dependen únicamente de la concentración de EB. Por lo tanto, para una concentración de EB determinada, y a partir de rectas como la mostrada en el inserto de la Fig.44, puede calcularse la fluorescencia que tendría la muestra en el caso en que no se produjera el filtro interno. Esta es entonces, la segunda corrección que debe realizarse para eliminar el efecto del EB en la determinación de la fluorescencia de la HPTS.

4.1.2.4. EVALUACIÓN DEL EFECTO QUENCHING EN LA FASE INTERNA DE LOS LIPOSOMAS

Para la determinación del pH interno de los liposomas debía verificarse la ausencia de un

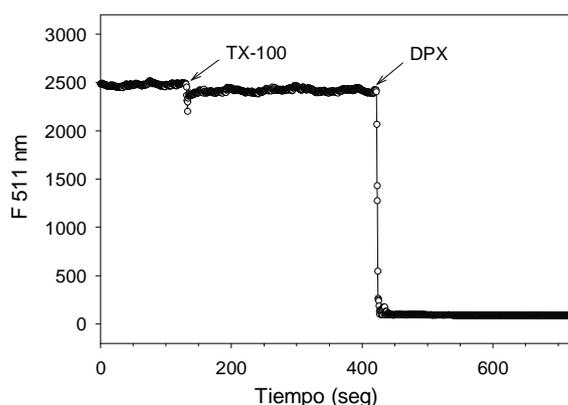


Fig.45: Evaluación del quenching de la HPTS encapsulada en liposomas HSPC a una concentración de 2 mM. Los liposomas se separaron por SEC en Sephadex G-25 empleando buffer T10 pH 7,4 como eluyente. Luego se diluyeron hasta una concentración de lípidos de 0,5 mg/ml. La fluorescencia se midió a 511 nm excitando a 417 nm. Las flechas indican el agregado de TX-100 10 mg/ml y DPX 10 mM.

efecto quenching debido a la sonda encapsulada a una concentración de 2 mM. Para esto se prepararon liposomas HSPC conteniendo HPTS a dicha concentración y se midió la fluorescencia en el punto isobéptico antes y después del agregado de Triton X-100 (TX-100). El tensioactivo se a una concentración final de 10 mg/ml y calentando previamente la muestra a 55°C, de modo tal de solubilizar completamente los liposomas (ver apartado 4.3.1.1.). Como se observa en la Fig.45 la fluorescencia de la sonda en los liposomas separados por SEC disminuye levemente cuando se agrega TX-100 debido a la pequeña dilución realizada, lo cual es una evidencia de que la sonda no se encuentra quenchada en la fase acuosa interna. El agregado posterior de DPX lleva

la fluorescencia a valores no detectables, confirmando la completa solubilización de los liposomas.

4.1.3. Determinación del contenido de extracto de bilis (EB) por espectrofotometría UV-visible

En este apartado se muestra la determinación del rango lineal para la determinación del contenido de extracto de bilis (EB) por espectrofotometría UV-visible. Estos resultados se emplearán en el apartado 4.2.5. para la determinación del porcentaje de elución del EB en la separación de liposomas del medio digestivo.

En la Fig.46 se muestran los espectros UV-visible obtenidos para soluciones del extracto de bilis en buffer T10 pH 6,5 entre 1,28 y 9,6 mg/ml. Tomando los valores de absorbancia a 412 nm, se graficó la curva de la Fig.47, en la que puede observarse una muy buena linealidad en el rango estudiado ($r^2 > 0,99$).

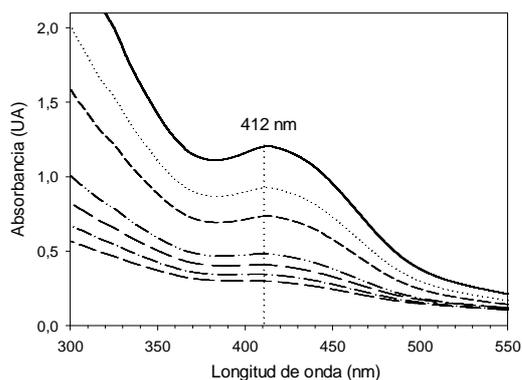


Fig.46: Espectros UV-visible obtenidos para distintas concentraciones de extracto de bilis en buffer T10. Se indica el máximo a 412 nm.

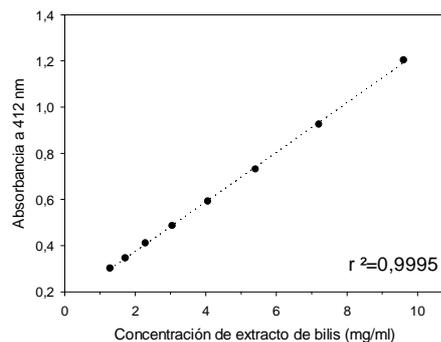


Fig.47: Curva de calibración "Absorbancia a 412 nm vs. concentración" obtenida para soluciones de extracto de bilis en buffer T10 p H 6,5.

4.1.4. Determinación del contenido de sales biliares en el extracto de bilis mediante electroforesis capilar (CE).

La determinación de la composición del extracto de bilis porcina se realizó según lo descrito en el apartado 3.3.10. (Materiales y Métodos). Esta caracterización resulta necesaria por varios motivos:

- Para una correcta interpretación de los estudios de solubilización de liposomas con extracto de bilis porcina (EB).
- Para comparar los resultados de la digestión *in vitro* de liposomas con otros trabajos que utilizan diversas fuentes de sales biliares.
- Porque se trata de un producto natural, que puede presentar variaciones en la composición lote a lote.
- Porque el proveedor sólo informa una composición aproximada, determinada por TLC. Además, esta composición no coincide con las especificaciones provistas por el fabricante del producto.
- Para realizar una comparación con la bilis humana (ver apartado 5.1.1. Discusión).

En la Tabla 8 se muestra la composición de sales biliares determinada por CE, y se compara con las especificaciones provistas por el fabricante y por el proveedor del extracto. Los resultados se expresan como porcentaje de ácidos biliares, pero en el extracto se encuentran como sales sódicas. Como se observa en la primera columna, los componentes mayoritarios analizados son los glico y tauroconjugados del ácido cólico, cuyo porcentaje está de acuerdo con lo declarado por el fabricante. Con respecto al resto de los ácidos biliares, el contenido hallado es aproximadamente el doble del especificado, si bien se mantienen las relaciones en peso entre los componentes de la mezcla (exceptuando el contenido de glico y taurocólico). Este hecho implica que los liposomas estarán sometidos a una mayor concentración total de sales biliares (alrededor de un 37%) que la supuesta a partir de las especificaciones del EB.

Con respecto a las especificaciones del proveedor, además de estar basadas en análisis semicuantitativos realizados por TLC, se informan únicamente los componentes mayoritarios.

Tabla 8: Comparación entre la composición del extracto de bilis porcina (EB) determinada por CE, las especificaciones del fabricante y del proveedor. Los resultados se expresan como porcentaje de ácido biliar respecto al extracto en base tal cual (% p/p b.t.c.). Las condiciones del ensayo se describen en el apartado 3.3.10 (Materiales y Métodos). El total de ácidos biliares es el mínimo contenido presente en el extracto, obtenido como la suma de los porcentajes identificados y cuantificados. NI: no informado.

ÁCIDO BILIAR	Cuantificación por CE (% p/p b.t.c.)	Especificaciones fabricante (% p/p b.t.c.)	Especificaciones proveedor (% p/p b.t.c.)
Hiocólico	5,3	NI	NI
Cólico	18,5	8-10	NI
Desoxicólico	2,5	0,9-1,1	NI
Glico y taurocólico	37,5	33-37	50-70
Glico y taurodesoxicólico	21,6	11-13	4-7
Total biliares (mín.)	85,4	53-61	54-77

4.1.5. Determinación de hierro con o-fenantrolina

Esta determinación fue empleada para cuantificar hierro soluble hasta un nivel mínimo de 6 μM . Las dos aplicaciones principales fueron la cuantificación de hierro incorporado en liposomas antes (M0) y después (M1) de separar por SEC, y en las siembras de los cultivos celulares, que tenían una concentración de hierro de aproximadamente 100 μM . Las muestras con niveles menores a 6 μM , como los extractos de los cultivos celulares, fueron cuantificados mediante absorción atómica en horno de grafito, según se explicará en el apartado 4.1.6.

4.1.5.1. ENSAYOS PRELIMINARES

Como había sido descrito previamente, la reacción del Fe^{2+} con la o-fenantrolina para dar un complejo rojizo es específica para la especie reducida del hierro (Sandell, 1959), por lo que el pH debe mantenerse por debajo de 3 para evitar la oxidación a Fe^{3+} . Además, suele agregarse a la solución un reductor que estabilice el Fe^{2+} .

De acuerdo con estos hechos, los primeros ensayos demostraron que soluciones entre 6 y 48 μM en exceso de ascórbico (AA 4,8 mM) mantenían un pH entre 2,9 y 3,0, lo cual estabilizaba la especie reducida del hierro.

Luego se determinó la estabilidad del complejo Fe/o-fen, registrando la absorbancia del mismo a lo largo del tiempo. Para esto se partió de 1 ml de FeAA 24 μM (en AA 4,8 mM) a la que se agregaron 20 μl de o-fen al 2% en etanol. Se midió la absorbancia a 508 nm a los 15, 30, 60 y 120 minutos, obteniéndose los valores de la Tabla 9. Como puede verse no hay variaciones en la absorbancia a 508 nm en el intervalo de tiempo estudiado, por lo tanto las muestras pueden analizarse hasta 120 minutos después de preparadas.

Se estudió además, si la concentración de la o-fen empleada estaba en exceso con respecto al hierro. Partiendo de la misma solución FeAA 24 μM , se agregaron alícuotas variables de la solución etanólica de o-fen, midiendo la absorbancia a 508 nm a los 15 minutos. Como se observa en la Tabla 10, no hay variaciones significativas de la absorbancia para alícuotas entre 5 y 50 μl , con lo cual se deduce que la o-fen está en exceso respecto al hierro desde las menores concentraciones estudiadas. En cuanto al aumento de la absorbancia para un volumen

de 100 μl , está evidentemente relacionado con el % de etanol. Se verificó que el agregado de una alícuota de la mezcla de 90 μl de etanol con 10 μl de solución etanólica de o-fen, producía el mismo incremento en la absorbancia.

Tabla 9: Estabilidad del complejo hierro/o-fen a lo largo del tiempo. Se partió de una solución FeAA 24 μM a la que se agregaron 20 μl de solución de o-fen al 2% en etanol. El complejo fue incubado a temperatura ambiente.

Tiempo (min)	Absorbancia a 508 nm
15	0,302
30	0,305
60	0,305
120	0,303

Tabla 10: Optimización de la concentración de o-fen. Se partió de una solución FeAA 24 μM que fue incubada 15 minutos a temperatura ambiente con las distintas alícuotas de solución de o-fen al 2% en etanol.

Alícuota o-fen (μl)	Absorbancia a 508 nm
5	0,297
10	0,294
20	0,308
50	0,307
100	0,336

4.1.5.2. DETERMINACIÓN DE HIERRO EN PRESENCIA DE LIPOSOMAS SOLUBILIZADOS CON TX-100

Según lo descrito en el apartado 3.3.4. (Materiales y Métodos), las suspensiones de liposomas debían ser previamente solubilizadas para determinar su contenido de hierro. Por lo tanto era necesario estudiar las posibles interferencias de este proceso en la determinación de hierro con o-fen. Dado que en la mayoría de los casos, los liposomas se solubilizaron con TX-100, se evaluó la posible interferencia de este tensioactivo a la máxima concentración de trabajo en combinación con los fosfolípidos, empleándose las condiciones de solubilización halladas para cada tipo de liposomas. Las pendientes de las distintas curvas de calibración obtenidas se muestran en la Tabla 11.

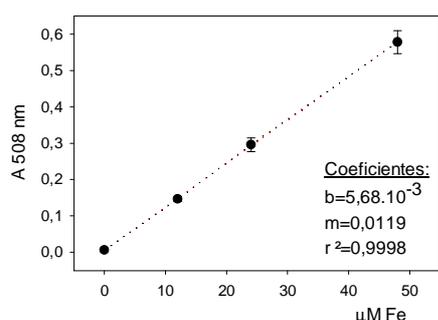


Fig.48: Curva de calibración promedio para la determinación de hierro con o-fenantrolina en presencia o no de interferencias. Fue obtenida promediando todos los valores de las curvas cuyas pendientes se muestran en la Tabla 7. *b*: ordenada al origen, *m*: pendiente, *r*²: coeficiente de correlación.

Tabla 11: Estudio de interferencias en la cuantificación de hierro con o-fenantrolina. Se indican las pendientes de las rectas de regresión correspondientes a FeAA (soluciones de hierro en AA 4,8 mM), y a FeAA con TX-100 (2, 10 y 30 mg/ml) y con liposomas (SPC, HSPC, o HSPC-Chol a una concentración de 0,005 mg lípidos/ml); (1) 1 h a 55°C (2) 24 hs a 55°C.

Curva de calibración	Pendiente (μM^{-1})
FeAA	0,0117
FeAA + SPC + TX-100 2 mg/ml	0,0115
FeAA + HSPC + TX-100 10 mg/ml ₍₁₎	0,0113
FeAA + HSPC-Chol + TX-100 30 mg/ml ₍₂₎	0,0126

De los resultados obtenidos se deduce que la presencia del tensioactivo y los liposomas convencionales solubilizados no afecta la curva de calibración del método de cuantificación con o-fenantrolina.

Esto se confirma al promediar los valores obtenidos para las cuatro curvas en el rango 0-48 μM : la recta de regresión obtenida tiene un coeficiente de correlación de 0,9998, como puede verse en la Fig.48. De este modo, pueden analizarse muestras de distinta composición lipídica empleando la misma curva de calibración. Si bien cada curva se preparó sin el agregado de TX-100 ni de fosfolípidos, se decidió incubar cada una junto con las muestras correspondientes para compensar cualquier alteración que pudiera darse como consecuencia del calentamiento prolongado a 55°C. Por lo tanto, las muestras de liposomas se solubilizaron según el procedimiento determinado en el apartado 3.5.5.4. y se enfriaron a temperatura ambiente antes del agregado de la alícuota de o-fen.

4.1.6. Determinación de hierro en cultivos celulares por absorción atómica en horno de grafito.

En esta determinación, resultaba fundamental evitar las interferencias de la matriz de la

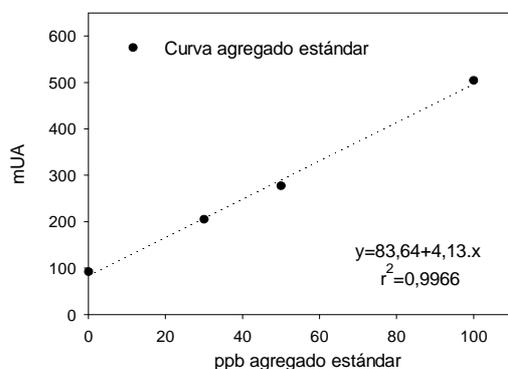


Fig.49: Curva de calibración para la determinación de hierro por AAS en horno de grafito por el método de agregado estándar. r^2 : coeficiente de correlación.

muestra en la cuantificación de concentraciones de hierro del orden de las ppb (partes por billón). Para evitar el llamado "efecto matriz" que podría influir en la determinación de hierro se compararon dos métodos: el método del agregado estándar y el método del estándar externo.

En el primer caso, se eligió una muestra representativa a la cual se adicionaron alícuotas crecientes de un estándar de cloruro férrico. Se seleccionó una rampa de temperaturas, optimizando la señal "Absorbancia vs. tiempo" a 372 nm correspondiente al hierro. En la Tabla 12 se muestra el programa de temperaturas para el horno de grafito y en la Fig.49, la curva de

calibración obtenida en estas condiciones.

Tabla 12: Programa de temperaturas del horno de grafito empleado en el método del agregado estándar. Hold time: tiempo de permanencia a una determinada temperatura.

Temp. horno (°C)	Proceso	Rampa (°C/seg)	Hold time (seg)
75	desolvatación	10	5,0
120	desolvatación	5	30,0
1.100	pirólisis	50	20,0
2.500	atomización	0	2,0
2.750	limpieza	0	1,5

Se observa una buena correlación ($r^2 > 0,99$) para los valores de absorbancia obtenidos a distintas concentraciones del estándar agregado. Por lo tanto, a partir de curvas como la de

Fig.49, se podrían calcular las concentraciones de las muestras restando a cada valor la absorbancia del blanco (buffer correspondiente), interpolando en la recta de regresión y realizando las correcciones por dilución.

Sin embargo, esta metodología implica que el efecto de la matriz es el mismo para todas las muestras, lo cual no puede asegurarse en todos los casos. De hecho, la determinación de hierro debía aplicarse, por ejemplo, a cultivos celulares incubados con soluciones de FeAA, con liposomas convencionales, con productos comerciales o a las siembras de los cultivos, entre otras muestras.

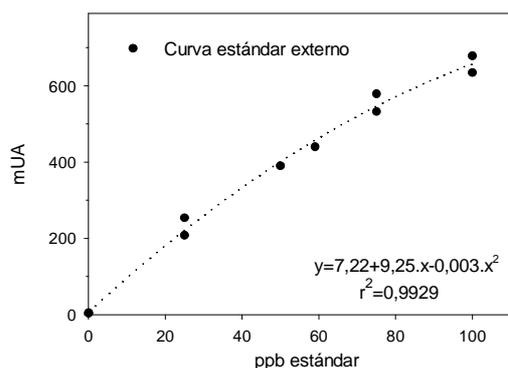


Fig.50: Curva de calibración para la determinación de hierro por AAS en horno de grafito por el método del estándar externo. r^2 : coeficiente de correlación.

Por lo tanto, se estudió un método alternativo para asegurar la confiabilidad de las determinaciones. Para aplicar el método del estándar externo, en el cual la curva de calibración es independiente de la matriz, debió asegurarse que el efecto matriz era eliminado durante el procesamiento de la muestra. La puesta a punto consistió básicamente en variar la temperatura de pirólisis y su rampa, hasta lograr una misma pendiente para el estándar sólo o una vez se agregó a una muestra representativa. Las condiciones del horno resultantes se muestran en la Tabla 13 y en la Fig.50 se observa un ejemplo de curva de calibración confeccionada

para soluciones de cloruro férrico, en la que se muestran conjuntamente puntos de estándar solo o con el agregado de una muestra de extractos celulares.

Tabla 13: Programa de temperaturas del horno de grafito empleado en el método del estándar externo. Hold time: tiempo de permanencia a una determinada temperatura.

Temp. horno (°C)	Proceso	Rampa (°C/seg)	Hold time (seg)
110	desolvatación	5	15
130	desolvatación	10	20
1.050	pirólisis	20	20
1.400	pirólisis	10	20
2.100	atomización	0	5
2.450	limpieza	1	3

Como puede verse, la curva se ajustó mediante una ecuación polinomial, que permitió obtener una alta correlación entre los valores de concentración y absorbancia ($r^2 > 0,99$).

A pesar de involucrar un mayor tiempo de procesamiento de la muestra en el horno de grafito, esta metodología permitió obtener resultados sin la interferencia del efecto matriz, razón por la cual fue empleado para la cuantificación de las muestras.

4.1.7. Estudio de interferencias en la determinación de proteínas

El primer método ensayado para la determinación de proteínas en los cultivos celulares fue el método de Lowry con dodecilsulfato de sodio (SDS). Los elevados valores obtenidos con este método (aproximadamente 5 mg/well) sugerían la presencia de interferencias. Por lo tanto, se analizó el efecto de las sustancias mayoritarias presentes en los extractos celulares, en las concentraciones adecuadas. Estas sustancias provenían de los medios añadidos a las células en alguna de las etapas de los ensayos de absorción de hierro.

Se observó que algunos componentes de los extractos no presentaban interferencias en el ensayo, como el TX-100, las sales ferrosas y los fosfolípidos. Sin embargo, el ácido ascórbico y el HEPES, presente en el buffer uptake, interferían en la determinación, dando valores de absorbancia mayores a los correspondientes.

Como alternativa, se ensayó el método del ácido bicinconínico (BCA). Según lo indicado por el fabricante, este método no es sensible ni a los tensioactivos ni al HEPES, sin embargo responde a ciertos reductores como el ácido ascórbico. Una de las acciones recomendadas para evitar las interferencias es diluir las muestras lo suficiente para minimizar dicho efecto sobre la absorbancia. En general esto es factible gracias a la elevada sensibilidad del método por las proteínas.

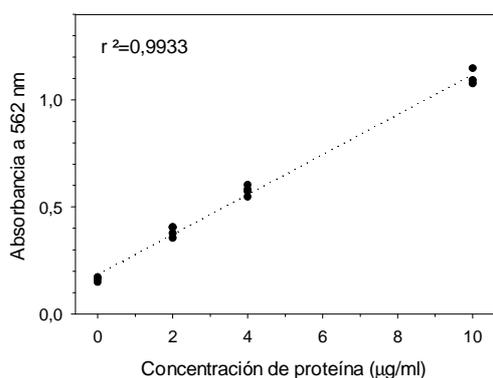


Fig.51: Curva de calibración para la determinación de proteínas en extractos de cultivos celulares por el método BCA, empleando BSA como testigo. Se muestra el coeficiente de correlación obtenido (r^2).

Tabla 14: Análisis de muestras por el método BCA. En todos los casos el volumen de la alícuota de muestra fue de 2 µl. Se analizaron soluciones (AA, FeAA o buffer uptake) o extractos celulares incubados con buffer uptake con o sin AA (200 µM), o liposomas HSPC-Chol conteniendo FeAA (n=2).

Muestra	mg/well
FeAA 1:2 10 µM	0,12 ± 0,02
AA 20 µM	0,02 ± 0,003
Buffer Uptake	0,07 ± 0,01
Extracto celular – buffer uptake	2,04 ± 0,31
Extracto celular – AA en buffer uptake	2,55 ± 0,38
Extracto celular – liposomas HSPC-Chol	2,37 ± 0,36

En la Tabla 14 se muestra que la mayor interferencia en la determinación proviene del hierro. Una solución de FeAA 1:2 con un contenido de hierro de 10 µM (una concentración que podría hallarse en una muestra de cultivos celulares incubados con FeAA) tiene una absorbancia tal, que el contenido de proteína calculado sería de 0,12 mg/well.

Por otro lado, las muestras correspondientes a extractos celulares tienen valores superiores a los 2 mg/well, es decir que la interferencia del hierro será a lo sumo del 6%. También se observa que las muestras de extractos celulares presentan contenidos similares de proteínas cualquiera haya sido su tratamiento previo. Por lo tanto, se estableció el empleo de alícuotas de 2 µl, aceptando que la influencia de las interferencias en el resultado final estará

dentro de la incertidumbre del ensayo. En efecto, los contenidos de proteínas variaron entre los 0,5 y 2 mg/well para los diferentes experimentos y los coeficientes de variación estuvieron entre el 10 y el 15%.

La Fig.51 muestra la curva de calibración obtenida para BSA, cuya preparación se describió en apartado 3.3.10. (Materiales y Métodos). Como puede observarse existe una buena linealidad en el rango 0-10 µg/ml.

4.1.8. Estudio de interferencias y rango lineal en la cuantificación de quitosano

Como se explicó en el apartado 3.3.11. (Materiales y Métodos), la determinación de quitosano mediante la formación del complejo con el colorante Cibacrom Brilliant Red 3B-A (CBR 3B-A) se empleó para cuantificar el quitosano asociado a liposomas antes y después de procesos separativos. Por tratarse de un método espectrofotométrico, los liposomas debían solubilizarse previamente con TX-100, por lo cual fue necesario evaluar si el tensioactivo interfería en la determinación. Además, por tratarse de liposomas conteniendo sales ferrosas, se debió estudiar la posible interferencia de las mismas.

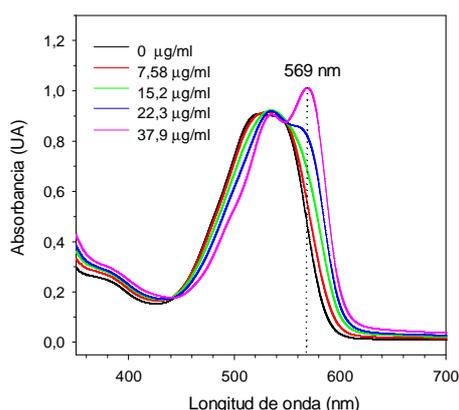


Fig.52: Espectros UV-visible obtenidos para el colorante CBR 3B-A (0,06 mg/ml en buffer glicina-HCl pH 3,2) a distintas concentraciones de quitosano. Se indica el máximo empleado para la cuantificación de quitosano a 569 nm.

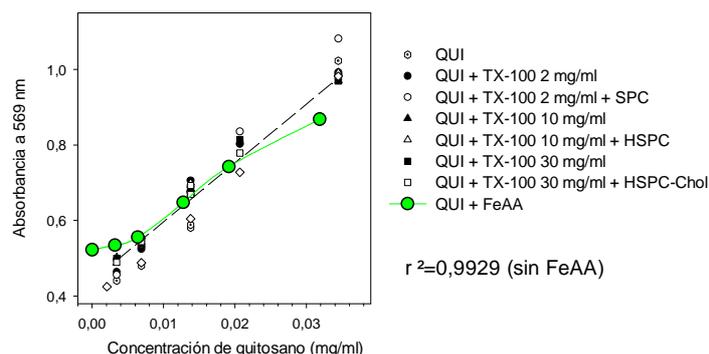


Fig.53: Curvas de calibración "Absorbancia a 569 nm vs. concentración de quitosano" obtenidas para quitosano solo o con el agregado de TX-100 con o sin liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol (símbolos en blanco y negro), o para quitosano con el agregado de FeAA 2 mM (símbolos verdes). Se muestra el coeficiente de correlación para la recta de regresión obtenida para los valores sin el agregado de hierro.

La Fig.52 muestra cómo varía el espectro de absorción del colorante a medida que aumenta la concentración de quitosano. En ausencia de quitosano, el espectro UV-visible del CBR 3B-A tiene un máximo a 523 nm. El agregado de quitosano produce un desplazamiento batocrómico para dar un máximo a 569 nm a concentraciones de quitosano superiores a los 30 µg/ml.

Ya se había observado que el aumento de la absorbancia a 569 nm es proporcional a la concentración de quitosano en un rango determinado de concentraciones (Muzzarelli, 1998). Como se observa en la Fig.53, se verificó una buena linealidad para el quitosano en buffer glicina-HCl pH 3,2 entre 6 y 30 µg/ml. El agregado de TX-100 a las concentraciones de solubilización de los liposomas (2, 10 y 30 mg/ml) en presencia o no de liposomas (SPC, HSPC y

HSPC-Chol) no modifica el rango lineal, obteniéndose un elevado coeficiente de correlación para la recta de regresión que incluye todos los puntos ($r^2 > 0,99$). Cuando se agregó FeAA a una concentración equivalente a la encontrada en liposomas (2 mM), el rango lineal se acortó, como puede verse en la curva correspondiente (círculos verdes). Por lo tanto en presencia de hierro, las muestras debieron diluirse hasta concentraciones de quitosano entre los 6 y los 20 $\mu\text{g/ml}$.

Otro factor que deber tenerse en cuenta en esta determinación es el tiempo que transcurre entre el agregado del reactivo y la lectura de la absorbancia. Si éste es superior a los 30 minutos, aparece un precipitado que inicialmente produce la dispersión de la luz incidente, llevando a lecturas de absorbancia mayores a las esperadas y posteriormente, a lecturas menores, una vez que el precipitado ha decantado.

4.1.9. Determinación del grado de desacetilación del quitosano

El grado de desacetilación y el parámetro complementario, el grado de acetilación del quitosano, se determinaron según lo descrito en el apartado 3.3.13. (Materiales y Métodos). La Fig.54 muestra un ejemplo de los espectros ^1H RMN obtenidos para el quitosano empleado. La asignación de las señales se realizó según lo descrito previamente (Lavertu et al., 2003).

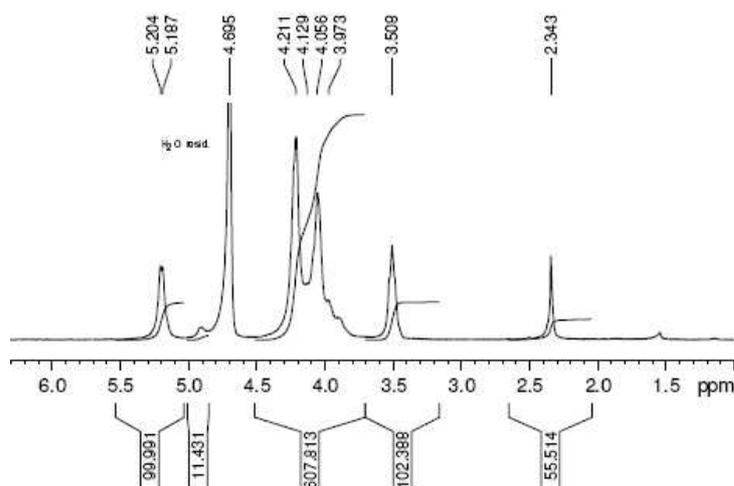


Fig.54: Espectro ^1H -RMN de una muestra de quitosano en solución preparada según lo descrito previamente (apartado 3.5.15.4.). Se indican los protones H1D y H2D correspondientes al monómero deacetilado y los HAc correspondientes al grupo metilo ($-\text{CH}_3$) del monómero acetilado.

Tabla 15: Valores obtenidos para el porcentaje de desacetilación (%DA), el de acetilación (%A) y la suma de ambos para quitosano, a partir de la integración de las señales de los protones H1D, H2D y HAc de espectros como el de la Fig.54.

% DA	85,2 \pm 1,1
% A	17,5 \pm 0,8
% DA + % A	102 \pm 1,0

Como se desprende de la figura, existe una buena resolución para las señales correspondientes a los protones del acetilo (HAc) y los protones unidos al carbono 1 y 2 del monómero deacetilado (H1D y H2D) respecto al resto de las señales. Por lo tanto se calcularon a partir de las áreas de estas señales los valores de %DA y %A según las ecuaciones presentadas en el apartado 3.3.13.4. (Materiales y Métodos). En la Tabla 15 se muestra que el valor obtenido para el %DA, se encuentra en el límite de la especificación del quitosano empleado ($\geq 85\%$). El valor de %DA+%A, cercano al 100%, valida la metodología teniendo en cuenta que el %A se calcula a partir de una ecuación independiente a la correspondiente al %DA.

4.2. RESULTADOS DE LOS MÉTODOS PREPARATIVOS

4.2.1. Optimización de la preparación de liposomas MLVs HSPC-Chol

Como etapa previa a la obtención de los liposomas HSPC-Chol mediante homogeneización a alta presión, y habiendo fijado de antemano la relación fosfolípido/colesterol en una relación molar de 3:2 respectivamente, se evaluaron tres aspectos importantes en cualquier protocolo de preparación de liposomas a gran escala:

- El método de obtención de los MLVs que posteriormente se someterán a homogeneización. Para ello se compararon las suspensiones obtenidas a partir de una película de lípidos con las obtenidas agregando directamente los componentes sobre la solución acuosa.
- El efecto del solvente orgánico empleado para la preparación de la película de lípidos (cloroformo o etanol). El uso de uno u otro determina qué procesos deben aplicarse para eliminarlos de manera que las formulaciones sean aptas para el consumo oral.
- La temperatura a la cual se realiza la homogeneización. El consumo energético es un factor importante a considerar en cualquier proceso de producción a gran escala.

Por lo tanto se ensayaron diferentes preparaciones variando estos parámetros, evaluando su aspecto macroscópico hasta una hora después de su preparación (según la aparición de precipitados y/o cremas) y determinando su temperatura de transición mediante DSC y el diámetro medio de las vesículas obtenidas. La concentración lipídica de todas las preparaciones se mantuvo constante a 25 mg/mL.

Los primeros ensayos realizados para preparar MLVs HSPC-Chol estuvieron basados en el método de preparación de MLVs compuestos por SPC o por HSPC: la adición directa de los lípidos al medio acuoso precalentado (apartado 3.4.2. Materiales y Métodos). Esta sería la forma de preparación más conveniente desde el punto de vista de la transferencia a escalas mayores. Por lo tanto, se agregaron la HSPC y el colesterol (Chol) sólidos al buffer T10 precalentado y se agitó a 55°C hasta obtener una suspensión de aspecto homogéneo. Las suspensiones obtenidas se homogeneizaron en condiciones de mínimo aporte energético a la muestra (presión de entrada 0,8 bar): ya sea por ciclos, C1-P0,8, o bien en modo de recirculación, L10-P0,8 (ver nomenclatura en apartado 3.4.3. Materiales y Métodos) a temperatura ambiente ó 55°C.

Respecto al empleo de solventes orgánicos, se prepararon MLVs mediante el método de la película de lípidos disolviendo la HSPC y el colesterol en etanol o cloroformo. Las películas lipídicas así obtenidas se dispersaron por agitación mecánica en buffer T10 y luego se procesaron en el Microfluidizer a C1-P0,8 o L10-P0,8 a temperatura ambiente o a 55°C. En la Tabla 16 puede verse un resumen de los ensayos realizados y la caracterización de las suspensiones obtenidas.

Como se observa en la Tabla 16, las tres muestras obtenidas mediante homogeneización a temperatura ambiente (Ensayos 8-2C, 8-2L y 8-3) presentan un aspecto macroscópico no adecuado, que es reflejo de la inestabilidad de la suspensión de liposomas. Esto ocurre aún en los ensayos en que se disuelven previamente los lípidos en cloroformo y se prepara una película lipídica (Ensayo 8-3). Las formulaciones obtenidas por agregado de los lípidos sólidos al buffer (Mezcla) y posterior homogeneización a 55°C (Ensayos 8-2-55 y 8-4), tienen un buen aspecto a

nivel macroscópico, sin embargo sus diámetros medios están por encima de los 2 μm en ambos casos.

Tabla 16: Preparaciones HSPC-Chol estudiadas.

Ensayo	Tipo de preparación (1)	Condiciones de homogeneización (2,3)	Aspecto (4)	Temperatura de transición ($^{\circ}\text{C}$) (5)	Diámetro medio \pm anchura (nm)	ΔH molar de transición ($\text{kJ/K}\cdot\text{mol}$) (6)
8-2C	Mezcla	C1-P0,8 a TA	NOK	$52,0 \pm 0,02$	1.983 ± 918	$23,21 \pm 1,38$
8-2L	Mezcla	L10-P0,8 a TA	NOK	$51,8 \pm 0,09$	2.258 ± 2.490	$17,33 \pm 1,07$
8-2-55	Mezcla	C1-P0,8 a 55°C	OK	$51,5 \pm 0,25$	2.691 ± 2.142	$16,71 \pm 2,26$
8-4	Mezcla	L10-P0,8 a 55°C	OK	$51,9 \pm 0,14$	4.137 ± 739	$9,11 \pm 0,70$
8-10C	P-etanol	C1-P0,8 a 55°C	OK	$52,4 \pm 0,10$	1.450 ± 803	$7,65 \pm 0,48$
8-10L	P-etanol	L10-P0,8 a 55°C	OK	$52,2 \pm 0,05$	1.118 ± 897	$6,38 \pm 1,32$
8-3	P-cloroformo	C1-P0,8 a TA	NOK	ND	3.142 ± 2083	$1,74 \pm 0,01$
8-1	P-cloroformo	C1-P0,8 a 55°C	OK	ND	2.229 ± 1.346	$0,78 \pm 0,49$
8-11	P-cloroformo	L10-P0,8 a 55°C	OK	ND	1.410 ± 1.012	$1,80 \pm 0,60$

Observaciones: (1) El tipo de preparación indicado como "Mezcla", corresponde al agregado de los lípidos sólidos sobre el buffer. Los denominados P-etanol ó P-cloroformo corresponden a preparaciones de películas lipídicas en los solventes indicados. (2) TA: temperatura ambiente. (3) Nomenclatura para homogeneización: apartado 3.6.5., Materiales y Métodos. (4) Aspecto macroscópico de la preparación, calificado como OK (correcto) y NOK (no correcto), incluyendo en este último caso las suspensiones que precipitan, creman, o experimentan ambos fenómenos, hasta una hora después de preparadas. (5) Se realizaron 3 barridos de cada muestra; ND: no detectable. (6) Entalpía molar de transición calculada como el área del termograma corregida por la línea de base y dividida por el número de moles.

En la Fig.55 se muestran ejemplos de termogramas obtenidos por DSC para las mezclas procesadas C1-P0,8 a temperatura ambiente y a 55°C (Ensayos 8-2C y 8-2-55 respectivamente). Como puede verse, ambos presentan una clara transición de fases alrededor de los 52°C , lo cual indica que no se ha producido una buena mezcla entre los componentes de las bicapas y que éstas presentan dominios lipídicos, ya que la proporción de colesterol en las preparaciones es suficiente para eliminar la transición de fase (New, 1990).

Cuando se emplea el método de la película disolviendo los lípidos en un solvente de baja toxicidad como el etanol (preparaciones P-etanol, correspondientes a los ensayos 8-10C y 8-10L), las suspensiones resultantes obtenidas por homogeneización a 55°C tienen buen aspecto y diámetros medios aceptables, inferiores a los 2 μm . Sin embargo, la transición de fases no está completamente eliminada, obteniéndose una entalpía molar de transición entre 6 y 8 $\text{kJ/K}\cdot\text{mol}$. El reemplazo del etanol por cloroformo para la disolución de los lípidos se traduce en una disminución significativa del valor de la entalpía molar de transición. En particular, en la muestra procesada C1-P0,8 a 55°C (Ensayo 8-1), la transición prácticamente ha desaparecido y el valor de la entalpía se encuentra cerca del límite de cuantificación, como puede verse en la Fig.56.

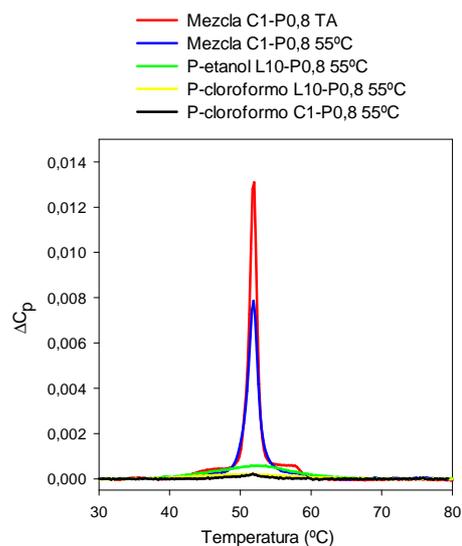


Fig.55: Termogramas obtenidos por DSC para distintas preparaciones de liposomas HSPC-Chol procesadas a temperatura ambiente (TA) o a 55°C, a partir de la mezcla o de una película de lípidos. Se indican las condiciones de homogeneización en cada caso y el solvente en el cual se preparó la película.

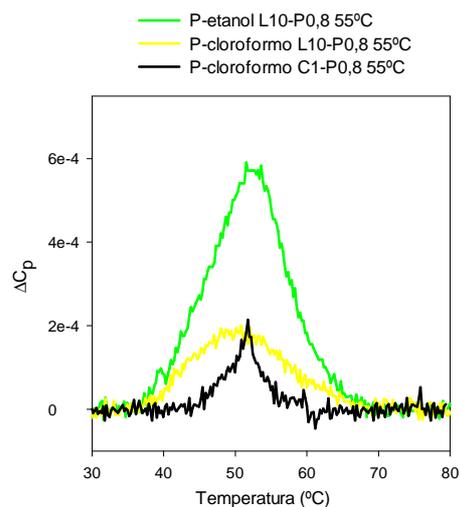


Fig.56: Ampliación de la zona de transición de los termogramas correspondientes a las preparaciones con películas de lípidos de la Fig. 55.

En base a los ensayos realizados, se eligió como forma de preparación de las formulaciones HSPC-Chol, el método de la película lipídica en cloroformo y la homogeneización a 55°C, asegurando una completa eliminación del solvente por liofilización.

4.2.2. Optimización de la preparación de liposomas convencionales con HPTS por homogeneización a alta presión

La optimización de la preparación de liposomas se realizó para las tres formulaciones convencionales (SPC, HSPC y HSPC-Chol) con el objeto de obtener el máximo volumen incorporado manteniendo un tamaño medio de vesícula inferior a 1 μm , realizando el menor número posible de experimentos. De esta forma se podría maximizar la encapsulación de una sustancia hidrosoluble como el sulfato ferroso. También se consideró la posibilidad de escalar las preparaciones, para lo cual se propuso minimizar lo posible el número de ciclos siempre y cuando se lograra la homogeneidad de la suspensión obtenida.

Para elegir las condiciones óptimas de homogeneización, se empleó el diseño multifactorial de experimentos descrito en el apartado 3.6.1. (Materiales y Métodos), utilizando un proceso en ciclos o lotes. En el caso de los liposomas HSPC y HSPC-Chol, se realizaron además, ensayos de extrusión de los liposomas por membranas de poro definido para eliminar las poblaciones de diámetro superior a 1.000 nm y se estudió la obtención de liposomas por recirculación como método alternativo a los ciclos (apartados 4.2.2.2 y 4.2.2.3.).

4.2.2.1. LIPOSOMAS SPC

La homogeneización se realizó partiendo de las suspensiones de MLVs preparadas según lo descrito en el apartado 3.4.2. (Materiales y Métodos). El número de ciclos se varió entre 1 y

9, y la presión de entrada entre 0,8 y 4 bar, y se seleccionaron los niveles de cada variable según un diseño de cuadrado centrado con estrella. La fuerza iónica del medio se mantuvo constante para todas las formulaciones (buffer T10 pH 7,4), así como la concentración total de lípidos (25 mg/ml). Los liposomas SPC fueron homogeneizados a temperatura ambiente y las suspensiones obtenidas se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante una hora después de preparadas, antes de realizar las mediciones para su caracterización.

Se determinó el diámetro medio (apartado 3.5.4. Materiales y Métodos) y el volumen incorporado o volumen acuoso interno (apartado 3.5.1. Materiales y Métodos) para cada punto del diseño, realizando triplicados de todos los puntos de la estrella.

Con los valores obtenidos para cada par de variables (número de ciclos, presión de entrada) se obtuvieron los coeficientes b_{ij} del polinomio que mejor caracteriza cada superficie (ver *Ecuación 8*, apartado 3.8.3., Materiales y Métodos). De esta manera el comportamiento del sistema puede explicarse mediante la siguiente ecuación polinomial:

$$Z = b_0 + b_1 \times C + b_2 \times P + b_3 \times C \times P + b_4 \times C^2 + b_5 \times P^2$$

donde Z puede ser el diámetro medio o bien el volumen incorporado, según el caso, C es el número de ciclos, P la presión de entrada en bar y b_0, b_1, b_2, b_3, b_4 y b_5 los coeficientes calculados. Para hallar una medida cuantitativa del grado de ajuste del modelo, se calcularon los coeficientes de determinación y correlación múltiples (r^2 y r), así como los estadísticos (F_{reg} y F_{mod}) que se comparan con un estadístico tabulado (F_{crit}). También se muestran los gráficos de las superficies de respuesta que permiten visualizar el comportamiento del sistema.

Procesamiento por ciclos: diámetro y volumen incorporado

A continuación se muestran las ecuaciones que describen la dependencia del diámetro y el volumen incorporado con las condiciones de trabajo del homogeneizador de alta presión, así como los estadísticos calculados en cada caso para evaluar el ajuste del modelo.

Ecuación del diámetro:	$D_{(nm; \% vol)} = 2.182,41 - 51,22 \times C - 914,30 \times P + 113,32 \times P^2$
Coeficiente de determinación múltiple (r^2):	0,95418
Coeficiente de correlación múltiple (r):	0,97682
Test de significación de la regresión (F_{reg}):	222,2 >> 2,9 (F_{crit})
Test de significación del modelo (F_{mod}):	1,02 < 2,57 (F_{crit})
Ecuación del volumen incorporado:	$V_{(L/mol)} = 1,291 - 0,146 \times P - 0,004 \times C \times P$
Coeficiente de determinación múltiple (r^2):	0,91012
Coeficiente de correlación múltiple (r):	0,95400
Test de significación de la regresión (F_{reg}):	81,01 >> 3,62 (F_{crit})
Test de significación del modelo (F_{mod}):	1,46 < 3,22 (F_{crit})

En la ecuación correspondiente al diámetro, se observa que el ajuste matemático descarta, por no resultar significativo, el término de dependencia cruzada (C x P), así como la dependencia cuadrática respecto a los ciclos. Este hecho se refleja en la superficie de respuesta de la Fig.57, en la que se aprecia que el diámetro disminuye en forma lineal y poco pronunciada al aumentar el número de ciclos. Por el contrario, éste tiene una fuerte dependencia con la presión de entrada, debida a la combinación entre el término lineal (P) y el cuadrático (P²), como se observa en la superficie de respuesta correspondiente.

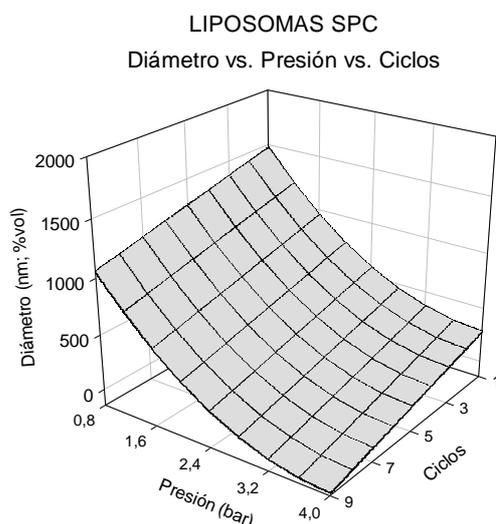


Fig.57: Superficie de regresión "Diámetro vs. Presión vs. Ciclos" obtenida para liposomas SPC 25 mg/ml conteniendo HPTS 2 mM (n=19).

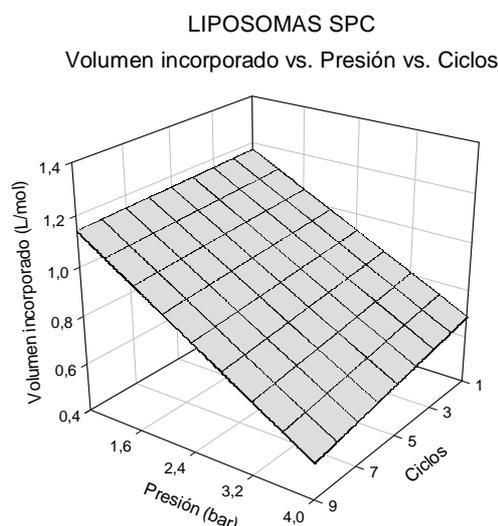


Fig.58: Superficie de regresión "Volumen Incorporado vs. Presión vs. Ciclos" obtenida para liposomas SPC 25 mg/ml conteniendo HPTS 2 mM (n=19).

En el caso del volumen incorporado, prácticamente ha desaparecido la contribución de los ciclos y predomina el efecto de la presión de entrada, como puede verse gráficamente en la superficie de respuesta de la Fig.58.

En cuanto al grado de ajuste del modelo, por un lado, se obtuvieron valores de r y r² aceptables. Por otro lado, se verificó en ambos casos que $F_{\text{regr}} \gg F_{\text{crit}} > F_{\text{mod}}$, por lo tanto los resultados del ajuste matemático del diámetro y del volumen encapsulado proporcionan ecuaciones que describen el sistema de modo eficiente (p<0,05).

Análisis de las distribuciones de diámetros

Las suspensiones obtenidas según las distintas condiciones de homogeneización ensayadas están constituidas por poblaciones polimodales (Fig.59a). Estos perfiles heterogéneos aparecen para todo el rango de ciclos y presiones estudiado. Sólo en los casos en los que se aporta más energía a las preparaciones, como por ejemplo el procesamiento de la muestra 5 ciclos a 4 bar de presión, se observa una tendencia a obtener liposomas de un diámetro único (Fig.59b).

Elección de las condiciones de procesamiento

Tanto el valor del diámetro medio como el volumen incorporado, calculados a partir de las ecuaciones que describen las superficies correspondientes para una presión de 2,4 y procesando 5 ciclos resultaron aceptables (385 nm y 0,87 l/mol respectivamente). Por lo tanto, se eligió procesar los liposomas SPC conteniendo HPTS o FeAA en estas condiciones (C5-P2,4) para utilizarlos en los ensayos *in vitro*. Ciertamente, la heterogeneidad de la población es elevada, ya que la dispersión tiene un valor de 0,14 (ver apartado 3.5.4. Materiales y Métodos). Pero, como puede apreciarse en las superficies de respuesta de las Figuras 57 y 58, cualquier disminución del diámetro de los liposomas, orientada a obtener poblaciones unimodales, disminuiría drásticamente el volumen encapsulado. Los valores de diámetro medio y volumen incorporado obtenidos en forma experimental para los liposomas SPC procesados en las condiciones elegidas (C5-P2,4) resultaron iguales a 431 ± 277 nm y $1,11 \pm 0,17$ l/mol respectivamente, levemente superiores a los calculados a partir de la ecuación que describe la superficie. Finalmente, la recuperación del contenido de fosfolípidos después de la homogeneización en estas condiciones fue del $90,6 \pm 6,5$ % (n=13), con lo cual se consideró que la pérdida de los fosfolípidos era aceptable.

4.2.2.2. LIPOSOMAS HSPC

Para este tipo de liposomas se han ensayado tres procesos diferentes de preparación: la homogeneización por ciclos, la homogeneización seguida de extrusión, y la homogeneización por recirculación. Las suspensiones de MLVs preparadas según lo descrito en el apartado 3.4.2. (Materiales y Métodos), fueron homogeneizadas a 55°C y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante una hora después de preparadas, antes de realizar las mediciones para su caracterización.

Procesamiento por ciclos: diámetro y volumen incorporado

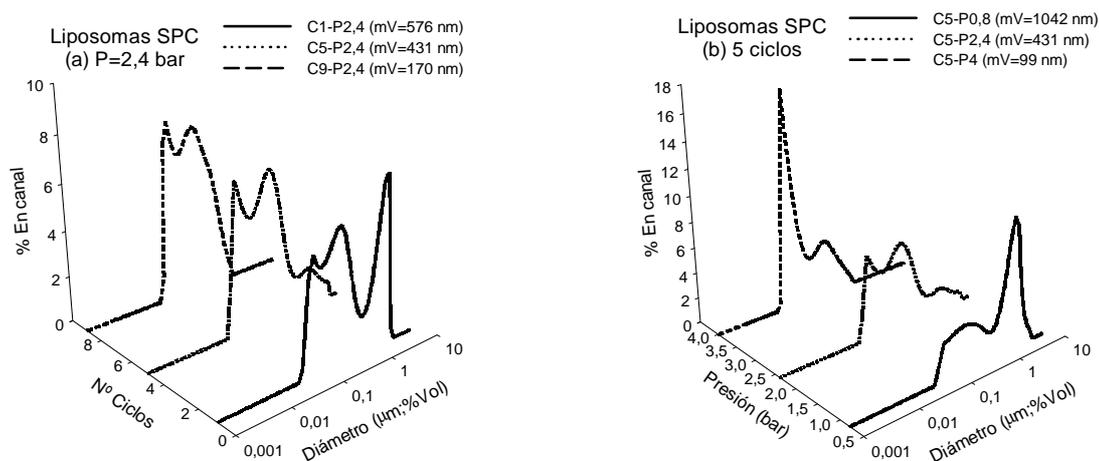


Fig.59: Distribuciones de tamaño de partícula para liposomas SPC obtenidos por homogeneización a alta presión (a) en función del número de ciclos a una presión de entrada constante de 2,4 bar, (b) en función de la presión de entrada procesando las muestras 5 ciclos. El eje de ordenadas indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador. Cada curva corresponde a una condición de procesamiento indicada en la leyenda, junto con el diámetro medio (mV) obtenido para la distribución en %Volumen.

Las ecuaciones que caracterizan el efecto de los ciclos y la presión de entrada sobre el diámetro medio y el volumen incorporado obtenidos para los liposomas HSPC son las siguientes:

Ecuación del diámetro:	$D_{(nm;\%vol)} = 4.472,63 - 212,29 \times C - 1.223,49 \times P + 14,03 \times C^2 + 120,25 \times P^2$
Coefficiente de determinación múltiple (r^2):	0,87135
Coefficiente de correlación múltiple (r):	0,93346
Test de significación de la regresión (F_{reg}):	60,96 >> 2,65 (F_{crit})
Test de significación del modelo (F_{mod}):	0,446 < 2,68 (F_{crit})

Ecuación del volumen incorporado:	$V_{(L/mol)} = 2,16 - 0,72 \times P + 0,09 \times P^2$
Coefficiente de determinación múltiple (r^2):	0,86097
Coefficiente de correlación múltiple (r):	0,92788
Test de significación de la regresión (F_{reg}):	37,16 >> 3,88 (F_{crit})
Test de significación del modelo (F_{mod}):	1,26 < 4,28 (F_{crit})

Para este tipo de liposomas, el diámetro depende en forma lineal y cuadrática tanto del número de ciclos como de la presión de entrada, como puede observarse en la superficie de respuesta de la Fig.60. En este caso, para obtener diámetros inferiores a los 1.000 nm, se requiere aplicar una presión superior a los 3,2 bar y procesar la muestra por lo menos 5 ciclos. En cuanto al volumen incorporado, de la ecuación obtenida se deduce que el volumen incorporado no depende del número de ciclos, sino que solo es función de la presión, como se visualiza en la superficie de la Fig.61.

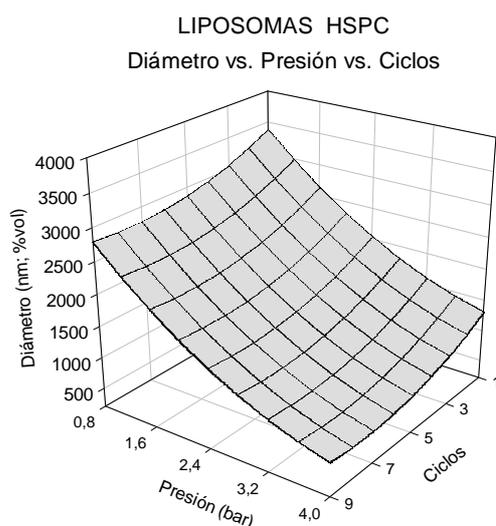


Fig.60: Superficie de respuesta "Diámetro vs. Presión vs. Ciclos" obtenida para liposomas HSPC 25 mg/ml conteniendo HPTS 2 mM ($n=19$) y procesando a 55°C.

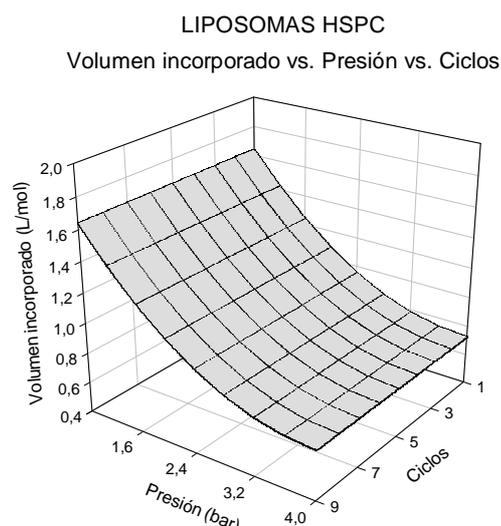


Fig.61: Superficie de respuesta "Volumen incorporado vs. Presión vs. Ciclos" obtenida para liposomas HSPC 25 mg/ml conteniendo HPTS 2 mM ($n=19$) y procesando a 55°C.

También en este caso se verifica que el modelo empleado representa adecuadamente la respuesta del sistema. Además de obtenerse valores de r y r^2 aceptables, se verificó tanto para el diámetro como para el volumen incorporado, la condición $F_{\text{regr}} \gg F_{\text{crit}} > F_{\text{mod}}$ necesaria para confirmar un buen grado de ajuste ($p < 0,05$).

Análisis de las distribuciones de diámetros

Los liposomas HSPC presentan distribuciones bimodales en todas las condiciones de homogeneización ensayadas durante la optimización del proceso por ciclos. La Fig.62(a) muestra un ejemplo de distribución de diámetros obtenido en las condiciones de homogeneización C5-P4 a 55°C. El diámetro medio experimental fue de 790 ± 829 nm y la dispersión 0,05, evidenciando la gran heterogeneidad de la suspensión. Por lo tanto, a pesar de que el diámetro medio está por debajo de los 1.000 nm debe tenerse en cuenta de que se trata de un promedio de dos poblaciones, una de las cuales se centra en los 1.000 nm. Para la determinación correcta del volumen incorporado fue necesario controlar la elución de los lípidos por SEC, para evaluar si se producía una retención de los liposomas de mayor diámetro.

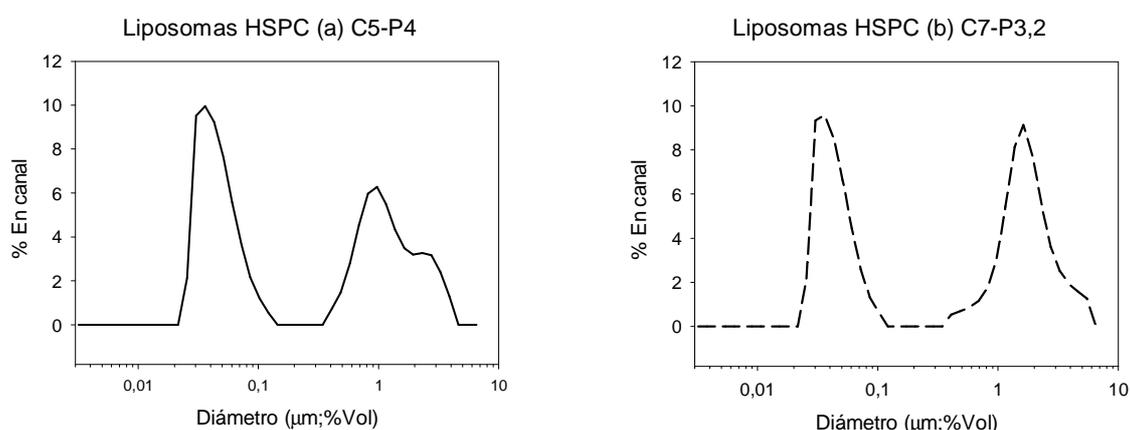


Fig.62: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC procesados a 55°C en las condiciones (a) C5-P4 y (b) C7-P3,2. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador para una distribución en volumen.

En la Fig.62(b) se observa como el procesamiento a una presión de 3,2 bar, aún después de 7 ciclos, presenta una distribución de diámetros que parecería continuar más allá del rango de medición del analizador. Aunque su diámetro medio fue de 1.153 ± 1.184 nm, podría sospecharse la existencia de poblaciones con diámetros aún superiores al límite del analizador (6.000 nm). La presencia de poblaciones mayores a los 1.000 nm se confirmó para los liposomas HSPC, determinando el diámetro medio antes y después de la purificación por SEC, como se verá a continuación.

Efecto de la cromatografía de exclusión – Extrusión de liposomas

Se estudió el comportamiento de las suspensiones bimodales con poblaciones por encima de los 1.000 nm luego de la purificación por SEC y cuál era el efecto de la extrusión por membranas de 800 nm a 55°C. Si los liposomas de mayor diámetro eran retenidos en la columna, podría obtenerse una muestra (M1) no representativa de la original (M0), sobre la cual se determinaría el volumen incorporado en forma incorrecta. La Tabla 17 muestra los

valores de diámetro medio (\pm anchura media) obtenidos para liposomas HSPC C5-P4 antes (M0) y después (M1) de la purificación por SEC.

Tabla 17: Diámetros medios obtenidos para distintas preparaciones de liposomas HSPC antes (M0) y después (M1) de la purificación por cromatografía de exclusión molecular. E800 indica que la suspensión procesada fue extrusionada por membranas de 800 nm (tres veces consecutivas).

Liposomas	Diámetro medio \pm anchura media (nm;%vol)	
	M0	M1
HSPC C5-P4	921 \pm 888	652 \pm 693
HSPC C5-P0,8	2.291 \pm 1.323	1.157 \pm 615
HSPC C5-P4 E800	423 \pm 448	383 \pm 349

Se observa en los liposomas HSPC C5-P4 una significativa discriminación de diámetros luego de la cromatografía de exclusión, evidenciada por la disminución del diámetro medio en la suspensión M1. En la Fig.63(A) se muestran ejemplos de distribuciones obtenidas para estos liposomas antes (M0) y después (M1) de la separación por SEC. Claramente se ve en M1 cómo la distribución ha variado respecto a M0, obteniéndose un mayor porcentaje relativo de

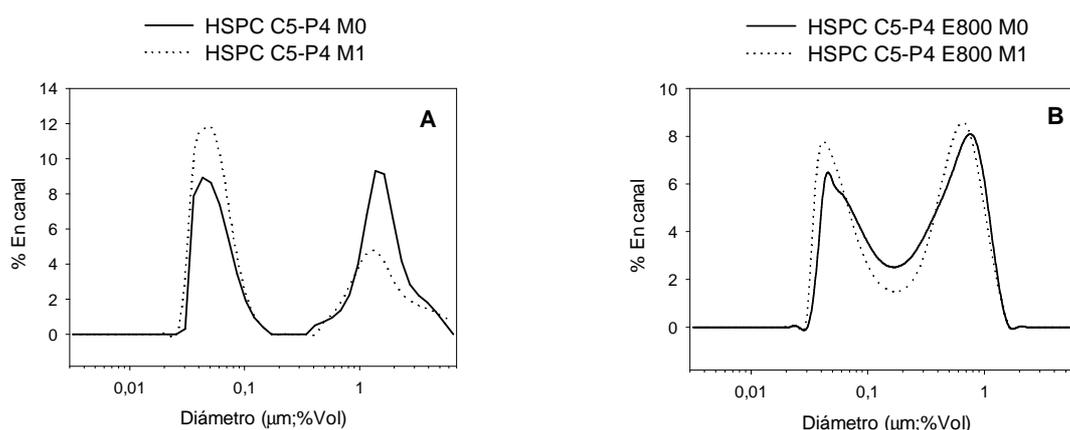


Fig.63: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC antes y después de la purificación por SEC (M0 y M1 respectivamente). En (A) se obtuvieron por homogeneización a 55°C C5-P4. En (B) se obtuvieron de la misma manera, y fueron extrusionados posteriormente por membrana de 800 nm. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador para una distribución en volumen.

vesículas con diámetros menores. Este efecto se acentúa aún más si se trata de liposomas homogeneizados a baja presión, como por ejemplo los liposomas HSPC C5-P0,8, como puede verse en la Tabla 17, en la que el diámetro medio se reduce en un 100% luego de la separación.

Cuando los liposomas homogeneizados son extrusionados por membranas de 800 nm, el diámetro medio se reduce sustancialmente y la discriminación desaparece, obteniéndose prácticamente el mismo diámetro medio antes y después de la separación (ver Tabla 17). Las distribuciones correspondientes a liposomas extrusionados también resultan equivalentes, como puede verse en la Fig.63(B).

Respecto al volumen incorporado, los valores obtenidos para liposomas C5-P4 extrusionados o sin extrusionar fueron equivalentes, situándose entre 0,9 y 1 l/mol. Por lo

tanto, y debido a las dificultades de extrusionar manualmente este tipo de liposomas (ver apartado 5.2.2., Discusión), se descartó su extrusión.

Procesamiento por recirculación

En el caso de los liposomas HSPC, además del proceso por ciclos, se ensayaron condiciones de recirculación con el objeto de evaluar la factibilidad de obtener poblaciones unimodales. La Fig.64 muestra la variación del diámetro medio con el tiempo de recirculación en el homogeneizador, para diferentes presiones de trabajo y a 55°C. En ningún caso se obtuvieron distribuciones unimodales. La Fig.65, por ejemplo, muestra la distribución de diámetros para una muestra procesada durante 8 minutos a 4 bar (L8-P4), cuyo diámetro medio fue de 434 ± 514 nm y su dispersión de 0,20. Tampoco se observó un aumento del volumen incorporado, que se mantuvo por debajo de 1 l/mol en todos los ensayos realizados, por lo tanto se descartó el proceso de recirculación por no presentar ventajas respecto al procesamiento por ciclos.

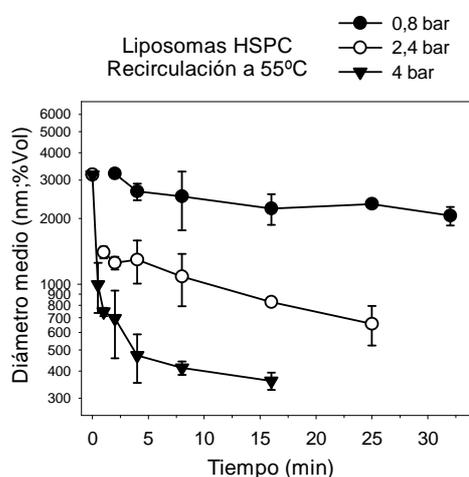


Fig.64: Variación del diámetro medio de la distribución en volumen de liposomas HSPC con el tiempo de recirculación para presiones de 0,8, 2,4 y 4 bar y a 55°C (n=2).

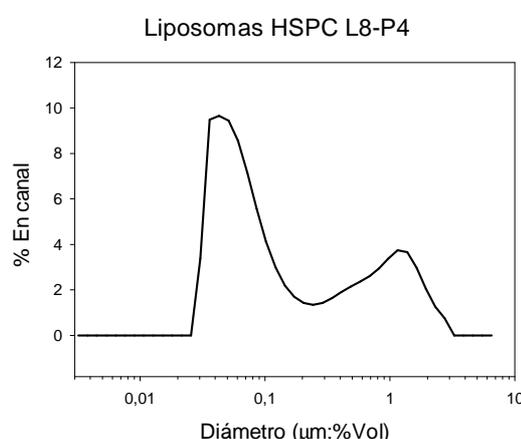


Fig.65: Distribución de diámetros para liposomas HSPC procesados a 55°C durante 8 minutos a 4 bar (L8-P4).

Elección de las condiciones de procesamiento

Como se mencionó anteriormente, es necesaria una presión mayor a 3,2 bar para que la homogeneización de liposomas HSPC proporcione vesículas con un diámetro medio inferior a 1.000 nm. Por lo tanto es aconsejable trabajar en la zona de máxima presión (4 bar). Por otro lado, a 4 bar la ecuación que describe la superficie de respuesta del volumen incorporado indica un valor de 0,72 l/mol, que no es muy favorable para la incorporación de sustancias hidrosolubles. Con objeto de disminuir el tiempo de preparación de las muestras operando a 4 bar, se consideró la posibilidad de procesar la muestra un número de ciclos intermedio. En el caso de que los ciclos sean 5, la ecuación correspondiente al diámetro indica un valor medio de 792 nm, que resulta aceptable.

Debido a la dificultad de extrusionar luego de la homogeneización y al hecho de que la recirculación no ofrece ventajas comparativas, se eligieron como condiciones de procesamiento para liposomas HSPC la homogeneización por 5 ciclos a 4 bar (C5-P4) a una temperatura de

55°C. Los valores experimentales medios obtenidos para el volumen incorporado y diámetro de liposomas HSPC C5-P4 fueron de $0,88 \pm 0,02$ l/mol y 859 ± 906 nm, muy similares a los calculados mediante las ecuaciones correspondientes.

En cuanto a la recuperación de los fosfolípidos después del procesamiento en las condiciones seleccionadas, se obtuvo un valor igual a $95,4 \pm 7,1$ % (n=13), con lo cual las pérdidas debidas al procesamiento son muy pequeñas.

4.2.2.3. LIPOSOMAS HSPC-CHOL

Las suspensiones de MLVs preparadas según lo descrito en el apartado 3.4.2. (Materiales y Métodos), fueron homogeneizadas a 55°C y mantenidas en reposo a temperatura ambiente durante una hora después de preparadas, antes de realizar las mediciones para su caracterización.

Procesamiento por ciclos: diámetro y volumen incorporado

Las ecuaciones halladas para describir el efecto de los ciclos y la presión de entrada sobre el diámetro medio y volumen incorporado de los liposomas HSPC-Chol son las siguientes:

Ecuación del diámetro:	$D_{(nm; \% vol)} = 2.434,51 - 89,38 \times C - 769,04 \times P + 5,61 \times C^2 + 108,21 \times P^2$
Coefficiente de determinación múltiple (r^2):	0,84522
Coefficiente de correlación múltiple (r):	0,91936
Test de significación de la regresión (F_{reg}):	45,05 >> 2,65 (F_{crit})
Test de significación del modelo (F_{mod}):	2,67 < 2,70 (F_{crit})
Ecuación del volumen incorporado:	$V_{(L/mol)} = 2,72 - 0,63 \times P - 0,02 \times C \times P + 0,08 \times P^2$
Coefficiente de determinación múltiple (r^2):	0,88529
Coefficiente de correlación múltiple (r):	0,94090
Test de significación de la regresión (F_{reg}):	12,65 >> 3,59 (F_{crit})
Test de significación del modelo (F_{mod}):	0,91 < 4,39 (F_{crit})

Como se desprende de la ecuación obtenida para el diámetro y se visualiza en la superficie de respuesta correspondiente (ver Fig.66), el diámetro medio tiene una fuerte dependencia tanto de la presión como del número de ciclos. En el caso del volumen incorporado, se evidencia una mayor influencia de la presión de entrada respecto al número de ciclos, como puede verse en la superficie de respuesta de la Fig.67.

En el caso de los liposomas HSPC-Chol, los valores de los coeficientes de determinación y correlación múltiples son algo menores que en los casos anteriores, especialmente para el diámetro. Aún así, el análisis de la varianza confirma que los términos del modelo explican adecuadamente las variaciones del sistema, como se desprende de las comparaciones de los estadísticos F calculados ($p < 0,05$).

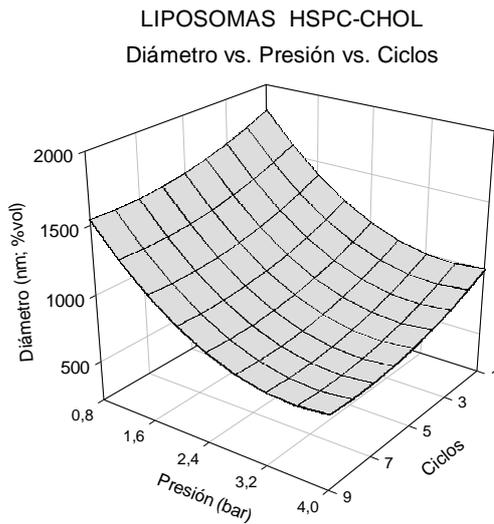


Fig.66: Superficie de respuesta "Diámetro vs. Presión vs. Ciclos" obtenida para liposomas HSPC-Chol 25 mg/ml conteniendo HPTS 2 mM (n=19) y procesando a 55°C.

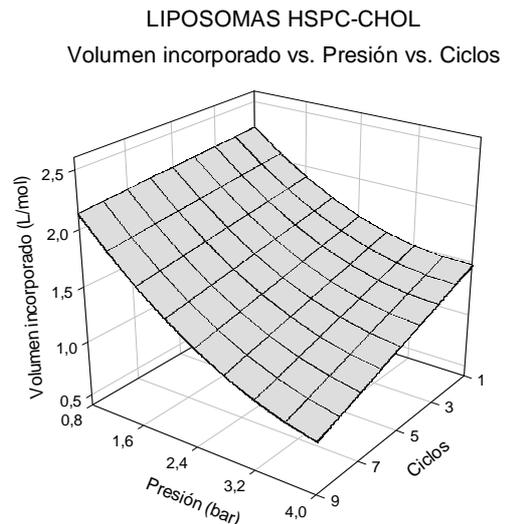


Fig.67: Superficie de respuesta "Volumen incorporado vs. Presión vs. Ciclos" obtenida para liposomas HSPC-Chol 25 mg/ml conteniendo HPTS 2 mM (n=19) y procesando a 55°C.

Análisis de las distribuciones de diámetros

Las distribuciones de liposomas HSPC-Chol resultaron semejantes a las HSPC: poblaciones bimodales en las que una población crece a expensas de la otra según las condiciones de procesamiento.

En la Fig.68 se observan las distribuciones para dos de las condiciones estudiadas. Como puede verse las distribuciones son prácticamente iguales, con una población minoritaria centrada por debajo de los 100 nm y otra mayoritaria centrada en los 1.000 nm. Por lo tanto, al igual que para liposomas HSPC, deberá controlarse que la elución de lípidos por columnas de exclusión durante la purificación de liposomas sea completa.

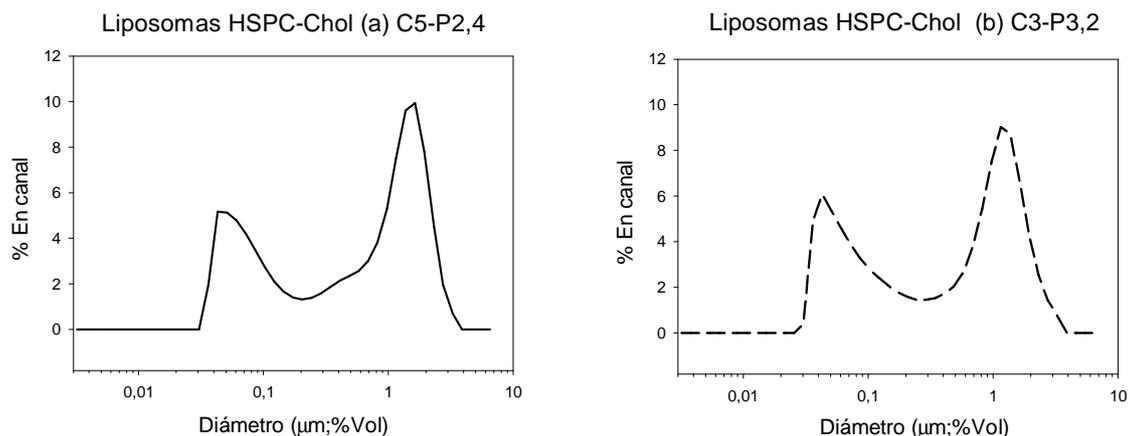


Fig.68: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC-Chol obtenidos por homogeneización a alta presión a 55°C en las condiciones (a) C5-P2,4 y (b) C3-P3,2. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador para una distribución en volumen.

Extrusión

La extrusión de liposomas HSPC-Chol a través de membranas de poro definido se realizó para eliminar las posibles poblaciones de vesículas con diámetros por encima de los 1.000 nm. En los liposomas HSPC se había verificado una disminución del 30% en el diámetro medio luego de extrusionar por membranas de 800 nm. En este caso, el diámetro medio de los liposomas C5-P2,4 obtenidos a 55°C fue de 832 ± 799 nm, mientras que luego de extrusionar a 55°C se

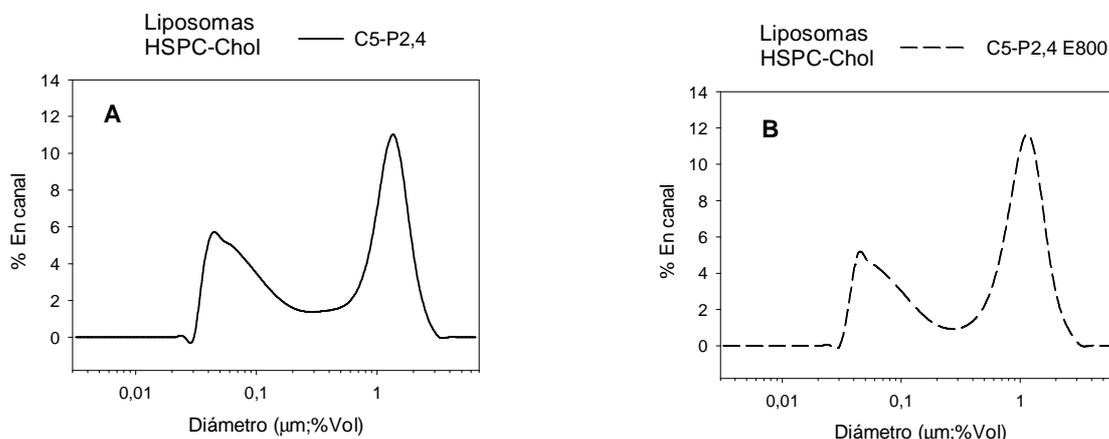


Fig.69: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC-Chol procesados C5-P2,4 a 55°C (A) sin extrusionar, (B) extrusionados por membranas de 800 nm. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador para una distribución en volumen.

obtuvo un diámetro medio de 833 ± 723 nm. La Fig.69(A) y (B) muestra ejemplos de distribuciones correspondientes a liposomas HSPC-Chol antes y después de la extrusión por 800 nm respectivamente.

Como puede observarse, no hay diferencias significativas entre las distribuciones de diámetros ni entre los diámetros medios correspondientes a los liposomas HSPC-Chol C5-P2,4 antes y después de extrusionar. Por lo tanto, en este caso, la extrusión puede obviarse.

Procesamiento por recirculación

La Fig.70 muestra los ensayos de recirculación realizados a 0,8, 2,4 y 4 bar y una temperatura de 55°C con liposomas HSPC-Chol. La recirculación a una presión de 0,8 bar no produjo variaciones apreciables del diámetro medio ni siquiera a los 25 minutos de recirculación. El procesamiento a 2,4 y 4 no causó variaciones importantes después de 8 minutos de recirculación, y las distribuciones obtenidas fueron bimodales en todos los casos. Por ejemplo, la suspensión procesada L8-P4, presentó un diámetro medio de 420 ± 419 nm y una dispersión mucho menor que 1 (0,10). El aumento del tiempo de recirculación de dicha muestra hasta 20 minutos no tuvo una gran influencia ni en el diámetro medio (346 ± 75 nm) ni en el índice de dispersión, que se mantuvo en 0,10. Además, el volumen incorporado fue inferior a 1 l/mol para ambas suspensiones. La Fig.71 muestra las distribuciones de diámetros obtenida para dos condiciones de procesamiento por recirculación.

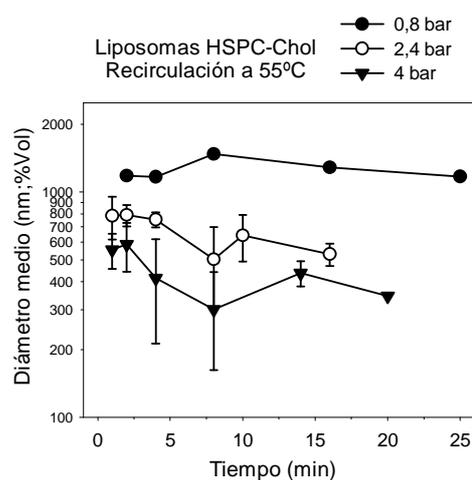


Fig.70: Variación del volumen medio (nm) de liposomas HSPC-Chol con el tiempo de recirculación para presiones de 0,8, 2,4 y 4 bar ($n=2$).

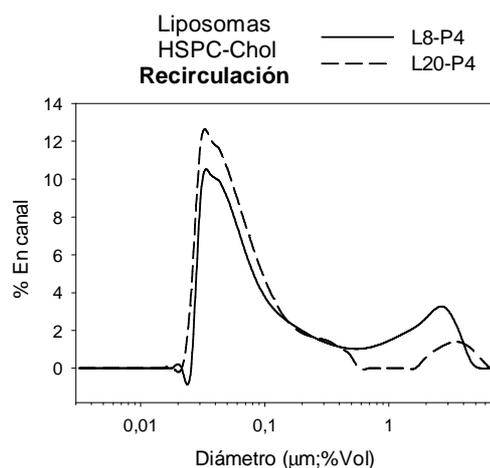


Fig.71: Distribución de diámetros para liposomas HSPC-Chol procesados a 55°C y 4 bar durante 8 (L8-P4) y 20 (L20-P4) minutos.

Evidentemente, tampoco en este tipo de liposomas la recirculación presenta ventaja alguna frente al proceso por ciclos.

Elección de las condiciones de procesamiento

Habiendo descartado el procesamiento por recirculación y la extrusión, se analizaron las condiciones que permitieran maximizar el volumen incorporado manteniendo el diámetro por debajo de los 1.000 nm. Las dos condiciones límite del procesamiento que cumplían con estos requisitos eran C3-P3,2 o bien C5-P2,4 (ver distribuciones en la Fig.68). Los diámetros medios de estas preparaciones calculados a partir de la ecuación que describe la superficie de respuesta fueron 864 nm y 905 nm respectivamente, mientras que sus volúmenes incorporados fueron iguales a 1,33 l/mol y 1,43 l/mol respectivamente. Dada las similitudes, podría haberse elegido cualquiera de las dos condiciones de homogeneización. Teniendo en cuenta que los liposomas SPC y HSPC fueron sometidos a 5 ciclos, se eligió la condición C5-P2,4 a 55°C, es decir procesarla un número de veces igual que el resto de las formulaciones. Los valores experimentales hallados para liposomas HSPC-Chol procesados C5-P2,4 a 55°C fueron de 941 ± 802 nm para el diámetro y $1,58 \pm 0,04$ l/mol para el volumen incorporado, similares a los calculados mediante las ecuaciones de las superficies de respuesta.

Respecto a la recuperación de los fosfolípidos después de la homogeneización en dichas condiciones, el valor obtenido fue de $106,4 \pm 10,3$ % ($n=13$). Teniendo en cuenta el error experimental, puede considerarse que no hay una pérdida significativa de lípidos.

4.2.3. Preparación y caracterización de liposomas conteniendo hierro

En este apartado se describirá la preparación y caracterización de distintas formulaciones de liposomas con hierro encapsulado, para evaluar posteriormente la captación de hierro mediante cultivos celulares. Se describen los ensayos realizados para:

- Estabilizar las soluciones de hierro con ácido ascórbico empleadas en la preparación de los liposomas (apartado 4.2.3.1.)
- Obtener liposomas convencionales con FeAA (SPC-FeAA, HSPC-FeAA y HSPC-Chol-FeAA) en base a las condiciones optimizadas empleando liposomas con HPTS, como se describió en el apartado 4.2.2. (apartado 4.2.3.2.)
- Preparar liposomas catiónicos reemplazando en los liposomas HSPC-Chol, el colesterol por su derivado catiónico DC-Chol (apartado 4.2.3.3.).
- Obtener liposomas aniónicos conteniendo DPPA, como base para la obtención de liposomas mucoadhesivos (apartado 4.2.3.4.).
- Preparar y purificar liposomas mucoadhesivos mediante el agregado de quitosano a la formulación (apartado 4.2.3.5.).

4.2.3.1. ESTABILIDAD DE SOLUCIONES FeAA

Como etapa previa a la preparación de liposomas conteniendo hierro, se ensayó la estabilidad de soluciones preparadas a partir de sulfato ferroso con o sin el agregado de ácido ascórbico como estabilizante.

Lo primero que se observó es que una solución de sulfato ferroso en agua, pardea en forma inmediata como resultado de su oxidación al aire, aún a concentraciones relativamente altas como 0,24 M. El agregado de ascórbico a la solución de sulfato ferroso en una relación molar de 1:2 (Fe:AA) estabiliza la solución, que puede permanecer por lo menos 15 días incolora mientras que el pH se mantenga por debajo de 3. Esta solución FeAA 1:2 0,24M comienza a oxidarse a pHs mayores o iguales a 3, para dar un complejo soluble violáceo que evoluciona con el tiempo y el aumento de pH, hasta dar un precipitado pardo. Estos cambios en el estado de oxidación del hierro se caracterizaron inicialmente por espectrofotometría en el visible.

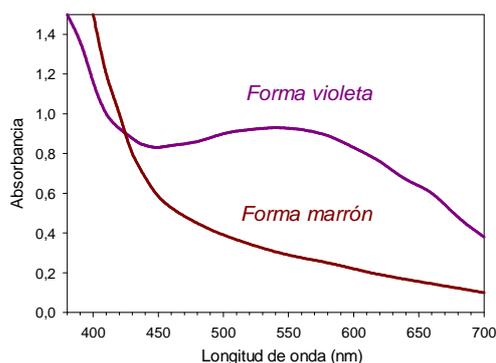


Fig.72: Espectros en el visible obtenidos para una solución FeAA 1:2 9,6 mM una vez llevada a pH 6,5 (línea violeta) o FeAA 1:2 2,4 mM, 60 minutos después de incubación a 37°C (línea marrón).

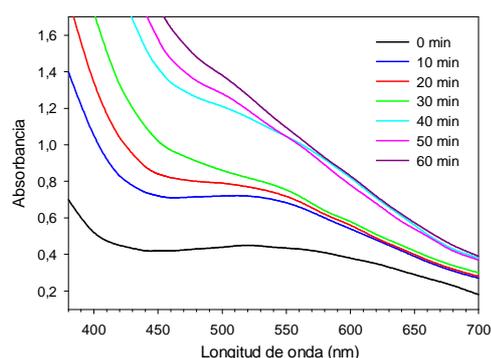


Fig.73: Espectros en el visible obtenidos para una solución FeAA 1:2 4,8 mM llevada a pH 6,5 (0 min) e incubada durante 60 minutos a 37°C, mostrando las lecturas que se realizaron cada 10 minutos en ese período.

En la Fig.72 se observan espectros obtenidos entre 380 y 700 nm para soluciones FeAA 1:2 con distinta concentración de hierro. Así, una solución 9,6 mM presenta el espectro característico de la forma "violeta", con un máximo a 540 nm, cuando es llevada a pH 6,5 (línea

violeta). Para esta concentración no se observa la formación de la forma "marrón" ni siquiera después de 60 minutos de incubación a 37°C a dicho pH. Por el contrario, una solución 2,4 mM presenta el espectro característico de la forma "marrón" a los pocos minutos de ser llevada a pH 6,5 y al menos durante los siguientes 60 minutos a 37°C (línea marrón). Estos resultados muestran cómo aumenta la estabilidad a la oxidación cuando aumenta la concentración de hierro. La solución FeAA 1:2 4,8 mM incubada a 37°C durante 60 minutos, permitió estudiar la evolución entre la forma "violeta" (Fig.73, espectro "0 min"), y la forma "marrón" (Fig.73, espectros a tiempos mayores que 30 minutos). Se observa cómo desaparece el máximo de la forma "violeta" y se produce un aumento en la línea de base que indica la presencia de partículas en suspensión.

Para una solución concentrada como FeAA 0,24 M, no se aprecia dicha evolución cuando se incubaba a pH 6,5, al menos en los tiempos estudiados. Sin embargo, se tomaron algunas precauciones durante la obtención de las suspensiones de liposomas, para prevenir la oxidación de la solución ferrosa. Por un lado, la dispersión de los lípidos se realizó en atmósfera de nitrógeno; por otro, el homogeneizador se enjuagó previamente con una solución de ácido ascórbico 0,1 M para que la suspensión no se viera expuesta al pH neutro del agua de lavado. Además todo el proceso se realizó evitando en lo posible la exposición de las suspensiones a la luz directa. Posteriormente se verá que en estas condiciones de preparación, la oxidación del hierro en estas suspensiones de liposomas no resultó significativa (ver apartado 4.5.4.).

Una solución FeAA 1:5 (0,24M : 1,2M) posee una mayor resistencia a la oxidación. Sin embargo, ni siquiera esta solución es estable a pH 7, lo cual llevó a descartar la idea inicial de preparar los liposomas empleando una solución de FeAA a pH neutro. También se observó que una concentración de ascórbico superior a 1,2 M, llevaba a la inestabilización física de la suspensión de liposomas, observándose precipitados a las 24 horas de preparación que eran difíciles de resuspender. Por lo tanto ésta fue la máxima concentración de ascórbico empleada en este trabajo.

4.2.3.2. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS CONVENCIONALES CON FeAA

Como se observa en la Fig.74, los liposomas convencionales con FeAA presentaron distribuciones de diámetros con dos o más poblaciones de vesículas, con diámetros en el rango de 30 a 1.500 nm. La heterogeneidad de sus poblaciones se vio reflejada en los valores obtenidos para la anchura media de cada distribución, como se aprecia en la Tabla 18.

Tabla 18: Caracterización fisicoquímica de liposomas convencionales conteniendo FeAA. Los valores de diámetro medio se expresan en nm, como promedio \pm anchura media. La incorporación de hierro se expresa en mg hierro/g de fosfolípidos (mg Fe/g PLs) o mg Fe/g de lípidos, como promedio \pm sem (desviación estándar de la media). Para todos los casos, $n \geq 3$.

Liposomas	Diámetro medio \pm anchura media (nm)	Hierro incorporado	
		mg Fe/g PLs	mg Fe/g lípidos
SPC	405 \pm 312	10,8 \pm 0,4	10,8 \pm 0,4
HSPC	697 \pm 721	15,9 \pm 1,0	15,9 \pm 1,0
HSPC-Chol	746 \pm 725	17,1 \pm 1,2	12,8 \pm 1,2

Las distribuciones obtenidas resultaron muy similares a las correspondientes a liposomas convencionales con HPTS preparadas en las mismas condiciones de homogeneización (ver apartado 4.4.2., Figuras 117, 118 y 119, liposomas PRE). Por lo tanto puede inferirse que

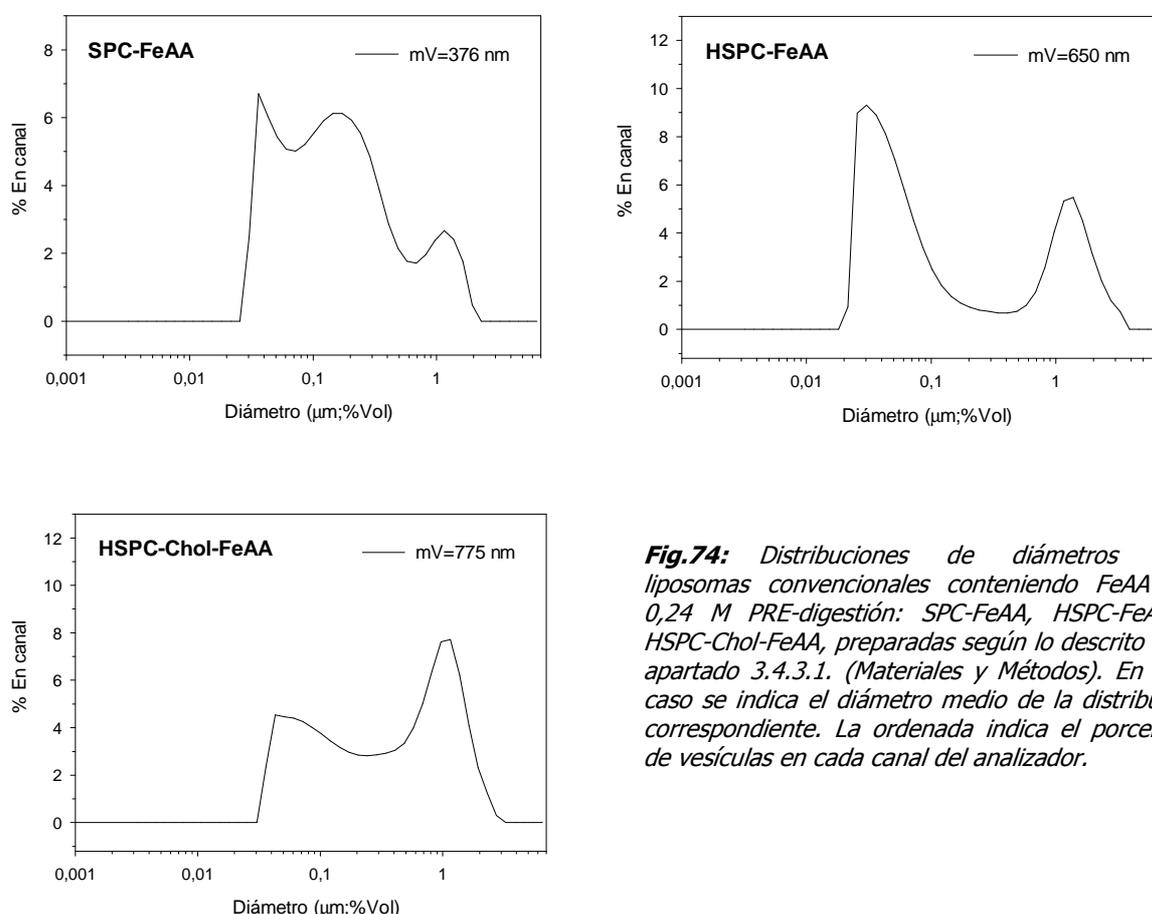


Fig.74: Distribuciones de diámetros para liposomas convencionales conteniendo FeAA 1:2 0,24 M PRE-digestión: SPC-FeAA, HSPC-FeAA y HSPC-Chol-FeAA, preparadas según lo descrito en el apartado 3.4.3.1. (Materiales y Métodos). En cada caso se indica el diámetro medio de la distribución correspondiente. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador.

la incorporación de la solución FeAA no produce cambios apreciables en la estructura física de las vesículas.

Los diámetros medios de los liposomas conteniendo FeAA variaron entre los 400 y los 750 nm dependiendo de la composición lipídica y de las condiciones de obtención (ver Tabla 18). En cuanto a la incorporación de hierro, los liposomas convencionales presentan valores entre 10 y 17 mgFe/gPLs. Al expresar el hierro incorporado en mg Fe /g lípidos, se observa que no existen diferencias en cuanto a la incorporación de hierro entre las distintas formulaciones de liposomas convencionales.

4.2.3.3. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS CATIONICOS CON FeAA

Para obtener liposomas con carga neta positiva, se reemplazó el colesterol de los liposomas HSPC-Chol por su derivado DC-Chol. Como se mencionó en el apartado 1.4.2. (Introducción), esta sustancia puede emplearse como sustituto del colesterol para la preparación de liposomas catiónicos que poseen muy baja toxicidad respecto a los liposomas catiónicos convencionales.

Los liposomas HSPC/DC-Chol se prepararon en FeAA 1:2 0,24 M, mediante una homogeneización en continuo (recirculación) para posibilitar la obtención de volúmenes pequeños de la suspensión (10 ml). La Fig.75 muestra cómo varía el diámetro medio de las vesículas obtenidas con el tiempo de recirculación. Como puede verse en la Fig.76, la distribución de diámetros obtenida para un procesamiento en continuo durante 4 minutos (L4-P2,4) resultó bimodal, al igual que las obtenidas para liposomas HSPC-Chol. En este caso, se observa un mayor porcentaje de vesículas en la población de menor tamaño (alrededor de los 100 nm; comparar Fig.76 con Fig.74), lo que se traduce en un diámetro medio inferior

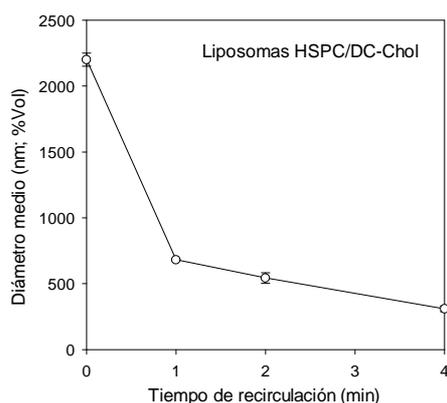


Fig.75: Variación del diámetro medio (mV) de liposomas HSPC/DC-Chol-FeAA 1:2 con el tiempo de recirculación. El procesamiento se realizó a 2,4 bar y 55°C sobre 10 ml de suspensión. La concentración total de lípidos fue de 25 mg/ml.

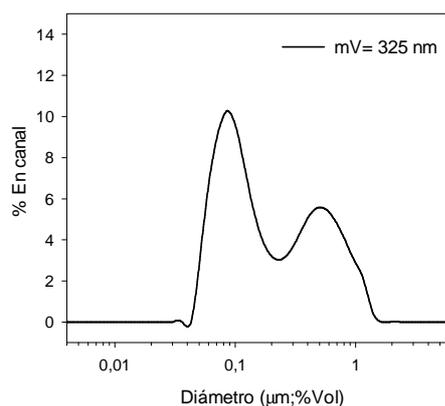


Fig.76: Distribución de diámetros para liposomas HSPC/DC-Chol-FeAA obtenidos en las condiciones L4-P2,4, a 55°C. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador. Se indica el diámetro medio obtenido para la distribución.

(comparar Tabla 19 con Tabla 18).

La carga neta positiva de estos liposomas, procesados en las condiciones L4-P2,4 a 55°C, se verificó mediante la determinación del potencial Z (ver Tabla 19). El aspecto macroscópico de las suspensiones resultantes fue correcto y las mismas (M0) pudieron aplicarse a columnas de Sephadex G-25, en forma similar a los liposomas HSPC-Chol. La purificación de estos liposomas por SEC, no alteró en forma significativa el potencial Z, confirmando que las vesículas mantienen su carga neta aún después de eliminado el hierro no encapsulado.

Tabla 19: Caracterización fisicoquímica de liposomas HSPC/DC-Chol-FeAA. Los valores de diámetro medio se expresan en nm, como promedio \pm anchura media. La incorporación de hierro se expresa en mg hierro/g de fosfolípidos (mg Fe/g PLs) o mg Fe/g de lípidos, como promedio \pm sem, $n \geq 2$ (desviación estándar de la media).

Liposomas	Diámetro medio \pm anchura media (nm)	Potencial Z (mV)	Hierro incorporado	
			mg Fe/g PLs	mg Fe/g lípidos
HSPC/DC-Chol	455 \pm 423	+17,7 \pm 1,3	32,8 \pm 4,6	24,5 \pm 4,6

4.2.3.4. PREPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS ANIÓNICOS CON FeAA

Los liposomas con carga neta negativa fueron preparados agregando ácido dipalmitoil fosfatídico (DPPA) a lípidos neutros como el HSPC o a mezclas HSPC-colesterol. Las vesículas obtenidas se emplearon como base para la obtención de liposomas mucoadhesivos con el

agregado de CHI, antes o después de ser procesados mediante homogeneización a alta presión. La Tabla 20 muestra los resultados obtenidos para el aspecto macroscópico, el diámetro medio y el potencial Z de las formulaciones más representativas.

Tabla 20: Formulaciones HSPC-DPPA con o sin colesterol obtenidas. Aquellas denominadas FeAA, contienen hierro y ácido ascórbico en una relación 0,24:0,48 M/M. El resto se preparó en buffer T10 pH 7,4. La concentración total de lípidos fue de 10 mg/ml en todos los casos. Las condiciones de procesamiento fueron C5-P4 a una temperatura de 55°C. ND: no determinado.

Liposomas	Contenido DPPA (%) ⁽¹⁾	Aspecto ⁽²⁾	Diámetro medio ± anchura media (nm)	Potencial Z (mV)
HSPC-DPPA	2,5	OK	445 ± 479	-33,4 ± 3,0
HSPC-DPPA	10	OK	188 ± 88	-40,3 ± 3,0
HSPC-Chol-DPPA	20	NOK	735 ± 787	ND
HSPC-Chol-DPPA FeAA	2,5	NOK	599 ± 563	-7,0 ± 0,3
HSPC-Chol-DPPA FeAA	10	NOK	724 ± 668	-17,0 ± 0,4

Observaciones: (1) El contenido de DPPA se expresa como porcentaje molar respecto al de HSPC. (2) Aspecto macroscópico de la preparación, calificado como OK (correcto) y NOK (no correcto), incluyendo en este último caso las suspensiones que precipitan, creman, o experimentan ambos fenómenos, hasta una hora después de preparadas.

Inicialmente se determinó la concentración de DPPA que debía agregarse al HSPC para obtener un potencial Z mínimo, con el objeto de favorecer la interacción de la superficie cargada con el quitosano. Para esto se prepararon liposomas HSPC-DPPA en buffer T10 pH 7,4 con concentraciones de DPPA entre 0 y 20%, trabajando a una presión de entrada de 4 bar y una temperatura de 55°C. El número de ciclos se optimizó determinando la variación del diámetro medio con el número de ciclos para las distintas concentraciones de DPPA.

Como se observa en la Fig.77, 5 ciclos resultan suficientes para lograr un diámetro medio practicamente constante para todos los porcentajes de DPPA. La Fig.78 muestra la

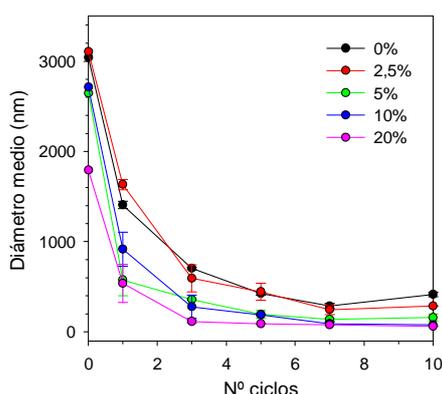


Fig.77: Variación del diámetro medio (nm) de liposomas HSPC-DPPA con el número de ciclos a distintas concentraciones relativas de DPPA. El procesamiento se realizó a 4 bar y 55°C en buffer T10 a pH 7,4 (n=2). Concentración total de lípidos: 10 mg/ml.

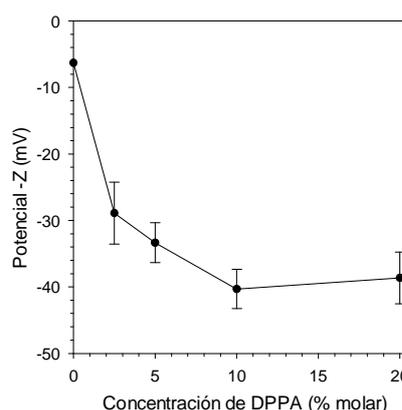


Fig.78: Variación del potencial Z con la concentración de DPPA para liposomas HSPC-DPPA preparados en las condiciones descritas en la Fig.77 (n=2).

variación del potencial Z con la concentración de DPPA para suspensiones preparadas en la condiciones C5-P4 a 55°C. Se observa una importante disminución del mismo con el agregado

de un 2,5% de DPPA, alcanzando un valor mínimo para concentraciones mayores o iguales al 10% (ver Tabla 20). Sin embargo, las formulaciones con contenidos de DPPA superiores al 5% tienen diámetros medios (mV) inferiores a los 200 nm, con lo cual se obtendrían vesículas estructuralmente muy diferentes a las formulaciones de liposomas convencionales, lo que dificultaría su comparación en los ensayos de absorción de hierro. En este sentido los liposomas con un 2,5% de DPPA poseen un diámetro medio más aceptable, como muestra la Tabla 20.

Cuando se agregó colesterol a los liposomas HSPC-DPPA, no se evidenció una marcada disminución en el diámetro medio con la concentración de DPPA ni siquiera para contenidos de DPPA del 20%, como ocurría con los liposomas sin colesterol (ver Tabla 20, liposomas HSPC-Chol-DPPA).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, se prepararon liposomas HSPC-Chol-DPPA conteniendo FeAA 1:2 0,24 M (AA 0,48 M) con un 2,5 y un 10% de DPPA. La Fig.79 muestra los valores de diámetro medio obtenidos para ambas formulaciones luego de 1, 3 y 5 ciclos de procesamiento. Como se había observado previamente con los liposomas preparados en buffer, no se evidencia un efecto de reducción del diámetro medio a 10% de DPPA respecto a los valores obtenidos con un 2,5%.

La Fig.80 muestra una de las distribuciones de diámetros obtenida para liposomas HSPC-Chol-DPPA FeAA C5-P4 con un 10% de DPPA. Se trata de una distribución heterogénea, con al menos tres poblaciones de vesículas.

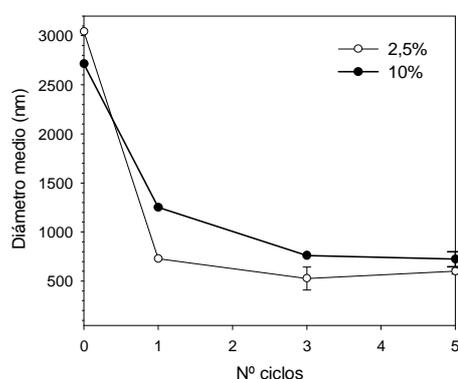


Fig.79: Variación del diámetro medio (mV) de liposomas HSPC-Chol-DPPA con el número de ciclos a 2,5 y 10% molar de DPPA. El procesamiento se realizó a 4 bar y 55°C en FeAA 1:2 0,24 M (n=2). Concentración total de lípidos: 10 mg/ml.

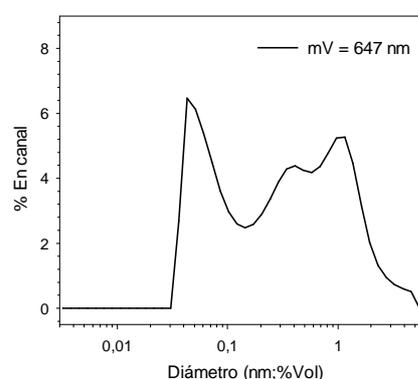


Fig.80: Distribución de diámetros de liposomas HSPC-Chol-DPPA FeAA con un 10% de DPPA, obtenidos mediante el procesamiento C5-P4 a 55°C. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador. Se indica el diámetro medio obtenido para la distribución.

Además se observó que las suspensiones de liposomas HSPC-Chol-DPPA tenían un aspecto macroscópico heterogéneo, en especial las que contenían FeAA, presentando precipitados debidos probablemente a la presencia de estructuras de mayor tamaño, fuera del rango de detección del analizador utilizado. Con respecto al potencial Z, los valores obtenidos para estos liposomas son más positivos que los obtenidos para sus homólogos HSPC-DPPA, verificándose un incremento hacia valores más negativos al aumentar la concentración de DPPA.

4.2.3.5. PREPARACIÓN, CARACTERIZACIÓN Y PURIFICACIÓN DE LIPOSOMAS MUCOADHESIVOS CONTENIENDO FeAA

Para la obtención de liposomas conteniendo quitosano, previamente debieron estudiarse los siguientes factores decisivos en la estabilidad y comportamiento de las formulaciones:

- El protocolo de preparación de la solución de FeAA conteniendo quitosano.
- La concentración de quitosano adecuada y su relación porcentual respecto la de lípidos.
- El método de separación del quitosano no asociado a los liposomas.
- El momento en que el quitosano es agregado a la suspensión (antes o después de la homogeneización).
- La concentración de DPPA.

A continuación se describen los resultados hallados para cada uno de los puntos indicados anteriormente. Complementariamente se muestra, en la Tabla 21, un resumen de las formulaciones estudiadas para optimizar la preparación de liposomas con quitosano y los parámetros empleados para la caracterización de cada una.

Tabla 21: Formulaciones estudiadas para la obtención de liposomas con quitosano. La solución FeAA 1:2 se preparó a una relación hierro:ascórbico 0,24:0,48 M/M. La concentración de fosfolípidos fue 10 mg/ml, excepto en el caso de los HSPC-Chol-DPPA FeAA-CHI POST, en que fue 8 mg/ml. Las formulaciones HSPC-Chol-DPPA se obtuvieron a una relación molar de 3:2:0,075 (correspondiente a 2,5% de DPPA) ó 3:2:0,3 (correspondiente a 10% de DPPA), procesando C5-P4 a una temperatura de 55°C.

Muestra	[CHI] (mg/ml)	[CHI]/ [PLs] ₍₃₎	%DPPA ₍₄₎	Aspecto ₍₅₎	SEC ₍₆₎	Potencial Z (mV)	DM ± AM ₍₇₎ (nm)
Solución FeAA-CHI	12	-	-	OK	-	-	-
Solución FeAA-CHI	2	-	-	OK	-	+9,5 ± 0,8	-
HSPC-Chol FeAA-CHI PRE ₍₁₎	12	1,2	-	NOK	No eluye	-	441 ± 355
HSPC-Chol FeAA-CHI PRE	2	0,2	-	OK	OK	-	1.152 ± 941
HSPC-Chol-DPPA FeAA-CHI PRE	2	0,2	2,5	OK	OK	+0,6 ± 0,3	971 ± 798
HSPC-Chol-DPPA FeAA-CHI POST ₍₂₎	2	0,2	2,5	OK	Eluye con presión >0	-	626 ± 598
HSPC-Chol-DPPA FeAA-CHI PRE	2	0,2	10	OK	OK	-6,5 ± 0,9	1.041 ± 869
HSPC-Chol-DPPA FeAA-CHI POST	2	0,2	10	OK	Eluye con presión >0	-	705 ± 640
HSPC-Chol-DPPA FeAA-CHI PRE	4	0,4	10	OK	Eluye con presión >0	+2,1 ± 0,5	-

Observaciones: (1) PRE: CHI agregado antes de la homogeneización de la suspensión de liposomas. (2) POST: CHI agregado después de la homogeneización de la suspensión de liposomas. Concentración final de PLs: 8 mg/ml. (3) [CHI]/[PLs] indica la relación en peso entre el quitosano y los fosfolípidos. (4) El porcentaje de DPPA se expresa respecto a HSPC en % molar. (5) Aspecto macroscópico de la preparación, calificado como OK (correcto) y NOK (no correcto), incluyendo en este último caso las suspensiones que precipitan, creman, o experimentan ambos fenómenos, hasta una hora después de preparadas. (6) Cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G-25 eluyendo por gravedad (OK) o con una bomba acoplada (Eluye con presión>0). (7) DM ± AM indica el diámetro medio ± la anchura media de la población de vesículas obtenidas.

Según la bibliografía existente sobre la obtención de liposomas con quitosano, habitualmente este polímero se agrega a los liposomas ya procesados (Henriksen et al., 1994). En el presente trabajo se evaluó, además, la posibilidad de agregar el quitosano antes de la homogenización, es decir, durante la etapa de obtención de los MLVs. Para esto debía prepararse previamente una solución de FeAA conteniendo quitosano que resultara adecuada para ser agregada a una película lipídica y permitiera la formación de dichas vesículas. En este aspecto resultó crítico el orden de agregado de los componentes de la solución. Primeramente debió obtenerse una solución de quitosano, lo cual se logró mediante su agitación a 40°C en una solución de ácido ascórbico durante el tiempo necesario (ver apartado 3.4.2.4. Materiales y Métodos). Recién entonces se agregó el sulfato ferroso y se agitó hasta su completa disolución (unos pocos minutos). Contrariamente, en caso de agregar el quitosano a la solución de FeAA, se observaba la aparición de una coloración violácea en la superficie de las partículas de quitosano, característico de las etapas iniciales del proceso de oxidación del hierro en presencia de ácido ascórbico (ver apartado 4.2.3.1.).

En cuanto a la concentración de quitosano, suelen emplearse relaciones en peso quitosano/fosfolípidos (CHI/PLs) entre 0,1 y 2,5 para obtener liposomas mucoadhesivos (ver apartado 5.2.3. Discusión). Con el tipo de quitosano empleado, la máxima concentración que permitió obtener una solución fluida fue de 12 mg/ml. Habiendo fijado la concentración de PLs en 10 mg/ml, los cocientes CHI/PLs estudiados estuvieron en el rango 0,2-1,2.

La solución FeAA conteniendo una concentración de quitosano de 12 mg/ml resultó adecuada para suspender una película lipídica y obtener MLVs. Sin embargo, la suspensión obtenida presentó una viscosidad demasiado elevada y resultó difícil de homogeneizar, aún trabajando a una temperatura de 55°C. Como se observa en la Tabla 21, los liposomas HSPC-Chol FeAA-CHI obtenidos para la relación CHI/PLs 1,2 resultaron inestables y la suspensión presentó una viscosidad muy elevada, lo cual impidió su purificación por SEC en Sephadex G-25. Por el contrario, los liposomas de igual composición lipídica pero conteniendo quitosano 2 mg/ml, resultaron estables y su purificación por SEC se realizó sin inconvenientes.

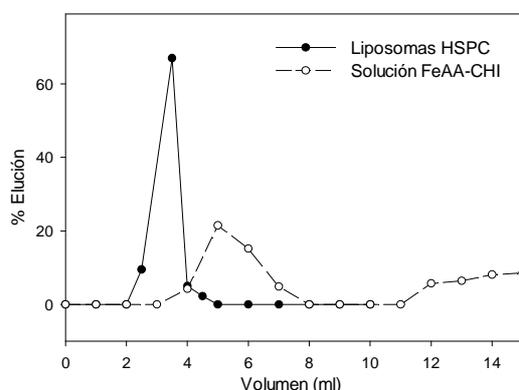


Fig. 81: Perfiles de elución para liposomas HSPC (círculos negros) y FeAA-CHI 2 mg/ml (círculos blancos), sembrados en forma individual en Sephadex G-25. La elución se realizó con HCl acuoso a pH 2,0.

Respecto a la capacidad de la SEC en Sephadex G-25 para separar el quitosano no asociado a liposomas del que sí lo está, ésta queda manifiesta en la Fig. 81. En ella se compara la elución de una solución FeAA con CHI 2 mg/ml con la de una suspensión de liposomas HSPC-FeAA. En ambos casos el eluyente fue una solución de HCl a pH 2. Como se observa, existe una buena separación entre liposomas y quitosano. En el caso de la aplicación de la solución de FeAA-CHI, el pico de quitosano, cuantificado según el método descrito en el apartado 3.3.11., eluye en las primeras fracciones. El porcentaje eluido representa un 40% del total de quitosano aplicado y

probablemente corresponda a los fragmentos de polímero de mayor peso molecular.

Debido a la elevada viscosidad de algunas preparaciones, se evaluó la ultracentrifugación como alternativa a la SEC para la separación del hierro y del quitosano no asociados a los liposomas. En la Fig.82 se muestra cómo se distribuye el quitosano y el hierro, cuando los liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% se separan por SEC en Sephadex G-25 o por ultracentrifugación durante 1 h a 115.600 x g y 4°C. Los valores mostrados son los obtenidos para liposomas conteniendo FeAA con quitosano 2 mg/ml agregado antes de la homogeneización de la suspensión (PRE), si bien se obtuvieron perfiles similares para liposomas con quitosano agregado después de la homogeneización (POST) conteniendo 2,5% ó 10% de DPPA.

Como puede observarse, la relación CHI/PLs disminuye en un 50% cuando los liposomas se separan por SEC (M1), lo cual implica que parte del quitosano de la preparación inicial no está asociado a los liposomas.

Cuando los liposomas se purifican por ultracentrifugación durante 30 minutos a 40.000 g, el pellet contiene prácticamente la totalidad del quitosano y sólo un 20 % de los liposomas. En el sedimento la relación hierro/fosfolípidos (Fe/PLs) es similar a la que presenta la muestra M1 SEC. Por lo tanto, si bien la ultracentrifugación separa adecuadamente el hierro encapsulado del libre, no ocurre lo mismo con el quitosano, que sedimenta, con lo cual esta metodología no resulta útil.

Una vez establecidas las condiciones de obtención de la solución de FeAA-CHI (orden de adición de los productos), el rango de concentraciones de trabajo (< 12 mg/ml de quitosano), y el método de separación de los liposomas (SEC), se procedió a la preparación y caracterización de distintas formulaciones de liposomas con quitosano.

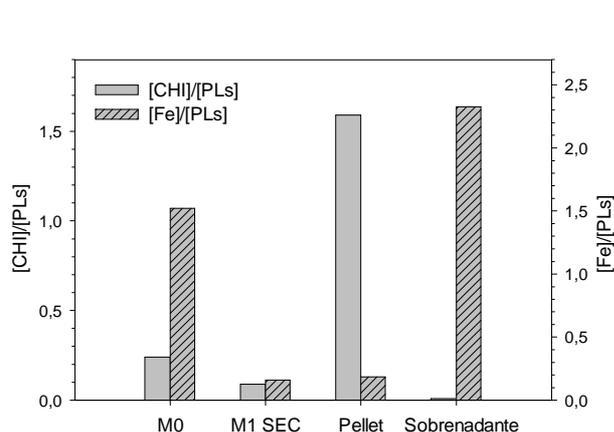


Fig.82: Distribución del quitosano y el hierro en liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% FeAA CHI 2 PRE (CHI 2 mg/ml agregado antes de homogeneizar), luego de ser separados por SEC en Sephadex G-25 (M1 SEC) o ultracentrifugados durante 1h a 115.600 x g y 4°C (pellet o sobrenadante). Los datos se expresan como cocientes de concentraciones en mg/ml.

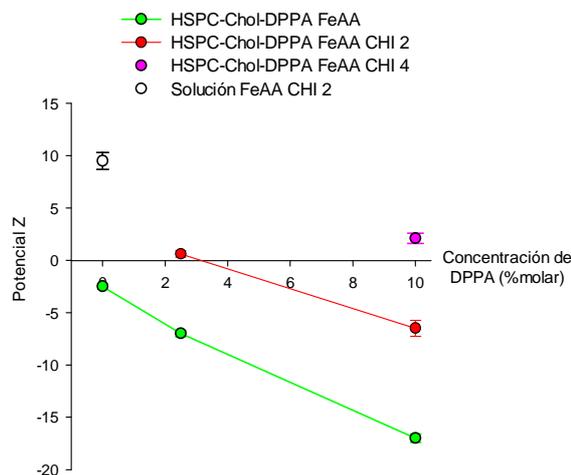


Fig.83: Variación del potencial Z con la concentración de DPPA para muestras de liposomas HSPC-Chol-DPPA conteniendo FeAA 1:2 (0,24:0,48 M/M) con o sin quitosano (CHI). CHI 2 y 4 indican concentraciones de quitosano de 2 y 4 mg/ml respectivamente.

Empleando una relación CHI/PLs (p/p) 0,2 se obtuvieron cuatro tipos de vesículas según su contenido de DPPA (2,5% ó 10%) y dependiendo de si el agregado de quitosano se realizaba antes (PRE) o después (POST) de la homogeneización de los liposomas. Por un lado se observa que los liposomas HSPC-Chol-DPPA FeAA-CHI PRE tienen diámetros medios mayores que sus homólogos POST. Sin embargo, debido a su mayor viscosidad, las suspensiones POST solo pueden ser purificadas por SEC en Sephadex G-25 mediante la aplicación de una presión positiva. Este hecho está relacionado con la fragmentación del quitosano debida a la homogeneización a alta presión según se describirá en el apartado 4.2.4.

En cuanto a los potenciales Z, una solución FeAA-CHI con una concentración de quitosano igual a 2 mg/ml, presenta una medida del potencial Z cercano a los +10 mV. Por otro lado, los liposomas HSPC-Chol-DPPA conteniendo FeAA tienen potenciales negativos proporcionales a la concentración de DPPA, como se había mostrado en la Tabla 21 y se representa en la Fig.83. Cuando se agrega CHI a estos liposomas y se homogeneizan, se observa un aumento del potencial Z para cada concentración de DPPA, que está relacionado con la concentración de CHI agregada (0, 2 y 4 mg/ml de quitosano para liposomas HSPC-Chol-DPPA 10%). También se determinó el potencial Z de las muestras con un 10% de DPPA obtenidas luego de la purificación por SEC (M1). Como se observa en la Tabla 22, los valores obtenidos para 2 y 4 mg/ml de quitosano son similares y característicos de una superficie cargada positivamente, lo cual podría favorecer las interacciones mucoadhesivas.

Para determinar la cantidad de hierro y quitosano asociado a estos liposomas se cuantificaron las relaciones en peso hierro/fosfolípido y quitosano/fosfolípido de las fracciones liposomales obtenidas por SEC. La Fig.84 muestra los resultados para formulaciones de liposomas a las cuales se ha agregado el quitosano antes (PRE) o después (POST) de homogenizar. Como puede verse, las relaciones CHI/PLs resultantes en las muestras separadas por SEC (M1) son prácticamente iguales para ambos tipos de muestras y para los liposomas con un contenido inicial de quitosano mayor (M0 Pre-4). Esto indica que después de la purificación,

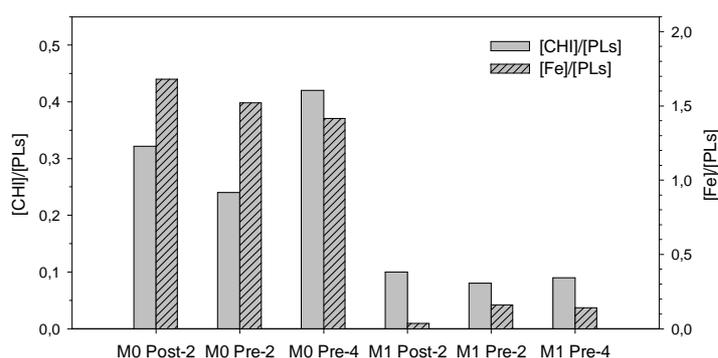


Fig.84: Distribución del quitosano y el hierro en liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% FeAA-CHI 2 mg/ml ó 4 mg/ml agregado antes de homogeneizar (M0 Pre), después de homogeneizar (M0 Post) y luego de ser separados por SEC en Sephadex G-25 (M1 Pre ó M1 Post). Los datos se expresan como cocientes de concentraciones en mg/ml.

Tabla 22: Variación del potencial Z para liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% FeAA-CHI 2 mg/ml (CHI2) ó 4 mg/ml (CHI4) agregado antes de la homogeneización, antes (M0) o después (M1) de su purificación por SEC en Sephadex G-25.

Muestra	Potencial Z (mV)
CHI 2 M0	-6,5 ± 0,9
CHI 2 M1 Sephadex	6,0 ± 0,9
CHI 4 M0	2,1 ± 0,5
CHI 4 M1 Sephadex	7,5 ± 1,0

las vesículas resultantes (M1) tienen un contenido de polímero similar, independientemente del proceso empleado y de la concentración de quitosano inicial (en el rango de trabajo de 2 a 4

mg/ml). Por consiguiente, en las formulaciones con un 10% de DPPA estudiadas, una concentración de 2 mg/ml de quitosano es suficiente para recubrir totalmente los liposomas con este polímero. Este hecho también se pone de manifiesto en la similitud entre los potenciales Z entre los liposomas separados por SEC, CHI 2 M1 y CHI 4 M1 (Tabla 22).

En cuanto al contenido de hierro, se observa una importante disminución del hierro encapsulado para los liposomas M1-Post respecto a los M1-Pre. Este hecho, sumado a su mayor facilidad para la separación por SEC, llevó a seleccionar como método de preparación de liposomas con quitosano, el agregado del polímero antes de su homogeneización. En la Fig.85 se muestran ejemplos de distribuciones de diámetros obtenidas para ambos tipos de liposomas.

Con respecto al contenido de DPPA, no se hallaron diferencias importantes entre las vesículas con un 2,5% respecto a las de 10%. Si bien el potencial Z de las suspensiones originales (M0) es muy diferente (ver Tabla 14: $+0,6 \pm 0,3$ vs. $-6,5 \pm 0,9$ mV respectivamente, para 2 mg/ml de quitosano), cuando se separan por SEC sus potenciales Z son prácticamente iguales ($+6,8 \pm 0,8$ vs. $+6,0 \pm 0,9$ mV). También se comportan de manera muy similar en cuanto a la distribución del hierro y el quitosano.

Por lo tanto se eligió como modelo la formulación HSPC-Chol-DPPA 10% FeAA-CHI 2 mg/ml para realizar los ensayos de estabilidad frente a la digestión *in vitro* (apartado 4.5.). En cuanto a los liposomas sin DPPA y con 2,5% de DPPA, se utilizarán para evaluar si la variación en el potencial Z como consecuencia del contenido de DPPA tiene alguna influencia en la absorción de hierro con cultivos celulares (apartado 4.6.). En la Tabla 23 se muestra la caracterización fisicoquímica de la formulación mucoadhesiva seleccionada antes de ser sometida al proceso de digestión.

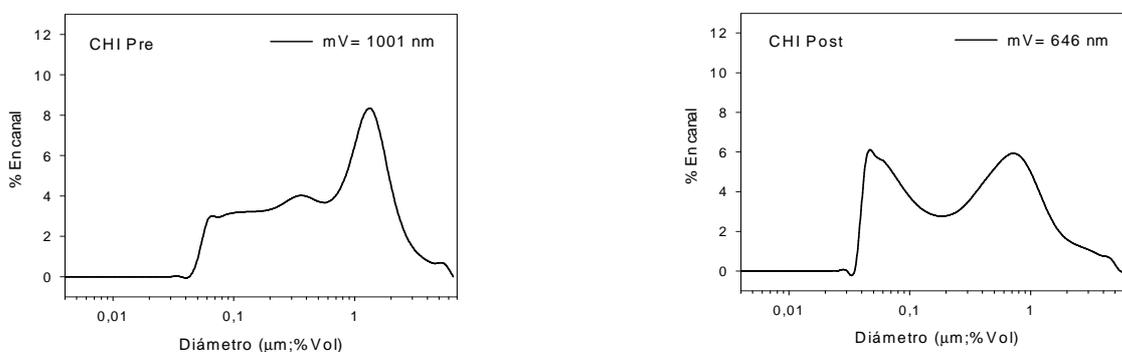


Fig.85: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% FeAA-CHI 2 mg/ml con el agregado de quitosano antes (CHI Pre) o después (CHI Post) de homogeneizar a 55°C C5-P4. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador. Se indica el diámetro medio obtenido para la distribución.

Tabla 23: Caracterización fisicoquímica de liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% FeAA-CHI 2 mg/ml. Los valores de diámetro medio se expresan como promedio \pm anchura media ($n \geq 3$). El potencial Z corresponde a la muestra original sin purificar (M0). La incorporación de hierro se expresa como promedio \pm sem, (desviación estándar de la media, $n \geq 3$).

Liposomas	Diámetro medio \pm anchura media (nm)	Potencial Z (mV)	Hierro incorporado	
			mg Fe/g PLs	mg Fe/g lípidos
HSPC-Chol-DPPA10-FeAA-CHI2	1.041 \pm 869	-6,5 \pm 0,9	151,4 \pm 9,3	105,8 \pm 9,3

4.2.4. Homogeneización de soluciones conteniendo quitosano

Como los liposomas más estables se obtuvieron cuando el quitosano se agregaba a la suspensión de liposomas antes de la homogeneización a alta presión, era importante determinar si la misma modificaba el peso molecular del polímero. Trabajos previos habían demostrado que una solución de quitosano en medio acético sometida a presiones entre 20 y 100 MPa, se fragmentaba para dar oligómeros de menor peso molecular (Kasaai et al., 2003). En este caso se quería evaluar si se producía alguna fragmentación en presencia de ácido ascórbico, midiendo la viscosidad cinemática antes y después de la homogeneización en las condiciones descritas en el apartado 4.2.5. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 24. Como puede verse, la viscosidad de la solución FeAA-CHI (CHI 2 mg/ml) después de la homogeneización C5-P4 a 60°C (POST) se reduce aproximadamente un 50% respecto al valor obtenido antes de la homogeneización (PRE).

Tabla 24: Valores obtenidos para la determinación de la viscosidad cinemática de una solución FeAA-CHI2 preparada según lo descrito en el apartado 4.2.6. La viscosidad cinemática se calculó según la ecuación correspondiente (apartado 3.5.14.3. Materiales y Métodos), donde la constante del viscosímetro a 40°C fue igual a 0,003979 csk/seg.

Muestra	Viscosidad cinemática (csk)
FeAA-CHI PRE-homogeneización	3,48 ± 0,01
FeAA-CHI POST-homogeneización	1,79 ± 0,01

Como la viscosidad cinemática es directamente proporcional al peso molecular, su disminución significativa es un indicador de la fragmentación del polímero por efecto del procesamiento.

4.2.5. Separación de liposomas de enzimas y extracto de bilis

Se prepararon soluciones de pepsina (0,6 mg/ml), pancreatina (0,65 mg/ml), extracto de bilis (2,4 mg/ml) y se empleó como modelo la suspensión de liposomas HSPC C5-P2,4 (25 mg/ml). Se sembraron alícuotas de estas soluciones en columnas PD-10 conteniendo distintos geles de exclusión molecular, para comparar su eficiencia en la purificación de los liposomas. Inicialmente, se sembró cada solución en forma individual en una misma columna, lavando exhaustivamente entre las distintas siembras (hasta absorbancia no detectable). Se eluyó con buffer T10 y se recogieron fracciones de 0,5 ml, en las que se determinaron las concentraciones de las enzimas (pepsina y pancreatina), el extracto de bilis y los liposomas midiendo la absorbancia a 280, 412 y 600 nm respectivamente.

Las Fig.86, 87 y 88 muestran los perfiles obtenidos para las enzimas, extracto de bilis y liposomas sembrados en forma individual en geles Sephadex G-75, Sephadex G-100 y BioGel A-15m respectivamente. La Tabla 25 muestra los porcentajes de enzimas y sales biliares que coeluyen con los liposomas en cada sistema. La elución de los liposomas resultó mayor al 95% en todos los casos. Como se desprende de los resultados obtenidos, el gel más adecuado para la separación es el BioGel A-15m. En la Tabla 25 puede verse como este sistema permite minimizar la elución conjunta de las enzimas y sales biliares con los liposomas.

Tabla 25: Comparación entre distintos tipos de SEC empleados para la separación entre los liposomas y las enzimas digestivas (pepsina y pancreatina) y el extracto de bilis. (1) Porcentaje que coeluye con la fracción de liposomas. (2) Porcentaje de elución total en las fracciones analizadas.

Gel	Pepsina		Pancreatina		Extracto de bilis	
	% coelución ⁽¹⁾	% elución ⁽²⁾	% coelución	% elución	% coelución	% elución
Sephadex G-75	30	47	12	27	54	63
Sephadex G-100	26	53	4	11	14	26
BioGel A-15m	7	92	<1	98	12	101

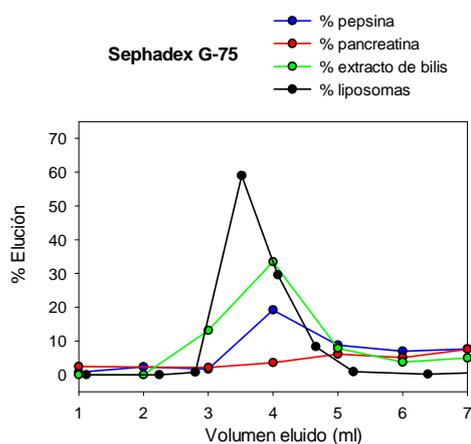


Fig.86: Perfiles de elución para pepsina, pancreatina, extracto de bilis y liposomas HSPC a través de una columna de Sephadex G-75. Buffer de elución: T10.

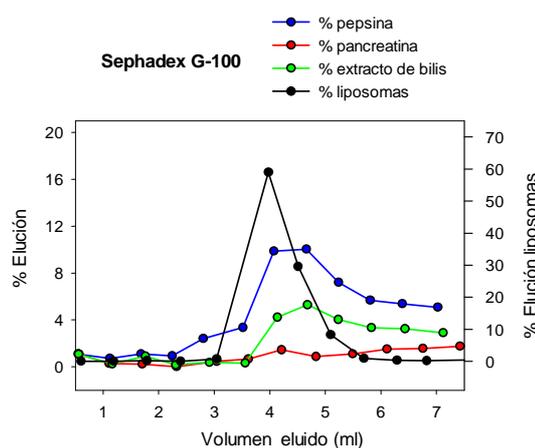


Fig.87: Perfiles de elución para pepsina, pancreatina y extracto de bilis (eje izquierdo) y liposomas HSPC (eje derecho) a través de una columna de Sephadex G-100. Buffer de elución: T10.

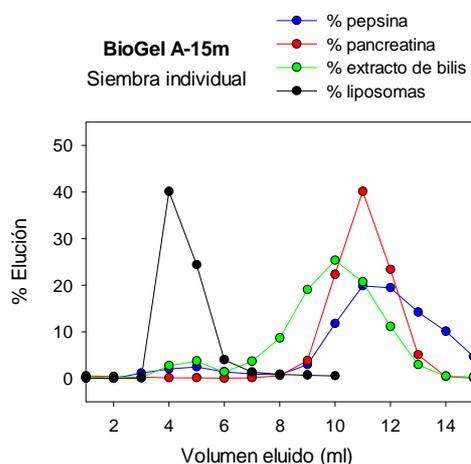


Fig.88: Perfiles de elución para pepsina, pancreatina, extracto de bilis y liposomas HSPC sembrados en forma individual en BioGel A-15m. Buffer de elución: T10.

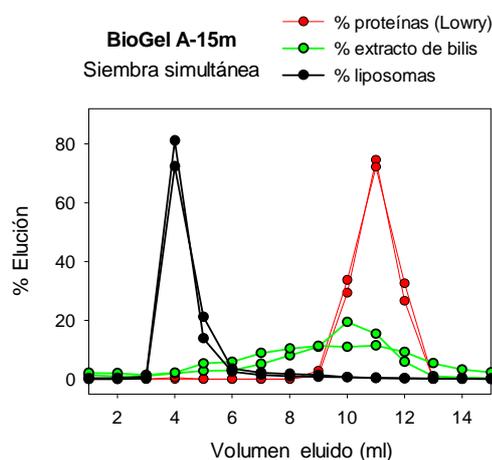


Fig.89: Perfiles de elución para mezclas de liposomas, pepsina, pancreatina y extracto de bilis empleando BioGel A-15m. Buffer de elución: T10. La concentración total de proteínas (pepsina + pancreatina) fue determinada por el método de Lowry.

Para verificar que la resolución se mantenía al sembrar en forma simultánea todas las sustancias, fue necesario cuantificar las proteínas por un método específico que no presentara interferencias por la presencia de los liposomas. Se verificó que el método de Lowry (ver

apartado 3.3.9. Materiales y Métodos) podía resultar adecuado, ya que la presencia de los fosfolípidos no interfiere en la reacción con el reactivo de Folin-Ciocalteu. Sin embargo, en las muestras más concentradas, la turbidez aumentaba inespecíficamente la absorbancia a 750 nm. Esto se solucionó centrifugando estas muestras durante 15 minutos en una microcentrífuga a 14.000 rpm, de forma que se sedimentaron los liposomas y se analizó el sobrenadante. El mismo procedimiento se siguió para cuantificar el extracto de bilis midiendo la absorbancia a 412 nm.

Como puede observarse en la Fig.89, los liposomas se separaron completamente de las proteínas y razonablemente bien del extracto de sales biliares cuando se sembró la mezcla en BioGel A-15m. La coelución de las proteínas con los liposomas resultó no detectable, mientras que la coelución del extracto de bilis estuvo alrededor del 10%, similar al valor obtenido para la siembra individual (ver Tabla 25).

4.3. SOLUBILIZACIÓN DE LIPOSOMAS

En este apartado se estudia la estabilidad de los liposomas convencionales frente a la solubilización con Triton X-100, el tensioactivo utilizado para obtener soluciones ópticamente transparentes como paso previo a las determinaciones analíticas, y frente al extracto de bilis, empleado en la etapa "intestinal" del proceso de digestión *in vitro*. Estos estudios permiten evaluar la estabilidad estructural de las vesículas obtenidas frente a tensioactivos sintéticos o naturales.

4.3.1. Solubilización de liposomas con Triton X-100

Los ensayos de solubilización se realizaron para las todas las formulaciones convencionales con el objeto de eliminar las interferencias de las suspensiones lipídicas en los métodos de cuantificación de las sustancias incorporadas (HPTS o compuestos de hierro). Estos estudios permitieron establecer las condiciones de solubilización para cada formulación en cuanto a temperatura, tiempo y concentración de tensioactivo en relación a la concentración lipídica de la muestra.

4.3.1.1. LIPOSOMAS HSPC

Los ensayos preliminares se realizaron con una formulación obtenida por homogeneización a temperatura ambiente en el modo ciclos (C15-P4), obteniéndose MLVs a una concentración de HSPC de 25 mg/ml, con un diámetro medio de 2.322 ± 1.075 nm. Se diluyó con buffer T10 hasta la obtención de una absorbancia a 511 nm (Abs 511) menor o igual a 0,7, resultando una concentración de lípidos de 0,66 mg/ml.

Previamente a los estudios de solubilización, se midió la variación de la Abs 511 con la temperatura para la suspensión C15-P4 diluida a 0,66 mg/ml en ausencia del tensioactivo, como se observa en la Fig.90. Partiendo de una suspensión a 25°C se aumentó la temperatura hasta los 55°C y se incubó durante 30 minutos.

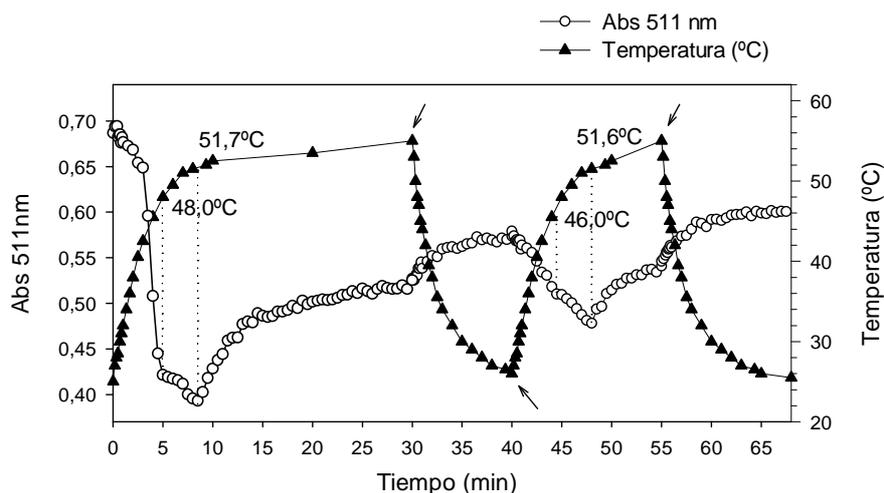


Fig.90: Efecto de la temperatura en la absorbancia de suspensiones de liposomas MLVs HSPC C15-P4 a 0,66 mg/ml. Las flechas indican los tiempos a los cuales se realizaron las variaciones de la temperatura de la celda del espectrofotómetro.

Luego se repitieron los gradientes 55°C a 25°C y 25°C a 55°C sobre la suspensión preincubada, como se indica mediante las flechas en el gráfico de temperatura vs. tiempo. Se observan importantes variaciones de la Abs 511 con la temperatura: al aumentar la temperatura, disminuye la Abs 511 hasta llegar a un mínimo, luego se recupera pero sin alcanzar los valores iniciales aún cuando la temperatura vuelve a los 25°C iniciales.

Interpolando en el gráfico "temperatura vs. tiempo" las temperaturas a las cuales se producen mínimos en la Abs 511, puede verse un mínimo secundario a 48,0°C, y un mínimo principal a 51,7°C. Para la muestra preincubada durante 30 minutos, se observa una menor

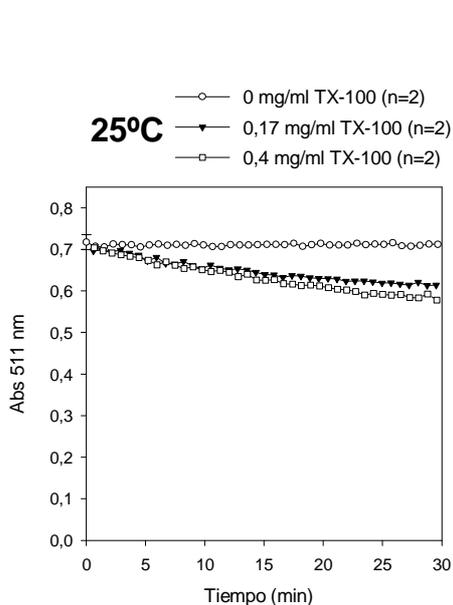


Fig.91: Cinéticas de absorbancia a 511 nm para liposomas HSPC C15-P4 0,66 mg/ml incubados con TX-100 a 25°C.

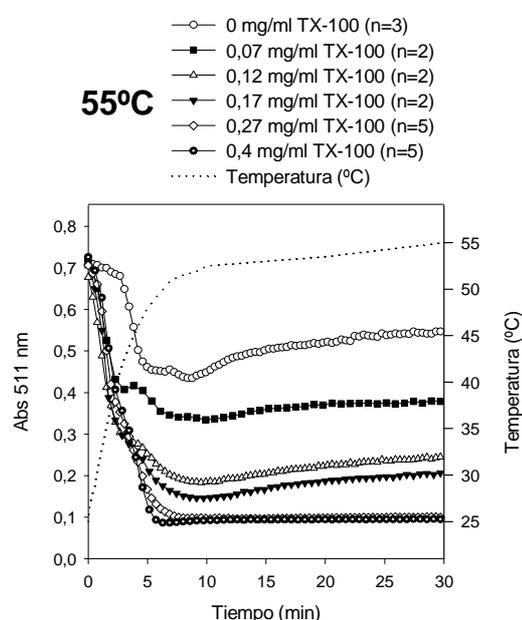


Fig.92: Cinéticas de absorbancia a 511 nm para liposomas HSPC C15-P4 0,66 mg/ml incubados con TX-100 y calentando desde 25°C hasta 55°C.

disminución de la Abs 511 y las temperatura a la cuales aparecen los mínimos secundario y principal son ahora 46,0°C y 51,6°C respectivamente. Este cambio en la temperatura de pre-

transición se observará mediante calorimetría de barrido diferencial, en liposomas HSPC incubados 30 minutos a 55°C (apartado 4.4.7.).

Los primeros ensayos con Triton X-100 revelaron que el agregado del tensioactivo a 25°C producía una pequeña disminución de la Abs 511 respecto al valor inicial, aún a las mayores concentraciones ensayadas, como se muestra en la Fig.91 (página anterior). Aumentando la temperatura por encima de la T_m determinada en el apartado 4.3.2. (52,2°C), el agregado de concentraciones crecientes de tensioactivo produce una drástica disminución de la Abs 511 (ver Fig.92), lo cual indica que, en mayor o menor grado, tiene lugar la solubilización de las vesículas.

Una vez transcurridos 30 minutos las muestras se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente (25°C), realizándose a continuación una nueva lectura de la absorbancia. Con los datos obtenidos se confeccionó el gráfico "Abs 511 vs. Concentración de TX-100" (Fig.93).

Como puede observarse, la solubilización total de los liposomas HSPC calentados a 55°C y posteriormente llevados a 25°C, se produce a una concentración de TX-100 de unos 0,4 mg/ml. En estas condiciones se obtienen muestras con valores de Abs 511 inferiores a 0,02. También se evidencia que no existe solubilización cuando los liposomas se incuban a 25°C y que no aparecen interferencias por la presencia del tensioactivo, como lo muestra la baja absorbancia correspondiente al blanco de TX-100. En la Fig.94 se muestra que una concentración de 0,4 mg/ml de TX-100 también resulta eficiente para solubilizar completamente liposomas HSPC de concentraciones inferiores a 0,66 mg/ml, obteniéndose absorbancias menores o iguales a 0,02 en todos los casos.

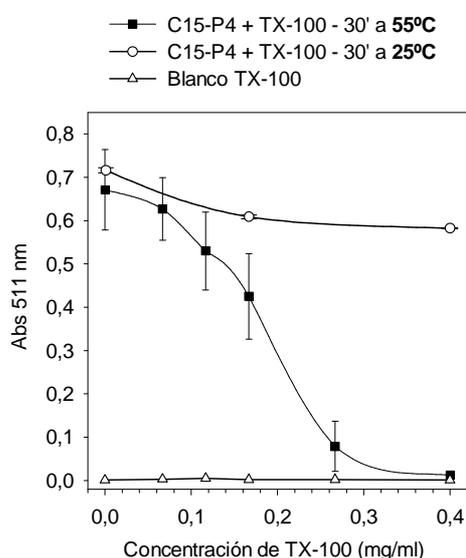


Fig.93: Absorbancia a 25°C en función de la concentración de TX-100 de suspensiones de liposomas HSPC C15-P4 0,66 mg/ml, luego de incubarse durante 30 minutos a 25°C (○) y a 55°C (■). Se incluyen blancos de TX-100 sin liposomas incubados a 55°C (△).

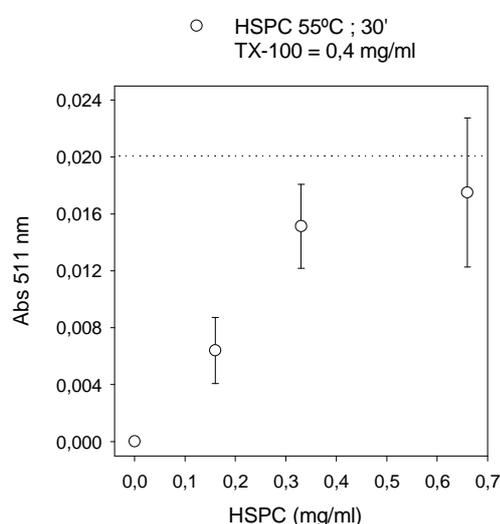


Fig.94: Absorbancia a 25°C en función de la concentración de lípidos para liposomas HSPC C15-P4, después de incubarse con TX-100 0,4 mg/ml durante 30 minutos a 55°C.

Las condiciones de solubilización halladas se probaron en otras formulaciones de HSPC con distintas distribuciones de diámetros. Para esto se prepararon liposomas L10-P4 a temperatura ambiente y C15-P4 homogeneizando a 55°C, con diámetros medios de 1.220 nm y

340 nm respectivamente. Se obtuvieron las cinéticas de solubilización para diluciones adecuadas de estas formulaciones y a partir de ellas, los gráficos "Abs 511 vs. concentración de TX-100" a 25°C, que se muestran en la Fig.95. Debido a que las absorbancias iniciales de cada tipo de suspensión ensayada son diferentes, la absorbancia en este caso, se expresa como porcentaje de la absorbancia inicial, tomando como referencia el valor inicial de cada muestra en ausencia del tensioactivo. Los resultados se comparan con la suspensión estudiada previamente (C15-P4 homogeneizada a 25°C).

Como puede verse en la misma figura, estas formulaciones también se solubilizan completamente a 55°C a una concentración de TX-100 cercana a los 0,4 mg/ml, de manera que una vez enfriadas hasta 25°C, su absorbancia es menor a, aproximadamente, el 3% del valor inicial.

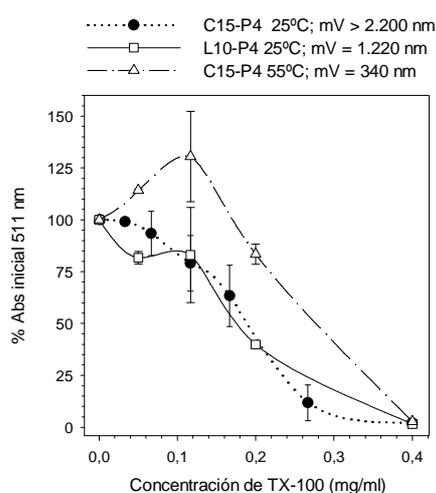


Fig.95: Variación de la absorbancia relativa con la concentración de TX-100 para distintas formulaciones de liposomas HSPC diluidas en buffer T10 hasta una concentración de 0,66 mg/ml e incubadas con TX-100 durante 30 minutos a 55°C. Se indican las condiciones de homogeneización de cada una y su diámetro medio (mV).

determinación del volumen incorporado.

Tabla 26: Variación de la absorbancia de formulaciones de liposomas HSPC (0,66 mg/ml) diluidas en buffer T100 con TX-100 0,4 mg/ml. La Abs. 511 inicial corresponde al valor obtenido para la muestra sin tensioactivo a 25°C. La Abs. 511 final es el valor luego de incubar 30 min a 55°C con tensioactivo y llevar a 25°C.

Muestra	Diámetro medio (nm)	Abs. 511 inicial	Abs. 511 final
C15-P4 hom.25°C	2.200	0,568	< 0,010
L10-P4 hom.25°C	1.220	0,318	< 0,010
C15-P4 hom.55°C	340	0,146	< 0,010

Finalmente, cabe destacar que durante el transcurso del presente trabajo se hallaron algunas formulaciones que resultaron resistentes a la solubilización en las condiciones determinadas anteriormente. Por ejemplo, las formulaciones C5-P2,4 y C5-P4 homogeneizadas

a 55°C, no se solubilizan completamente incubando durante 30 minutos con TX-100 0,4 mg/ml. Por lo tanto se ensayaron concentraciones de 2 y 10 mg/ml de tensioactivo y se incubó durante 30 y 60 minutos.

Como puede verse en la Tabla 27, fue necesaria una incubación durante 30 a 60 minutos a 55°C y a una concentración de TX-100 de 10 mg/ml para obtener valores de Abs 511 menores que 0,01 en las formulaciones estudiadas diluidas hasta 0,66 mg/ml. Por lo tanto se decidió emplear estas condiciones de solubilización con TX-100 para cualquier formulación liposomal compuesta por HSPC.

Tabla 27: Absorbancia a 511 nm y a 25°C de formulaciones de liposomas HSPC (0,66 mg/ml) después de su incubación con TX-100. Se indica la concentración del tensioactivo (mg/ml) y el tiempo de incubación (minutos) a 55°C antes de leer la absorbancia una vez que la muestra se ha llevado a temperatura ambiente.

Muestra	Diámetro medio ± anchura (nm)	Abs 511 nm				
		Inicial	2 mg/ml 30'	2 mg/ml 60'	10 mg/ml 30'	10 mg/ml 60'
C5-P2,4	1.483 ± 1.400	0,741	0,070	0,042	0,011	< 0,010
C5-P4	815 ± 869	0,187	0,038	0,015	< 0,010	< 0,010

4.3.1.2. LIPOSOMAS SPC

Las cinéticas de solubilización de liposomas SPC se realizaron a 25°C empleando concentraciones de TX-100 entre 0 y 4 mg/ml. Para verificar la solubilización total de liposomas de diferentes diámetros, se prepararon MLVs homogeneizando a C1-P0,8 (diámetro 1.847 ± 1.684 nm), y SUVs (diámetro 61,3 ± 44,1 nm), mediante homogeneización L3-P4 a temperatura ambiente. Los liposomas obtenidos a una concentración de 25 mg/ml, se diluyeron hasta una concentración de 0,6 mg/ml en buffer T100. Debido a la diferencia de diámetros, las absorbancias iniciales de ambas diluciones resultaron muy diferentes, por lo que, para hacer comparables los resultados, éstos se expresan como "% Abs inicial 511 vs. concentración de TX-100".

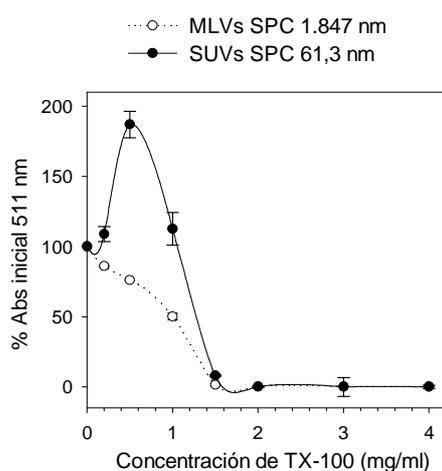


Fig.96: Solubilización con TX-100 de dos formulaciones de liposomas SPC diluidas hasta 0,6 mg/ml en buffer T10.

Los primeros resultados obtenidos muestran que, a temperatura ambiente, estas muestras alcanzan el equilibrio en forma inmediata después del agregado del tensioactivo y agitando la muestra con vórtex durante unos segundos. En estas condiciones se obtienen absorbancias estables en el tiempo. La Fig.96 muestra las curvas de solubilización de liposomas SPC con TX-100.

Como ya se había observado para los liposomas HSPC de menor tamaño, los SUVs SPC presentan un aumento de la Abs 511 respecto al valor inicial a bajas concentraciones de TX-100. También se observa que ambas preparaciones se solubilizan completamente a una concentración

de TX-100 mayor o igual que 1,5 mg/ml. Debido a esto, se decidió solubilizar los liposomas SPC 0,6 mg/ml con TX-100 2 mg/ml a temperatura ambiente agitando con vórtex durante unos segundos.

4.3.1.3. LIPOSOMAS HSPC-CHOL

Los ensayos preliminares de solubilización de liposomas HSPC-Chol se realizaron con formulaciones C1-P0,8 procesadas a 55°C y a una concentración de lípidos de 25 mg/ml. En estas condiciones se obtienen MLVs, con un diámetro medio de 2.229 nm. Con el objeto de obtener absorbancias dentro del rango lineal del espectrofotómetro, los liposomas se diluyeron hasta una concentración de 0,25 mg/ml en buffer T100, ya que los liposomas HSPC-Chol son los que poseen una mayor turbidez entre los estudiados.

Primeramente se ensayaron condiciones similares a las halladas para liposomas HSPC. Por lo tanto se realizaron cinéticas de hasta 2 horas empleando concentraciones crecientes de tensioactivo hasta una concentración de 20 mg/ml, incubando a 55°C. La Fig.97 muestra las cinéticas de Abs 511 para liposomas HSPC-Chol incubados a 55°C con concentraciones crecientes de TX-100. La Fig.98 es el gráfico "Abs 511 vs. concentración de TX-100" obtenido a partir de las muestras de la Fig.97, una vez que las mismas se llevaron a 25°C después de la incubación de 2 horas. Se observa que ni siquiera a la máxima concentración de TX-100 ensayada se obtiene la solubilización completa de los liposomas, como lo indica el valor de 0,06 para la Abs 511 obtenido con una concentración de tensioactivo de 20 mg/ml, y que corresponde a un 7% de la absorbancia inicial de la muestra.

El uso del ultrasonido con el objetivo de acelerar la solubilización no arrojó resultados satisfactorios. La sonicación de muestras incubadas a 55°C con 20 mg/ml de TX-100 a 55°C no produjo disminuciones significativas de la absorbancia.

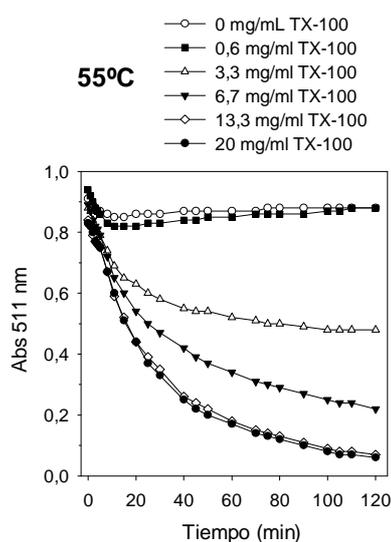


Fig.97: Cinéticas de absorbancia a 511 nm para liposomas HSPC-Chol C1-P0,8 0,6 mg/ml incubados con TX-100 a 55°C durante 120 minutos.

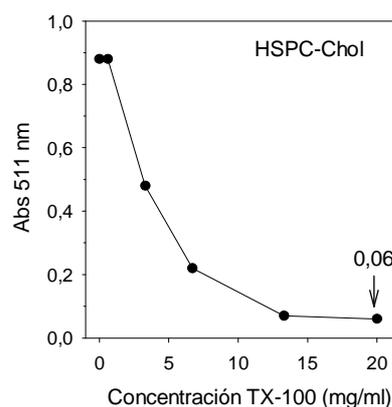


Fig.98: Absorbancia a 25°C de suspensiones de liposomas HSPC-Chol (C1-P0,8) 0,6 mg/ml incubadas con TX-100 a 55°C durante 120 minutos.

Como consecuencia de los resultados anteriores, se estudiaron tiempos de incubación y concentraciones de tensioactivo mayores. Para esto se incubaron con concentraciones de TX-

100 de 0, 10 y 30 mg/ml a 55°C y durante diferentes períodos, liposomas HSPC-Chol con una concentración de 0,25 mg/ml. Éstos se prepararon en buffer T10 con diferentes condiciones de obtención de la película lipídica y de homogeneización, por lo cual los diámetros medios de las vesículas resultaron distintos (Tabla 28). Se realizaron lecturas de la absorbancia a 25°C después de incubar las mezclas durante 0, 3, 19 y 24 horas.

Tabla 28: Absorbancia a 25°C de suspensiones de liposomas HSPC-Chol incubadas con TX-100 a 55°C durante 0, 3, 19 y 24 horas (n=2). En todos los casos, la concentración de TX-100 fue de 30 mg/ml y la de las suspensiones de 0,25 mg/ml (concentración de lípidos). DM \pm AM: diámetro medio \pm anchura media.

Condiciones homogeneiz.	Tipo de preparación	DM \pm AM (nm)	Abs 511 nm			
			Inicial	t=3 h	t=19 h	t=24 h
C1-P0,8 - 55°C	P-cloroformo	2.229 \pm 1.346	0,848 \pm 0,0215	0,031 \pm 0,002	< 0,01	< 0,01
C1-P0,8 - TA	Mezcla	1.983 \pm 918	0,826 \pm 0,033	0,076 \pm 0,001	0,014 \pm 0,001	< 0,01
C1-P0,8 - 55°C	P-etanol	1.450 \pm 803	0,682 \pm 0,019	0,017 \pm 0,002	< 0,01	< 0,01
L10-P0,8 - 55°C	P-cloroformo	1.118 \pm 897	0,683 \pm 0,021	< 0,01	< 0,01	< 0,01

Se observó que una concentración de 10 mg/ml era insuficiente para lograr la solubilización total de algunas de las preparaciones aún incubando durante 24 horas a 55°C. La Tabla 28 muestra los valores de Abs 511 obtenidos para TX-100 30 mg/ml, la máxima concentración de tensioactivo ensayada. Si bien la mayoría de las muestras se encuentran solubilizadas antes de las 19 horas, los liposomas con un diámetro medio de 1.983 nm, presentan una absorbancia del orden del 2% de la inicial, pero ésta disminuye hasta un valor

no detectable después de 24 horas de incubación.

También se verificó la solubilización total a concentraciones de lípidos menores a 0,25 mg/ml en las condiciones descritas anteriormente, es decir, una incubación a 55°C durante 24 h con TX-100 a 30 mg/ml (ver Fig.99).

Como se verá posteriormente, esta elevada resistencia a la solubilización observada en los liposomas HSPC-Chol, motivó la búsqueda de un método alternativo más rápido para cuantificar el contenido de la sustancia incorporada.

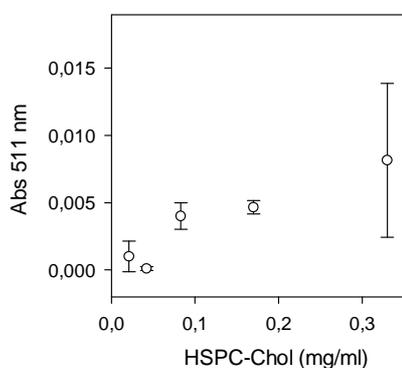


Fig.99: Absorbancia a 25°C de liposomas HSPC-Chol (1.983 \pm 918 nm) diluidos en buffer T10 a concentraciones menores o iguales a 0,33 mg/ml y solubilizados previamente con TX-100. Las condiciones de solubilización fueron 24 h a 55°C con TX-100 30 mg/ml.

4.3.2. Solubilización de liposomas con extracto de bilis

En este apartado se muestran los ensayos de solubilización realizados con extracto de bilis (EB) y liposomas convencionales. Los resultados obtenidos permiten conocer el estado de las vesículas durante los ensayos de digestión *in vitro*.

La solubilización se verificó monitoreando la disminución de la absorbancia al visible (apartado 3.3.2., Materiales y Métodos) y determinando los diámetros medios de las vesículas a medida que van evolucionando hacia la formación de sistemas micelares (apartado 3.5.4., Materiales y Métodos).

4.3.2.1. ENSAYOS PRELIMINARES

Estos ensayos permitieron establecer las condiciones adecuadas para realizar los estudios de solubilización con extracto de bilis con cada tipo de liposoma. Así, se estudió el rango de concentración lipídica adecuado tanto para las mediciones de absorbancia como de tamaño de partícula; el tiempo necesario para obtener valores de absorbancia constantes y la temperatura de incubación para llegar a la solubilización completa de las vesículas. En cuanto a la determinación del diámetro medio, se eligió en cada caso una concentración tal que estuviera dentro del rango de medición del equipo empleado y que al mismo tiempo permitiera una determinación precisa del diámetro de las micelas obtenidas por solubilización de los liposomas (diámetros inferiores a los 20 nm).

Para los liposomas SPC se estableció un rango de concentración de lípidos entre 0,45 y 2,5 mg/ml, se fijó la temperatura en 37°C y el tiempo máximo de incubación en 20 minutos. Con los liposomas HSPC se trabajó entre 0,3 y 2,5 mg/ml incubando durante 60 minutos a 55°C, mientras que para los liposomas HSPC-Chol se emplearon concentraciones entre 0,15 y 0,65 mg/ml, incubando a 65°C durante 60 minutos. En el caso de los liposomas HSPC y HSPC-Chol, las concentraciones más altas requirieron una incubación de 120 minutos para llegar a una absorbancia constante, que caracteriza el estado de equilibrio. En cuanto a la concentración lipídica, se emplearon diluciones que permitieran la medición precisa de la absorbancia a 600 nm y que se solubilizaran completamente con concentraciones de extracto de bilis de hasta 30 mg/ml (máxima concentración estudiada). La Fig.100 muestra ejemplos de cinéticas de absorbancia a 600 nm para los tres tipos de liposomas convencionales, obtenidas

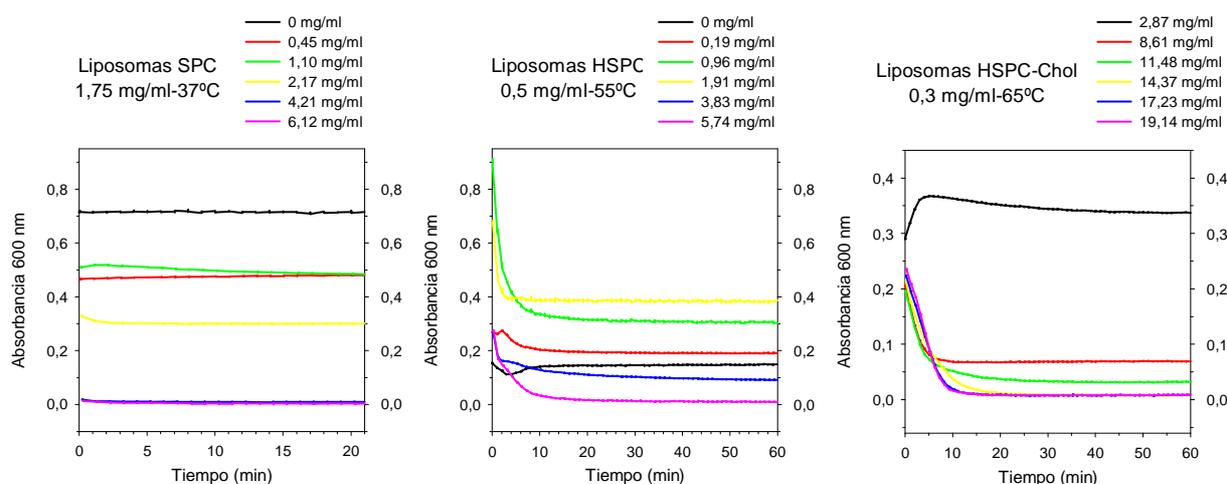


Fig.100: Cinéticas de absorbancia a 600 nm obtenidas para liposomas SPC (1,75 mg/ml a 37°C), HSPC (0,5 mg/ml a 55°C) y HSPC-Chol (0,3 mg/ml a 65°C) a distintas concentraciones de EB. Las muestras se diluyeron en buffer T10 llevado a pH 6,5.

en las condiciones mencionadas.

Como se desprende del gráfico correspondiente (Fig.100, izquierda), una suspensión de liposomas SPC diluida a 1,75 mg/ml se solubiliza completamente a concentraciones de EB mayores o iguales a 4,21 mg/ml a 37°C. Para los liposomas HSPC, se requiere una concentración de 5,74 mg/ml para solubilizar suspensiones conteniendo 0,5 mg lípidos/ml a 55°C (Fig.100, centro). Los liposomas HSPC-Chol 0,3 mg/ml requieren una concentración de EB de 14,37 mg/ml para su solubilización (Fig.100, derecha), resultando los más resistentes a la formación de micelas.

También se observa que un aumento de concentración en el EB, no siempre se ve reflejado en una disminución de la absorbancia. Como puede verse en el gráfico correspondiente a SPC, concentraciones de EB de 0,45 y 1,10 mg/ml tienen igual efecto sobre los valores de absorbancia (líneas roja y verde), mientras que en el caso de los liposomas HSPC, concentraciones entre 0,19 y 1,91 mg/ml producen un aumento de la absorbancia a 600 nm respecto a la muestra incubada sin EB a la misma temperatura (líneas roja, verde y amarilla).

4.3.2.2. LIPOSOMAS SPC

Así como son rápidamente solubilizados por bajas concentraciones de TX-100 a 25°C, los liposomas SPC también son muy susceptibles a la solubilización con sales biliares a 37°C. La Fig.101 muestra las curvas de solubilización "Absorbancia vs. concentración de EB" obtenidas

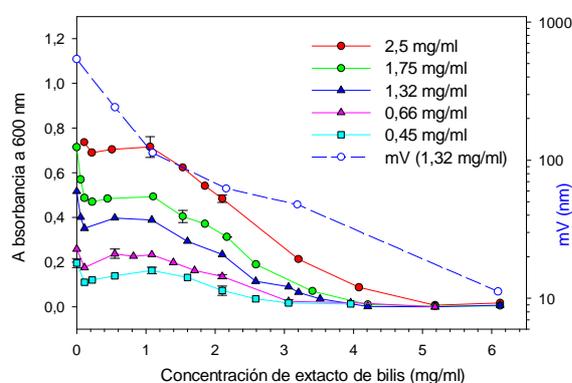


Fig.101: Variación de la absorbancia a 600 nm con la concentración de extracto de bilis (EB) para distintas concentraciones de liposomas SPC en buffer T10 pH 6,5, incubadas a 37°C durante 20 minutos. La línea discontinua azul corresponde a la variación del diámetro medio con la concentración de EB en las mismas condiciones para SPC 1,32 mg/ml.

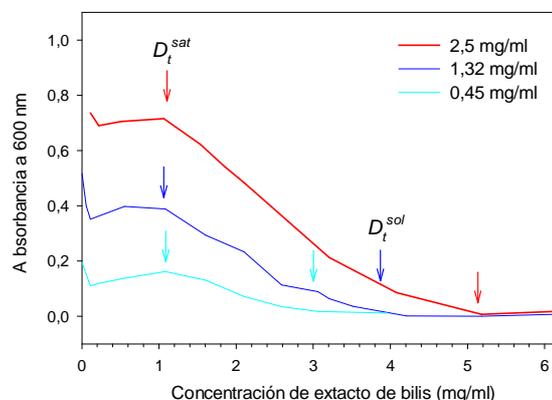


Fig.102: Curvas de solubilización "Absorbancia vs. concentración de EB" obtenidas para tres de las diluciones de la Fig.101, indicando mediante flechas los parámetros D_t^{sat} y D_t^{sol} (concentración total del EB al comienzo de la solubilización y una vez completada la misma).

para distintas concentraciones de lípidos, entre 0,45 y 2,50 mg/ml. Las mismas fueron obtenidas a partir de los puntos finales (absorbancia constante) de cinéticas de solubilización.

En la Fig.101 puede verse además, la variación en el diámetro medio para liposomas SPC a una concentración de 1,32 mg/ml (línea azul discontinua). Se observa que a concentraciones de 6 mg/ml de EB los valores de diámetro medio son cercanos a los 10 nm, lo

cual indica la presencia de micelas. El análisis de las distribuciones de diámetros permite verificar la transformación de una población heterogénea correspondiente a las vesículas SPC C5-P2,4 (Fig.105A), en una población unimodal con un diámetro medio en el rango de la estructuras micelares (Fig.105B).

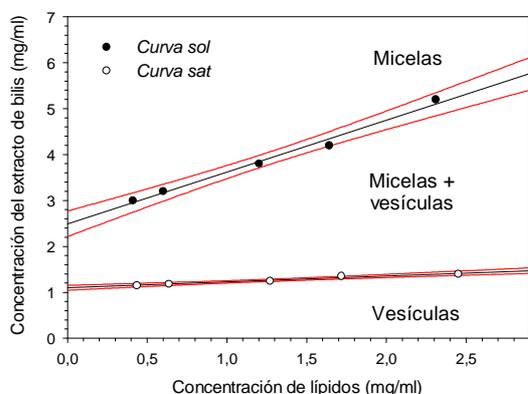


Fig.103: Curvas de saturación y solubilización de liposomas SPC con EB. Las curvas "sol" y "sat" fueron obtenidas a partir de la Fig.101. Las líneas rojas indican los intervalos de confianza calculados a partir de los valores hallados.

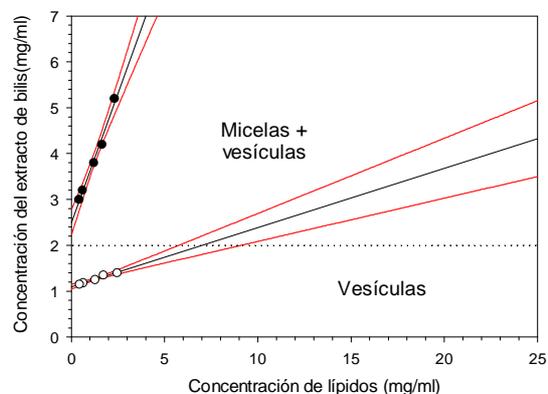


Fig.104: Extrapolación de las curvas "sol" (círculos negros) y "sat" (círculos blancos) de la Fig.103 para una concentración de lípidos igual a 25 mg/ml. La línea punteada indica la concentración de EB presente en la digestión in vitro.

En la Fig.102 se muestra la obtención de los valores D_t^{sat} y D_t^{sol} a partir de las curvas de solubilización de la Fig.101. Con estos valores se obtuvieron las curvas "Concentración de tensioactivo vs. concentración de lípidos" correspondientes a las vesículas saturadas de tensioactivo (curva "sat") y a las micelas mixtas (curva "sol"), como se muestra en la Fig.103.

La extrapolación de estas curvas hasta una concentración de lípidos de 25 mg/ml (Fig.104), correspondiente a la suspensión original, permite determinar que a 2 mg/ml de EB

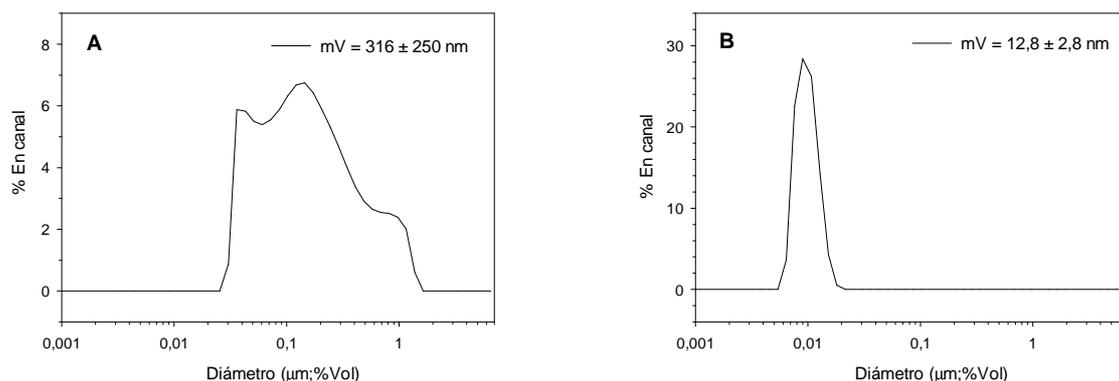


Fig.105: Distribuciones de diámetros para liposomas SPC C5-P2,4 diluidos en buffer T10 hasta una concentración de 1,32 mg/ml, antes (A) o después (B) del tratamiento con extracto de bilis a una concentración de 6 mg/ml. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador. Se indica el diámetro medio obtenido para la distribución.

(concentración aproximada del EB que se aplica a una concentración lipídica de 25 mg/ml) aún no ha comenzado la solubilización y las estructuras predominantes son las bicapas lipídicas. Sin embargo, tan solo duplicando la concentración del EB (4 mg/ml, por ejemplo), las vesículas

estarían en equilibrio con las micelas mixtas, lo cual demuestra la baja resistencia de este sistema a las sales biliares.

4.3.2.3. LIPOSOMAS HSPC

En la Fig.106 se muestran las curvas de solubilización con extracto de bilis obtenidas para liposomas HSPC a una temperatura igual a 55°C. Como puede apreciarse, la concentración

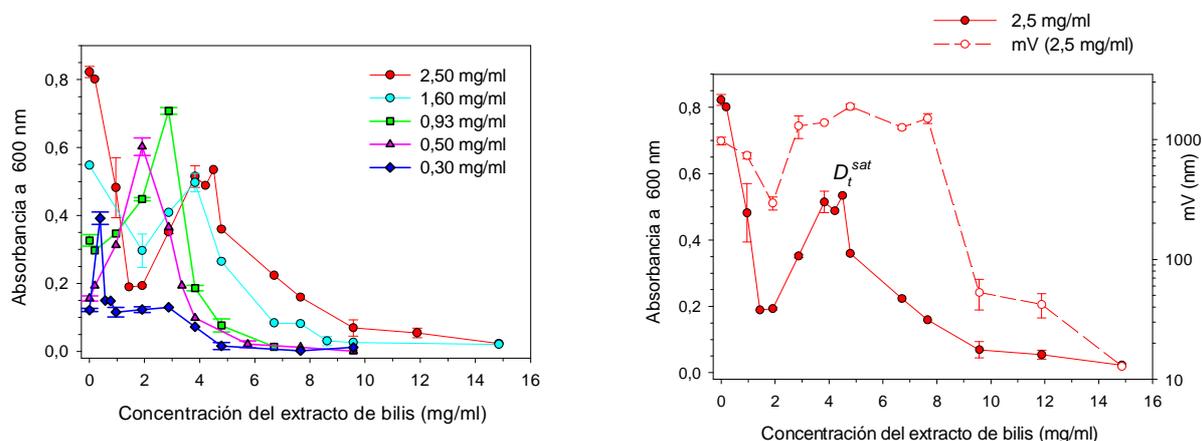


Fig.106: Variación de la absorbancia a 600 nm con la concentración de EB para distintas concentraciones de liposomas HSPC en buffer T10 pH 6,5, incubados a 55°C hasta absorbancia constante (60-120 minutos).

Fig.107: Variación de la absorbancia a 600 nm con la concentración de EB para liposomas HSPC 2,5 mg/ml incubados en las condiciones de la Fig.106. La línea discontinua roja corresponde a la variación del diámetro medio (mV) con la concentración de EB en las mismas condiciones. Se indica el valor de D_t^{sat} en la curva de absorbancia para 2,5 mg/ml.

de EB requerida para lograr la solubilización total de estos liposomas es mucho mayor que la empleada para los liposomas SPC, en un rango similar de concentraciones de lípidos. Así, mientras los liposomas SPC 2,5 mg/ml se solubilizaban completamente a 37°C con concentraciones de EB superiores a los 5 mg/ml, los liposomas HSPC a la misma concentración requieren una temperatura por encima de su T_m y una concentración de EB mayor o igual que 15 mg/ml.

Las curvas de solubilización para las concentraciones más altas (2,5; 1,6 y en menor medida 0,93 mg/ml), presentan características similares: una disminución inicial de la absorbancia que luego alcanza un máximo a concentraciones de EB intermedias. Este máximo fue asignado como el parámetro D_t^{sat} , que indica el comienzo de la solubilización de las vesículas saturadas con las sales biliares. Las concentraciones más bajas (0,5 y 0,3 mg/ml) también presentan curvas similares si bien no se observa la disminución inicial de la absorbancia a 600 nm debido, probablemente, a la escala de trabajo. En la Fig.107 se observa que el perfil correspondiente a la variación del diámetro medio (mV) con la concentración de EB se asemeja al de la absorbancia, a una misma concentración de lípidos (2,5 mg/ml). Sin embargo, a concentraciones entre 6 y 8 mg/ml de EB, la determinación del diámetro medio no registra el cambio que indica el perfil de la absorbancia, con lo cual el D_t^{sat} que se obtendría a partir de esta curva sería mayor. Esto se debe a que el diámetro medio corresponde a una distribución en volumen, con lo cual las micelas que comienzan a formarse en esta etapa (Etapa

II de la solubilización), no tienen una influencia importante en el cálculo del diámetro medio, ya que su volumen es prácticamente despreciable frente al de las vesículas. Por lo tanto, en este caso, la turbidez es más sensible a la transformación de las vesículas en micelas que la determinación del diámetro medio de la distribución en volumen.

En forma equivalente a lo descrito para liposomas SPC, se graficaron las curvas "sat" y "sol" con sus intervalos de confianza (Fig.108) y se extrapolaron hasta una concentración de lípidos de 25 mg/ml (Fig.109). Se observa que a la concentración de EB presente en la digestión *in vitro* (2 mg/ml) y a 55°C no habría solubilización. Por lo tanto tampoco es de esperar que se produzcan a una temperatura de 37°C, temperatura en la cual las membranas están en fase gel. Para estos liposomas, la micelización a 55°C recién comenzaría para concentraciones del EB superiores a los 15 mg/ml. En el apartado 4.4.9. se mostrarán los ensayos realizados incubando los liposomas con el EB a 37°C.

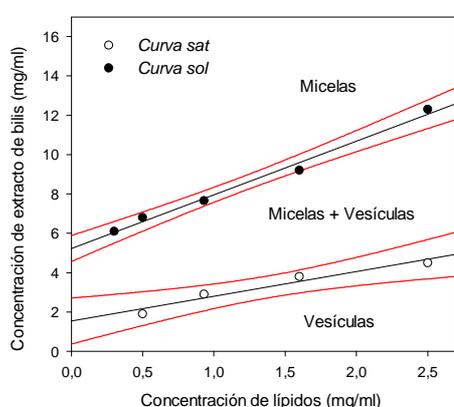


Fig.108: Curvas de saturación y solubilización de liposomas HSPC con EB. Las curvas "sol" y "sat" fueron obtenidas a partir de la Fig.107. Las líneas rojas indican los intervalos de confianza calculados a partir de los valores hallados.

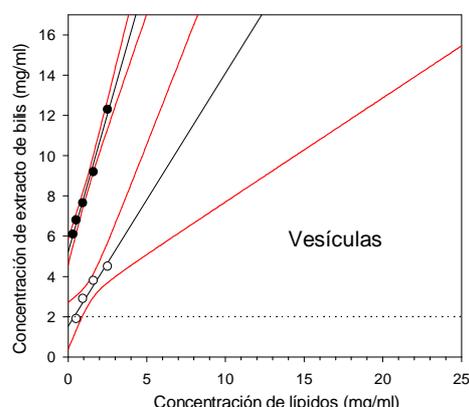


Fig.109: Extrapolación de las curvas "sol" (círculos negros) y "sat" (círculos blancos) de la Fig.108 para una concentración de lípidos igual a 25 mg/ml. La línea punteada indica la concentración de EB presente en la digestión *in vitro*.

4.3.2.4. LIPOSOMAS HSPC-CHOL

Para estudiar la solubilización de estos liposomas con EB se debió partir de suspensiones muy diluidas (concentraciones menores a 0,7 mg/ml) e incubarlas a una temperatura de 65°C.

La mayor temperatura utilizada respecto a los liposomas HSPC permitió acelerar el proceso, alcanzando el equilibrio en tiempos razonables. Una serie de experimentos previos mostró que los valores de las curvas de solubilización a 55°C y a 65°C eran equivalentes, variando únicamente el tiempo necesario para alcanzar valores de absorbancia estable. Aún así, las concentraciones de EB necesarias son mucho mayores a las requeridas por los otros dos tipos de liposomas, como puede verse en las curvas de solubilización de la Fig.110. En cuanto a los tiempos de incubación se demostró que 60 minutos eran suficientes para las concentraciones lipídicas medias o bajas, mientras que para las más altas debieron realizarse incubaciones de hasta 120 minutos hasta obtener una absorbancia constante.

Como se observa en la Fig.110, los perfiles de solubilización para estos liposomas son muy complejos, y por lo tanto es difícil la asignación del valor D_i^{sat} . El perfil correspondiente al diámetro medio de la distribución en volumen (mV; línea discontinua Fig.110) para la dilución 0,63 mg/ml, muestra una disminución inicial seguida de un aumento en el diámetro a concentraciones de EB entre 15 y 22 mg/ml. A concentraciones mayores, el mV disminuye

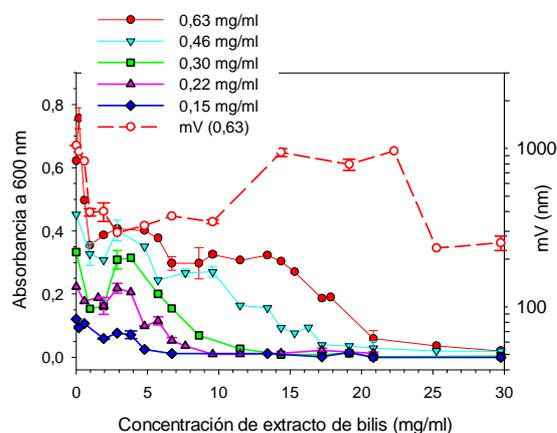


Fig.110: Variación de la absorbanza a 600 nm con la concentración de EB para distintas concentraciones de liposomas HSPC-Chol en buffer T10 pH 6,5, incubados a 65°C hasta absorbanza constante (60-120 minutos). Línea roja discontinua: variación del diámetro medio (mV) con la concentración de EB para 0,63 mg/ml.

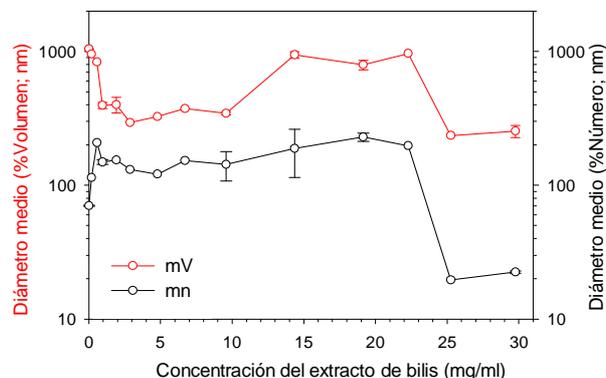


Fig.111: Variación de diámetro medio con la concentración de EB, para la distribución en volumen (en rojo) y en número (en negro) de liposomas HSPC-Chol 0,93 mg/ml incubados en las condiciones de la Fig.110.

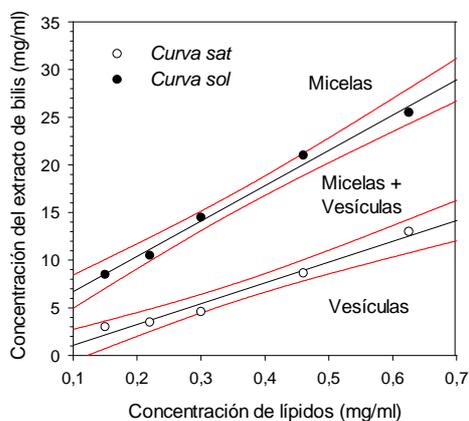


Fig.112: Curvas de saturación y solubilización de liposomas HSPC-Chol con EB. Las curvas "sol" y "sat" fueron obtenidas a partir de la Fig.110. Las líneas rojas indican los intervalos de confianza calculados a partir de los valores hallados.

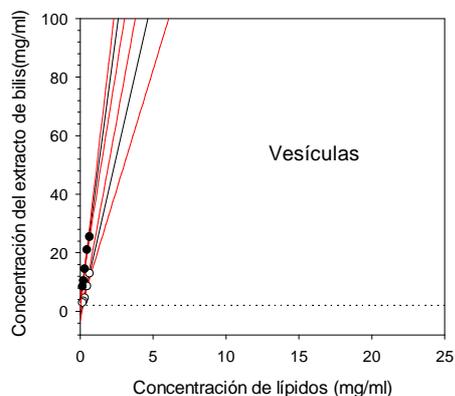


Fig.113: Extrapolación de las curvas "sol" (círculos negros) y "sat" (círculos blancos) de la Fig.112 para una concentración de lípidos igual a 25 mg/ml. La línea punteada indica la concentración de EB presente en la digestión in vitro.

hasta un valor final de 250 nm a 30 mg/ml de EB. Sin embargo, el valor final de absorbanza de esta dilución disminuye hasta 0,02, indicando la solubilización de las vesículas. Si se observa el perfil obtenido para el diámetro medio de la distribución en número (mn; línea negra Fig.111) se observa una abrupta disminución del mismo a concentraciones de EB mayores a 25 mg/ml, llegando a un valor final de 22 nm. Esta aparente contradicción puede explicarse por la

presencia de estructuras de mayor tamaño que las micelas, pero que, obviamente, tienen una marcada influencia si la distribución de tamaños se expresa en volumen.

Como en los casos anteriores, se graficaron las curvas correspondientes al comienzo de la solubilización (sat) y a la solubilización completa (sol) (ver Fig.112) y se extrapolaron a una concentración de lípidos de 25 mg/ml. En la Fig.113 puede verse que la zona correspondiente a las vesículas es mucho más extensa que las correspondientes a los liposomas SPC ó HSPC, lo cual evidencia que los liposomas HSPC-Chol son los más resistentes a la solubilización por sales biliares. De hecho, ni siquiera una concentración de EB tal elevada como 100 mg/ml y a una temperatura de 65°C, resultaría suficiente para la formación de micelas mixtas a una concentración de lípidos de 25 mg/ml.

4.4. ESTABILIDAD FÍSICOQUÍMICA DE LIPOSOMAS CON HPTS DURANTE LA DIGESTIÓN *IN VITRO*

4.4.1. Efecto del pH ácido sobre el volumen incorporado y la distribución de diámetros

Los liposomas convencionales (SPC, HSPC y HSPC-Chol) fueron incubados a pH 2 durante 2 horas a 37°C. Se determinaron el diámetro medio, la variabilidad de las distribuciones INTRA ensayo y ENTRE-ensayos (apartado 3.5.4.3.), y el volumen incorporado (apartado 3.5.3.), antes y después del tratamiento en medio ácido. Una vez incubadas las muestras, cualquier dilución que se realizase (para mediciones de diámetro o separación por SEC) se llevó a cabo utilizando el buffer T10 a pH 2. De este modo se evitaron cambios de pH y de fuerza iónica que pudieran modificar las características de los liposomas obtenidos tras dicho tratamiento. La Tabla 29 muestra los resultados obtenidos para los tres tipos de liposomas convencionales.

Tabla 29: Valores de diámetro medio (\pm anchura media), variabilidad INTRA y ENTRE-ensayo, y volumen incorporado obtenidos para liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol antes (PRE) y después (POST) del tratamiento a pH 2 durante 2 h a 37°C ($n \geq 3$, excepto para el volumen incorporado en que $n=2$). El asterisco (*) indica que el valor POST es estadísticamente diferente del valor PRE ($P < 0,05$).

Liposomas	Diámetro medio \pm anchura media (nm)		Variabilidad de distribuciones		Volumen incorporado (l/mol)	
	PRE	POST	PRE/intra (n=3)	POST/entre (n=9)	PRE	POST
SPC	466 \pm 491	205 \pm 153*	26,2 \pm 8,2	41,4 \pm 6,7*	1,11 \pm 0,17	1,44 \pm 0,06
HSPC	872 \pm 888	236 \pm 187*	29,8 \pm 11,6	89,9 \pm 6,5*	0,88 \pm 0,02	1,00 \pm 0,06
HSPC-Chol	1018 \pm 855	859 \pm 815	37,7 \pm 6,9	43,0 \pm 9,4	1,51 \pm 0,17	2,07 \pm 0,35

El tratamiento a pH 2 causa una disminución significativa del diámetro medio en los liposomas SPC y HSPC, acompañada por un cambio en la distribución de tamaños. Por otro lado, los resultados de la variabilidad INTRA-ensayo se encuentran alrededor del 30%, lo cual

coincide con la variabilidad histórica entre lecturas de una misma muestra con el equipo utilizado.

Respecto al volumen incorporado, el valor correspondiente a los liposomas SPC y HSPC PRE-tratamiento es similar, siendo próximo a 1 l/mol. Los liposomas HSPC-Chol son los que presentan el mayor volumen interno, siendo aproximadamente un 50% mayor que el de los casos anteriores. Como puede apreciarse, el tratamiento a pH ácido tiene el efecto de aumentar el volumen incorporado para los tres tipos de liposomas.

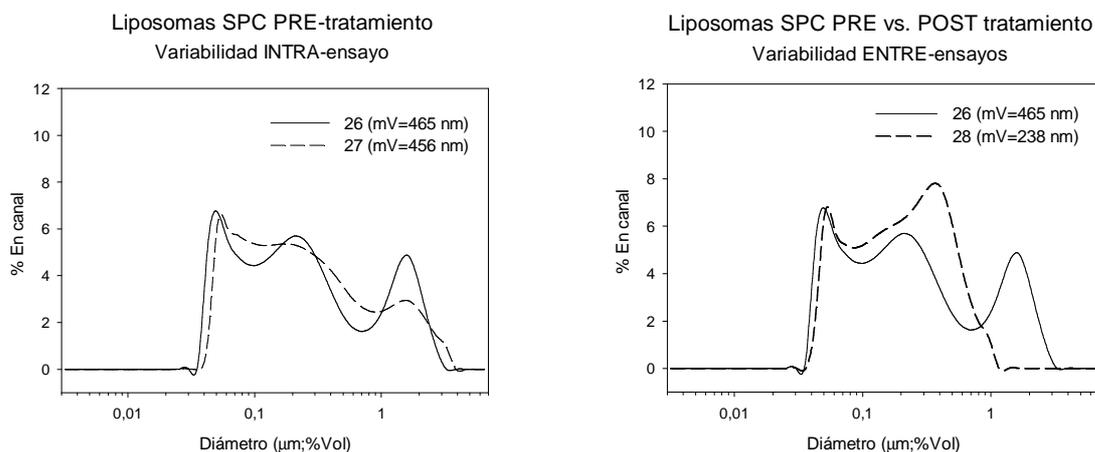


Fig.114: Comparación entre distribuciones de diámetros para liposomas SPC pre-tratamiento (Variabilidad INTRA ensayo; Lecturas N° 26 y 27) y pre-tratamiento vs. post-tratamiento (Variabilidad ENTRE-ensayos; Lecturas N° 26 y 28). La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador.

En las Figuras 114, 115 y 116 se muestran algunas de las distribuciones de diámetros obtenidas antes y después del tratamiento a pH de dichos liposomas. La Fig.114, correspondiente a liposomas SPC, muestra una comparación entre dos distribuciones de diámetros PRE-tratamiento (variabilidad INTRA-ensayo) y entre una distribución PRE-tratamiento y otra POST-tratamiento (variabilidad ENTRE-ensayos).

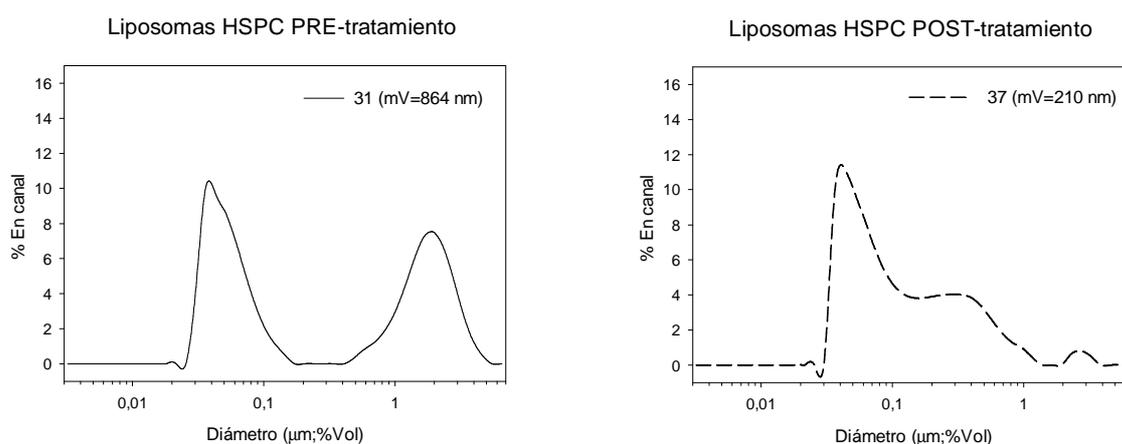


Fig.115: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC pre-tratamiento (Lectura N° 31) y post-tratamiento (Lectura N° 37). La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador.

Se observa cómo la variabilidad ENTRE-ensayos es significativamente mayor que la variabilidad INTRA-ensayo. La distribución correspondiente a la lectura N° 26 (PRE-tratamiento), muestra una población de vesículas con diámetros mayores a los 1.000 nm, que

en la lectura Nº 28 (POST-tratamiento) ha desaparecido. Esto explica la disminución del diámetro medio como efecto del tratamiento a pH ácido.

Los liposomas HSPC presentan la máxima variabilidad ENTRE-ensayos (ver Tabla 29). En la Fig.115 se muestran ejemplos de distribuciones PRE y POST-tratamiento. Se observa que el tratamiento a pH 2 ha modificado la distribución bimodal que caracteriza a estos liposomas. Como en el caso de los liposomas SPC, es la población de vesículas de mayor tamaño la que resulta afectada por el tratamiento, y da lugar a poblaciones de menor diámetro, con lo cual el diámetro medio disminuye drásticamente. En el apartado 4.4.2. se verá que esta disminución del diámetro medio es reversible cuando el pH vuelve a la neutralidad.

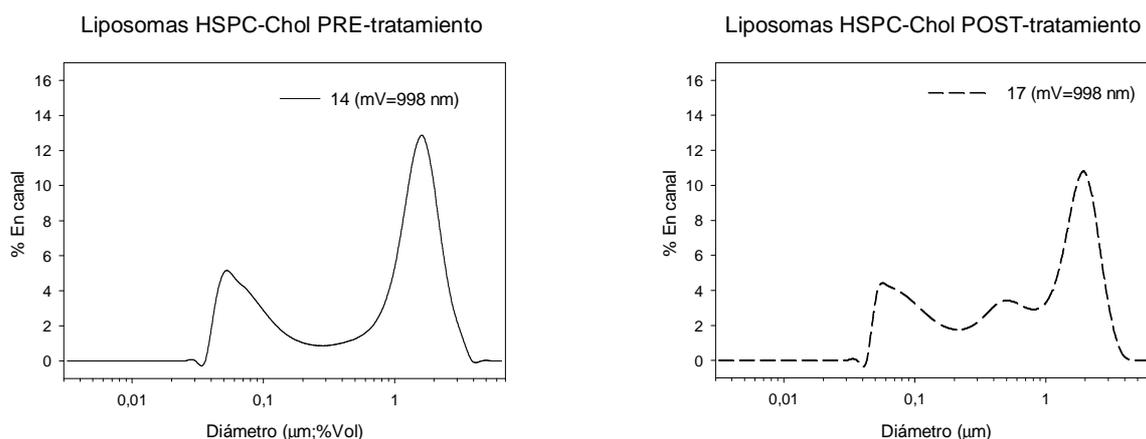


Fig.116: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC-Chol pre-tratamiento (Lectura Nº 14) y post-tratamiento (Lectura Nº 17). La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador.

Por el contrario, en el caso de los liposomas HSPC-Chol no se observa una disminución significativa del diámetro medio, a pesar de presentar un marcado cambio de la distribución, como se deduce de la variabilidad ENTRE-ensayos. En la Fig.116 pueden verse ejemplos de distribuciones PRE-tratamiento (Lectura Nº 14) y POST-tratamiento (Lectura Nº 17) que casualmente presentan el mismo diámetro medio. Se observa que el tratamiento tiene un claro efecto en la distribución de tamaños, que no se ve reflejada en el diámetro medio. A diferencia de los casos anteriores, el pH ácido no modifica totalmente la población de vesículas de mayor diámetro.

4.4.2. Efecto de la digestión sobre el volumen incorporado y la distribución de diámetros

Este apartado está relacionado con el anterior (apartado 4.4.1.), sólo que en este caso se evalúa el efecto de la digestión completa sobre los liposomas convencionales. Por lo tanto, los valores correspondientes a volúmenes incorporados y diámetros medios PRE-digestión son iguales en ambos casos y varían los valores POST-tratamiento.

Los liposomas convencionales (SPC, HSPC y HSPC-Chol) fueron digeridos según lo descrito en el apartado 3.4.7.2. (Materiales y Métodos). Se determinó el diámetro medio, la distribución de diámetros (apartado 3.5.4.) y el volumen incorporado (apartado 3.5.1.) antes y después de la digestión *in vitro*.

También se estudió la variabilidad de las distribuciones INTRA y ENTRE-ensayos según lo descrito en el apartado 3.5.4.3. (Materiales y Métodos). La Tabla 30 muestra los valores obtenidos para los parámetros estudiados.

Tabla 30: Valores de diámetro medio (\pm anchura media), variabilidad INTRA y ENTRE-ensayo, y volumen incorporado obtenidos para liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol antes (PRE) y después (POST) de la digestión *in vitro* descrita en el apartado 3.6.9.2. (Materiales y Métodos) ($n \geq 3$). El asterisco (*) indica que el valor POST es estadísticamente diferente del valor PRE ($P < 0,05$).

Liposomas	Diámetro medio \pm anchura media (nm)		Variabilidad de distribuciones		Volumen incorporado (l/mol)	
	PRE	POST	PRE/intra (n=3)	POST/entre (n=9)	PRE	POST
SPC	466 \pm 491	348 \pm 272*	34,5 \pm 10,9	40,4 \pm 9,5	1,11 \pm 0,17	1,39 \pm 0,06
HSPC	872 \pm 888	947 \pm 782	28,3 \pm 4,5	83,2 \pm 13,9*	0,88 \pm 0,02	0,53 \pm 0,07*
HSPC-Chol	1018 \pm 855	674 \pm 619*	33,0 \pm 6,2	82,8 \pm 14,1*	1,51 \pm 0,17	2,45 \pm 0,21*

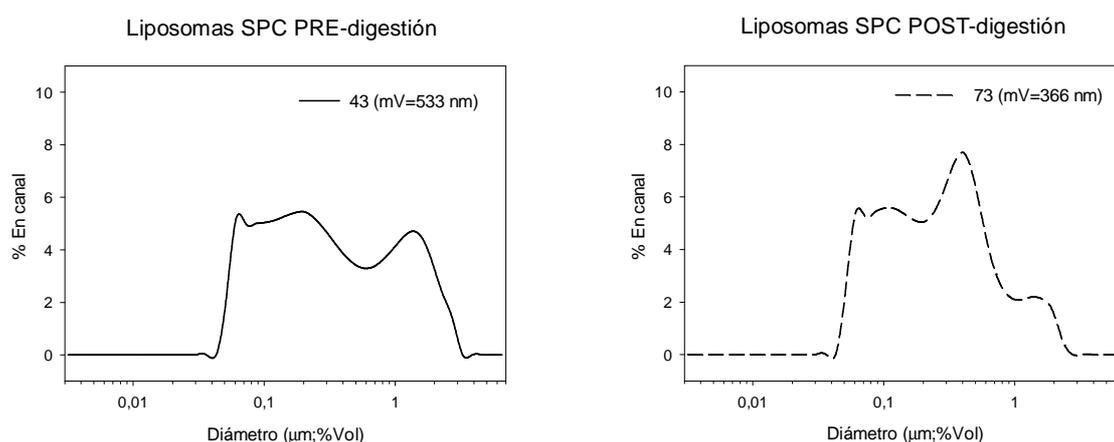


Fig.117: Distribuciones de diámetros para liposomas SPC PRE-digestión (Lectura N° 43) y POST-digestión (Lecturas N° 51). La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador.

Como se observa en los valores obtenidos para liposomas SPC, existe un leve efecto de la digestión en la disminución del diámetro medio, pero la variabilidad de las distribuciones INTRA y ENTRE-ensayos son similares. En la Fig.117 (Lecturas N° 43 y 73) pueden verse ejemplos de las distribuciones PRE y POST digestión, donde se observa el corrimiento de la distribución hacia poblaciones de menor diámetro. El aumento abrupto del porcentaje de vesículas en canales correspondientes a diámetros menores a 0,1 μm podría indicar la presencia de SUVs que no son considerados por caer fuera del rango de medición del equipo empleado.

Los liposomas HSPC presentan un gran aumento de la variabilidad ENTRE-ensayos respecto a INTRA-ensayo, lo que indica que la digestión tiene un efecto muy marcado en la distribución de diámetros, como puede verse en la Fig.118 (Lecturas N° 69 y 76). Sin embargo, este efecto no se refleja en una diferencia significativa entre los diámetros medios PRE y POST digestión

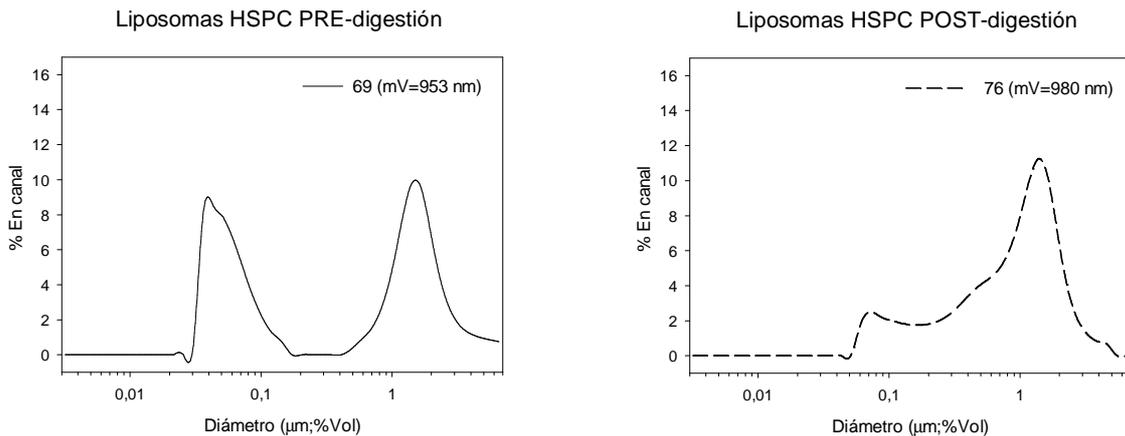


Fig.118: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC PRE-digestión (Lectura N° 69) y POST-digestión (Lecturas N° 76). La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador.

En el caso de los liposomas HSPC-Chol, la digestión *in vitro* afecta tanto la distribución como el diámetro medio, como se desprende de la Tabla 30 y se visualiza en los ejemplos de la Fig.119 (Lecturas N° 70 y 60). Como se había observado en el apartado 4.4.1. (ver Fig.116), la distribución pierde su carácter bimodal, dando lugar a poblaciones de menor diámetro, que en el caso de la digestión completa, afectan el valor del diámetro medio.

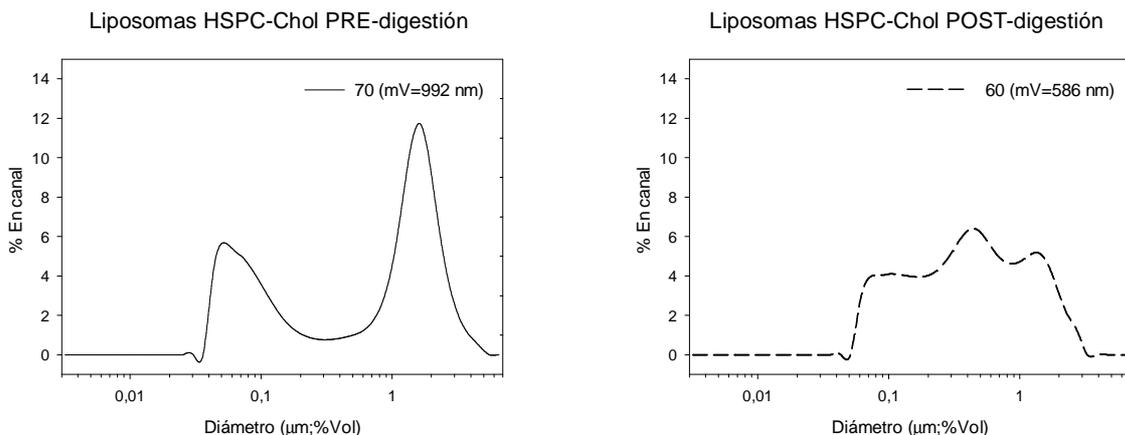


Fig.119: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC-Chol PRE-digestión (Lectura N° 70) y POST-digestión (Lecturas N° 60). La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador.

En cuanto a los valores obtenidos para los volúmenes incorporados, la digestión *in vitro* provoca un aumento del volumen incorporado para los liposomas HSPC-Chol, mientras que el efecto es contrario para los liposomas HSPC. En este caso se observa que la desaparición de poblaciones de menor diámetro (ver Fig.118, Lectura N° 76) coincide con una disminución del 40% en el volumen incorporado.

4.4.3. Efecto de la digestión sobre la permeabilidad de liposomas

El efecto de la digestión *in vitro* sobre la permeabilidad de las bicapas de los liposomas fue estudiado mediante fluorescencia. Para ello se determinó la permeabilidad de la HPTS en liposomas antes y después de ser sometidos a la digestión *in vitro*. Las muestras, purificadas

por SEC (M1) y diluidas en buffer T10, se incubaron a 37°C durante 1 hora. Durante este período se tomaron alícuotas a distintos intervalos, determinándose su fluorescencia (excitación a 417 nm; emisión a 511 nm) antes y después del agregado de DPX. La disminución de la fluorescencia con el agregado del quencher es proporcional a la concentración de sonda que haya salido de los liposomas en cada instante, por lo tanto el porcentaje de la fluorescencia inicial es un indicador del contenido de sonda que permanece en el interior acuoso. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig.120.

Como se desprende de los valores obtenidos, se verificó la baja permeabilidad de la HPTS a través de las bicapas. En las tres formulaciones de liposomas convencionales no sometidos a la digestión *in vitro* (PRE), el porcentaje de sonda que permanece en la fase acuosa interna luego de 60 minutos a 37°C es próximo al 100% (curvas en verde indicadas como "PRE"). En lo que respecta a las muestras que previamente han sido sometidas a una digestión *in vitro*, la cantidad de HPTS encapsulada disminuye ligeramente en el caso de liposomas SPC y HSPC (alrededor del 5%), y no es apreciable para los HSPC-Chol.

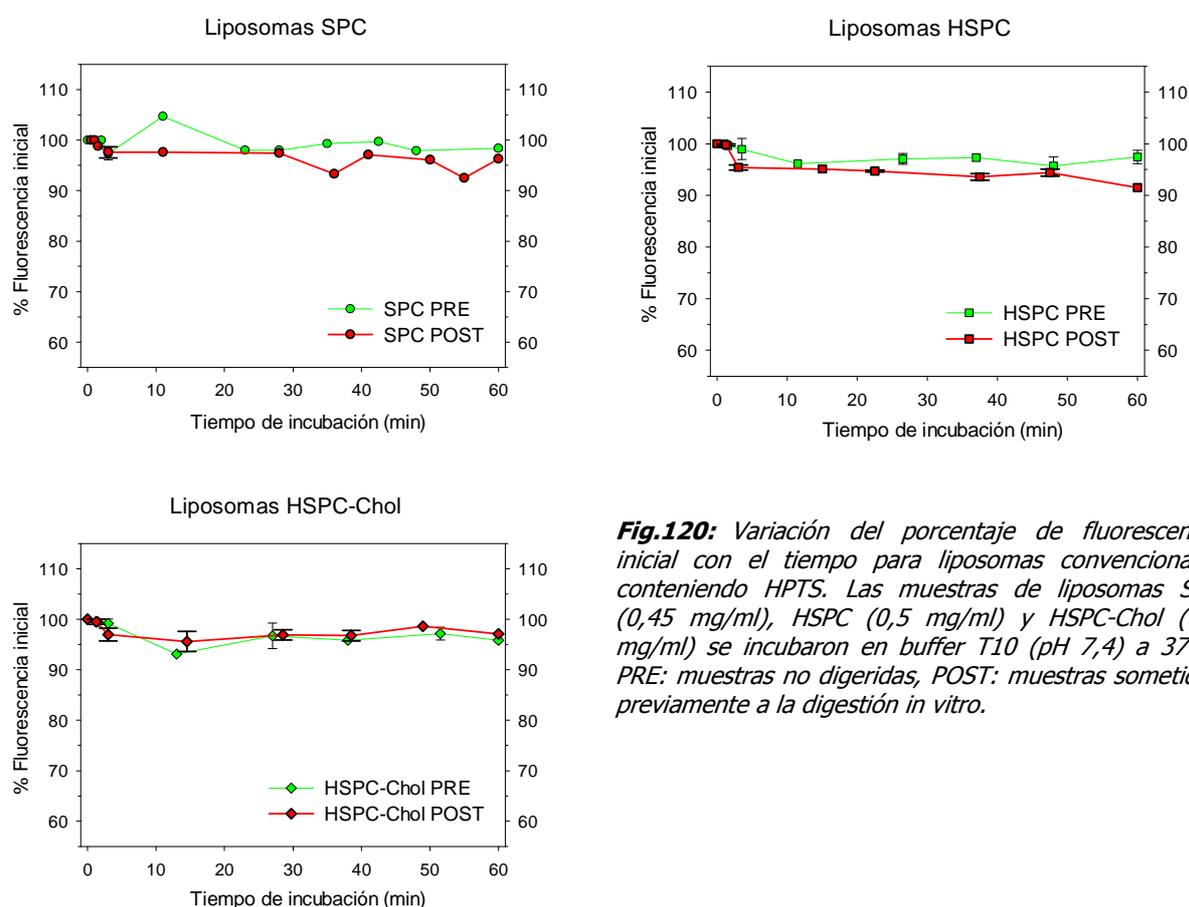


Fig.120: Variación del porcentaje de fluorescencia inicial con el tiempo para liposomas convencionales conteniendo HPTS. Las muestras de liposomas SPC (0,45 mg/ml), HSPC (0,5 mg/ml) y HSPC-Chol (0,3 mg/ml) se incubaron en buffer T10 (pH 7,4) a 37°C. PRE: muestras no digeridas, POST: muestras sometidas previamente a la digestión *in vitro*.

Por lo tanto, la digestión *in vitro* no altera significativamente la permeabilidad de las bicapas para ninguna de las formulaciones (curvas en rojo indicadas como "POST"). Los valores finales correspondientes a los 60 minutos de incubación a 37°C serán empleados para corregir las medidas de fluorescencia de liposomas incubados en las mismas condiciones con distintas concentraciones de extracto de bilis (apartado 4.4.9.).

4.4.4. Determinación del pH interno de liposomas y de su contenido en HPTS

Se determinó el cambio del pH de la fase acuosa interna de liposomas convencionales conteniendo HPTS durante la digestión *in vitro*. Como pasos previos a este estudio fue necesario, por un lado, estudiar las posibles interferencias de los liposomas en las medidas de fluorescencia, y por otro lado, obtener una adecuada calibración del pH. Para esto, se compararon los valores de pH de soluciones de HPTS con los proporcionados por liposomas conteniendo esta sonda y tratados con gramicidina, según lo descrito en apartado 3.5.2.3. (Materiales y Métodos).

4.4.4.1. EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS DE LOS LIPOSOMAS

En la determinación de pH del interior acuoso de los liposomas era necesario evaluar la interferencia de las vesículas en la medición del R454/403. Para esto se preparó una suspensión de liposomas SPC mediante homogeneización L3-P4 a temperatura ambiente, con un diámetro medio de $48,5 \pm 28,9$ nm. A partir de esta suspensión se preparó una dilución en buffer T10 hasta una concentración lipídica de 0,5 mg/ml y se registró el espectro de excitación de la suspensión resultante a una longitud de onda de emisión de 511 nm. Adicionalmente, una alícuota de la suspensión diluida se incubó con gramicidina (ver apartado 3.5.4.4. Materiales y Métodos) y se registró su espectro de excitación, para descartar posibles interferencias por el agregado del formador de canales. La Fig.121(A) muestra los espectros obtenidos para liposomas con o sin gramicidina. La fluorescencia a 511 nm para la excitación a 403 y/o 454 nm es inferior a las 10 cuentas por segundo (cps). Debido a que la fluorescencia de la sonda encapsulada en los liposomas varió entre las 200 y las 2.000 cps, la interferencia de las

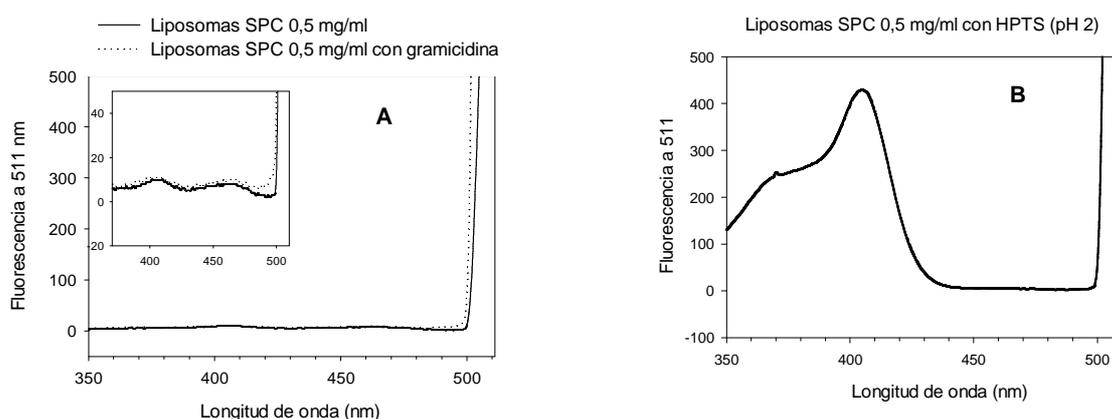


Fig.121: Espectros de excitación (emisión a 511 nm) obtenidos con suspensiones de liposomas SPC 0,5 mg/ml en buffer T10 pH 7,4 (A) con o sin el agregado de gramicidina; (B) conteniendo HPTS 2mM a pH 2. El inserto de (A) muestra una ampliación del espectro en la zona de excitación de la HPTS.

vesículas en la determinación del R454/403 no resulta significativa. Espectros similares fueron obtenidos para liposomas MLVs HSPC y HSPC-Chol. A pesar de tratarse de vesículas que provocan una mayor dispersión de la luz, en ningún caso la fluorescencia superó los 20 cps en la zona de excitación de la HPTS. En la Fig.121(B) se observa el espectro de excitación obtenido para liposomas SPC 0,5 mg/ml conteniendo la sonda fluorescente a pH 2. Se aprecia el

comportamiento característico de la sonda a pH ácido, es decir, con un máximo a 403 nm (430 cps) y la desaparición del máximo a 454 nm. Precisamente a esa longitud de onda, la fluorescencia a 511 nm tiene un valor inferior a las 10 cps, confirmando la ausencia de interferencias por la presencia de los liposomas.

4.4.4.2. ELECCIÓN DEL PAR DE EXCITACIÓN PARA LA CALIBRACIÓN DEL pH

Como se mostró en los espectros de excitación de la Fig.35 (apartado 4.1.2.1.), la longitud de onda de excitación más sensible al pH en el rango 7,29-5,11 es 454 nm. Sin embargo a pHs menores que 6, la intensidad de la fluorescencia a 511 nm por excitación a 454 nm es muy baja, como se observa en la Fig.122(A). Por lo tanto, al obtener el cociente entre los valores de excitación a 454 y a 417 nm (punto isobéptico), resulta un valor independiente de la concentración (fuera de la zona de autoquenching) y de las fluctuaciones instrumentales, aunque con pocas variaciones a pHs bajos. De hecho, como puede verse en la Fig.122(B), el rango lineal para el pH correspondiente al R454/417 se extiende entre 5,2 y 7,8. Por otro lado, la intensidad a 403 nm continúa aumentando levemente con el pH aún por debajo de 6. Este hecho convierte al cociente R454/403 en un mejor indicador para pHs entre por lo menos 4,8 y 7,8, como se observa en la Fig.122(C). En el siguiente apartado se verá que el rango lineal puede extenderse hasta un pH de 4,6.

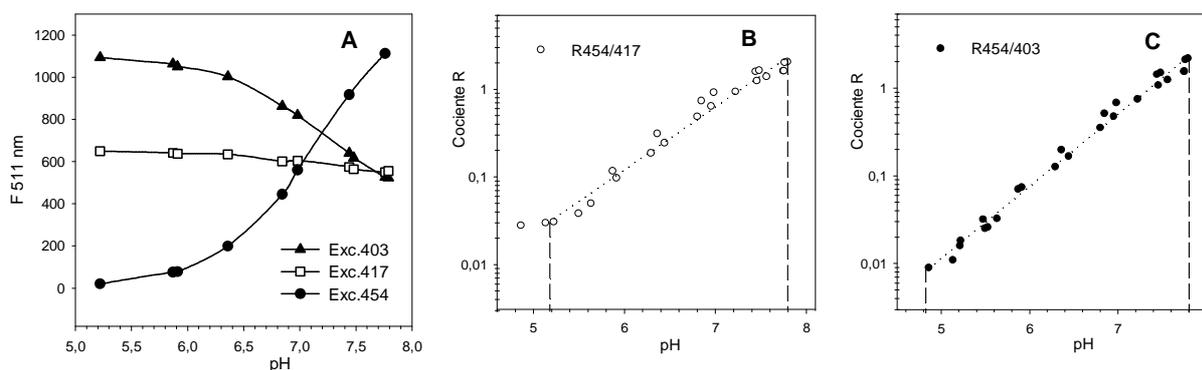


Fig.122: Variación de la fluorescencia de emisión a 511 por excitación a 403, 417 y 454 nm (A), del R454/417 (B) y del R454/403 (C) en función del pH. Los valores se obtuvieron a partir de una solución de HPTS 0,5 μ M preparada en buffer T10 cuyo pH fue modificado por el agregado de alícuotas de HCl 1N. En las Figuras B y C se indica en línea discontinua el rango lineal de cada curva.

4.4.4.3. CALIBRACIÓN DEL pH

La calibración del pH se realizó según lo descrito en Materiales y Métodos, en los apartados 3.5.2.2. y 3.5.2.3., para soluciones de HPTS y liposomas con gramicidina respectivamente. Una vez obtenidos los valores de fluorescencia a 511 nm para las longitudes de onda de excitación 454 y 403 nm, se calculó el cociente entre estos valores (R454/403) y se graficó en función del pH medido con un pHmetro. La Fig.123 muestra los gráficos obtenidos para soluciones HPTS 0,5; 1 y 2,5 μ M, y liposomas con gramicidina y conteniendo HPTS a concentraciones de 0,5; 1 y 2 mM.

Las soluciones de HPTS muestran, en la representación semi-logarítmica, una buena linealidad entre el cociente R454/403 y el pH a partir de pH 4,2 y hasta pH 7,6. Para las suspensiones de liposomas aparecen desviaciones a pHs inferiores a 4,6. En el rango comprendido entre 4,6 y 7,8 no hay diferencias significativas entre los valores de soluciones de HPTS y liposomas conteniendo HPTS (y gramicidina). Confirmando esta observación, la regresión lineal que incluye la totalidad de los puntos tiene un coeficiente de correlación mayor a 0,99 (ver r^2 en la Fig.123).

Por lo tanto, la presencia de liposomas no altera la lectura del pH, con lo cual cada calibración posterior podrá realizarse simplemente con HPTS en solución. Por otro lado, el pH del interior acuoso de cualquier liposoma podrá ser inferido a partir del R454/403, siempre y cuando la señal de fluorescencia detectada provenga exclusivamente del interior de los liposomas.

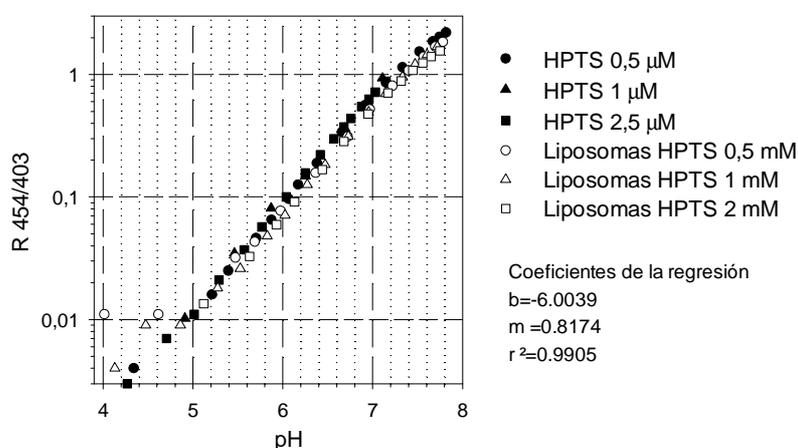


Fig.123: Variación de la emisión fluorescente de HPTS (a 511 nm) con el pH. El eje de ordenadas indica el cociente de la emisión al excitar la sonda a 454 y 403 nm. Los resultados corresponden a la sonda libre en medio acuoso a 0,5, 1 y 2,5 μM, y encapsulada a 0,5, 1 y 2 mM en liposomas SPC incubados con gramicidina. Se muestran los coeficientes para la regresión lineal obtenida a partir de la combinación de todos los puntos. Los coeficientes de la regresión se indican como b (ordenada al origen), m (pendiente) y el coeficiente de correlación r^2 .

4.4.4.4. OPTIMIZACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE DPX, QUENCHER DE LA HPTS

Como se mencionó anteriormente, la HPTS tiene una muy baja permeabilidad a través de las bicapas lipídicas (Fernandez y Politi, 1997). Sin embargo en las condiciones de la digestión *in vitro*, su permeabilidad podría verse incrementada debido a cambios fisicoquímicos en los liposomas. Por lo tanto resultaba indispensable agregar una sustancia que, permaneciendo en el exterior acuoso del liposoma, suprimiera la fluorescencia de la HPTS que pudiera permear durante el proceso digestivo. Para este fin se eligió el bromuro de p-xilen-bispiridinio ó DPX, que es el quencher más empleado para la HPTS.

Los ensayos preliminares consistieron en seleccionar la concentración de DPX más adecuada para suprimir la fluorescencia de soluciones de HPTS en el rango 1-4 μM a pH 2 y 7,4. El rango de concentraciones de HPTS abarca las máximas concentraciones que se

obtendrían en el medio acuoso si los diferentes tipos de liposomas convencionales perdieran todo su contenido durante la digestión *in vitro*. Por otro lado, los valores de pH indicados aseguran la eficiencia del efecto quenching en todo el rango de pH de trabajo.

Se incubaron las soluciones de HPTS a 37°C, se agregaron alícuotas crecientes de soluciones de DPX 200 mM a pH 2 y pH 7,4 y se midió la fluorescencia obtenida a 511 nm por excitación a 403, 417 (isobéptico) y 454 nm. Se calcularon los valores de concentración de DPX corregida por la dilución y el porcentaje de fluorescencia quencheda (%FQ) según la siguiente ecuación:

$$\% FQ = \frac{(F_0 - F)}{F_0} \times 100$$

donde F_0 es la fluorescencia inicial y F la fluorescencia después del agregado de la alícuota de DPX. Finalmente, y con el objeto de obtener gráficos lineales, se graficó la inversa de %FQ en función de la inversa de la concentración de DPX correspondiente a cada agregado, para cada longitud de onda, a cada pH y concentración de HPTS según lo descrito anteriormente (Ziegler y Penefsky, 1993). Se estableció que la mínima concentración de DPX a emplear en cada caso será aquella para la cual el %FQ fuese igual a 95, o lo que es equivalente, su inversa igual a 0,0105. La Fig.124 muestra los gráficos de "1/%FQ vs. 1/[DPX]" obtenidos para HPTS 1 y 4 μM.

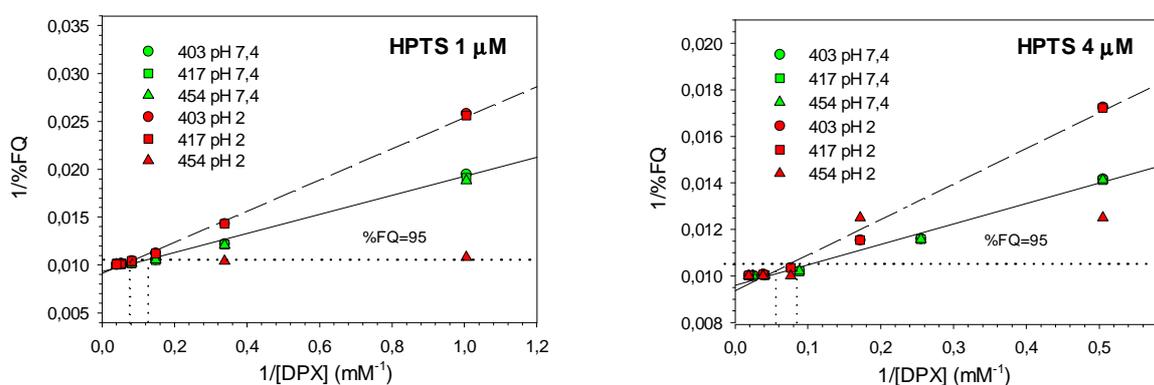


Fig.124: Obtención de la concentración de DPX óptima para quenchar la fluorescencia de soluciones de HPTS 1 y 4 μM. Se muestran los valores de 1/%FQ obtenidos excitando a 403, 417 y 454 nm, a pH 2 y 7,4 para cada concentración de DPX. La línea punteada horizontal indica el 95% de fluorescencia quencheda, mientras que las líneas punteadas verticales indican la intersección de ésta con las rectas obtenidas para cada pH.

Como se desprende de la figura, el efecto quenching del DPX a un pH determinado es de igual magnitud para las tres longitudes de onda a un pH determinado, con lo cual se obtiene una misma recta para cada pH (línea discontinua para pH 2,0, línea continua para pH 7,4).

Son una excepción los valores obtenidos a pH 2 excitando a 454 nm. En este caso se observa el autoquenching ya descrito para la sonda originado por la desaparición del máximo de excitación a 454 nm. Por lo tanto, los valores obtenidos en estas condiciones son el resultado del ruido instrumental.

Estableciendo como límite máximo el 5% de fluorescencia no quenchada, señalado por la línea punteada horizontal, se obtuvo la intersección de este límite con las rectas correspondientes a cada pH. La concentración de DPX que debería emplearse para obtener un 95% de la fluorescencia quenchada en una solución de HPTS 1 μM a pH 2,0 es de es del orden de 12,5 mM ($1/0,08 \text{ mM}^{-1}$), mientras que a pH 7,4 se requeriría una concentración aproximada de 8,3 mM ($1/0,12 \text{ mM}^{-1}$). Una solución de HPTS 4 μM requerirá una concentración de alrededor de 13,3 mM ($1/0,075 \text{ mM}^{-1}$) a pH 2,0 y cercana a 10 mM ($1/0,10 \text{ mM}^{-1}$) a pH 7,4. Debido a que en el intervalo de concentraciones de HPTS estudiado (1 a 4 μM) los valores de DPX requeridos son similares, se estableció utilizar una concentración de DPX igual a 10 mM.

En la Fig.125 se muestran los resultados de los ensayos realizados para verificar la eficiencia del DPX a una concentración de 10 mM. Para esto se emplearon liposomas HSPC conteniendo HPTS 2 mM recientemente separados por SEC y diluidos hasta una concentración de fosfolípidos de 2 mg/ml. La dilución se incubó en la cubeta del fluorímetro a 37°C y se registró la fluorescencia a 511 nm excitando a 403 nm. Luego de algunos segundos se agregó DPX hasta una concentración de 10 mM, observándose una pequeña disminución de la fluorescencia (alrededor de un 14%) correspondiente a la sonda desencapsulada durante la separación y/o dilución. Posteriormente se agregó Triton X-100 a 10 mg/ml, una concentración suficiente para solubilizar los liposomas HSPC. Se observa que la fluorescencia disminuye abruptamente hasta un 10% del valor inicial, ya que la sonda es liberada por la ruptura de un alto porcentaje de los liposomas y quenchada por el DPX en solución. El posterior tratamiento a 55°C, por encima de la temperatura de transición para este tipo de liposomas, llevó finalmente la fluorescencia a valores no detectables, debido a la solubilización completa de los mismos. Por lo tanto, aún si se liberara el contenido total de la sonda incorporada, la concentración de DPX resultaría suficiente para eliminar la fluorescencia.

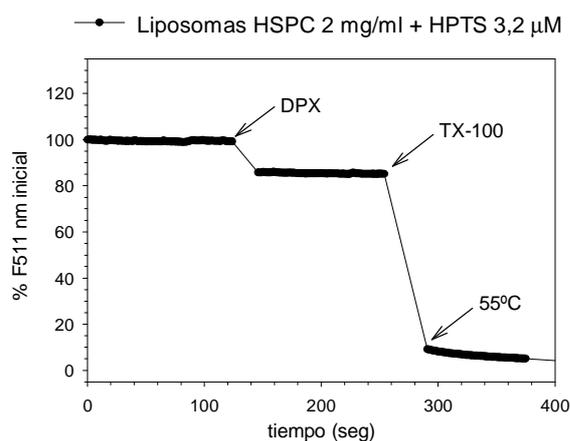


Fig.125: Efecto del DPX sobre HPTS encapsulada en liposomas HSPC a una concentración de 2 mg/ml. Se determinó la fluorescencia a 511 nm excitando a 403 nm. Las flechas indican el agregado de DPX 10 mM, de TX-100 10 mg/ml, y la aplicación de 55°C para favorecer la solubilización de los liposomas HSPC. Los resultados se expresan como porcentaje de la fluorescencia inicial.

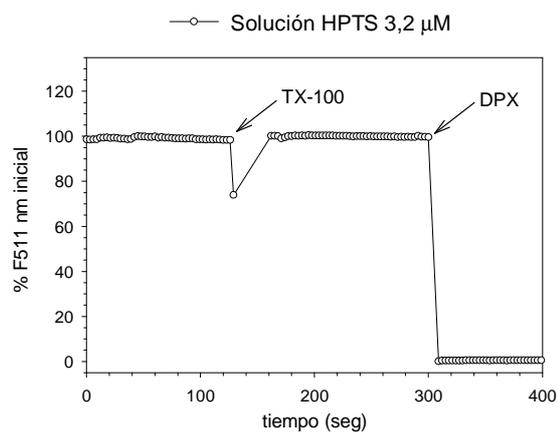


Fig.126: Efecto del DPX sobre HPTS en solución 3,2 μM a pH 7,4. Se determinó la fluorescencia a 511 nm excitando a 403 nm. Las flechas indican el agregado de TX-100 10 mg/ml y DPX 10 mM. Los resultados se expresan como porcentaje de la fluorescencia inicial.

En la Fig.126 se muestran los ensayos con DPX realizado con una solución de HPTS 3,2 μM , una concentración que podría hallarse en una suspensión de liposomas HSPC purificados por SEC y diluidos hasta 2 mg/ml. La misma se incubó a 37°C, se agregó TX-100 a una concentración de 10 mg/ml y finalmente DPX a una concentración de 10 mM. Se observa una disminución instantánea de la fluorescencia hasta valores no detectables, verificándose su eficiencia a esa concentración de fluoróforo.

4.4.4.5. DETERMINACIÓN DEL pH INTERNO Y MONITOREO AL PUNTO ISOSBÉTICO EN LIPOSOMAS CON HPTS

Una vez realizada la calibración del pH, y habiendo verificado la relación entre R454/403 y pH, se procedió a la determinación del pH del interior acuoso de liposomas convencionales durante la digestión *in vitro* según lo descrito en el apartado 3.4.7. (Materiales y Métodos). La determinación del pH interno se realizó en simultáneo con el monitoreo de la fluorescencia en el punto isosbético, que es un indicador de la cantidad de sonda que permanece en el interior acuoso, según lo descrito en el apartado 3.3.3.3. (Materiales y Métodos). La Fig.127 muestra los ensayos realizados para cada tipo de formulación convencional. En cada caso, la línea en azul representa la variación del porcentaje medio de fluorescencia a 511 nm para la excitación a 417 nm (isosbético) que proviene de la HPTS remanente en el interior del liposoma con respecto al valor previo a la digestión. Cabe recordar que los liposomas inicialmente están diluidos a una concentración lipídica de aproximadamente 0,5 mg/ml en buffer T10 a un pH inicial que resulta igual a 6,8.

Los liposomas SPC presentan una brusca disminución del pH interno luego del agregado de la solución conteniendo pepsina y HCl (pep/HCl; indicado como H^+ en la Fig.127(a)), que produce un cambio de pH en el medio, desde 6,8 hasta 2. Este hecho demuestra una alta permeabilidad de las bicapas al cambio de pH. El valor que alcanza el pH del medio interno cuando se acidifica el medio externo no puede determinarse mediante esta sonda fluorescente, ya que es menor que 4,6 (pH mínimo detectable mediante el cociente R454/403). Luego de agregar la solución conteniendo pancreatina y extracto de sales biliares (pan/EB) y llevar el pH hasta 6,5 con bicarbonato de sodio (indicado como HCO_3^-), estos liposomas presentan un abrupto aumento de pH, para finalizar la digestión a un pH similar al de partida.

En cuanto a la variación de fluorescencia a 417 nm, presentan una disminución significativa posteriormente a la acidificación del medio, finalizando con un valor cercano al 85% del inicial, con lo cual puede inferirse que solo se ha perdido un 15% de la sonda encapsulada durante el proceso digestivo *in vitro*.

Los liposomas HSPC, la única preparación con bicapas en estado gel a 37°C, son los menos permeables al cambio de pH, llegando a un mínimo situado entre 5,3 y 5,0 al final de la etapa estomacal y comienzo de la intestinal (ver Fig.127(b)). Finalmente, a los 120 minutos, alcanzan un pH de 6,2. Por otro lado, son los que presentan el porcentaje más elevado de desencapsulación de la HPTS, observándose una significativa disminución al comienzo de la etapa intestinal, para terminar con un 55% de sonda remanente al final de la digestión. Como puede verse en la Fig.127(c), los liposomas HSPC-Chol presentan una permeabilidad al pH

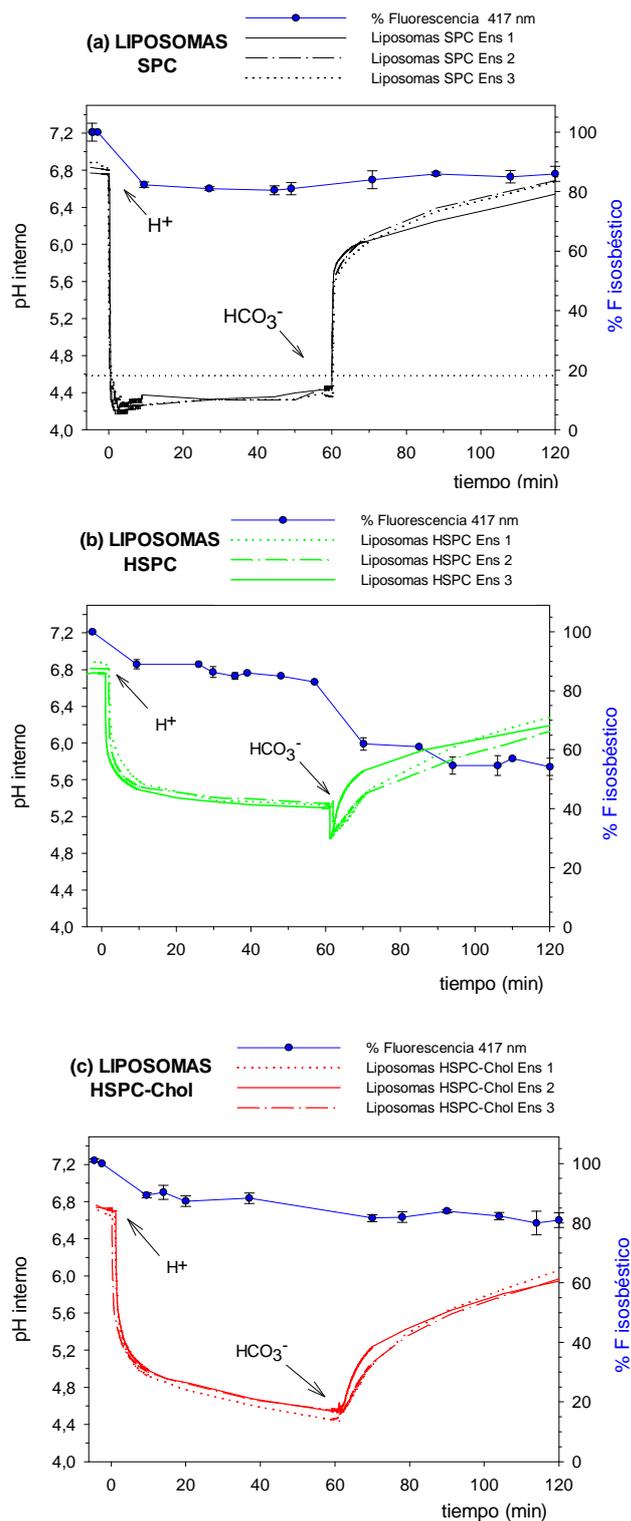


Fig.127: Derminación del pH interno en liposomas (a) SPC, (b) HSPC y (c) HSPC-Chol durante la digestión *in vitro*. Cada trazo representa un experimento independiente. Las flechas indican el agregado de pep/HCl (H^+) y pan/EB (HCO_3^-) limitando las zonas que simulan la digestión estomacal e intestinal. En azul se indica el promedio del porcentaje de fluorescencia a 511 nm por excitación a 417 nm (punto isobéístico), que es proporcional a la cantidad de sonda encapsulada. La línea punteada en (a) indica el límite inferior para la determinación del pH empleando el cociente R454/403.

intermedia respecto a las formulaciones anteriores, alcanzando un pH de 4,6 al final de la etapa estomacal y de 6,0 al final de la etapa intestinal.

Con respecto a la variación de la fluoescencia a 417 nm, resulta bastante gradual, con un porcentaje final de 80% de HPTS remanente una vez concluido el tratamiento.

La Fig.128(a) muestra una comparación entre los promedios de las determinaciones de pH para los tres tipos de liposomas convencionales en las condiciones descritas para la Fig.127. En la Fig.128(b) se muestran los promedios para las determinaciones de pH obtenidas sin agregar DPX al medio de incubación. Los perfiles no difieren significativamente de los obtenidos con DPX, excepto por una menor permeabilidad al cambio de pH que se observa en los liposomas HSPC y HSPC-Chol, en los gráficos obtenidos sin DPX.

Esto indica que con estos tres tipos de liposomas y en caso de no utilizar el DPX, la cantidad de HPTS desencapsulada durante la digestión *in vitro* no interfiere en la determinación del pH.

Por lo tanto las tres formulaciones de liposomas convencionales parecen resistir en mayor o menor grado las condiciones de la digestión *in vitro* utilizadas, resultando los liposomas con transición de fase a 55°C (HSPC) los que tienen mayor tendencia a perder su contenido. En cuanto al pH interno, todas las formulaciones tienen una considerable permeabilidad al brusco cambio de pH

externo al que son sometidas al comienzo de la digestión, para luego recuperar parcialmente el pH inicial durante la etapa intestinal.

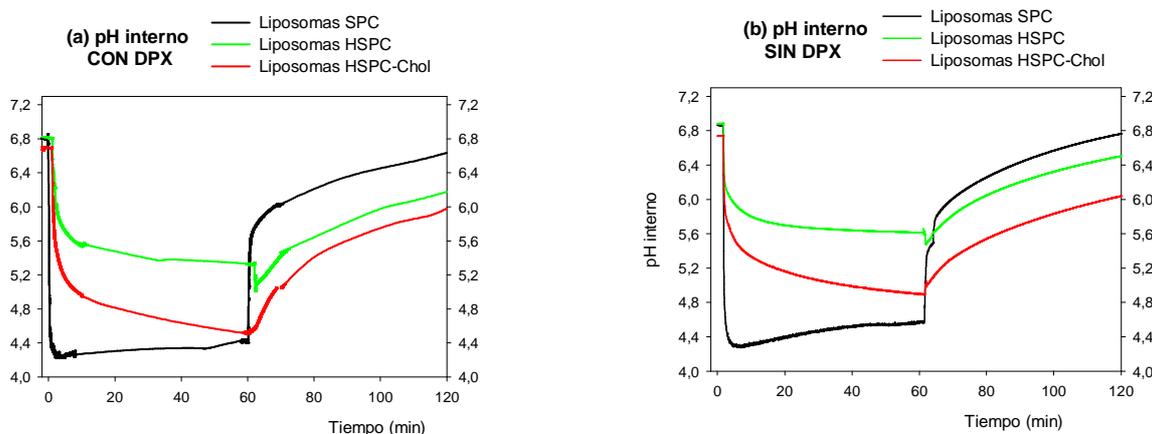


Fig.128: Comparación entre gráficos promedio "pH interno vs. tiempo" para liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol (a) con el agregado de DPX, (b) sin DPX, durante la digestión in vitro en las condiciones de la Fig.127.

4.4.5. Determinación del pH interno en liposomas SPC empleando OG-514

Los ensayos con Oregon Green 514 (OG-514) se realizaron para comprobar que el pH interno de liposomas SPC en la etapa de la digestión en medio ácido alcanza pHs menores que 4,6. Esta hipótesis surge del perfil de cambio de pH de la Fig.127(a), pero no pudo ser demostrada empleando HPTS ya que la medición cae fuera del rango de dicha sonda.

4.4.5.1. PROPIEDADES DEL OG-514 EN SOLUCIÓN

Espectros de excitación en función del pH

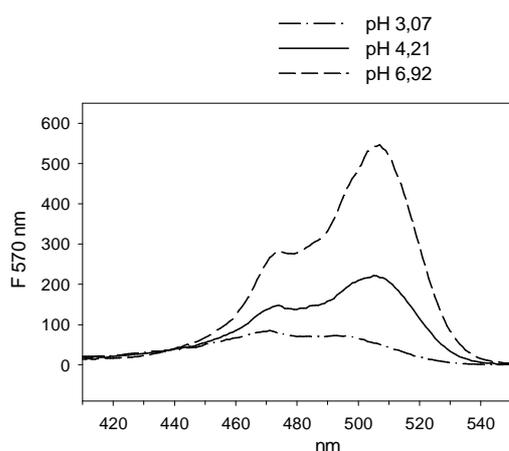


Fig.129: Espectros de excitación para OG-514 a distintos pHs. La longitud de onda de emisión fue 570 nm. Se indica la intensidad de fluorescencia a 450, 470 y 510 nm.

Inicialmente se adquirieron espectros de excitación para OG-514 en solución a distintos pHs. Como se observa en la Fig.129, los espectros tienen un máximo principal alrededor de los 510 nm y uno secundario a 470 nm. También se observa que a medida que el pH disminuye, también lo hace la intensidad de la fluorescencia de emisión, observándose un efecto de quenching por efecto del pH.

Para la determinación del pH con OG-514, suelen emplearse los pares de excitación 510/450 ó 510/470 obteniendo los respectivos cocientes de la emisión a 526 ó 570 nm (Lin et al., 1999). En los siguientes apartados se muestran los ensayos que

llevaron a seleccionar uno de los dos pares de excitación como indicador del pH.

Efecto de filtro interno

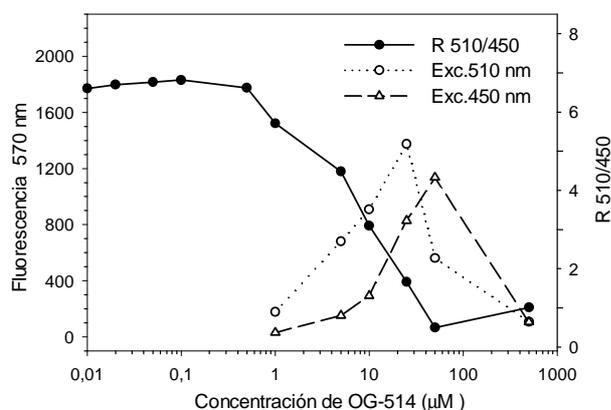


Fig.130: Variación de la fluorescencia de emisión a 570 (excitando a 450 y 510 nm) y del R510/450 con la concentración de OG-514. El ensayo se realizó en buffer T10 a pH 6,9, empleando un paso óptico de 1 cm.

Como se describió para la sonda fluorescente HPTS, el efecto de filtro interno depende de la concentración de la sonda y del paso óptico (Apartado 4.1.2.2.). En la Fig.130 se observa una disminución de la fluorescencia debida a dicho efecto a concentraciones mayores que 25 μM cuando se excita a 450 nm, y superiores a 50 μM al hacerlo a 510 nm. Sin embargo, su efecto sobre el cociente R510/450 se evidencia a concentraciones mucho menores. Como se observa en la figura (línea continua), el R510/450 permanece constante en el rango 0-0,5 μM .

Rango lineal

Como se mencionó previamente, pueden hallarse dos cocientes entre longitudes de onda de excitación que responden a los cambios de pH: R510/450 y R510/470. Para seleccionar el más adecuado, se preparó una solución de OG-514 0,03 μM y se realizaron pequeñas variaciones de pH para estudiar la respuesta de cada cociente. La Fig.131(A) muestra cómo varía la emisión fluorescente a 570 nm con el pH, a distintas longitudes de onda de excitación. Se observa que 510 nm es la longitud de onda que presenta una mayor respuesta al pH

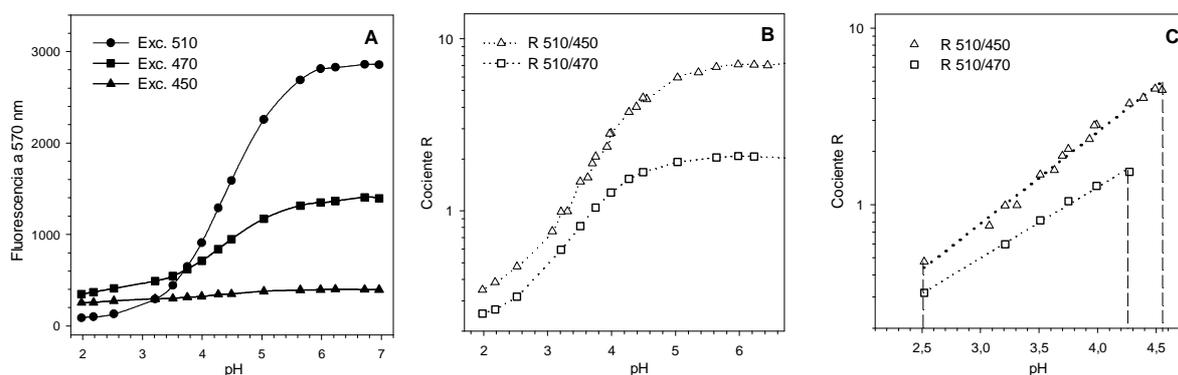


Fig.131: Variación de la fluorescencia de emisión a 570 excitando a 450, 470 y 510 nm (A) y del R510/450 (B) con el pH a 37°C. Se empleó una solución de OG-514 0,03 μM preparada en buffer T10 cuyo pH fue modificado por el agregado de alícuotas de HCl 1N. En la Fig.C se indica la zona lineal de cada curva de la Fig.B.

mientras que cuando se excita a 450 nm, la variación es muy leve. También se observa el

efecto de quenching a pH ácido en particular para la excitación a 510 nm, alcanzando valores de fluorescencia cercanos al ruido instrumental a $\text{pH} < 2,5$.

La Fig.131(B) muestra cómo varían los cocientes R510/450 y R510/470 con el pH. Ambos presentan distribuciones sigmoideas, con una zona media aproximadamente lineal. En la Fig.131(C) se ajustan dichas zonas lineales a rectas de regresión, eligiendo el máximo intervalo que proporcionase coeficientes de correlación $> 0,99$. Como se indica en la figura con línea discontinua, los rangos de linealidad difieren entre ambos cocientes. Así, el cociente R510/450 presenta linealidad en el rango de 2,50 a 4,55, mientras que para el cociente R510/470 el rango es levemente menor (2,50 a 4,25). Esta es la razón que llevó a elegir el cociente R510/450 como indicador del pH.

Quenchers del OG-514

Con el antecedente de haber empleado el DPX como quencher para la HPTS (apartado 4.4.5.3.), se investigó su eficacia para el OG-514. Se encontró que para reducir la fluorescencia en un 75%, se requería una concentración de DPX equivalente a 10^6 veces la concentración de la sonda. Por lo tanto se descartó esta sustancia por su baja eficiencia como quencher. Resultados similares se obtuvieron con el cloruro de europio, una sustancia habitualmente utilizada con sondas fluorescentes de estructura química similar al OG-514 (Bertrand et al., 2000).

El yoduro de potasio suele emplearse como quencher alternativo para algunos fluoróforos, generalmente a concentraciones más elevadas que los quenchers orgánicos (Watt, 1979). En este caso se vio que para obtener un 95% de la fluorescencia quencheda en una solución de OG-514 $0,03 \mu\text{M}$, la concentración de KI debía ser $0,7 \text{ M}$. En los ensayos realizados con liposomas conteniendo la sonda, se observó que, al agregar KI al medio externo, la fluorescencia disminuía gradualmente hasta valores que dificultaban su determinación. Este efecto, que podría ser debido a la difusión del KI en exceso desde el seno de la solución hacia el interior de los liposomas, llevó a descartar el empleo de este quencher para el OG-514.

Debido a las dificultades observadas para eliminar la fluorescencia de la sonda mediante quenchers, se decidió aprovechar el quenching que ésta experimenta a $\text{pH} < 2,5$ (ver Fig.131). En estas condiciones, la fluorescencia detectada al excitar a 510 nm alcanza los valores del ruido instrumental. Así, puede asegurarse que, durante la etapa ácida de la digestión, el pH del medio externo de los liposomas elimina la fluorescencia de la excitación a 510 nm que pudiera provenir de la sonda desencapsulada. Este hecho asegura que, mientras la señal de fluorescencia detectada al excitar a 510 nm sea superior al ruido, ésta provendrá de la sonda contenida en los liposomas. Esto será así hasta que el pH del interior de las vesículas sea también inferior a 2,5.

4.4.5.2. ESTUDIOS CON OG-514 INCORPORADO EN LIPOSOMAS

Evaluación de interferencias de los liposomas

Dado que las mediciones de pH interno debían realizarse a partir de valores de fluorescencia bajos, era crítico conocer las posibles interferencias de las vesículas. Para esto se

adquirieron espectros de excitación para la sonda en solución con o sin liposomas y para las vesículas preparadas en buffer a pH 6,9 y 2,0.

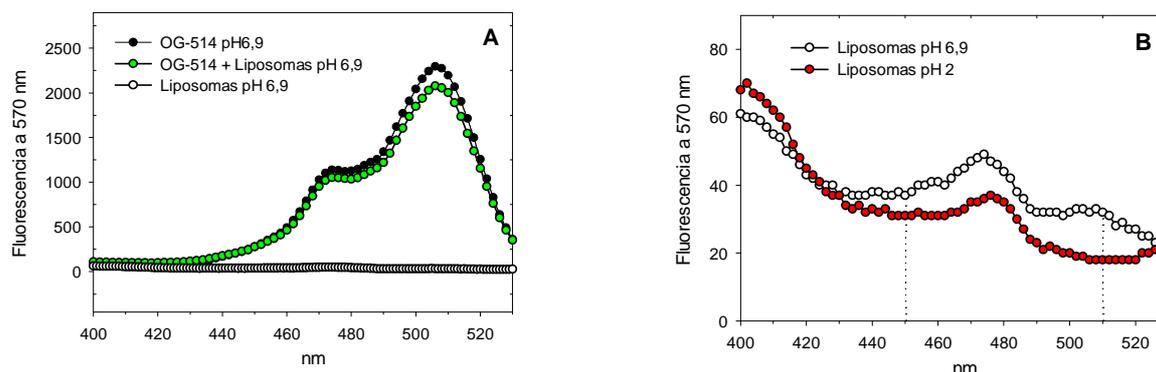


Fig.132: Espectros de excitación (emisión a 570 nm) obtenidos para OG-514 a pH 6,9 con o sin liposomas SPC 0,5 mg/ml preparados en buffer T10. El gráfico de la derecha muestra una ampliación de la zona de interés para liposomas SPC 0,5 mg/ml a pH 6,9 y 2,0.

Como se desprende de la Fig.132(A), la presencia de las vesículas modifica la emisión fluorescente. Por otro lado se observa que la fluorescencia a 570 nm para los liposomas preparados en buffer es muy baja, tanto a pH 6,9 como a pH 2,0 (Fig.132(B)). Sin embargo debe tenerse en cuenta que los liposomas pueden afectar las determinaciones de pH cuando se trabaja a pH cercanos a 2, en que las lecturas son de pocas cuentas por segundo.

Calibración del pH

Como se ha visto en los apartados anteriores, los liposomas interfieren de forma apreciable, aunque leve, en el espectro de excitación del OG-514 y por lo tanto en el cálculo del cociente R510/450 a partir del cual se pretende obtener su pH interior. Para estudiar esta influencia, se comparó la curva de calibración del pH obtenida para la sonda en solución (Fig.133(A)), con la obtenida para liposomas conteniendo OG-514 encapsulada con el agregado de gramicidina (Fig.133(B)).

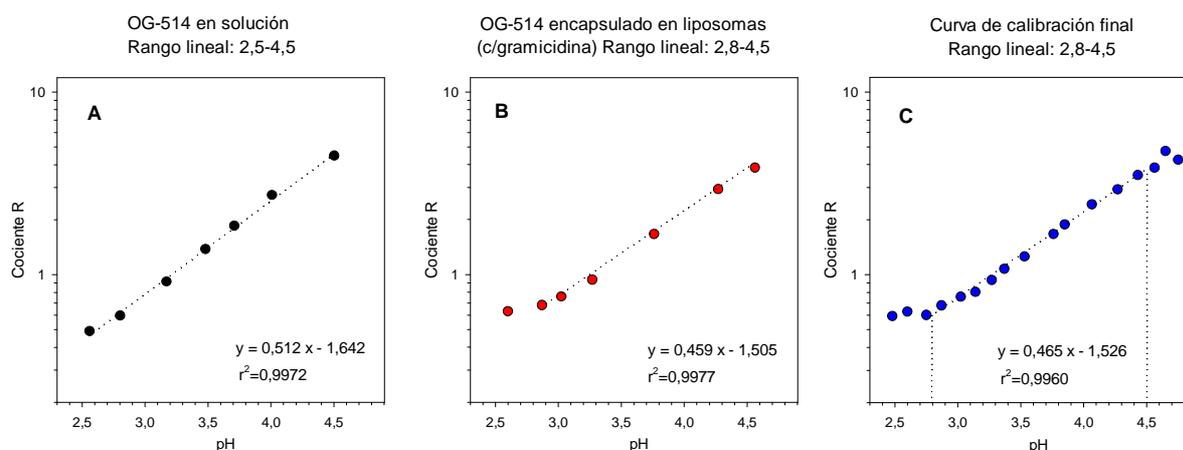


Fig.133: Curvas de calibración para OG-514 en solución (A), encapsulado en liposomas a 50 μ M con el agregado de gramicidina (B) y la curva final de calibración para OG-514 en solución con el agregado de liposomas (C). Se indican las ecuaciones de las rectas correspondientes y sus coeficientes de correlación (r^2), calculados para la zona lineal indicada con línea de puntos.

El efecto más notable es la disminución del rango que puede ser considerado lineal, que pasa de 2,5-4,5 en el caso del OG-514 en solución (Fig.133(A)), a 2,8-4,5 cuando la sonda está encapsulada (Fig.133(B)). Este efecto puede ser debido a la interferencia de los liposomas en la medición de la fluorescencia, la cual se evidencia a un pH cercano a 2. En efecto, en estas condiciones, la señal causada por los liposomas (> 20 cps) ya no es despreciable con respecto a la emisión del OG-514 al ser excitado a 510 nm (aproximadamente 100 cps). Por este motivo se estableció que las lecturas de fluorescencia debían ser mayores a las 100 cps para resultar confiables.

Otro cambio que se aprecia en la comparación de las rectas es una leve disminución de la pendiente de la recta de regresión obtenida en presencia de liposomas. La Fig.133(C) muestra la curva obtenida utilizando soluciones de OG-514 a las que se añadieron liposomas a una concentración equivalente a la de las muestras. Como puede observarse, el resultado es equivalente al de la sonda encapsulada en liposomas con el agregado de gramicidina liposomas (Fig.133(B)). Por este motivo se utilizaron para las calibraciones del pH soluciones preparadas con el agregado de liposomas SPC.

Finalmente, cabe aclarar que ni la presencia de gramicidina ni de TX-100 alteró la curva de calibración o el rango lineal cuando se agregaron a soluciones de OG-514.

4.4.5.3. DETERMINACIÓN DEL pH INTERNO EN LIPOSOMAS SPC

La Fig.134 muestra cómo disminuyen abruptamente los valores de fluorescencia al excitar a 510 y 450 nm después del agregado de la solución de pep/HCl. Aún así, la intensidad de fluorescencia se mantiene por encima de los 100 cps.

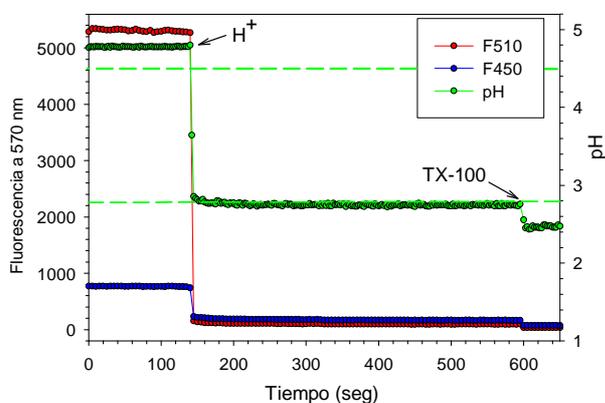


Fig.134: Determinación del pH interno en liposomas SPC conteniendo OG-514. Se muestran los perfiles obtenidos para cada longitud de onda y para el pH interno. Se indican los agregados de pep/HCl (como H^+) y de TX-100, así como los límites del rango lineal para la calibración del pH en presencia de liposomas.

De los resultados se desprende que el pH interno disminuye hasta 2,8, ya que éste es el límite inferior de la curva de calibración en presencia de liposomas. Cuando éstos se solubilizan mediante el agregado de TX-100, hay una disminución adicional de la fluorescencia. El cociente proporciona un pH que se sitúa en el límite inferior que puede determinarse con la sonda en solución (sin liposomas), lo cual es consistente con el pH de la muestra, que es 2.

4.4.6. Determinación del contenido residual de HPTS en liposomas digeridos

Este ensayo fue complementario al monitoreo del punto isobéctico (apartado 4.4.4.) y su finalidad fue determinar la cantidad de sonda que permanece dentro de los liposomas una vez finalizada la digestión *in vitro*.

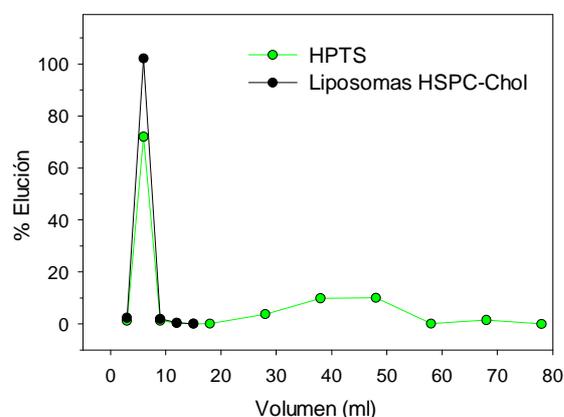


Fig.135: Perfiles de elución para HPTS y liposomas (HSPC-Chol C5-P2,4 procesados a 55°C) después de la digestión *in vitro*. Buffer de elución: T10.

Brevemente, el ensayo consistió en purificar los liposomas por SEC, para obtener la fracción de liposomas sin sonda libre (M1). Esta muestra se sometió a la digestión *in vitro* (apartado 3.4.7.2., Materiales y Métodos) y la muestra resultante se aplicó a una columna de Sephadex G-25. Se eluyó con buffer T10 recogiendo 6 fracciones de 3 ml y 6 fracciones adicionales de 10 ml. En cada fracción se determinó el contenido de HPTS y de fosfolípidos, y se calculó: el porcentaje de elución total, el porcentaje de elución de HPTS en las fracciones correspondientes a los liposomas y el porcentaje de elución de la HPTS libre. El ensayo se realizó para los tres tipos de

liposomas convencionales. La Fig.135 muestra un ejemplo de los perfiles de elución de HPTS y fosfolípidos para liposomas HSPC-Chol.

Dado que el porcentaje de elución total fue mayor al 95% tanto para la HPTS como para los fosfolípidos (indicador de la elución de los liposomas), se consideró que el porcentaje de sonda que permanece encapsulada después de la digestión, es equivalente al porcentaje de HPTS que eluye en las fracciones correspondientes a los liposomas. En la Tabla 31 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 31: Contenido residual de HPTS encapsulada al final de la digestión *in vitro* (POST). La determinación se realizó según lo descrito en el texto para los tres tipos de liposomas convencionales. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n \geq 2$).

Muestra	% HPTS encapsulada
Liposomas SPC POST	91 \pm 5
Liposomas HSPC POST	46 \pm 5
Liposomas HSPC-Chol POST	77 \pm 2

Se observa que los liposomas HSPC son los que presentan la menor encapsulación luego del proceso digestivo, mientras que tanto los SPC como los HSPC-Chol presentan elevados porcentajes de sonda remanente.

4.4.7. Efecto de la digestión sobre el comportamiento termotrópico de los liposomas HSPC

Los primeros ensayos para caracterizar el comportamiento termotrópico de liposomas HSPC se realizaron sobre suspensiones homogeneizadas en las condiciones C15-P4 a temperatura ambiente. Se registraron termogramas de esta suspensión antes y después de someter la muestra a una incubación de 30 minutos a 55°C. La Fig.136 muestra un ejemplo de los termogramas obtenidos para la muestra sin el tratamiento térmico. En la misma se observa un máximo para la capacidad calorífica a 52,2°C correspondiente a la transición de fases para fosfatidilcolina de soja saturada y una pre-transición aproximadamente a 47,8°C.

Cuando la muestra procesada a temperatura es posteriormente sometida a una incubación a 55°C, es decir a una temperatura por encima de su T_m , se observa un corrimiento en la temperatura de pre-transición, mientras que su T_m permanece prácticamente inalterada (ver Fig.137). Este cambio en la temperatura de pre-transición ya se había observado mediante cinéticas de absorbancia en el visible (511 nm), en liposomas HSPC incubados 30 minutos a 55°C (ver apartado 4.3.1.1.).

Por otro lado, y como se había descrito en el apartado 4.4.2., los liposomas HSPC presentan distribuciones de diámetros bimodales que son sensibles a la digestión *in vitro*.

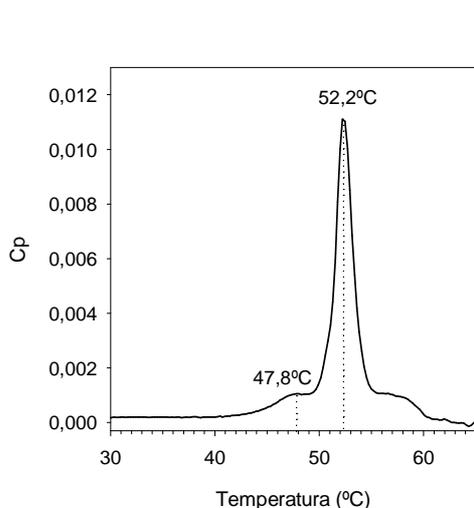


Fig.136: Calorimetría de barrido diferencial de liposomas HSPC C15-P4 procesados a temperatura ambiente. Se indican las temperaturas de pre-transición (47,8°C) y transición (52,2°C).

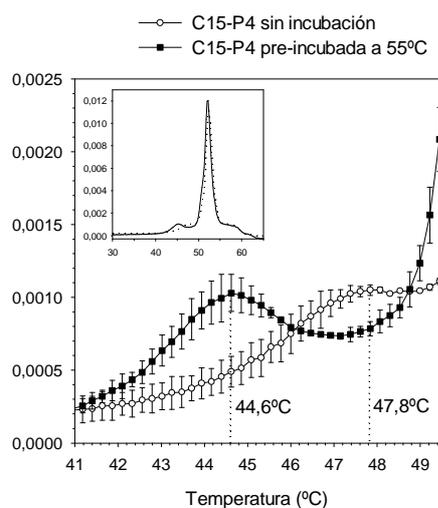


Fig.137: Comparación entre termogramas de liposomas HSPC C15-P4 pre-incubados o no durante 30' a 55°C, indicando el corrimiento de la temperatura de pre-transición desde 47,8°C hasta 44,6°C (n=3). El inserto muestra la superposición de los termogramas completos.

En efecto, la distribución PRE-digestión presenta dos poblaciones bien definidas, mientras que la distribución POST-digestión prácticamente pierde la población de diámetros pequeños, como se había descrito previamente (ver Fig.118, apartado 4.4.2.).

Para comprender el comportamiento termotrópico de los liposomas HSPC frente a la digestión *in vitro*, era conveniente separar las poblaciones pequeñas de las grandes y analizar cada una por DSC en forma independiente. Para esto se prepararon liposomas HSPC C5-P4 a 55°C y se separaron por decantaciones sucesivas luego de dejarlos en reposo a 4°C. Se obtuvo

un sobrenadante conteniendo las vesículas de menor diámetro y un pellet, con las vesículas de mayor diámetro. Las distribuciones de diámetros de las suspensiones así obtenidas (PRE) se muestran en la Fig.138.

A continuación se sometieron alícuotas de cada fracción, al proceso de digestión *in vitro*, según lo descrito en el apartado 3.4.7.2. (Materiales y Métodos) y se analizaron por DSC. La Fig.139(A) y (B) muestra los termogramas obtenidos para el sobrenadante y el pellet, antes (PRE) y después (POST) de la digestión.

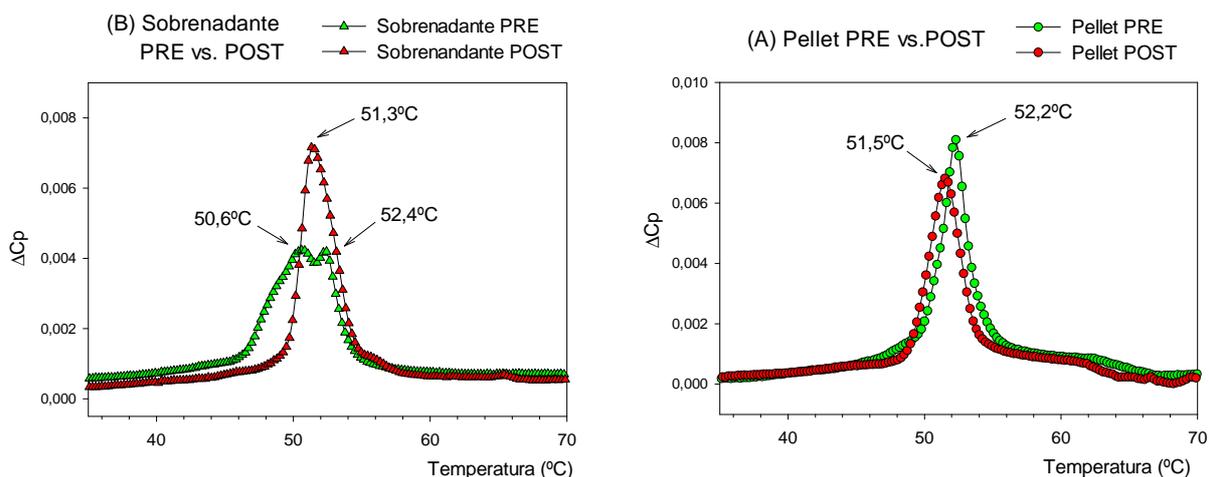


Fig.139: Comparación entre termogramas de liposomas HSPC C15-P4 separados en sobrenadante (A) y pellet (B), antes (PRE) y después (POST) de la digestión *in vitro*. Se indican las temperaturas correspondientes a los máximos en cada barrido ($n=3$).

Se observa que el termograma del pellet sin digerir presenta una señal aguda, con un máximo a 52,2°C correspondiente a la T_m , como ya se había observado en el apartado 4.2.1. (ver Fig.55). Por el contrario, las vesículas más pequeñas presentes en el sobrenadante producen un ensanchamiento de la señal debido a la aparición de un máximo adicional a 50,6°C y a un hombro situado hacia los 48°C. Cuando ambas fracciones son digeridas, los termogramas son semejantes: una señal aguda, con un máximo para T_m entre 51,3-51,5°C, posición ligeramente desfasada respecto al máximo del pellet sin digerir. Para evaluar si existe

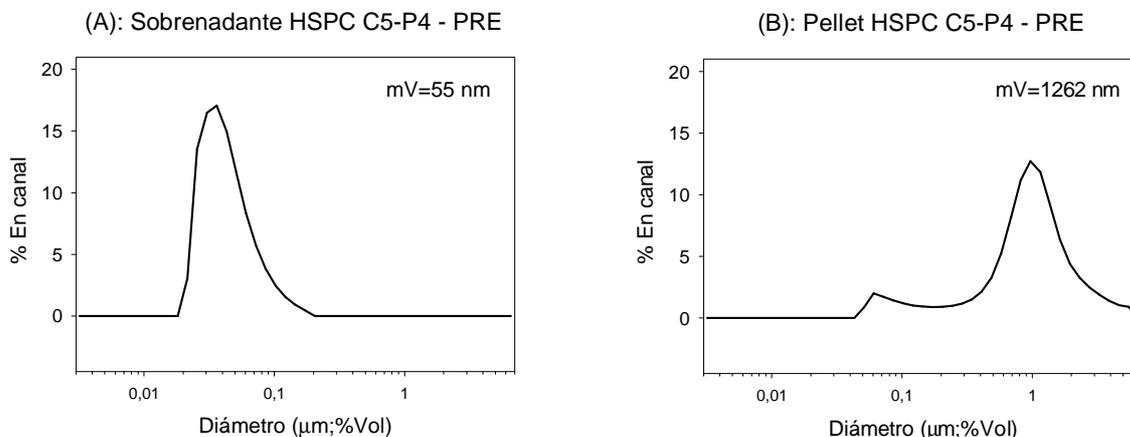


Fig.138: Ejemplos de distribuciones de diámetros para liposomas HSPC C5-P4 PRE-digestión. (A) Sobrenadante y (B) pellet obtenidos por decantación a partir de la suspensión original. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador.

relación entre este comportamiento y los cambios en las distribuciones de diámetros, se compararon estos resultados con los diámetros medios obtenidos para las muestras digeridas. La Tabla 32 muestra los valores de diámetros medios PRE y POST, los anchos de banda a media altura de la transición termotrópica y las T_m obtenidas en cada caso.

Tabla 32: Efecto de la digestión sobre las fracciones sobrenadante y pellet obtenidas a partir de liposomas HSPC C5-P4 55°C. Se muestran los valores correspondientes al diámetro medio, el ancho de banda a media altura y la/s temperaturas de transición cada termograma.

Muestra	Diámetro medio \pm anchura media (nm)	Ancho de banda a media altura ($^{\circ}$ C)	Temperatura de transición ($^{\circ}$ C)
Sobrenadante PRE	53 \pm 20	5,9	50,6 \pm 0,2 / 52,4 \pm 0,1
Sobrenadante POST	289 \pm 165	2,7	51,3 \pm 0,1
Pellet PRE	1.116 \pm 667	2,2	52,2 \pm 0,1
Pellet POST	5.168 \pm 685	2,8	51,5 \pm 0,1

Se observa tanto para el sobrenadante como para el pellet, un incremento del 500% en el diámetro medio por efecto de la digestión. Por otro lado, aunque el diámetro correspondiente al sobrenadante digerido tiene un valor muy inferior al del pellet digerido, los termogramas son similares tanto en su ancho a media altura, como en su temperatura de transición.

4.4.8. Evaluación de la estabilidad química mediante ^{31}P -RMN

4.4.8.1. ENSAYOS PRELIMINARES

Para verificar la utilidad de esta metodología para la cuantificación de formas liso se tomaron dos alícuotas de una suspensión de liposomas EPC/PA 7:3 p/p en buffer T10 extrusionados hasta 400 nm. Una de ellas se conservó en atmósfera de N_2 y a 4°C. La segunda se sometió acidificó con HCl hasta pH 2, incubándola a 37°C durante 16 horas, e iluminándola con luz UV durante 2 h.

Ambas suspensiones se procesaron según lo descrito en el apartado 3.7.11. (Materiales y Métodos) para extraer los lípidos y analizarlos por ^{31}P -RMN. La Fig.140(a) muestra el espectro RMN obtenido con protón desacoplado para la muestra almacenada en N_2 a 4°C (muestra sin tratar). Se observa que cada tipo de fosfolípido da lugar a un singulete cuyo desplazamiento químico (δ) depende de la naturaleza de su cabeza polar.

Los valores de δ se fijaron según bibliografía, asignando un valor de -0,84 ppm a la señal correspondiente a la PC (Meneses y Glonek, 1988). En la Fig.140(b) se muestra el espectro RMN correspondiente a la muestra que recibió el tratamiento de degradación. Se observa la aparición de dos señales a campos más altos respecto de los fosfolípidos originales, que se asignaron a sus correspondientes formas liso según lo descrito anteriormente (Glonek, 1998). La pequeña señal que aparece a -0,381 ppm fue atribuida al fósforo inorgánico, que podría originarse por la pérdida del grupo fosfato de la PC y/o del PA.

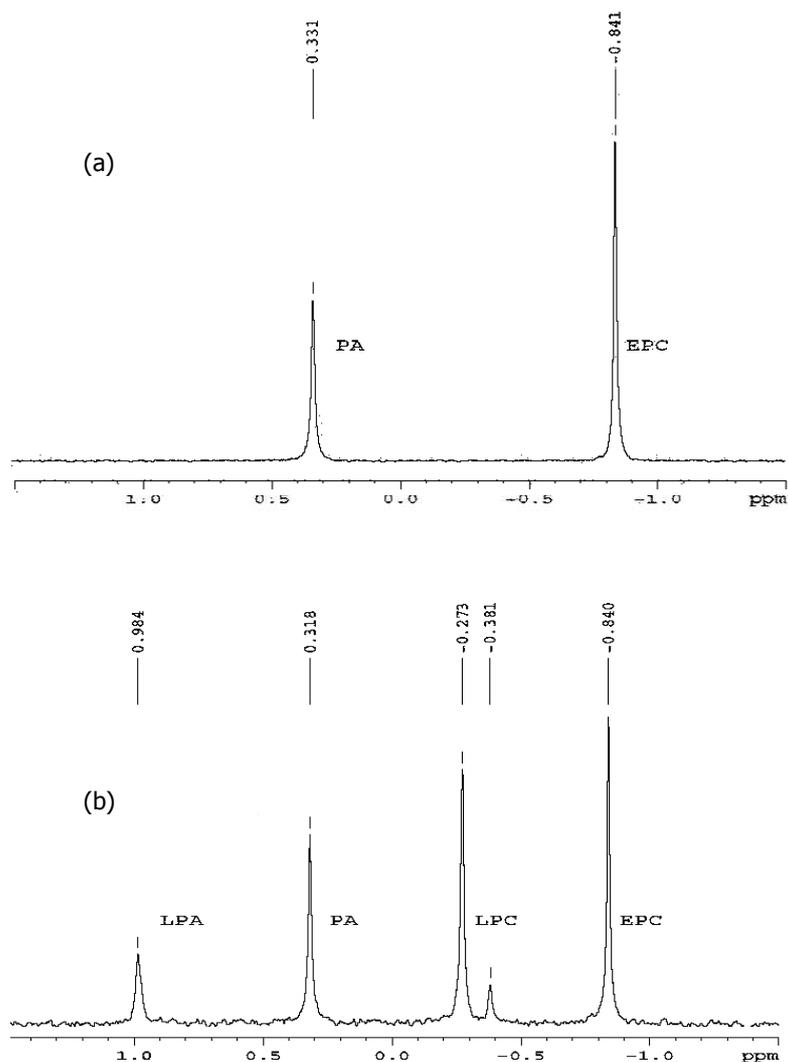


Fig.140: Espectros ^{31}P -RMN de la muestra conteniendo EPC-PA (a) sin tratamiento con protón desacoplado y (b) de la muestra tratada (pH 2, 37°C, radiación UV) con protón desacoplado. PA: ácido fosfatídico, EPC: fosfatidilcolina de huevo, LPA: ácido liso- fosfatídico, LPC: lisofosfatidilcolina de huevo.

La Tabla 33 muestra los valores calculados por normalización de áreas para EPC, PA y sus formas de degradación, a partir de los espectros de la Fig.140(a) y (b).

Tabla 33: Cuantificación de formas liso de fosfolípidos por ^{31}P -RMN con protón desacoplado. El área se expresa como el porcentaje del área total de los picos presentes. δ : desplazamiento químico (en ppm). EPC: fosfatidilcolina de huevo, Pi: fósforo inorgánico, LPC: lisofosfatidilcolina de huevo, PA: ácido fosfatídico, LPA: ácido liso- fosfatídico, ND: no detectablemograma.

Sustancia	δ (ppm)	Muestra sin tratar (% Área total)	Muestra tratada (% Área total)
EPC	-0,84	61,3	30,2
Pi	-0,38	ND	5,5
LPC	-0,27	ND	28,6
PA	+0,32	38,7	23,2
LPA	+0,98	ND	12,5

Después del tratamiento, un 32% de PA y un 47% de PC se convirtieron en sus formas liso, por pérdida de una de las cadenas de ácido graso. La separación obtenida, debida a la alta resolución del equipo empleado, permitió cuantificar una mezcla de dos fosfolípidos y sus formas de oxidación, y diferenciarlas de la señal correspondiente al fósforo inorgánico

4.4.8.2. CUANTIFICACIÓN DE FORMAS LISO EN LIPOSOMAS PRE Y POST DIGESTIÓN

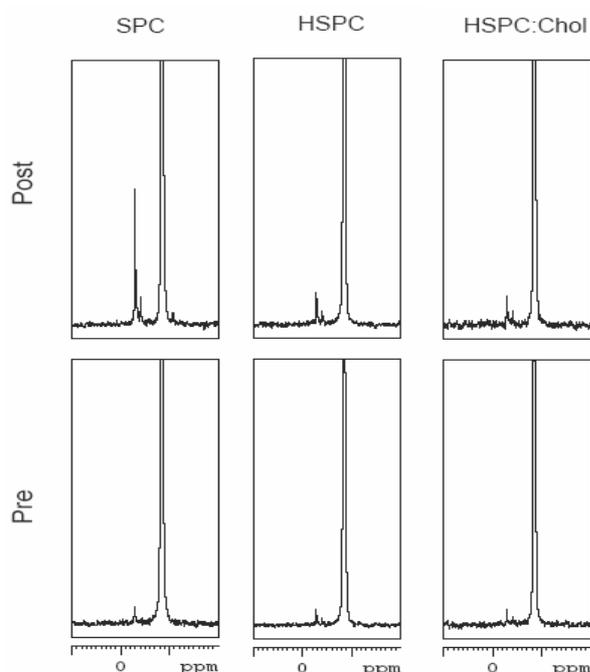


Fig.141: Espectros ^{31}P -RMN de liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol antes (Pre) y después (Post) de ser sometidos a procesos de digestión *in vitro*. La señal principal, a campos bajos corresponde a la PC y la de menor intensidad a su forma liso, según fue asignado en la Fig.53.

Una vez puesta a punto la cuantificación de formas liso por ^{31}P -RMN, se aplicó al estudio de la estabilidad de los liposomas convencionales preparados por homogeneización a alta presión y sometidos a la digestión *in vitro*.

Los liposomas convencionales, SPC, HSPC y HSPC-Chol, se prepararon según lo descrito en el apartado 3.4.3. y se sometieron al proceso de digestión *in vitro* descrito en el apartado 3.4.7. (Materiales y Métodos). Se extrajeron los fosfolípidos de muestras antes y después de digerir según el procedimiento descrito en el apartado 3.5.9. y se analizaron por ^{31}P -RMN. Se calculó el porcentaje de PC y liso PC por normalización de áreas, a partir de los espectros obtenidos con protón desacoplado.

En la Fig.141 pueden verse ejemplo de los espectros obtenidos para liposomas

antes (Pre) y después (Post) de ser sometidos al proceso de digestión *in vitro*. El singulete correspondiente a la PC es la señal más abundante en todos los casos y aparece a $-0,841 \pm 0,001$ ppm. También se observa la señal de liso PC a $-0,288 \pm 0,012$ ppm, con distinta intensidad según la muestra, así como una pequeña contribución del fósforo inorgánico a $-0,396 \pm 0,013$ ppm. En la Tabla 34 se muestran los valores de liso PC obtenidos a partir de la integración de las señales de espectros como el de la Fig.141, calculados por normalización de áreas.

Tabla 34: Cuantificación de formas liso por ^{31}P -RMN en liposomas SPC, HSPC, y HSPC-Chol antes (PRE) y después (POST) de ser sometidos a procesos de digestión *in vitro* (n=3). Los porcentajes de liso PC corresponden al % de área correspondiente respecto al área total.

Liposomas	PRE % liso PC	POST % liso PC
SPC	1,8 ± 0,3	8,1 ± 1,3
HSPC	1,6 ± 0,4	2,6 ± 0,4
HSPC-Chol	1,2 ± 0,4	2,3 ± 0,5

Los valores de liso PC en las muestras sin digerir (PRE) se encuentran en el rango de 1 a 2% para las tres formulaciones, lo cual coincide con los valores de las hojas de especificaciones de las materias primas (ver apartado 3.1.1. Materiales y métodos). Por el contrario, la digestión *in vitro* produce un aumento significativo del contenido de formas liso en las tres formulaciones. Los liposomas HSPC y HSPC-Chol sin embargo, mantienen un contenido de liso PC aceptable, inferior al 3%. Por el contrario los liposomas SPC muestran un drástico incremento con valores alrededor del 8%, lo cual podría incluso llevar a la inestabilización de las vesículas, como se mencionó en el apartado 1.5.1. (Introducción).

En cuanto al contenido de fósforo inorgánico en las muestras sin digerir no resultó detectable, mientras que en las muestras digeridas se encuentra por debajo del límite de cuantificación (0,5%).

4.4.9. Efecto de la incubación a 37°C con extracto de bilis

Los ensayos que se muestran en este apartado tienen como objetivo evaluar el efecto de la incubación de los liposomas convencionales con concentraciones crecientes de extracto de bilis (EB) durante 1 hora a 37°C y pH 6,5. Por lo tanto se realizan en las condiciones de la digestión *in vitro*, pero omitiendo la pre-incubación a pH 2 y el agregado de enzimas. Se estudió la variación del diámetro medio y la absorbancia a 600 nm con la concentración de EB, y se evaluó la pérdida de HPTS encapsulada mediante fluorimetría, según lo descrito en el apartado 3.5.7. (Materiales y Métodos).

El comportamiento de los liposomas SPC frente a la incubación con EB a 37°C ya había sido descrito en el apartado 4.3.2.2., en el que se estudiaba la solubilización de liposomas con sales biliares. Como se vio en las curvas de solubilización de la Fig.101, a 37°C todas las concentraciones estudiadas de liposomas SPC se solubilizan antes de los 20 minutos cuando son incubadas con concentraciones suficientes de EB.

Por el contrario, el comportamiento de los liposomas que contienen fosfolípidos saturados resulta marcadamente diferente. En las Figuras 142 y 143 se observan los gráficos "Absorbancia a 600 nm vs. concentración de EB" obtenidos para liposomas HSPC y HSPC-Chol respectivamente. También puede verse cómo varía el diámetro medio de la distribución en volumen (mV) para una de las concentraciones lipídicas estudiadas (líneas discontinuas).

Para las concentraciones más altas de liposomas HSPC (1,60 y 2,50 mg/ml) se observa una pequeña disminución inicial de la absorbancia a 600 nm seguida de un aumento pronunciado a medida que aumenta la concentración de EB, hasta absorbancias que triplican el valor inicial en algunos casos. Las concentraciones menores a 1 mg/ml presentan perfiles con un máximo a bajas concentraciones de EB. Luego la absorbancia disminuye pero sin alcanzar los valores iniciales.

El perfil correspondiente al diámetro medio (mV) para una concentración de 0,93 mg/ml coincide con lo observado para la absorbancia. El diámetro medio inicial fue de 637 nm, luego alcanzó un máximo entre 2.100 y 2.000 nm para concentraciones de EB intermedias, para terminar en valores entre 1.500 y 1.800 nm a altas concentraciones de EB.

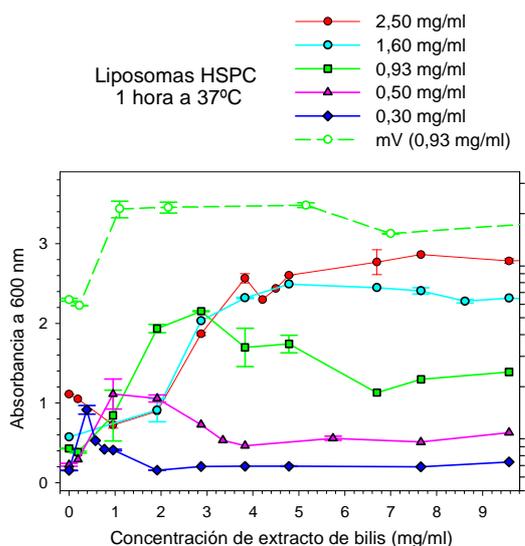


Fig.142: Variación de la absorbancia a 600 nm con la concentración de EB para distintas diluciones de liposomas HSPC en buffer T10 pH 6,5, incubados a 37°C durante 1 hora. La línea discontinua verde corresponde a la variación del diámetro medio (mV) con la concentración de EB en las condiciones indicadas, para una concentración lipídica de 0,93 mg/ml.

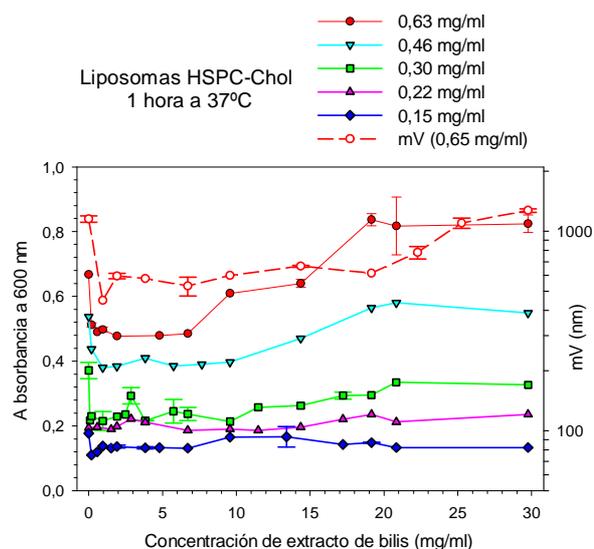


Fig.143: Variación de la absorbancia a 600 nm con la concentración de EB para distintas diluciones de liposomas HSPC-Chol en buffer T10 pH 6,5, incubados a 37°C durante 1 hora. La línea discontinua roja corresponde a la variación del diámetro medio (mV) con la concentración de EB en las condiciones indicadas para una concentración lipídica de 0,65 mg/ml.

También se realizaron estudios para determinar si el comportamiento de estos liposomas a 37°C es reversible una vez que son solubilizados. Los liposomas HSPC 1,60 mg/ml (Fig.142) se incubaron durante 1 h a 37°C con distintas concentraciones de EB, luego se solubilizaron a 55°C hasta absorbancia no detectable y finalmente se incubaron nuevamente a 37°C durante

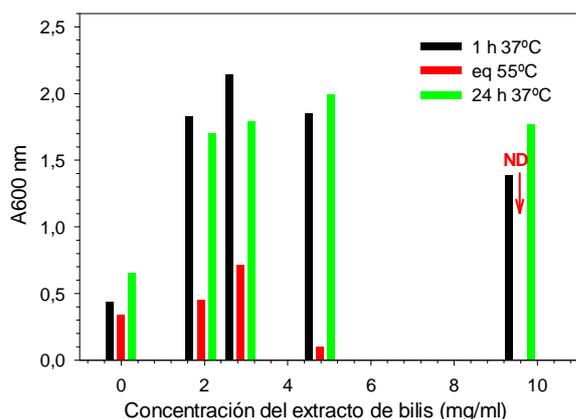


Fig.144: Estudio de la reversibilidad del comportamiento de los liposomas HSPC 0,93 mg/ml incubados con extracto de bilis (EB) a 37°C durante 1 h (barras negras), a 55°C hasta absorbancia constante (barras rojas) y nuevamente a 37°C durante 24 h (barras verdes). ND: absorbancia no detectable.

una disminución de la absorbancia inicial seguida de un aumento de la misma aunque no tan pronunciado como en los liposomas HSPC. A altas concentraciones de EB la absorbancia se

24 h. La Fig.144 muestra cómo la turbidez aumenta bruscamente cuando los liposomas se incuban durante 1 h a 37°C, como se había observado en la Fig.142. La incubación a 55°C hasta absorbancia constante provocó la solubilización de los liposomas, como se desprende de los valores de absorbancia no detectables a una concentración de EB igual a 9,6 mg/ml.

La incubación posterior durante 24 h a 37°C revierte la solubilización y la absorbancia recupera los elevados valores característicos de la incubación a dicha temperatura.

Los perfiles obtenidos para los liposomas HSPC-Chol (Fig.143) son similares para todas las concentraciones ensayadas:

estabiliza en valores similares a los valores iniciales. La evolución del diámetro medio es similar a la que muestra la absorbancia, detectándose una disminución inicial que da lugar, al incrementar la concentración de EB, a vesículas de mayor tamaño.

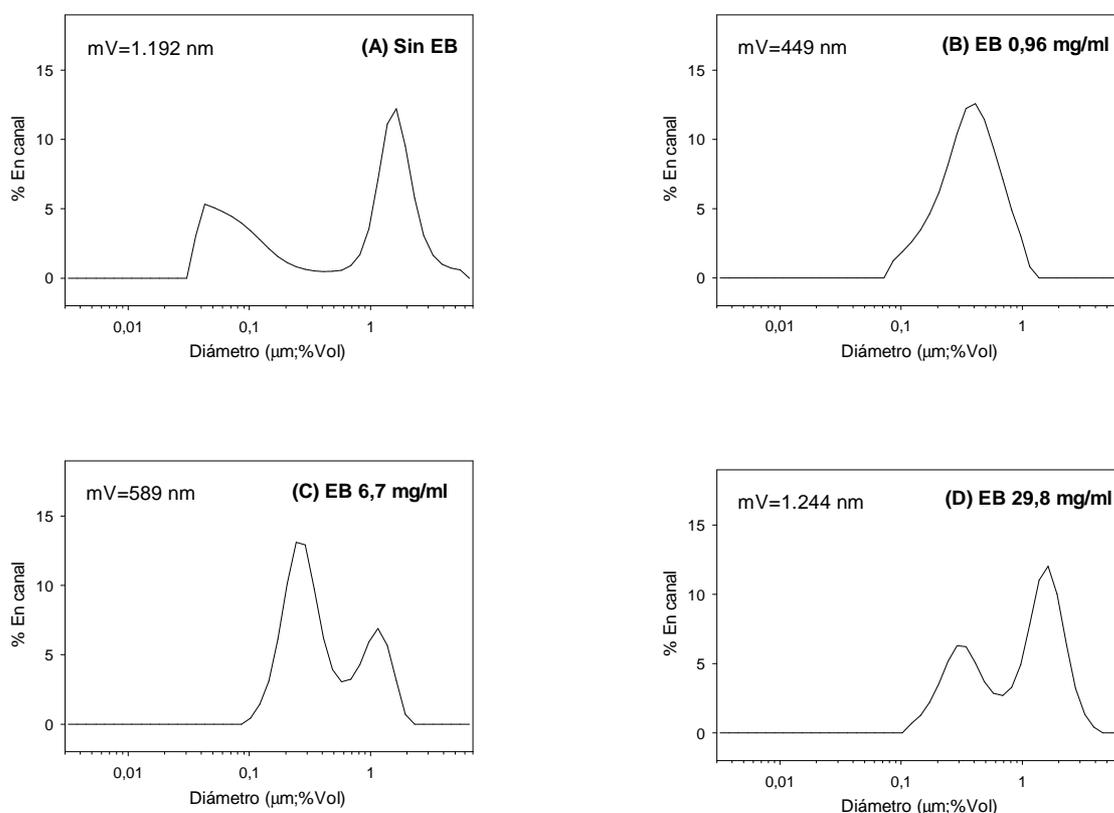


Fig.145: Distribuciones de diámetros obtenidas para liposomas HSPC-Chol incubados durante 1 hora a 37°C con concentraciones crecientes de extracto de bilis (EB): 0,96 mg/ml (1,8 mM) (B), 6,7 mg/ml (12,5 mM) (C) y 29,8 mg/ml (55,6 mM) (D). El gráfico (A) corresponde a la muestra incubada sin EB. La concentración de lípidos se mantuvo constante a 0,63 mg/ml. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador. Se indica el diámetro medio (mV) de la distribución en volumen obtenida para cada concentración de EB.

En la Fig.145, se muestra cómo influye el aumento de la concentración del EB en la distribución de diámetros de los liposomas HSPC-Chol incubados durante 1 h a 37°C. Inicialmente, se observa la distribución bimodal característica de los liposomas HSPC-Chol, con un diámetro medio de 1.192 ± 1.049 nm en el ejemplo mostrado (Fig.145(A)). Cuando estos liposomas se incuban con una baja concentración de sales biliares (Fig.145(B)), la distribución de diámetros cambia radicalmente, para dar lugar a una población monomodal, con un diámetro medio menor que el de la suspensión original. A una concentración de 6,7 mg/ml (Fig.145(C)), la distribución vuelve a ser bimodal, pero ambas poblaciones están desplazadas hacia diámetros mayores, con lo cual aumenta el diámetro medio resultante. La formación de micelas no se observa ni siquiera incubando estos liposomas a concentraciones tan altas como 29,8 mg/ml (Fig.145(D)). A esta concentración de EB la distribución sigue siendo bimodal con un predominio de las vesículas de mayor tamaño, lo cual lleva el diámetro medio a un valor de 1.244 ± 902 .

Para comprender el efecto del tratamiento con EB a 37°C sobre cada tipo de liposoma, es necesario relacionar los cambios observados en la absorbancia y en el diámetro medio, con

la pérdida de sonda encapsulada en función de la concentración de EB. Para esto se realizaron los ensayos de monitoreo de la fluorescencia en el punto isobéptico antes y después del agregado de DPX y se calculó la fluorescencia residual para cada concentración de EB, según lo descrito en el apartado 3.5.7. (Materiales y Métodos). Los ensayos preliminares realizados para validar esta metodología fueron mostrados en el apartado 4.1.2.3.

En las Figuras 146 (A), (B) y (C) se muestran los resultados obtenidos para la fluorescencia residual (F_R) en función de la concentración de EB para liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol respectivamente. Las curvas obtenidas se comparan con gráficos "Absorbancia a 600 nm vs. concentración de EB" similares a los mostrados en las Figuras 101, 142 y 143, obtenidos a la misma concentración de fosfolípidos que el ensayo de fluorescencia.

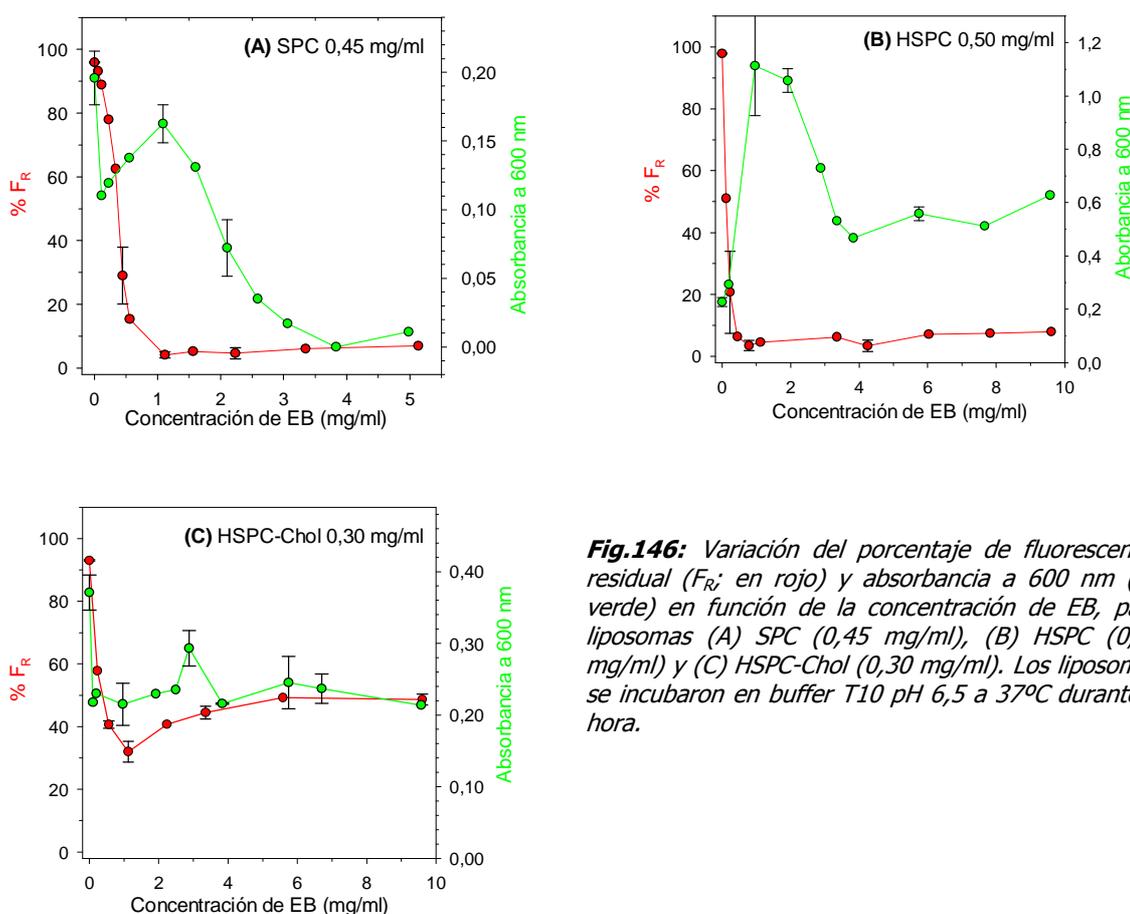


Fig.146: Variación del porcentaje de fluorescencia residual (F_R ; en rojo) y absorbancia a 600 nm (en verde) en función de la concentración de EB, para liposomas (A) SPC (0,45 mg/ml), (B) HSPC (0,50 mg/ml) y (C) HSPC-Chol (0,30 mg/ml). Los liposomas se incubaron en buffer T10 pH 6,5 a 37°C durante 1 hora.

Como se había visto anteriormente (Fig.101), los liposomas SPC presentan una disminución de la absorbancia a bajas concentraciones de EB respecto al valor inicial, pero luego se produce un aumento de la misma con un máximo alrededor de 1 mg/ml (Fig.146(A)). El gráfico correspondiente a la fluorescencia residual muestra una brusca disminución a bajas concentraciones de EB. Puede verse que a 1 mg/ml, el porcentaje de F_R es inferior al 5%. Por lo tanto, el cambio estructural que provoca el aumento de la absorbancia, produce una completa liberación del contenido de HPTS encapsulada durante la hora de incubación. Al aumentar la concentración de EB, la absorbancia disminuye hasta valores no detectables, correspondientes a la presencia de micelas.

Los liposomas HSPC tienen un comportamiento similar a los SPC en cuanto al perfil de la F_R en función de la concentración de EB (Fig.146(B), en rojo). Sin embargo, la absorbancia a

600 nm permanece a niveles mucho mayores que el inicial aún a concentraciones de EB de 10 mg/ml. Por lo tanto si bien el efecto del EB favorece la liberación de la HPTS, no predomina la formación de micelas, un proceso que se traduciría en valores de absorbancia prácticamente no detectables.

En cuanto a los liposomas HSPC-Chol (Fig.146(C)), la situación es intermedia a los otros dos tipos de liposomas convencionales. La absorbancia presenta una disminución del 40% a bajas concentraciones de EB y luego permanece aproximadamente constante aún a 10 mg/ml. El perfil de la F_R muestra una abrupta disminución inicial pero sólo hasta el 40%, contrariamente a los liposomas SPC y HSPC. Dicho contenido de sonda residual se mantiene aún a las mayores concentraciones de EB estudiadas. Por lo tanto ni la solubilización ni la liberación son completas y el efecto sobre la absorbancia resulta menos marcado que en los otros dos casos.

4.5. ESTABILIDAD FÍSICOQUÍMICA DE LIPOSOMAS CON HIERRO ENCAPSULADO DURANTE LA DIGESTIÓN *IN VITRO*

Los efectos de la digestión sobre los liposomas conteniendo FeAA se evaluaron mediante los siguientes estudios:

- Obtención de diámetros medios y distribuciones de diámetros
- Determinación del pH interno
- Evaluación de la estabilidad química por la cuantificación de liso PC
- Determinación del grado de oxidación del hierro

Los ensayos para determinar la incorporación de hierro y su permeabilidad en los liposomas digeridos no pudieron llevarse a cabo, ya que ambos involucraban una separación por SEC. En estas separaciones se observaba que las columnas de Sephadex se obturaban por la presencia de hierro libre y/o por el aumento del diámetro medio de las vesículas. Por lo tanto, la purificación por SEC de los liposomas digeridos además de dificultosa, resultaba poco confiable. Tampoco fue posible evaluar la desencapsulación de hierro mediante la pérdida de HPTS, debido las interferencias de la solución FeAA sobre la intensidad de fluorescencia de la HPTS, como se mostrará en el apartado 4.5.2.3. A continuación se mostrarán los ensayos realizados con liposomas convencionales, catiónicos con DC-Chol, y se elegirán como modelo de mucoadhesivos, los liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% FeAA-CHI 2 mg/ml, preparados según lo descrito en el apartado 4.2.3.5. y que a partir de ahora serán denominados liposomas CHI.

4.5.1. Efecto sobre el diámetro medio y las distribuciones de diámetros

La Fig.147 muestra las variaciones del diámetro medio cuando los liposomas con FeAA son sometidos a las distintas etapas del proceso de digestión *in vitro* descrito en el apartado 3.4.7.4. Los resultados corresponden al final de la etapa "estomacal" a pH 2 y al final de la digestión completa, con un pH final de 6,5.

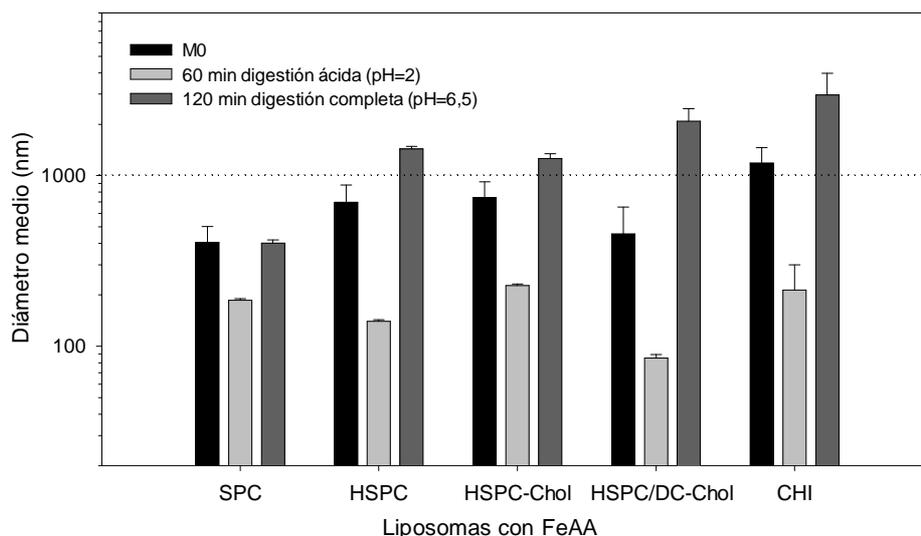


Fig.147: Variaciones del diámetro medio para liposomas conteniendo FeAA durante la digestión *in vitro*. Se indican los valores obtenidos para los liposomas sin digerir (M0), después de 60 minutos de digestión a pH 2 (60 min digestión ácida) y al cabo de 120 minutos, es decir una vez completada la misma (120 min digestión completa). Las condiciones de la digestión *in vitro* se describen en el apartado 3.4.7.4. (Materiales y Métodos). Los resultados se expresan como promedio \pm sem ($n \geq 2$). La línea punteada indica el límite confiable para el analizador de tamaño de partícula (aprox. 1.000 nm).

Como puede observarse, el diámetro medio de los liposomas disminuye significativamente al cabo de 1 hora de digestión a pH 2. En particular, los liposomas HSPC/DC-Chol alcanzan diámetros inferiores a los 100 nm.

Después de la digestión completa, los liposomas SPC recuperan su tamaño original. Por el contrario, los liposomas HSPC, HSPC-Chol, HSPC/DC-Chol y CHI digeridos tienen diámetros medios que exceden el límite confiable del analizador de tamaño de partículas (1.000 nm). En estos casos, el diámetro medio representa una estimación del volumen real de estas vesículas, el cual podría ser aún mayor que el informado por el equipo. Para los liposomas HSPC/DC-Chol por ejemplo, los agregados que se forman son visibles a simple vista, lo cual hace evidente la presencia de estructuras de mayor diámetro que las determinadas por el analizador.

En la Fig.148 se muestran ejemplos de las distribuciones obtenidas para dos de las formulaciones de liposomas (HSPC-Chol y CHI) antes de la digestión, después de 60 minutos a pH 2 (etapa estomacal) y luego de la digestión completa a pH 6,5 (120 minutos).

Como puede verse para los liposomas HSPC-Chol, la típica distribución bimodal de las muestras sin digerir ($mV=746$ nm), cambia sustancialmente después de la etapa estomacal, aumentando el porcentaje de vesículas entre 30 y 80 nm a expensas de las poblaciones de mayores diámetros ($mV=227$ nm). Al final de la digestión completa, se recupera la distribución bimodal, pero la misma se encuentra desplazada hacia mayores diámetros, lo cual se refleja en el diámetro medio obtenido ($mV=1.259$ nm).

En cuanto a los liposomas CHI, se verifica el efecto del pH 2, ya observado para otras formulaciones, que altera la distribución llevando el diámetro medio de 1.041 nm a 213 nm. El efecto de la digestión completa sobre estos liposomas, se traduce en una distribución prácticamente unimodal, en la cual han desaparecido las poblaciones de menor diámetro, como

se desprende de la Fig.148. Esto explica el aumento drástico del diámetro medio a valores por encima de los 1.000 nm (mV estimado: 2.962 nm), según lo visto en la Fig.147.

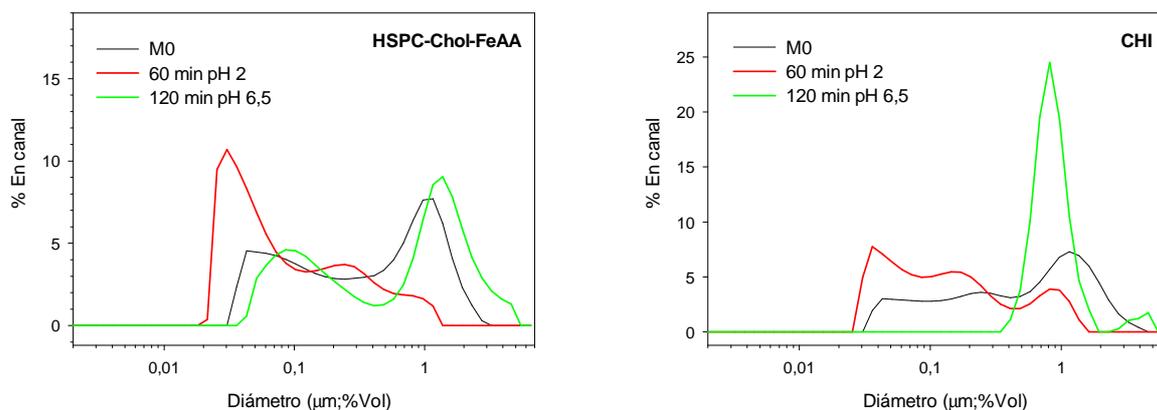


Fig.148: Distribuciones de diámetros para liposomas HSPC-Chol y CHI sin digerir (M0), después de 60 minutos de digestión a pH 2 (60 min digestión ácida) y al cabo de 120 minutos, es decir una vez completada la misma (120 min digestión completa). La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador.

4.5.2. Determinación del pH interno para liposomas con FeAA y HPTS

Si bien la variación del pH interno durante la digestión *in vitro* en los liposomas convencionales ya había sido estudiada (apartado 4.4.4.), debía evaluarse si la presencia de la solución FeAA encapsulada modificaba los resultados obtenidos para liposomas con HPTS. También debía realizarse la determinación de pH interno para las formulaciones no convencionales, que no habían sido incluidas en los estudios previos.

Para esto debieron prepararse y caracterizarse liposomas conteniendo FeAA 0,24 M y HPTS 2 mM. Además, para estudiar el efecto del ácido ascórbico como estabilizante del hierro, se realizaron ensayos encapsulando AA 0,48 M o bien FeAA conteniendo 0,24 M de hierro, a distintas relaciones Fe:AA (FeAA 1:2 y FeAA 1:5).

4.5.2.1. ENSAYOS PRELIMINARES

En los primeros ensayos con HPTS en solución en presencia de soluciones de FeAA y/o AA, se observó una disminución importante de la intensidad de la fluorescencia. Esta observación inicial llevó a realizar un estudio del efecto del hierro y del ácido ascórbico sobre la fluorescencia de la HPTS a pH 3 (el de las suspensiones de liposomas con FeAA), y a pH mayores que 4,6, correspondientes a la zona en que la sonda es utilizada para determinar el pH interno de los liposomas (apartado 4.4.4.2.).

En la Fig.149 se muestra una serie de espectros de excitación de la sonda en solución acuosa a pH 3 (el pH inicial de las soluciones FeAA), a la cual se agregaron alícuotas crecientes de una solución de FeAA 1:2. Se observa cómo las sucesivas adiciones de FeAA disminuyen la intensidad del espectro característico de la HPTS.

En la Fig.150 se muestra el efecto de la concentración de hierro sobre la intensidad de fluorescencia a 403 nm, máximo de excitación a ese pH y a 417 nm, que es el punto isobéstico. También se observa que la fluorescencia a 454 nm resulta no detectable, independientemente de la concentración de hierro.

El efecto del Fe y AA sobre la HPTS en la zona de medición del pH (4,6 a 7,8) se estudió

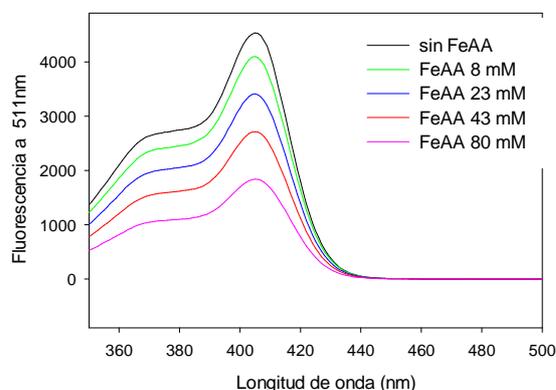


Fig.149: Espectros de excitación obtenidos para una solución de HPTS 1 μ M a pH 3 luego del agregado de FeAA 1:2 hasta concentraciones finales entre 0 y 80 mM. Longitud de onda de emisión: 511 nm.

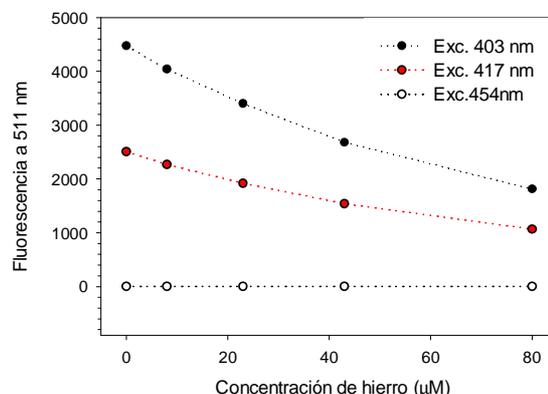


Fig.150: Variación de la fluorescencia a 511 nm por excitación a 403, 417 y 454 nm con la concentración de FeAA 1:2. Las concentraciones se expresan como μ mol de hierro por litro. La solución de HPTS se preparó a pH 3 a una concentración de 1 μ M.

agregando estas sustancias a una solución de la sonda (1,5 μ M) y llevando la preparación al pH deseado mediante la adición de NaOH.

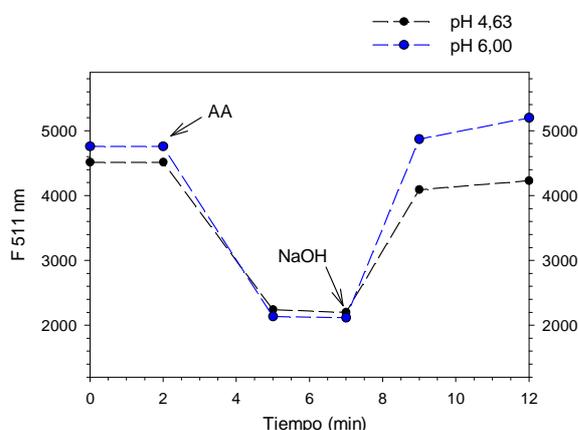


Fig.151: Variación de la fluorescencia de emisión a 511 nm (excitación a 417 nm) de una solución de HPTS 1,5 μ M a 37°C por el agregado de AA a una concentración de 192 mM y de NaOH 1N hasta pH 4,63 (línea negra) y 6,00 (línea azul).

contrario, la intensidad de fluorescencia después del agregado del NaOH es igual o aún menor que la correspondiente a la solución de HPTS quencheda por FeAA. En efecto, a los 5 minutos de incubación a pH 4,65 (línea azul), la intensidad de fluorescencia recupera el valor causado por la presencia de FeAA. Contrariamente, a pH 5,20 (línea negra) el valor resultante es un 25% más bajo que el quenchedo por FeAA.

Como puede apreciarse en la Fig.151, la adición de AA (192 mM final) a una solución de HPTS a pH 3 causa una disminución de la fluorescencia del orden del 50% cuando se excita en el punto isobéstico. La posterior modificación del pH por la adición de NaOH hace que la intensidad se recupere en un 90% al llegar a pH 4,63, y en un 100% si el pH final es 6,00.

Cuando el ensayo se realiza agregando una solución FeAA 1:2 (96 mM final), nuevamente se observa el efecto de quenching sobre la sonda, pero en este caso no hay una recuperación de la fluorescencia inicial al aumentar el pH (ver Fig.152). Por el

Cuando el pH es llevado a 5,5, el efecto observado es una disminución adicional de la intensidad de fluorescencia (línea magenta). Para valores de pH superiores a 6,0, los valores de fluorescencia son tan bajos, que las lecturas resultan poco fiables.

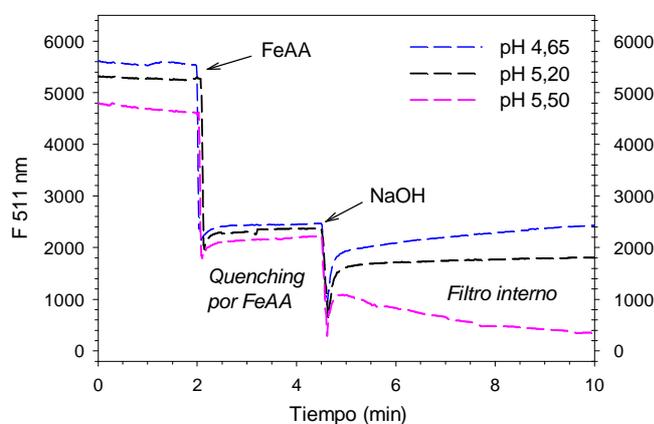


Fig.152: Variación de la fluorescencia de emisión a 511 nm (excitación a 417 nm) de una solución de HPTS 1,5 µM a 37°C por el agregado de FeAA 1:2 a una concentración de 96 mM y de NaOH 1N hasta pH 4,65 (línea azul), 5,20 (línea negra) y 5,50 (línea magenta).

Esta disminución de la fluorescencia adicional al quenching por AA o FeAA puede explicarse por la oxidación del Fe, fenómeno que causaría un efecto de filtro interno. Como se había descrito en el apartado 4.2.3., las soluciones FeAA llevadas a pH > 3 experimentan un proceso oxidativo caracterizado por la aparición de complejos que absorben en el espectro UV-visible. Estas especies absorben la luz incidente, disminuyendo la intensidad de la fluorescencia emitida por la sonda. Este hecho fue verificado mediante la observación de la disminución del haz de luz incidente, y mediante la adquisición de espectros en el visible de las muestras.

Los efectos combinados de quenching a pH ácido y filtro interno (Fig.152) no permiten la determinación del porcentaje de fluorescencia mediante la excitación en el punto isobéptico. A pesar de que a esta longitud de onda la sonda presenta una intensidad de fluorescencia independiente del pH, ésta es susceptible a los efectos del FeAA y AA, lo cual introduciría artefactos en la medición del contenido de sonda residual.

Finalmente, se determinó si los efectos de quenching y de filtro interno sobre la HPTS descritos anteriormente interferían en la determinación del pH interno, calculado a partir del cociente entre longitudes de onda de excitación R454/403. Para esto se realizó el ensayo que originó la Fig.153, determinando el pH de la muestra de dos maneras: mediante un pHmetro colocado en la cubeta situada en el fluorímetro (pH experimental), y calculándolo a partir del cociente R454/403, adquirido en forma automática por el equipo empleado. Este último (pH interpolado) se obtuvo interpolando los valores de R454/403 en una curva de calibración de HPTS con el agregado de FeAA.

Como puede observarse a partir de la variación del pH experimental, inicialmente la solución se halla a pH 3, luego disminuye hasta 2,4 por el agregado de FeAA y finalmente alcanza el valor deseado en cada caso, por el agregado de NaOH. En cuanto al pH calculado a partir del cociente R454/403, se observa inicialmente y hasta el agregado del NaOH, un pH ligeramente menor a 4 que no resulta fiable por hallarse por debajo del límite de detección de la sonda. Cuando el pH es llevado a 4,65, el pH interpolado indica un valor que difiere sólo en 0,2 unidades respecto del experimental.

A medida que el pH final aumenta, el valor del pH interpolado se acerca al experimental, hasta que ambas mediciones son iguales a pH 5,5. También se observa que a medida que

aumenta el pH, el pH interpolado presenta mayores fluctuaciones ocasionadas por la disminución de la fluorescencia a 454 y 403 nm, debida al filtro interno que causa la oxidación del hierro, como ya se explicó anteriormente.

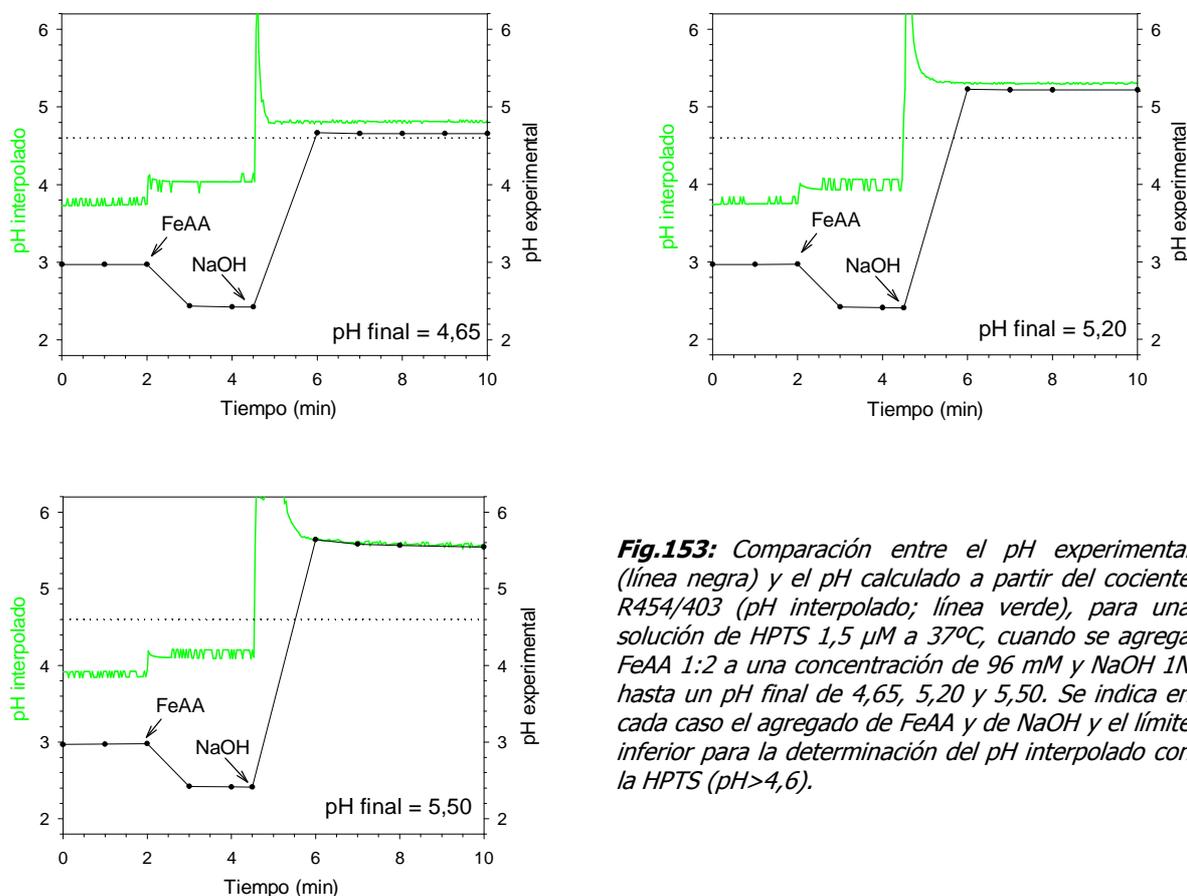


Fig.153: Comparación entre el pH experimental (línea negra) y el pH calculado a partir del cociente R454/403 (pH interpolado; línea verde), para una solución de HPTS 1,5 μ M a 37°C, cuando se agrega FeAA 1:2 a una concentración de 96 mM y NaOH 1N hasta un pH final de 4,65, 5,20 y 5,50. Se indica en cada caso el agregado de FeAA y de NaOH y el límite inferior para la determinación del pH interpolado con la HPTS ($pH > 4,6$).

De los ensayos realizados se concluye que el pH calculado a partir del cociente R454/403 puede utilizarse para la determinación del pH interno en el rango 4,6-6,0. El límite inferior está dado por la HPTS, mientras que el límite superior está determinado por el efecto de filtro interno debido a la presencia del FeAA, que hace disminuir la señal de fluorescencia a niveles próximos al ruido instrumental.

4.5.2.2. CALIBRACIÓN DEL pH

Una vez estudiadas las interferencias en la determinación del pH y el rango adecuado para la misma, se obtuvieron curvas "Log(R454/403) vs. pH" para soluciones de HPTS, de HPTS con AA o de HPTS con FeAA 1:2, y para suspensiones de liposomas SPC conteniendo FeAA 1:2 e incubados con gramicidina.

La Fig.154 muestra que la totalidad de los puntos ajustan a una recta con un coeficiente de correlación mayor que 0,99. Cabe aclarar que la recta de regresión obtenida para la sonda en presencia de una solución FeAA 1:5, presentó desviaciones respecto a la que se muestra en la Fig.154, especialmente en la pendiente (0,87 vs. 0,70), lo que llevó a utilizar una calibración especial para HPTS en presencia de FeAA 1:5.

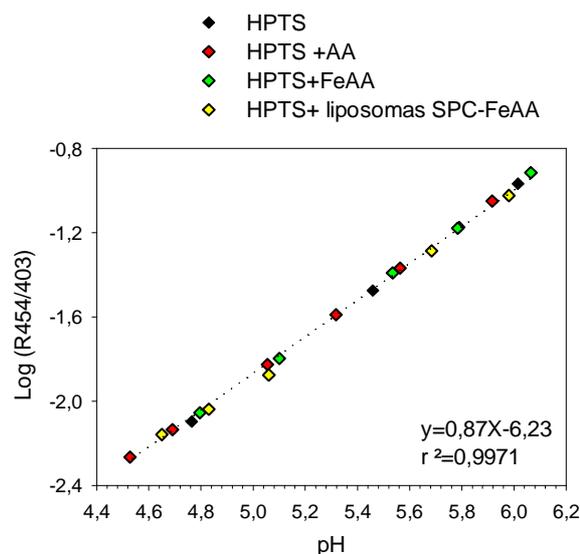


Fig.154: Calibración del pH para HPTS en medio acuoso a $1 \mu\text{M}$ en presencia de AA, FeAA 1:2 o encapsulada a 2 mM en liposomas SPC-FeAA 1:2 incubados con gramicidina. El eje de ordenadas indica el cociente de la emisión a 511 nm al excitar la sonda a 454 y 403 nm . Se muestra la ecuación de la recta de regresión lineal y el coeficiente de correlación (r^2) obtenidos a partir de la combinación de todos los puntos.

4.5.2.3. pH INTERNO EN LIPOSOMAS CON FEAA

Una vez obtenida la calibración del pH, y habiendo estudiado la relación entre R454/403 y pH en presencia de FeAA, se procedió a la determinación del pH del interior acuoso de liposomas convencionales durante la digestión *in vitro* según lo descrito en el apartado 3.5.2.5. (Materiales y Métodos).

La Fig.155 muestra los ensayos realizados para cada tipo de formulación convencional incorporando AA ($0,48 \text{ M}$), FeAA 1:2 ($0,24\text{M}:0,48\text{M}$) y FeAA 1:5 ($0,24\text{M}:1,2\text{M}$), así como un gráfico que integra las determinaciones de los tres tipos de liposomas. En el caso único de los liposomas HSPC no fue posible incorporar AA $1,2 \text{ M}$, obteniéndose una suspensión heterogénea aún después del procesamiento a 55°C en las condiciones C5-P4.

Como se desprende de la Fig.155, todos los liposomas presentan un pH inferior a $4,6$ en la etapa ácida del proceso digestivo (los primeros 60 minutos), fuera del rango sensible al pH de la sonda. Esto resulta lógico, ya que la fase interna de estas vesículas inicialmente se encuentra a pH entre 2 y 3. Cuando las mismas se separan por SEC y quedan suspendidas en HCl acuoso pH 2 como eluyente, el ingreso de protones hacia la fase interna podría incluso disminuir el pH interno inicial de las soluciones AA ó FeAA.

Cuando comienza la digestión "intestinal" por agregado de la solución pan/EB y NaHCO_3 hasta pH $6,5$, los liposomas tienen distintos comportamientos según la relación Fe:AA de la solución que incorporan. Así, en el caso de los liposomas SPC, son los que no contienen hierro (SPC-AA) los que experimentan un mayor cambio de pH en su interior, el cual alcanza valores mayores que 6 al final del proceso digestivo.

En el otro extremo, los liposomas SPC-FeAA 1:2 presentan un pH interno con leves variaciones, alcanzando un valor final de 5,2. Dado que la composición de las membranas lipídicas es la misma en los tres casos, las diferencias podrían deberse a una mejor capacidad buffer de la solución FeAA 1:2 respecto a los otros medios.

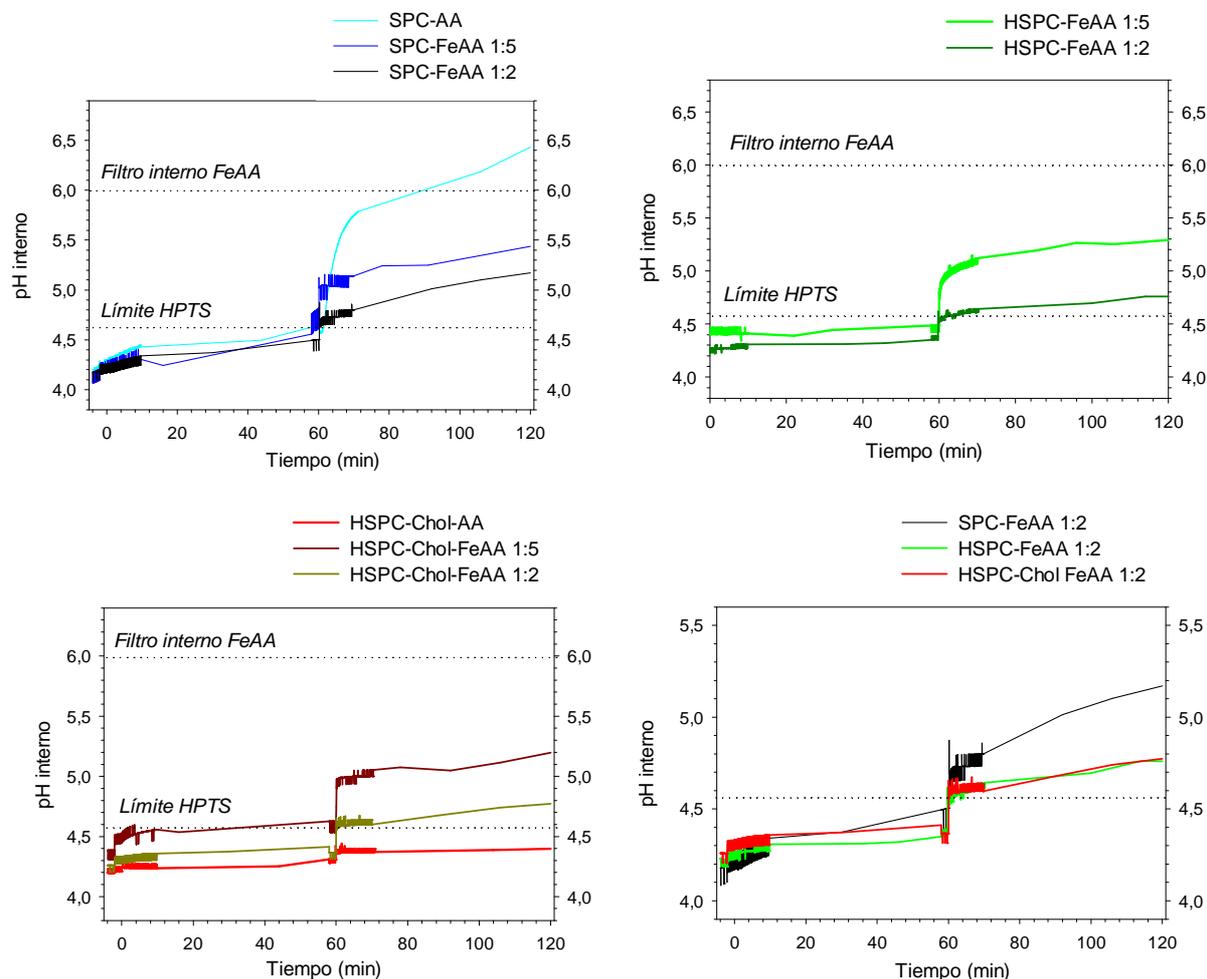


Fig.155: Determinación del pH interno en liposomas convencionales (SPC, HSPC y HSPC-Chol) conteniendo FeAA: durante la digestión *in vitro*. Se incluye un gráfico integrado con los tres tipos de liposomas. Las líneas punteadas indican: el límite inferior para la determinación del pH empleando el cociente R454/403 (pH 4,6) y el límite superior correspondiente al efecto de filtro interno del FeAA sobre la sonda (pH 6).

Para los liposomas HSPC y HSPC-Chol, el comportamiento es similar y el aumento de pH observado es incluso menor, a excepción de los liposomas HSPC-Chol-AA, que mantienen el pH por debajo de 4,6 entre los 60 y los 120 minutos, contrariamente al comportamiento de los SPC-AA.

La determinación del pH interno se extendió a liposomas catiónicos y mucoadhesivos con o sin DPPA. La Fig.156 muestra el comportamiento de tres formulaciones no convencionales que incorporan FeAA 1:2.

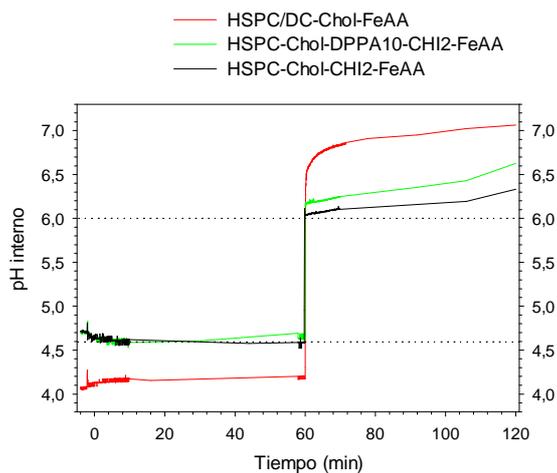


Fig.156: Determinación del pH interno en liposomas catiónicos y mucoadhesivos conteniendo FeAA 1:2 durante la digestión *in vitro*. Las formulaciones evaluadas fueron HSPC-DC/Chol, HSPC-Chol-DPPA 10% CHI 2 mg/ml y HSPC-Chol CHI 2 mg/ml (sin DPPA). Las líneas punteadas indican el límite inferior para la determinación del pH empleando el cociente R454/403 (pH 4,6) y el límite superior correspondiente al efecto de filtro interno del FeAA sobre la sonda (pH 6).

Como puede verse, el agregado de la solución pan/EB y el NaHCO_3 hasta pH 6,5, provoca un abrupto incremento del pH interno hasta valores similares al pH del seno de la suspensión, aunque no pueden determinarse en forma exacta debido al efecto de filtro interno.

Este hecho demuestra una elevada permeabilidad de estas vesículas, principalmente las que contienen DC-Chol, al cambio de pH y una muy baja capacidad buffer de la solución FeAA 1:2 remanente en la fase interna. De acuerdo con esto, el sistema podría ser ineficiente para prevenir la oxidación del hierro. A continuación se estudiará si estos

cambios de pH están relacionados con una pérdida de contenido de hierro encapsulado.

4.5.3. Evaluación de la estabilidad química mediante ^{31}P -RMN

Este ensayo se realizó en forma similar a lo descrito para liposomas convencionales conteniendo HPTS (apartado 4.4.8.2.), solo que las suspensiones de liposomas debieron ser previamente purificadas por SEC. En los ensayos preliminares se observó que el exceso de hierro libre ensanchaba las señales, dificultando su integración.

En este caso, el objetivo fue estudiar si la digestión de liposomas en presencia de una solución de FeAA encapsulada en su interior, ejerce algún efecto sobre la degradación de los fosfolípidos.

El primer efecto observado fue un corrimiento de las señales del espectro respecto a los valores obtenidos para liposomas con HPTS y una mayor variabilidad en los valores de desplazamiento químico. En la Tabla 35 se muestran los promedios de los desplazamientos químicos de las señales obtenidos para liposomas con FeAA antes o después de ser digeridos, en comparación con los valores de referencia (Glonek, 1998). Como puede verse, los valores de δ difieren entre el 10 y el 20% respecto a los valores de referencia, e incluso hasta un 60% en el caso de la señal correspondiente al PA. Con respecto a la variabilidad, expresada por la desviación estándar, los valores tienen coeficientes de variación altos, entre el 7 para la señal mayoritaria de PC y el 36% para la señal minoritaria correspondiente a liso PC.

La Tabla 35 muestra los porcentajes medios obtenidos para PC, P_i y liso PC a partir de liposomas convencionales conteniendo FeAA antes (PRE) y después (POST) de ser sometidos a la digestión *in vitro*. Los valores se calcularon por normalización de áreas integrando las señales de espectros como los que aparecen en la Fig.157.

Tabla 35: Comparación entre los valores promedio de desplazamiento químico (δ) obtenidos para PC (fosfatidilcolina), P_i (fósforo inorgánico), LPC (lisofosfatidilcolina) y PA (ácido fosfatídico), a partir de liposomas con FeAA antes o después de ser digeridos y los valores de referencia extraídos de Glonek et al., 1998. Las muestras se procesaron según lo descrito en el apartado 3.7.11. (Materiales y Métodos) y se analizaron por ^{31}P -RMN. En todos los casos, $n \geq 4$ excepto el caso señalado con (*), que corresponde a un valor único.

Sustancia	δ liposomas FeAA (ppm)	δ referencia (ppm)
PC	$-0,756 \pm 0,054$	-0,84
P_i	-0,440 (*)	-0,37
LPC	$-0,217 \pm 0,079$	-0,28
PA	$+0,513 \pm 0,046$	+0,25 a +0,32

Como se desprende de la Tabla, los valores de liso PC en las muestras sin digerir (PRE) son similares a los obtenidos para liposomas con HPTS, con la excepción de los liposomas SPC, que presentan un valor significativamente superior. Por lo tanto el proceso de obtención de los liposomas afecta la estabilidad química de los liposomas SPC cuando se realiza en presencia de FeAA 1:2 0,24 M. En cuanto a los HSPC y HSPC-Chol, el contenido mínimo de liso PC debería ser el correspondiente a la materia prima sin procesar (entre 1 y 1,8%). Por lo tanto, se consideró que en este caso, el límite de detección sería del 2%. Este hecho puede explicarse por la falta de precisión en la integración, originada por un ensanchamiento de las señales, atribuido a la presencia del hierro, lo cual que dificulta la integración, especialmente en el caso de señales minoritarias como las correspondientes al fósforo inorgánico (P_i) y a la liso PC. Por lo tanto, se consideró que en este caso el límite de detección es del 2%, valor que se asignó a las muestras HSPC y HSPC-Chol sin digerir.

Tabla 36: Cuantificación de PC, P_i y liso PC por ^{31}P -RMN en liposomas convencionales con FeAA 1:2, antes (PRE) y después (POST) de ser sometidos al proceso de digestión *in vitro* ($n=2$). Los porcentajes se calcularon como el % del área correspondiente respecto al área total. (*) El valor de P_i para los liposomas SPC POST se calculó por diferencia ($100 - \% PC - \% \text{liso PC}$).

Liposomas con FeAA	PRE digestión			POST digestión		
	% PC	% P_i	% liso PC	% PC	% P_i	% liso PC
SPC	$93,8 \pm 0,7$	< 2	$6,19 \pm 0,74$	$52,5 \pm 0,6$	aprox. 3,5 (*)	$44,0 \pm 4,4$
HSPC	≥ 98	< 2	< 2	$83,5 \pm 1,1$	< 2	$16,5 \pm 1,1$
HSPC-Chol	≥ 98	< 2	< 2	$90,4 \pm 0,2$	< 2	$9,6 \pm 0,2$

Respecto a las muestras digeridas, se evidencia que el proceso provoca un aumento drástico del contenido de formas liso en los liposomas SPC, alcanzando valores que podrían producir la desencapsulación de FeAA por inestabilización de las vesículas. Los liposomas HSPC muestran valores menores, aunque aún elevados. Finalmente se observa que la presencia del colesterol favorece la estabilidad química de los fosfolípidos, ya que estas vesículas muestran los valores más bajos de liso PC, si bien la degradación es mayor que la observada para liposomas conteniendo HPTS (ver Tabla 36).

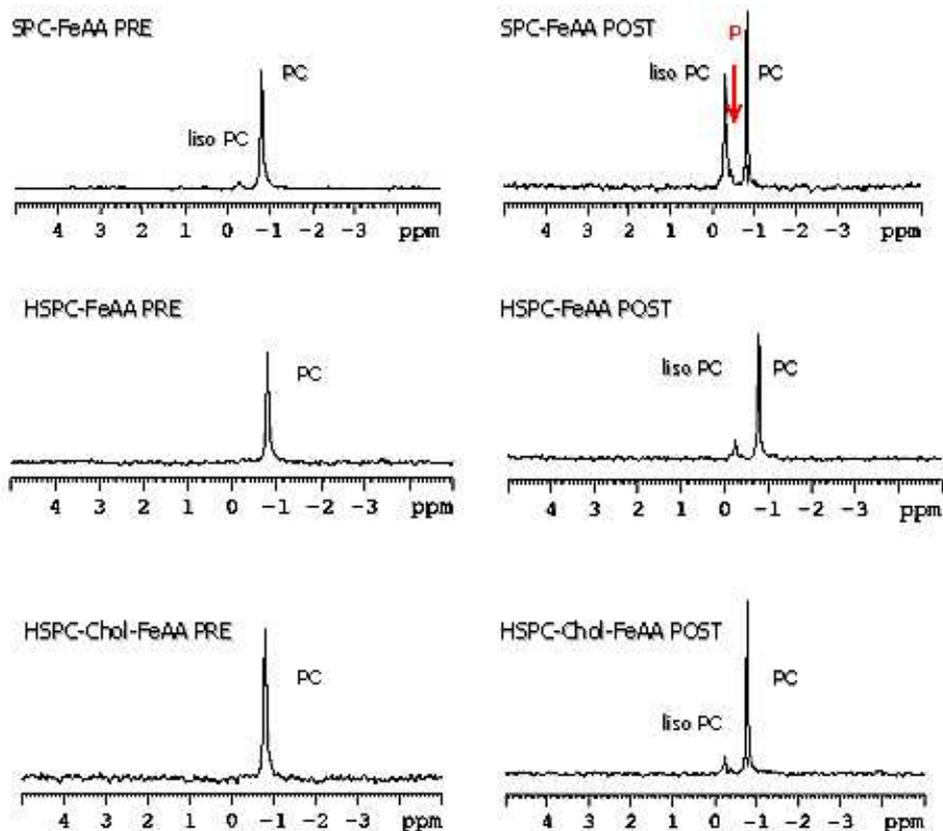


Fig.157: Espectros ^{31}P -RMN de liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol conteniendo FeAA 1:2 0,24 M antes (PRE) y después (POST) de ser sometidos a procesos de digestión *in vitro*. Los espectros inferiores se obtuvieron restando la línea de base a los superiores. Se indican las señales correspondientes a PC y liso PC (fosfatidilcolina y su forma liso) y Pi (fósforo inorgánico en rojo).

La Fig.157 muestra ejemplos de los espectros obtenidos. En el caso de los liposomas SPC-FeAA POST, se indica la señal correspondiente al fósforo inorgánico, que aparece como un hombro de la señal de la liso PC, razón por la cual se cuantificó como diferencia entre el área total y la suma de las áreas de PC y liso PC integrada sin tener en cuenta el hombro.

El comportamiento de los liposomas no convencionales (HSPC-Chol-DPPA 10% CHI 2 mg/ml y HSPC/DC-Chol conteniendo FeAA 1:2) resultó en principio contrario a lo esperado, ya que como ambas formulaciones resultaban inestables a nivel macroscópico ante la digestión *in vitro*, se esperaba un elevado porcentaje de formas liso. En la Tabla 36 se observa que después del proceso digestivo, la única señal que presentan estos liposomas es la correspondiente a PC, resultando su porcentaje cercano al 100%. El resto de las señales no resulta detectable, ni siquiera en el caso de los liposomas CHI que contienen PA en su formulación: la señal que aparece en los liposomas PRE, con un valor que coincide con su contenido (10%), no se observa en ninguna de las muestras digeridas.

Tabla 37: Cuantificación de PC, liso PC y PA por ^{31}P -RMN en liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% CHI 2 mg/ml (CHI) y HSPC/DC-Chol con FeAA 1:2 0,24 M, antes (PRE) y después (POST) de ser sometidos al proceso de digestión *in vitro* ($n \geq 2$). Los porcentajes se calcularon como el % del área correspondiente respecto al área total.

Liposomas con FeAA	PRE digestión			POST digestión		
	% PC	% liso PC	% PA	% PC	% liso PC	% PA
CHI	$81,0 \pm 5,2$	$8,8 \pm 2,6$	$10,2 \pm 1,6$	≥ 98	< 2	< 2
HSPC/DC-Chol	≥ 98	< 2	< 2	≥ 98	< 2	< 2

Esta aparente contradicción observada para los liposomas mucoadhesivos (CHI) y catiónicos (HSPC/DC-Chol) puede explicarse mediante la observación de los espectros de la Fig.158, en particular los correspondientes a los liposomas digeridos (POST).

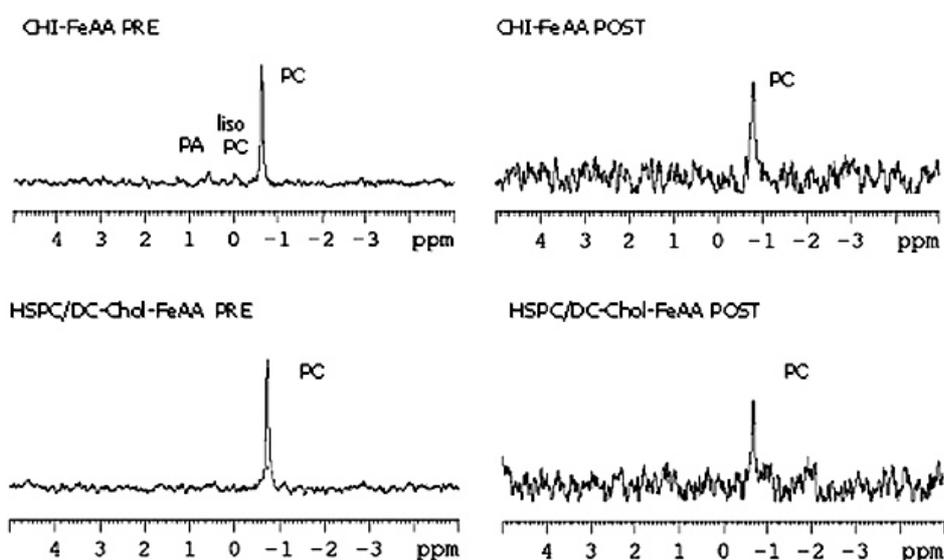


Fig.158: Espectros ^{31}P -RMN de liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% CHI 2 mg/ml (CHI) y HSPC/DC-Chol conteniendo FeAA 1:2 0,24 M antes (PRE) y después (POST) de ser sometidos a procesos de digestión *in vitro*. Los espectros inferiores se obtuvieron restando la línea de base a los superiores. Se indican las señales correspondientes a PC y liso PC (fosfatidilcolina y su forma liso) y PA (ácido fosfatídico).

Como puede verse, estas señales tienen niveles de intensidad cercanos al ruido instrumental, lo cual significa que la cantidad de fósforo total es menor, ya que la adquisición se realiza en las mismas condiciones que la de las muestras de liposomas convencionales. Una explicación posible para este fenómeno es que los agregados formados como consecuencia de la digestión *in vitro* hayan promovido la generación de especies que no son extraídas mediante la técnica empleada, y por lo tanto, no se detectan por RMN.

4.5.4. Determinación del grado de oxidación del hierro libre o incorporado en liposomas por espectrometría Mössbauer

Esta determinación se realizó para evaluar la hipótesis de que los liposomas protegen al Fe^{2+} encapsulado de la oxidación durante la digestión *in vitro*, con respecto al hierro en solución.

4.5.4.1. ENSAYOS PRELIMINARES - CURVA DE CALIBRACIÓN

Los primeros ensayos tuvieron como objeto analizar soluciones FeAA con distintas relaciones $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ y determinar el límite de cuantificación para cada especie.

Para esto se preparó una solución FeAA 48 mM (AA 96 mM) pH 2,9, se retiró una alícuota (PRE) y el resto fue llevado a pH 6,5 con NaHCO_3 1M. Se tomaron alícuotas de la solución tratada 60 minutos después de incubarla a pH 6,5 a 37°C (POST). Las muestras se prepararon para su medición en portamuestras de 4 mm de espesor según lo descrito en el apartado 3.3.6.4. (Materiales y Métodos). Los espectros obtenidos se muestran en las Fig.159 (A) y (B).

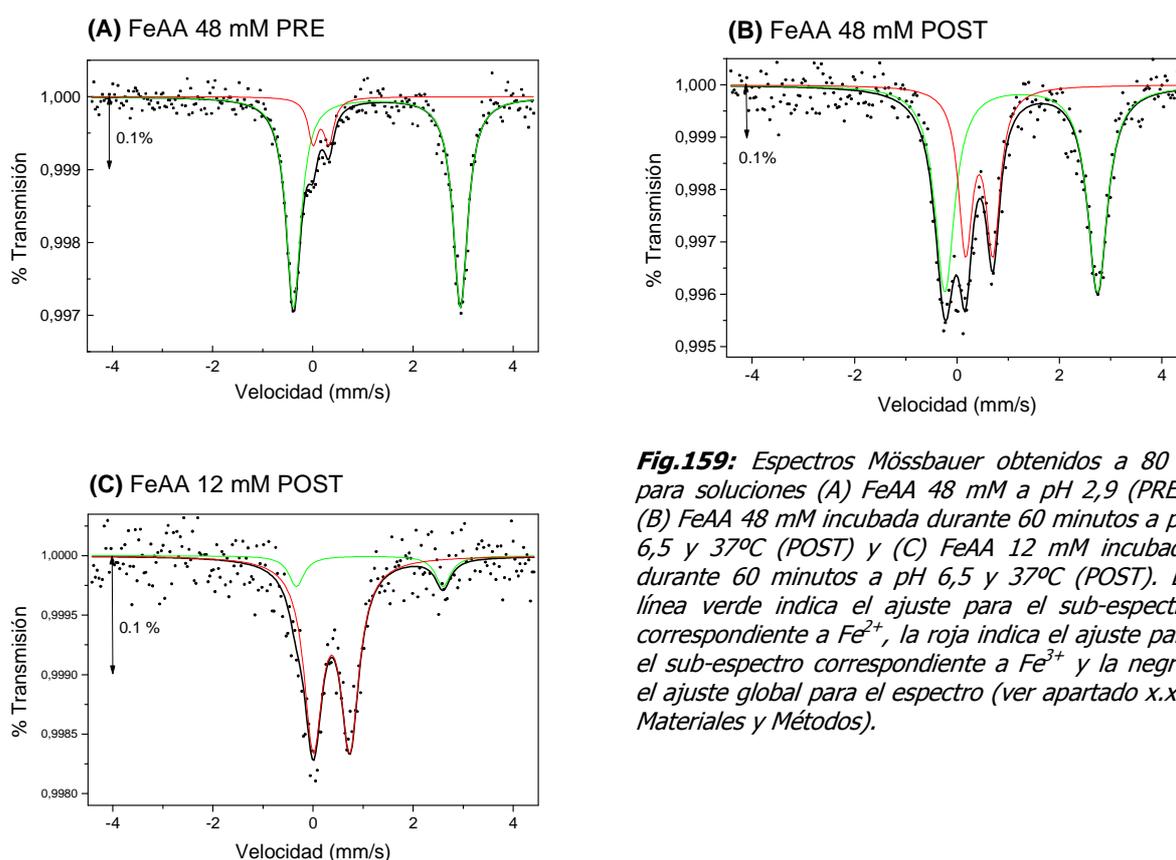


Fig.159: Espectros Mössbauer obtenidos a 80 K para soluciones (A) FeAA 48 mM a pH 2,9 (PRE); (B) FeAA 48 mM incubada durante 60 minutos a pH 6,5 y 37°C (POST) y (C) FeAA 12 mM incubada durante 60 minutos a pH 6,5 y 37°C (POST). La línea verde indica el ajuste para el sub-espectro correspondiente a Fe^{2+} , la roja indica el ajuste para el sub-espectro correspondiente a Fe^{3+} y la negra, el ajuste global para el espectro (ver apartado x.x.x Materiales y Métodos).

Como puede observarse en la Fig.159(A), una solución FeAA 48 mM a pH 2,9 presenta una señal principal que consiste en un doblete con un desdoblamiento cuadrupolar (ΔE) de alrededor de 3, que coincide con el tabulado para Fe^{2+} . También se distingue una pequeña señal secundaria con un ΔE alrededor de 0,5, característico del doblete de Fe^{3+} . El espectro presenta una adecuada intensidad de la señal respecto al ruido para esta concentración de hierro, si bien la señal del Fe^{3+} se encuentra en el límite de cuantificación. La misma muestra,

luego de ser incubada durante 60 minutos a pH 6,5 y 37°C muestra un aumento significativo de la señal correspondiente al Fe³⁺, como se observa en la Fig.159(B). Si bien una concentración de 48 mM resulta adecuada con respecto a la sensibilidad del equipo, se ha visto que porcentajes relativos de Fe²⁺ ó Fe³⁺ menores al 10% resultan imposibles de cuantificar.

También se prepararon soluciones FeAA más diluidas para hallar el límite de cuantificación. La solución con menor contenido de hierro analizada fue FeAA 12 mM (AA 24 mM). Luego de ser incubada durante 60 minutos a a pH 6,5 y 37°C, la muestra presenta un doblete principal correspondiente a Fe³⁺ y uno minoritario correspondiente a Fe²⁺, como puede verse en la Fig.159(C). La baja intensidad de las señales respecto al ruido instrumental determina que esta sea la menor concentración cuantificable de hierro.

Por lo tanto, el límite de cuantificación depende no solo de la concentración total de hierro sino del grado de oxidación. De este modo, se tomará una concentración de hierro 12 mM como el límite de cuantificación, teniendo en cuenta que la mínima concentración relativa de Fe²⁺ ó Fe³⁺ cuantificable será del 10%.

Cabe aclarar que los tiempos de adquisición fueron variables, con el objeto de lograr una buena relación señal ruido. Por lo tanto los valores absolutos de intensidad de las señales no son proporcionales a la concentración de hierro en la muestra. La sensibilidad en esta metodología puede aumentarse empleando tiempos de adquisición mayores o bien aumentando el espesor del portamuestras. Para poder cuantificar la solución FeAA 12 mM, por ejemplo, debió emplearse un portamuestras de 6 mm de espesor y un tiempo de análisis de 96 horas, que se fijó como tiempo máximo para muestras muy diluidas.

Con objeto de conocer la estabilidad durante la digestión *in vitro* del hierro en solución a una concentración equivalente a la que proporcionan los liposomas, se preparó una curva de calibración con soluciones de FeAA 1:2 conteniendo 12, 24, 48 y 96 mM de hierro. Se sometieron a la digestión *in vitro* y se obtuvieron espectros a partir de los cuales se calcularon las concentraciones relativas de Fe²⁺ y Fe³⁺. En la Tabla 38 se muestran los resultados obtenidos para cada solución de FeAA, así como el ancho total de banda a media altura (Γ) y el desdoblamiento cuadrupolar (ΔE) para cada nivel.

Tabla 38: Análisis de soluciones FeAA por espectrometría Mössbauer.

Muestra	Site del hierro	Γ (mm/s)	ΔE (mm/s)	% Área total
FeAA 96 mM	Fe ²⁺	0,45	3,10	66
	Fe ³⁺	0,35	0,56	34
FeAA 48 mM	Fe ²⁺	0,46	2,98	64
	Fe ³⁺	0,34	0,53	36
FeAA 24 mM	Fe ²⁺	0,47	2,99	56
	Fe ³⁺	0,40	0,61	44
FeAA 12 mM	Fe ²⁺	0,40	2,39	12
	Fe ³⁺	0,45	0,73	88

De la tabla se desprende que las señales tiene un ancho de banda considerable, con lo cual la resolución de las especies de hierro está comprometida en algunos casos. Este es el

caso de muestras muy diluidas o de muestras en las que una de las dos especies es minoritaria, como se mencionó anteriormente. En cuanto a los desdoblamientos cuadrupolares, se ven claramente dos sites para hierro: uno con un ΔE promedio de $0,61 \pm 0,09$, correspondiente a Fe^{2+} y otro con un ΔE promedio de $2,86 \pm 0,32$, correspondiente a Fe^{3+} .

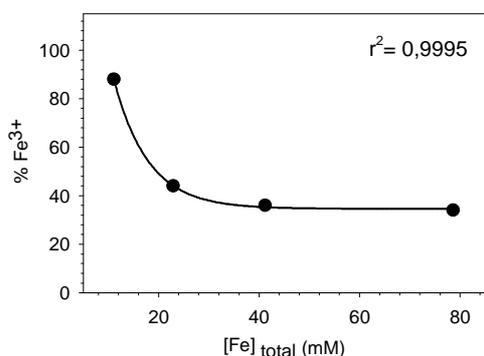


Fig.160: Curva de calibración obtenida para soluciones FeAA analizadas por espectrometría Mössbauer. El % Fe^{3+} corresponde al porcentaje de área total de la Tabla 9. Se indica el coeficiente de correlación obtenido para el ajuste de los valores a una función de caída exponencial de tres parámetros ($y=y_0+a.e^{-b.x}$).

En cuanto a los valores de % Área total, indicadores de la relación Fe^{2+}/Fe^{3+} en cada muestra, se observa que la solución más concentrada (96 mM) es la que presenta la mayor concentración de Fe^{2+} después del tratamiento, como era de esperarse. La estabilidad del Fe^{2+} disminuye para menores concentraciones, pero la variación no resulta lineal, como puede verse en la Fig.160. De este modo se espera que

soluciones FeAA con contenidos menores a 12 mM posean, después de la digestión *in vitro*, un contenido de Fe^{2+} menor al 12%.

4.5.4.2. ANÁLISIS DE LIPOSOMAS

Como paso previo al análisis de liposomas que encapsulan hierro, se demostró que los fosfolípidos no interferían en la determinación. Para esto se prepararon liposomas SPC en buffer T10 y se analizaron por espectrometría Mössbauer según lo descrito en el apartado 3.3.6.3. (Materiales y Métodos). Estos liposomas no presentaron señales que se diferenciaron del ruido instrumental.

Se prepararon muestras de los tres tipos de liposomas convencionales conteniendo FeAA 1:2 ó 1:5, antes (PRE) o después (POST) de ser sometidos a la digestión *in vitro* (apartado 3.4.7. Materiales y Métodos). La Fig.161 muestra los espectros obtenidos para los pellets de liposomas HSPC-Chol, ya que los correspondientes a liposomas SPC y HSPC presentaron características similares.

Como puede observarse en la Fig.161(A), el espectro correspondiente a los liposomas antes de la digestión *in vitro* presenta una señal principal correspondiente a Fe^{2+} . Si bien en algunos espectros obtenidos se observa una pequeña señal en la zona del doblete de Fe^{3+} (indicada mediante una flecha en la Fig.161(A)), ésta se encuentra por debajo del límite de cuantificación en los liposomas HSPC y HSPC-Chol. Por lo tanto, según lo explicado en el apartado 4.5.4.1., el contenido de Fe^{3+} en estas muestras se encuentra por debajo del 10% del hierro total. Este resultado indica que el proceso de obtención de estos liposomas conteniendo hierro no produce una oxidación apreciable del Fe^{2+} . En los liposomas SPC, sin embargo, fue posible cuantificar un 16% de Fe^{3+} en muestras sin digerir.

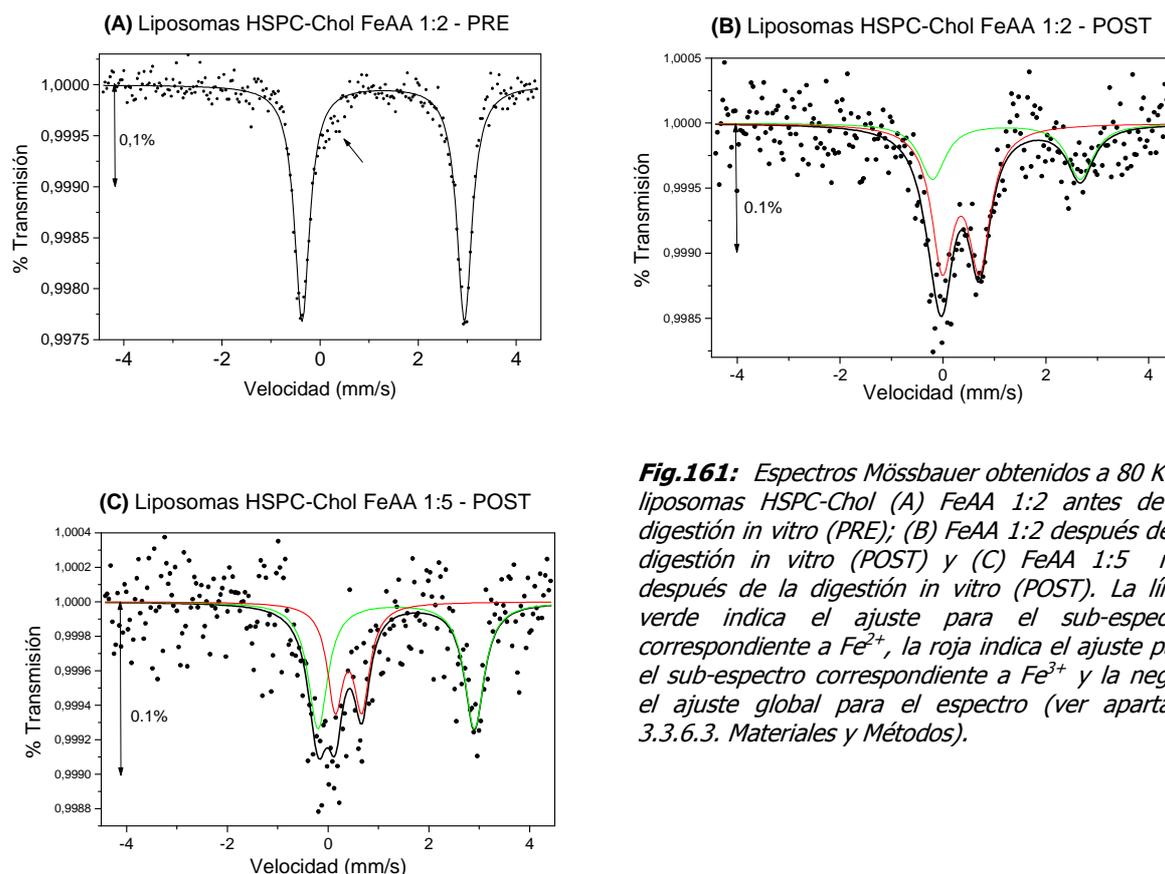


Fig.161: Espectros Mössbauer obtenidos a 80 K de liposomas HSPC-Chol (A) FeAA 1:2 antes de la digestión *in vitro* (PRE); (B) FeAA 1:2 después de la digestión *in vitro* (POST) y (C) FeAA 1:5 mM después de la digestión *in vitro* (POST). La línea verde indica el ajuste para el sub-espectro correspondiente a Fe^{2+} , la roja indica el ajuste para el sub-espectro correspondiente a Fe^{3+} y la negra, el ajuste global para el espectro (ver apartado 3.3.6.3. Materiales y Métodos).

En cuanto a las muestras de liposomas sometidas a la digestión *in vitro*, se observa un aumento del contenido de Fe^{3+} respecto a Fe^{2+} , especialmente en los liposomas que incorporan FeAA 1:2. Los liposomas con FeAA 1:5 presentan contenidos similares de ambas especies, sin embargo resulta claramente menor la intensidad del % transmisión.

En la Fig.162 se comparan los niveles de % Fe^{2+} obtenidos para los tres tipos de liposomas convencionales con FeAA 1:2 ó 1:5 y se comparan con los obtenidos para una solución FeAA 1:2 12 mM. Como se desprende de dicha figura, la digestión reduce el contenido de Fe^{2+} en los tres tipos de liposomas convencionales, tanto los que encapsulan FeAA 1:2 como, en menor medida, los que contienen FeAA 1:5. Sin embargo se observa claramente que la oxidación del hierro es mucho mayor cuando se somete a la digestión a una solución FeAA sin encapsular. La mínima concentración evaluada (12 mM) presenta, después del tratamiento, un contenido de Fe^{2+} muy inferior al de cualquiera de las formulaciones con liposomas. Una solución FeAA 2 mM, que es el nivel correspondiente a las formulaciones de FeAA en liposomas, tendrá un contenido aún menor. Si se calcula el contenido de Fe^{3+} por extrapolación a partir de la curva de calibración (Fig.160), se obtiene un valor superior al 100% para la solución 2 mM, con lo cual se puede considerar que el contenido de Fe^{2+} al término de la digestión *in vitro* es prácticamente nulo.

En cuanto a la comparación entre las distintas formulaciones, no pudieron establecerse diferencias significativas entre las tres formulaciones estudiadas, si bien la incorporación de una solución FeAA 1:5 parece aumentar la estabilidad de la especie reducida.

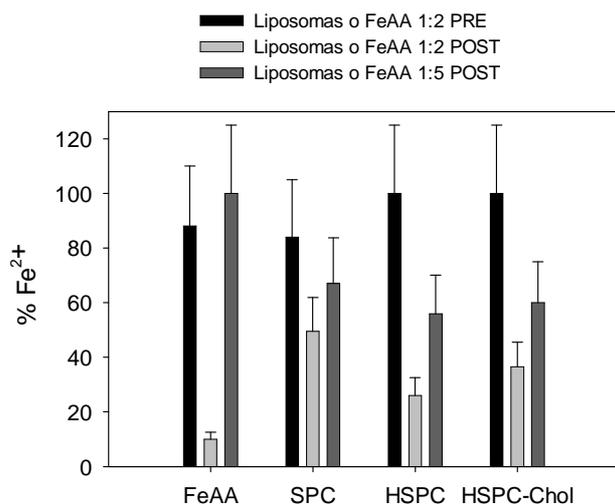


Fig.162: Determinación del porcentaje de Fe²⁺ por espectrometría de Mössbauer para una solución FeAA 12 mM o liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol con FeAA 1:2 antes de la digestión in vitro (barras negras), 1:2 después de la digestión in vitro (barras gris claro) y 1:5 después de la digestión in vitro (barras gris oscuro).

Tabla 39: Porcentajes de hierro medidos en los sobrenadantes de la ultra-centrifugación luego de la digestión in vitro de liposomas convencionales.

Liposomas	% Hierro sobrenadante
SPC FeAA 1:2 POST	49 ± 6
SPC FeAA 1:5 POST	82 ± 10
HSPC FeAA 1:2 POST	30 ± 4
HSPC FeAA 1:5 POST	67 ± 8
HSPC-Chol FeAA 1:2 POST	50 ± 6
HSPC-Chol FeAA 1:5 POST	77 ± 9

4.5.4.3. CONSISTENCIA DE LOS PARÁMETROS DE AJUSTE

La adquisición de espectros Mössbauer se realizó sobre muestras con contenidos muy diferentes de hierro total y distintas relaciones Fe²⁺/Fe³⁺, en solución o conteniendo FeAA encapsulado en liposomas. Por lo tanto, para poder comparar entre muestras diferentes, era necesario verificar la consistencia de los valores obtenidos para los siguientes parámetros: el desplazamiento isomérico respecto al hierro metálico (δFe), el desdoblamiento cuadrupolar (ΔE) y el ancho total de banda a media altura (Γ). La Fig.163(A) muestra el comportamiento de dichos parámetros para soluciones FeAA de distinta concentración, mientras que la Fig.163(B) muestra los valores obtenidos para FeAA encapsulado en liposomas convencionales antes y después de ser digeridos.

Se observa que los valores de δFe , ΔE y Γ obtenidos para Fe²⁺ y Fe³⁺ son similares para soluciones FeAA y liposomas con FeAA encapsulado, independientemente de la concentración total de hierro, del tipo de liposoma y del tratamiento de la muestra. Este hecho confirma que pueden establecerse comparaciones entre las distintas muestras, ya que los entornos químicos son semejantes. En el caso de los liposomas HSPC y HSPC-Chol no se aparecen valores para Fe³⁺, ya que su contenido en las muestras sin digerir resultó no detectable.

Por otro lado, los valores obtenidos para δFe y ΔE coinciden con los esperados para Fe²⁺ y Fe³⁺, como se desprende de la Tabla 40, mientras que los valores de ancho de banda son similares para los dos estados de oxidación y para ambos tipos de muestras.

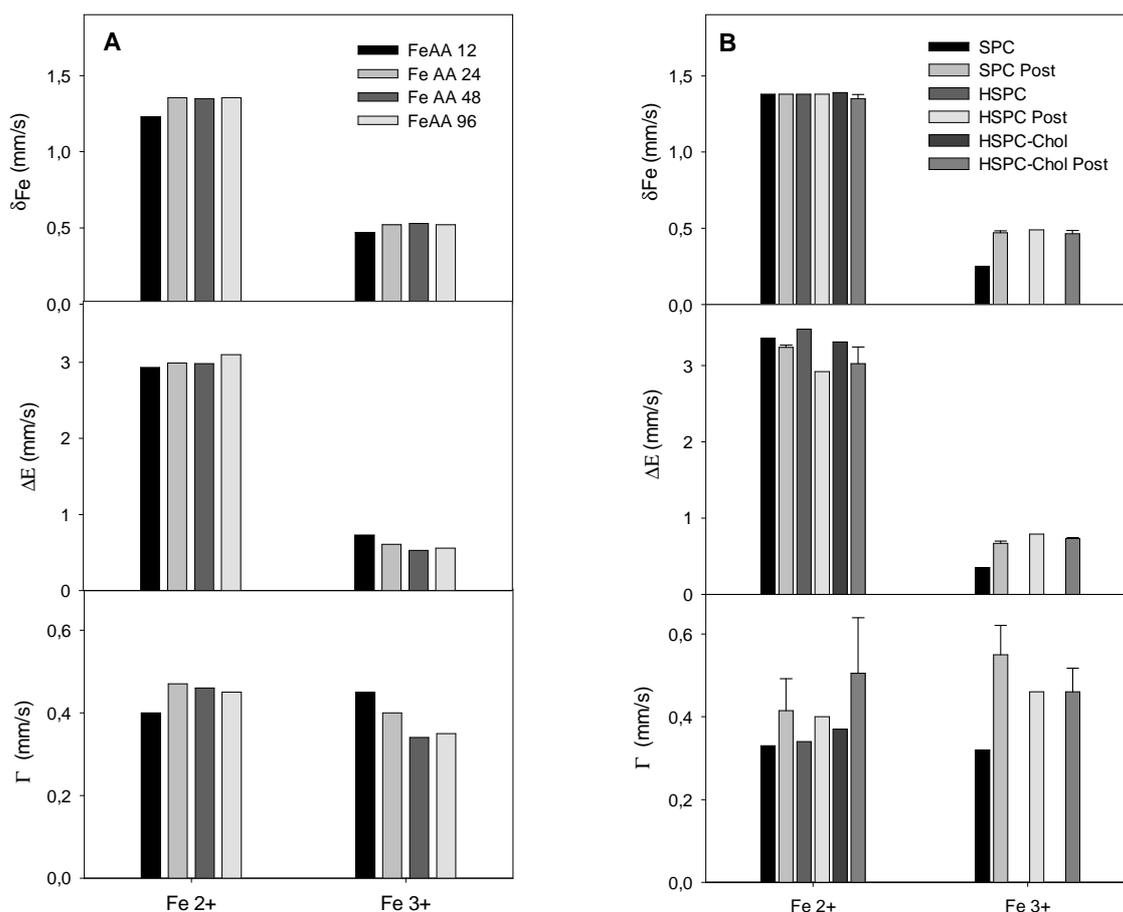


Fig.163: Variación de los parámetros de ajuste δFe (desplazamiento isomérico respecto al hierro metálico), ΔE (desdoblamiento cuadrupolar) y Γ (ancho total de banda a media altura) obtenidos para soluciones FeAA 1:2 con concentraciones de hierro 12, 24, 48 y 96 mM (A) y para liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol antes o después (Post) de la digestión *in vitro* (B).

Tabla 40: Parámetros de ajuste obtenidos para espectros Mössbauer de soluciones FeAA o liposomas convencionales con FeAA encapsulado. Los valores corresponden a promedios ($n \geq 3$) de las soluciones y los liposomas de Fig.163.

Muestra	δFe^{2+} (mm/s)	δFe^{3+} (mm/s)	$\Delta E Fe^{2+}$ (mm/s)	$\Delta E Fe^{3+}$ (mm/s)
Solución FeAA	$1,32 \pm 0,06$	$0,51 \pm 0,03$	$3,00 \pm 0,07$	$0,61 \pm 0,09$
Liposomas con FeAA	$1,37 \pm 0,02$	$0,48 \pm 0,01$	$3,17 \pm 0,19$	$0,63 \pm 0,19$

4.5.5. Estabilidad del hierro en solución frente a la digestión *in vitro*

Como se verá en el apartado 4.6., la evaluación de la absorción de hierro mediante cultivos celulares se realizaba comparando los liposomas conteniendo FeAA con una solución de FeAA sometida al mismo proceso de digestión *in vitro*. Por lo tanto era importante conocer qué porcentaje de hierro permanecía en solución tras la digestión *in vitro* y si este porcentaje estaba

relacionado exclusivamente con los cambios de pH, o por el contrario, la presencia de enzimas y sales biliares también influía sobre la solubilidad al final de la digestión.

De este modo se sometió una solución de FeAA 1:2 2 mM a la digestión *in vitro* en presencia o no de enzimas y EB, centrifugando la solución resultante para eliminar el hierro insoluble durante 15 minutos a 14.000 rpm (16.000 g). El porcentaje final de hierro soluble fue de $33,3 \pm 5,3$ % y $31,5 \pm 3,8$ % respectivamente. Estos valores demuestran por un lado, la elevada formación de especies insolubles de hierro a causa de la digestión, y por otro que la presencia de enzimas y EB no altera el porcentaje final de hierro soluble.

4.6. ESTUDIOS DE ABSORCIÓN DE HIERRO ENCAPSULADO EN LIPOSOMAS

4.6.1. Ensayos preliminares con cultivos de Caco-2

Si bien las células Caco-2, provenientes de carcinoma de colon humano, son el modelo *in vitro* más empleado en la actualidad para estimar la absorción intestinal, fue necesario realizar estudios preliminares para evitar artefactos en los experimentos. Las dos principales fuentes de variabilidad identificadas fueron: la adsorción inespecífica de compuestos de hierro insolubles a la superficie de las células, controlada mediante el empleo del reactivo específico para el hierro (REH), y el efecto de la concentración de la siembra en los valores obtenidos para la captación de hierro. Se estudió además, la influencia de la eliminación previa del hierro insoluble y el efecto de la incubación en presencia de enzimas y sales biliares.

El resto de las variables se mantuvo aproximadamente constante para los distintos experimentos realizados, minimizando las diferencias que pudieran existir entre las distintas tandas de cultivos celulares. Algunas de estas variables fueron el número de repique en que se sembraron las células, la densidad de siembra y el período de incubación de las células previo al ensayo.

4.6.1.1. EFECTO DEL REH Y DE LOS LAVADOS

En la determinación de hierro en cultivos celulares es esencial diferenciar entre el hierro que se encuentra inespecíficamente adsorbido sobre la superficie de las células y el que efectivamente ha sido captado por las mismas. En este sentido, se publicó una serie de artículos en los que se postula la necesidad de emplear un reactivo específico para eliminar la interferencia del hierro adsorbido en la superficie (Glahn et al., 1995). Como se detalló en el apartado 3.4.8. (Materiales y Métodos), el reactivo específico para hierro (REH) se basa en un derivado de la 1,10-fenantrolina u o-fenantrolina, la 4,7-difenil-1,10-fenantrolina, conocido como batofenantrolina, que forma con el hierro un complejo de un color rosado intenso con una alta constante de formación, resultando sumamente estable. Según Glahn et al., el REH aplicado a una concentración de 1 mM, es capaz de eliminar el 97% del hierro insoluble depositado en la superficie apical de las células, después de una incubación con hierro a una concentración de 100 μ M. Una vez formado, el complejo debe ser eliminado en forma

cuantitativa para evitar un error por exceso en la determinación de hierro. Generalmente esto se logra mediante lavados sucesivos de los cultivos con buffer.

Sin embargo, no se sabía si el empleo del REH sería necesario en el caso de incubar las células con hierro encapsulado en liposomas. Por lo tanto se estudió el efecto del REH sobre los valores obtenidos para la captación de hierro luego de incubar con distintos tipos de muestras a una concentración de hierro de 100 μM , así como el efecto de los lavados posteriores. La Fig.164 muestra los valores obtenidos para la solución FeAA y para los liposomas convencionales SPC, HSPC (indicados como HS), y HSPC-Chol (indicados como HCH) antes (M0) y después (M1) de su purificación por SEC, y la comparación con el blanco correspondiente a las células incubadas con buffer uptake o con AA 200 μM (los resultados son equivalentes).

Como se desprende de la figura, los valores obtenidos para los cultivos incubados con liposomas conteniendo hierro libre (liposomas M0) y que posteriormente no son tratados con REH, se sitúan entre 0,7 y 0,8 $\mu\text{g Fe/mg prot}$ y resultan similares a los obtenidos para una solución FeAA aplicada a la misma concentración. Sin embargo, el mismo ensayo realizado con liposomas purificados por SEC (liposomas M1), arroja valores menores que varían según el tipo de vesícula.

Cuando se aplicó el REH a los cultivos de Caco-2 incubados con estas muestras, se constató una disminución en el contenido de proteínas resultante. Este hecho se asoció a un efecto negativo del reactivo sobre la adherencia de las células a los wells, ya que se observó que en algunos casos, durante el lavado, se producía un desprendimiento parcial de la monocapa celular. Por lo tanto se estudió cual era el número de lavados adecuado para eliminar las trazas del complejo Fe-REH, alterando en la menor medida posible las monocapas.

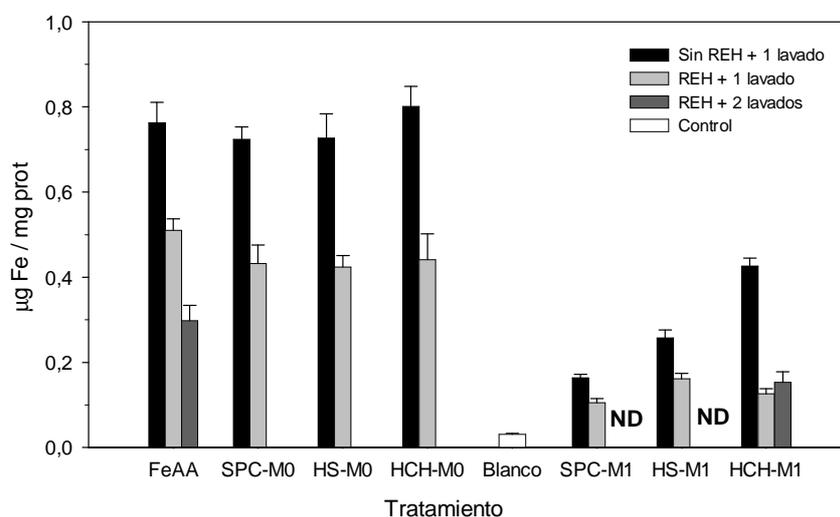


Fig.164: Ensayos preliminares con células Caco-2 para estudiar el efecto del reactivo específico para hierro (REH) y del número de lavados con PBS posteriores, en la determinación de hierro por absorción atómica en horno de grafito. Las condiciones del ensayo se describen en el apartado 3.4.8. (Materiales y métodos). Los resultados se expresan en μg de hierro por mg de proteína, como promedio \pm sem. ND: no determinado. $n=1$ cultivo (con tres wells por ensayo) para las incubaciones con liposomas M0 sin lavado con REH. Para el resto de muestras $n \geq 2$ cultivos independientes (tres wells por ensayo).

Como se aprecia en la Fig.164 (barras gris claro), el empleo del REH seguido de un lavado con buffer PBS disminuye el contenido de hierro a aproximadamente un 60% del valor obtenido sin el lavado. Para las muestras M1, la disminución es variable según el caso. Este hecho verifica la necesidad de utilizar el REH en todos los casos.

En cuanto al número de lavados, se observa que un lavado es suficiente para las incubaciones con liposomas (los valores de uno y dos lavados para HSPC-Chol son iguales). Contrariamente, la solución FeAA requiere de dos lavados con PBS, como lo demuestra la correspondiente disminución hasta un 40% del valor inicial (sin lavados) en el contenido de hierro (barra gris oscuro). Por lo tanto, la metodología empleada incluyó dos lavados posteriores a la incubación con REH para todas las muestras.

4.6.1.2. EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE HIERRO EN LAS SIEMBRAS

En la bibliografía consultada suelen incubarse las células Caco-2 con concentraciones de hierro entre 50 y 200 μM . En el presente trabajo se realizaron ensayos previos para estudiar el efecto de la concentración de la siembra en la captación de hierro.

La Fig.165 muestra el efecto de la concentración de las siembras en la absorción de

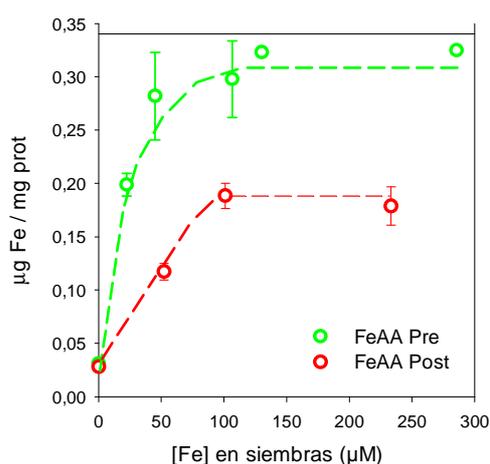


Fig.165: Efecto de la concentración de la siembra en la captación de hierro por células Caco-2 para la solución FeAA 1:2 0,24 M sin digerir (Pre) o digerida (Post). Las condiciones del ensayo se describen en el apartado 3.4.8. (Materiales y Métodos). Los resultados se expresan como promedio \pm sem de por lo menos 2 cultivos independientes con 2 wells por muestra. Se empleó el REH a una concentración de 1 mM.

hierro para una solución FeAA 1:2 sin digerir (línea discontinua verde) y la misma solución una vez digerida (línea discontinua roja). Como puede observarse, en ambos casos la absorción resulta dependiente de la dosis administrada hasta que se alcanza un valor crítico. A partir de él, la captación resulta constante. En el caso de las muestras no digeridas, dicho valor se sitúa entre, aproximadamente, 50 y 100 μM de hierro. La solución digerida (FeAA Post) lo alcanza a partir de 100 μM . Los valores máximos también son diferentes en cada caso, siendo de unos 0,3 μg de Fe/mg proteína para la muestra no digerida, y de alrededor de 0,18 para la digerida. Cabe aclarar que la concentración de las siembras corresponde al valor de hierro total aplicado a las monocapas, sin tener en cuenta la formación de especies

insolubles (FeAA Post) que puedan ser eliminadas por el REH empleado. Por lo tanto, los resultados ponen de manifiesto que, además de la concentración de la siembra, es importante el porcentaje de cada especie de hierro presente y qué parte de éste se encuentra en forma soluble. Son precisamente estas características las que diferencian la muestra digerida de la que no lo está.

4.6.1.3. EFECTO DE LA ELIMINACIÓN DEL HIERRO INSOLUBLE

Como se demostró previamente (apartado 4.5.5.), el porcentaje de hierro soluble luego de la digestión *in vitro* de una solución FeAA 1:2 descendía hasta aproximadamente un 30%. Por lo tanto, las soluciones FeAA digeridas contenían un alto porcentaje de especies insolubles. Esto llevó a centrifugar estas muestras antes de la siembra, para así tomar una alícuota de una solución o bien de una suspensión homogénea.

Sin embargo, si se centrifugaban estas muestras, también deberían centrifugarse las muestras con liposomas conteniendo FeAA, ya que en algunos casos, el hierro que se perdía a lo largo de la digestión podría haberse oxidado en la misma medida en que lo hace la solución FeAA. Pero por otro lado, esta centrifugación podía resultar contraproducente, ya que con ella podían eliminarse de la suspensión los liposomas MLVs y las vesículas de mayor tamaño que se forman por efecto de la digestión *in vitro*, como se describió en el apartado 4.5.1.

Ante estos hechos, se estudió si la centrifugación previa a la siembra de las soluciones FeAA digeridas tenía algún efecto sobre la absorción de hierro, empleando el REH y los dos lavados posteriores, según lo descrito en el apartado 4.6.1.1. Como se observa en la Tabla 41, no existen diferencias significativas entre la absorción de la solución centrifugada y sin centrifugar. Por lo tanto no resulta necesaria la centrifugación de las soluciones digeridas.

Tabla 41: Absorción de hierro determinada para una solución FeAA 1:2 digerida y sembrada en cultivos de Caco-2 antes o después de centrifugar en las condiciones del apartado 4.5.6. Los valores se expresan como el promedio \pm sem ($n \geq 3$).

Muestra	SIN CENTRIFUGAR $\mu\text{Fe}/\text{mg}$ proteína	CENTRIFUGADA $\mu\text{Fe}/\text{mg}$ proteína
Solución FeAA 1:2	0,187 \pm 0,008	0,178 \pm 0,021

Este ensayo permite verificar por un lado la eficacia del REH para eliminar el hierro insoluble y por otro, evitar la centrifugación de las suspensiones de liposomas, que podrían ser alteradas durante dicho proceso.

4.6.1.4. EFECTO DE LA PRESENCIA DE ENZIMAS Y SALES BILIARES

Si bien la cromatografía de exclusión empleando BioGel A-15m resultó adecuada para la separación entre los liposomas sin digerir y la mezcla de enzimas con sales biliares (apartado 4.2.5.), su aplicación para purificar los liposomas con FeAA digeridos no resultó exitosa. Como se mostró en el apartado 4.5.1., los liposomas HSPC y HSPC-Chol, así como los catiónicos y los mucoadhesivos, presentaron un importante incremento en el diámetro medio por efecto de la digestión, lo cual dificultó la separación por SEC, aún empleando una bomba peristáltica. Por lo tanto debió evaluarse el efecto de la incubación de los cultivos celulares con los liposomas suspendidos en el medio de digestión. Cabe aclarar que en todos los casos, se realizaron diluciones (aproximadamente entre 1/20 y 1/50) de esta suspensión post-digestión para ajustar la concentración de hierro a los valores deseados.

En primer lugar, se comparó el valor de hierro basal de las células blanco (incubadas con buffer uptake) con el obtenido para las células incubadas con liposomas sin hierro previamente digeridos y diluidos en forma similar a los liposomas con FeAA. Los valores obtenidos para estos ensayos preliminares fueron de 0,0311 \pm 0,008 μg Fe/mg proteína ($n=12$)

y $0,03103 \pm 0,001 \mu\text{g Fe/mg proteína}$ ($n=3$) respectivamente, lo cual muestra que no hay diferencias significativas entre ambos ensayos. Tampoco se apreciaron diferencias en el aspecto microscópico de las monocapas celulares ni en los niveles de proteínas determinados en los extractos celulares correspondientes.

También debía estudiarse si existía alguna influencia de la incubación en presencia de enzimas y sales biliares, sobre los valores de absorción de hierro. Para esto se comparó la captación de hierro de células incubadas con una solución FeAA digerida en presencia de los agentes digestivos (protocolo de digestión *in vitro* descrito en el apartado 3.4.7.), con los valores hallados para células incubadas con la misma solución, pero digerida sin enzimas ni sales biliares (habiendo realizado sólo cambios de pH a 37°C). Los valores obtenidos para la captación de hierro en presencia o no de enzimas fueron de $0,1832 \pm 0,0301$ ($n=9$) y $0,1939 \pm 0,0069 \mu\text{g Fe/mg}$ ($n=3$) proteína respectivamente, lo cual demostró que no existía una influencia del medio digestivo en la absorción de hierro.

4.6.2. Evaluación de la captación de hierro mediante cultivos de Caco-2

Los cultivos de células Caco-2 fueron empleados para evaluar la captación de hierro a partir de soluciones FeAA o de liposomas conteniendo FeAA antes y después de ser sometidos al proceso de digestión *in vitro*. En todos los casos se incluyeron blancos de células incubadas con buffer, cuyos valores de captación de hierro son en realidad los niveles basales de las células Caco-2 incubadas según el protocolo descrito en el apartado 3.4.8. (Materiales y Métodos). La Fig.166 muestra los resultados obtenidos para la solución FeAA y los liposomas convencionales, en comparación con un blanco de células incubadas con buffer uptake o con AA $200 \mu\text{M}$. También se incluyen los valores obtenidos para los tres productos comerciales, procesados según lo descrito en el apartado 3.4.7.6. (Materiales y Métodos).

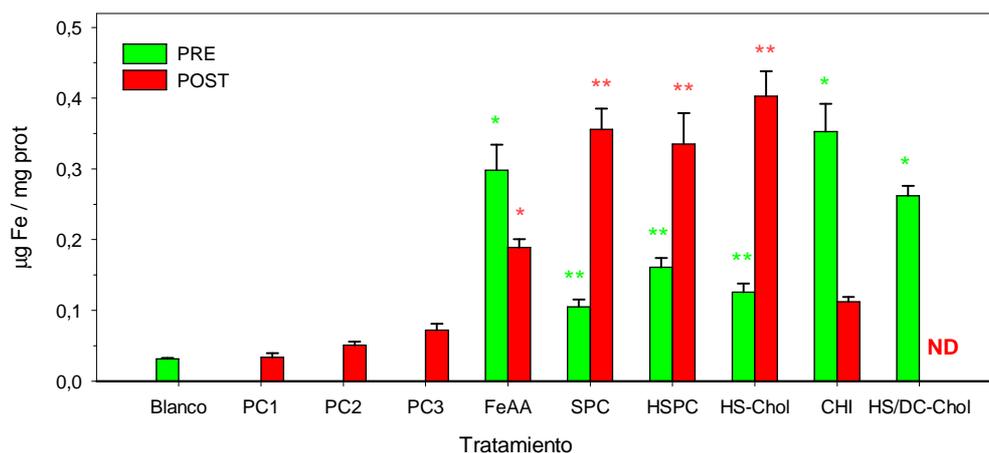


Fig.166: Captación de hierro por cultivos de células Caco-2 incubadas con muestras sin digerir (PRE) o digeridas (POST). Las monocapas en confluencia fueron incubadas con buffer uptake (Blanco), productos comerciales digeridos (PC1, PC2 y PC3), solución FeAA y formulaciones de liposomas con FeAA. Las condiciones del ensayo se describen en el apartado 3.4.8. (Materiales y métodos). Los resultados se expresan en μg de hierro por mg de proteína, como promedio \pm sem. Los asteriscos indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas, como se explica en el texto ($p < 0,05$; $n \geq 2$ cultivos independientes). ND: no determinado.

El valor obtenido para el blanco de células Caco-2 fue de $0,0312 \pm 0,0018 \mu\text{g Fe/mg}$ proteína. Este valor corresponde al contenido de hierro basal, que las células adquieren durante su crecimiento en un medio enriquecido con un 10% de suero fetal bovino. El valor fue el mismo para las células incubadas con buffer uptake que para aquellas incubadas con AA $200 \mu\text{M}$.

Cuando los cultivos se incubaron con una solución de FeAA 1:2 (Fe $100 \mu\text{M}$), se observó un incremento significativo en el valor de hierro captado, que fue de $5,6 \text{ nmol}$ por well, lo cual equivale a un 5,6% de absorción respecto al hierro sembrado. En la Tabla 42 se muestran los porcentajes de absorción de hierro calculados para las muestras de la Fig.166, que serán discutidos posteriormente. Estos porcentajes representan la cantidad de hierro captado por well (calculado a partir de los valores de $\mu\text{g Fe/mg prot}$) respecto de la cantidad de hierro sembrado en cada well.

Tabla 42: Valores de absorción de hierro por células Caco-2 incubadas con muestras sin digerir (PRE) o digeridas (POST). Las células se incubaron en las condiciones descritas en el apartado 3.4.8. (Materiales y métodos) con productos comerciales digeridos (PC1, PC2 y PC3), solución FeAA 1:2 y formulaciones de liposomas convencionales, liposomas CHI y liposomas HS/DC-Chol conteniendo FeAA. Los cálculos se realizaron a partir de los datos de la Fig.166, a partir de un contenido promedio estimado de proteína de $1,11 \text{ mg/well}$. ND: no determinado.

Muestra	% Absorción PRE	% Absorción POST
PC1	ND	0,6
PC2	ND	1,1
PC3	ND	1,4
FeAA	5,6	3,7
Liposomas SPC	3,1	4,8
Liposomas HSPC	3,0	5,2
Liposomas HSPC-Chol	3,1	8,0
Liposomas CHI	7,0	2,2
Liposomas HS/DC-Chol	5,2	ND

La incubación de las células con las formulaciones de liposomas convencionales ocasionó un aumento de la captación de hierro respecto del blanco, pero no tan pronunciado como el correspondiente a la solución FeAA. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los tres tipos de liposomas convencionales.

Las muestras de productos comerciales (PC1, PC2 y PC3) solo pudieron ser evaluadas después de la digestión *in vitro*, ya que se trata de formas farmacéuticas diseñadas para resistir la digestión estomacal mediante un cambio físico para luego dispersarse o disolverse a pH 6,5. Por ejemplo, el PC2 precipita en forma de masa compacta a pH 2,0, lo cual favorece el tránsito estomacal. Luego se disuelve en forma completa a pH 6,5, dando lugar a una solución de color ámbar, debida al quelato que forma el Fe^{3+} con el proteínsuccinato. Como se observa en la figura, los contenidos de hierro en células incubadas con productos comerciales resultaron

ligeramente superiores al contenido del blanco y en ningún caso superaron los 0,08 $\mu\text{g Fe/mg}$ proteína.

La digestión *in vitro* tuvo un efecto negativo sobre la captación de hierro en el caso de la solución FeAA. Este hecho puede deberse a la oxidación parcial del hierro y la consecuente formación de especies insolubles, que son eliminadas mediante el REH. Por el contrario, los valores correspondientes a los tres tipos de liposomas convencionales digeridos fueron significativa-mente mayores a los obtenidos para la solución FeAA digerida y para los liposomas sin digerir, independientemente de su composición lipídica. Estos valores resultaron del orden de los obtenidos para la solución FeAA sin digerir.

En cuanto a las formulaciones de liposomas no convencionales, se observó que tanto los liposomas catiónicos (HSPC/DC-Chol) como los mucoadhesivos (CHI: HSPC-Chol-DPPA 10% CHI 2 mg/ml) provocan una captación semejante a una solución de FeAA. En el caso de los liposomas CHI digeridos, la absorción disminuye hasta valores similares a la soluciones FeAA digeridas. Respecto a los liposomas catiónicos digeridos, los valores obtenidos no resultaron fiables ya que se observó la formación de un precipitado heterogéneo sobre las monocapas que no era eliminado totalmente por la concentración de REH empleada ni los lavados posteriores.

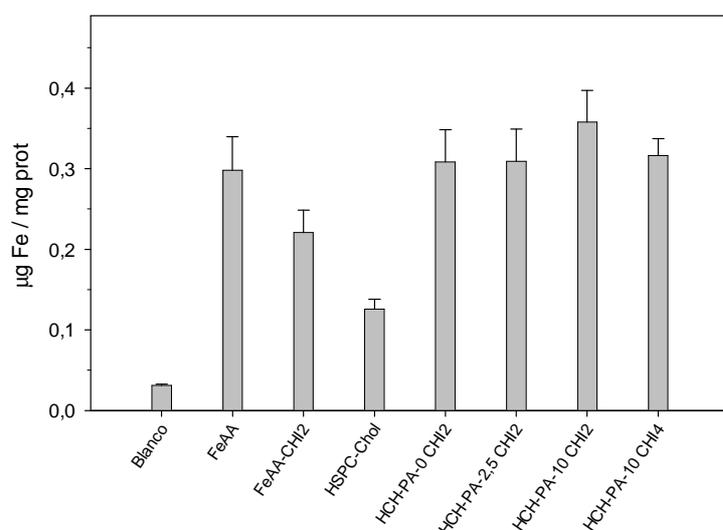


Fig.167: Captación de hierro por cultivos de células Caco-2 incubadas con formulaciones no digeridas. Las monocapas en confluencia fueron incubadas con: (a) buffer uptake (Blanco); (b) soluciones de FeAA; (c) soluciones de FeAA con quitosano 2 mg/ml (FeAA-CHI2); (d) liposomas HSPC-Chol; (e) HSPC-Chol con quitosano 2 mg/ml (HCH-CHI2); (f) HSPC-Chol con DPPA al 2,5 % y quitosano 2 mg/ml (HCH-PA-2.5 CHI2); (g) HSPC-Chol con DPPA al 10 % y quitosano 2 mg/ml (HCH-PA-10 CHI2); y (h) HSPC-Chol con DPPA al 10 % y quitosano 4 mg/ml (HCH-PA-10 CHI4). Las condiciones del ensayo se describen en el apartado 3.4.8. (Materiales y métodos). Los resultados se expresan en μg de hierro por mg de proteína, como promedio \pm sem de $n \geq 1$ cultivo con 3 wells por muestra.

Para evaluar el efecto del contenido de DPPA o de quitosano en la captación de hierro, se realizó una comparación entre las distintas formulaciones de liposomas con quitosano, que se muestran en la Tabla 21 del apartado 4.2.3.5.

Como se observa en la Fig.167, el quitosano no produce un aumento de la captación del hierro cuando se agrega a una solución de FeAA. Sin embargo, cuando se agrega quitosano a los liposomas, la captación de hierro alcanza valores tan altos como la solución FeAA,

independientemente de la concentración de DPPA o de quitosano. De esta manera, el agregado de quitosano a liposomas HSPC-Chol-FeAA sin DPPA produce el mismo aumento en el contenido de hierro captado

que cuando los liposomas HSPC-Chol-FeAA contienen 2,5 o 10% de DPPA. Lo mismo ocurre para el agregado de quitosano a 2 ó 4 mg/ml.

4.6.3. Observación de células Caco-2 incubadas con liposomas mediante microscopía confocal

Las células Caco-2 fueron incubadas con liposomas conteniendo HPTS para estudiar las interacciones células-liposomas según lo descrito en el apartado 3.4.8. (Materiales y Métodos). Como control se emplearon células incubadas con una solución de HPTS en buffer uptake y como blanco células incubadas con buffer uptake, las cuales permitieron ajustar el cero de fluorescencia.

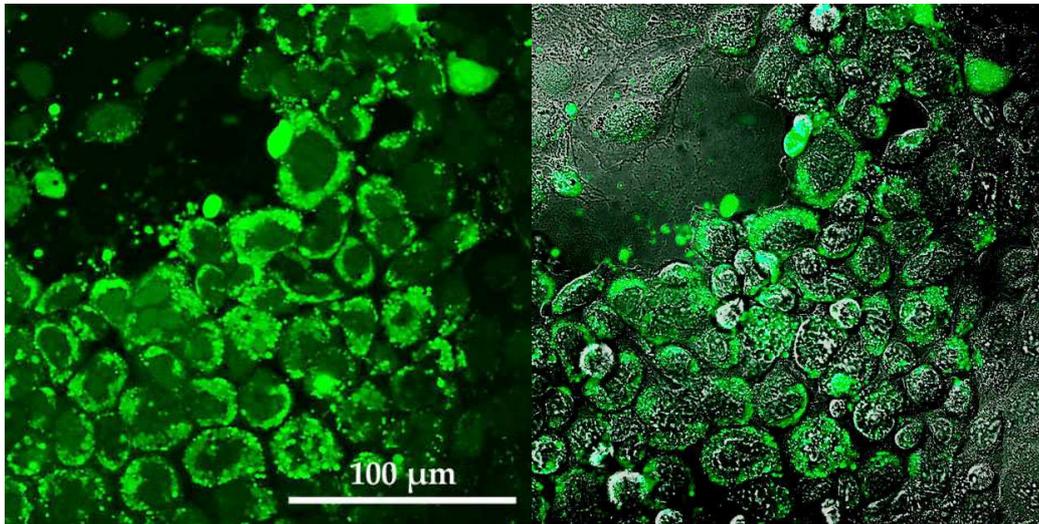


Fig.168: Microscopía confocal de células Caco-2 incubadas con una solución de HPTS en buffer uptake, luego de 1 hora de incubación a 37°C. (a) Imagen fluorescente (b) superposición de la imagen fluorescente con la microfotografía del campo correspondiente.

La Fig.168 muestra la imagen fluorescente obtenida para la incubación realizada con una solución de HPTS (a) y la superposición de esta imagen con una microfotografía del mismo campo (b). Como se desprende de las mismas, existe una importante captación de la HPTS por las células Caco-2.

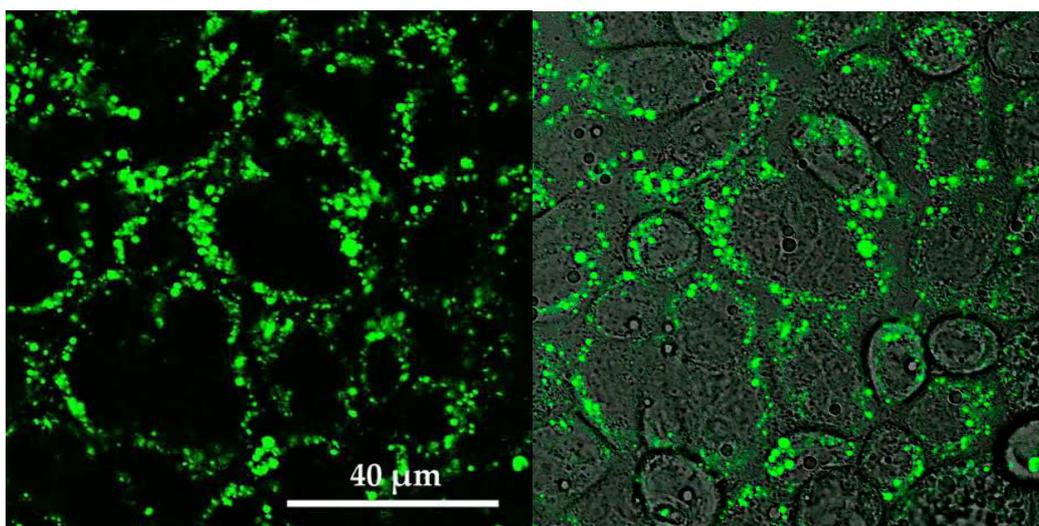


Fig.169: Microscopía confocal de células Caco-2 incubadas con liposomas HSPC-Chol con HPTS, purificados por SEC (M1) luego de 1 hora de incubación a 37°C. (a) Imagen fluorescente (b) superposición de la imagen fluorescente con la microfotografía del campo correspondiente.

La fluorescencia se presenta en el citoplasma en forma difusa y también en forma puntual, asociada a estructuras celulares (Fig.168). La ausencia de fluorescencia en las zonas en que las monocapas se han despegado de la superficie de la placa, confirma que la misma está exclusivamente vinculada a la presencia de las células y que los lavados de las mismas post-incubación son eficientes.

En la Fig.169 se muestra la imagen de las células incubadas con liposomas HSPC-Chol conteniendo HPTS encapsulado en las vesículas purificadas mediante SEC (liposomas M1). Se observa una menor intensidad de la fluorescencia, que también se distribuye en el citoplasma aunque en forma menos difusa que la correspondiente a la Fig.168.

La Fig.170 muestra una imagen obtenida para liposomas HSPC-Chol con DPPA al 10% y quitosano 2 mg/ml (CHI2), conteniendo FeAA y HPTS. Las células fueron incubadas con la muestra purificada por SEC (M1). Como se desprende de la imagen fluorescente, la intensidad de la fluorescencia es mucho mayor que la correspondiente a los liposomas convencionales HSPC-Chol. Además el patrón de distribución de la fluorescencia ha cambiado radicalmente: en este caso se observa una fluorescencia difusa en el citoplasma acompañada de una fuerte tinción nuclear, apreciándose claramente ciertas organelas nucleares como los nucleolos.

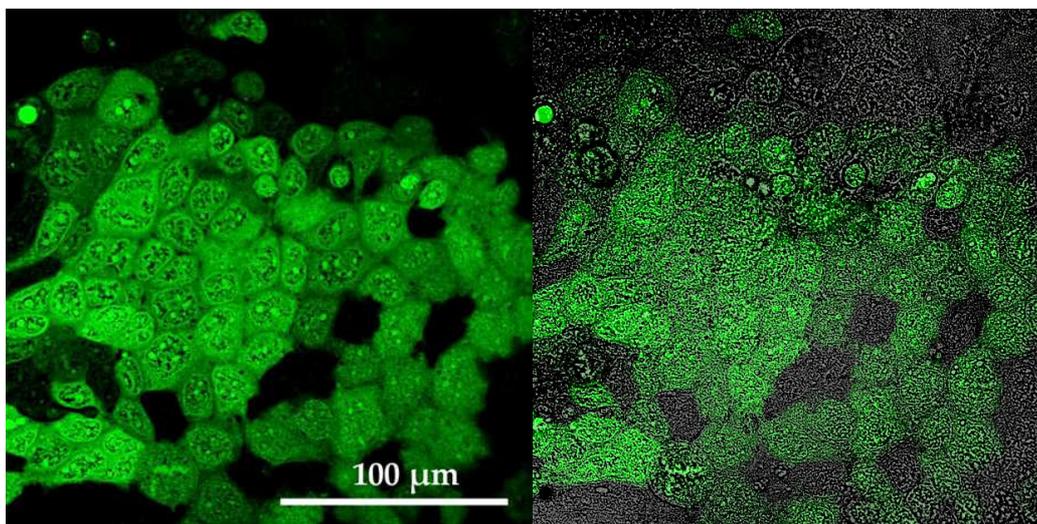


Fig.170: Microscopía confocal de células Caco-2 incubadas con liposomas HSPC-Chol-DPPA 10-CHI2-FeAA (DPPA 10%; CHI 2 mg/ml) conteniendo HPTS, purificados por SEC (M1) luego de 1 hora de incubación a 37°C. (a) Imagen fluorescente (b) superposición de la imagen fluorescente con la microfotografía del campo correspondiente.

5. DISCUSIÓN

5.1. EVALUACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

5.1.1. Caracterización del extracto de bilis

La caracterización del extracto de bilis empleado en la digestión *in vitro* resulta fundamental para comprender sus efectos sobre las formulaciones de liposomas y para estudiar la validez del modelo de digestión elegido.

A principios de los '80, solían emplearse mezclas artificiales de sales biliares para estudiar los efectos de las mismas sobre la desencapsulación de principios activos encapsulados en liposomas (Rowland y Woodley, 1980). Estas mezclas simulaban la composición presente en bilis humana, que ya había sido estudiada previamente (Hofmann, 1963) y que continúa siendo objeto de estudio por su posible relación con la formación de cálculos biliares (Gustafsson et al., 2003; Yago et al., 2005).

Posteriormente estas mezclas artificiales fueron reemplazadas por extractos de bilis de origen humano, bovino o porcino, con el objeto de incluir el efecto de otros componentes de las mezclas naturales que podrían resultar sinérgicos o antagónicos al efecto propio de las sales biliares (Han et al., 1997; Patel et al., 2000). En base a este criterio, los estudios de absorción de hierro mediante cultivos de Caco-2 a partir de muestras digeridas *in vitro*, suelen emplear extracto de bilis porcina, que fue la fuente de sales biliares utilizada en este trabajo (García et al., 1996; Glahn et al., 1996; Au y Reddy, 2000; Jovani et al., 2001).

Por lo tanto, es interesante establecer una comparación entre la composición de sales biliares del EB determinada por electroforesis capilar (CE) y la informada para bilis artificial o extracto de bilis humana, según la bibliografía (ver Tabla 43).

Tabla 43: Comparación entre la composición del extracto de bilis porcina (EB) determinada por CE (apartado 4.1.4. Resultados), la composición de la mezcla artificial empleada por Rowland y Woodley, 1980 (1) y la composición del extracto de bilis humana, según Yago et al, 2005 y Gustafsson et al, 2003 (2). Las condiciones de la cuantificación por CE se describen en el apartado 3.3.10 (Materiales y Métodos). ND: no detectado. NA: no agregado.

ÁCIDO BILIAR	Extracto de bilis porcina (Cuantificación por CE; % p/p)	Bilis artificial (1) (% p/p)	Extracto de bilis humana (% p/p) (2)
Cólico	18,5	NA	ND
Hiocólico	5,3	NA	ND
Litocólico	ND	NA	0,6-1
Desoxicólico	2,5	NA	ND
Ursodesoxicólico	ND	NA	1,3-1,7
Glico y taurocólico	37,5	40	35-46
Glico y taurodesoxicólico	21,6	20	19-21
Glico y tauroquenodesoxicólico	ND	40	31-44

Como puede verse en la Tabla 43, la composición de ácidos cólico y desoxicólico conjugados con glicina y taurina es similar entre el extracto de bilis porcino empleado, la mezcla artificial y el extracto de bilis humana. La diferencia que presenta el extracto porcino, es la ausencia de ácido quenodesoxicólico conjugado. En su reemplazo, presenta un porcentaje importante de ácido cólico libre y cantidades menores de ácidos hiocólico y desoxicólico.

Cabe recordar que cuando las sales biliares ingresan al intestino, se producen dos transformaciones de las mismas. En primer lugar, se pierde la conjugación, y en segundo lugar, se transforma el ácido quenodesoxicólico en litocólico y el cólico en desoxicólico. Por lo tanto, si se pensara en la extrapolación a una situación fisiológica, la diferencia principal no estará en la ausencia del quenodesoxicólico conjugado del extracto porcino, sino en la ausencia de litocólico, que se genera a partir del anterior por acción de la flora intestinal. Esto debe tenerse en cuenta si se pretende comparar el modelo de digestión *in vitro* elegido con otros que empleen extractos de bilis humana o mezclas artificiales. Los efectos específicos que surjan de estas diferencias en la composición serán objeto de futuras investigaciones.

5.1.2. Determinación de hierro por absorción atómica en horno de grafito

La metodología más comúnmente empleada para cuantificar el hierro en estudios de absorción mediante células Caco-2 es la determinación de la intensidad de rayos gamma. Para esto debe emplearse un radioisótopo del hierro que emita ese tipo de radiación, como es el ^{59}Fe . Entre las ventajas de esta determinación se encuentran la alta sensibilidad de los equipos empleados (contadores gamma) y la especificidad de la técnica. Esto ha permitido estudiar no solo la captación de hierro por las células, sino el transporte del mismo a través de las monocapas, una vez verificada su integridad (Alvarez-Hernandez et al., 1991). Para esta aplicación resulta esencial contar con un método extremadamente sensible, ya que los valores de transporte de hierro, ya de por sí bajos, se hallan disminuidos en el modelo de las Caco-2, debido a una baja expresión de la proteína transportadora (Wienk et al., 1999). Esta metodología también fue empleada para validar el reactivo específico que elimina el hierro adsorbido inespecíficamente (Glahn et al., 1995) y para estimar la biodisponibilidad del hierro presente en distintos alimentos (Garcia et al., 1996; Glahn et al., 1996).

El hierro cuantificado en estos ensayos se agrega al analito generalmente en forma de $^{59}\text{FeCl}_3$, debido al alto costo de las otras sustancias marcadas. Trazas de radioisótopo, a concentraciones adecuadas para su cuantificación, se mezclan con las sustancias control (como por ejemplo FeSO_4) o con los alimentos evaluados. Luego se hace la suposición de que el isótopo se intercambia con el hierro nativo y se comporta de la misma manera. En algunos casos en que se requiere evaluar la absorción del Fe^{2+} , se reduce el $^{59}\text{Fe}^{3+}$ con ácido ascórbico, pero siempre debe verificarse el contenido final de cada especie. Este recurso se empleó para confirmar la absorción preferencial del Fe^{2+} respecto del Fe^{3+} , hallándose que para lograr una captación de hierro apreciable se requerían niveles de Fe^{2+} superiores al 50% (Han et al., 1995b). En el presente trabajo, un agregado adicional de $^{59}\text{Fe}^{3+}$ podría alterar el equilibrio entre ambas especies, lo cual impediría correlacionar el grado de oxidación real con la captación de hierro.

Estas desventajas inherentes al empleo de radioisótopos, llevó al desarrollo de metodologías alternativas que no requirieran el uso de ^{59}Fe . Para los estudios de transporte, la única herramienta analítica que permite medir el hierro nativo a tan bajas concentraciones es la espectrometría de plasma con detector óptico o de masa. Empleando esta metodología, pudo determinarse la captación y transporte de hierro a partir de cianobacterias fortificadas (Puyfoulhoux et al., 2001) y realizar correlaciones entre la captación y el transporte a través de las monocapas (Tallkvist et al., 2000).

Sin embargo, cuando sólo debe cuantificarse la captación de hierro por las células, pueden emplearse metodologías más accesibles para los laboratorios analíticos y que resultan más robustas. Este es el caso de la espectrometría de absorción atómica (AAS), que ya había sido empleada para la comparación de la captación de hierro proveniente de digestos de distintas fórmulas infantiles (Jovani et al., 2001). Estos autores digerían por vía seca a 450°C los extractos celulares y luego realizaban la cuantificación de hierro en las soluciones obtenidas, libre de materia orgánica.

En el presente trabajo, el interés era evaluar si la encapsulación del hierro en liposomas producía algún efecto en la captación de hierro. Los principales requisitos para su cuantificación eran que la metodología tuviera la sensibilidad adecuada y que permitiera cuantificar el hierro en presencia de posibles interferencias provenientes de los liposomas, de los extractos celulares y de los tensioactivos empleados para obtenerlos. Como se demostró en el apartado 4.1.6., el horno de grafito realiza una calcinación de la muestra que elimina la materia orgánica que podría interferir en la cuantificación de hierro, sin necesidad de digestiones ácidas previas. La eficiencia de este pre-tratamiento de la muestra en el horno de grafito se verificó obteniendo curvas de calibración con o sin el agregado de las matrices correspondientes y confirmando que no se alteraran los parámetros de las curvas obtenidas. Por otro lado, el rango lineal resultó adecuado para los niveles de hierro presentes en los extractos, permitiendo su determinación aún en las muestras blanco, que no contenían hierro agregado.

La determinación de hierro por AAS con horno de grafito también se aplicó a la

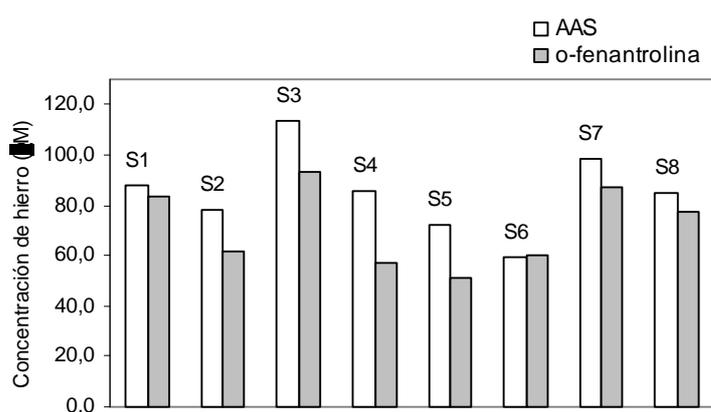


Fig.171: Comparación entre métodos de cuantificación de hierro en distintas siembras (S1, S2,...): espectrometría de absorción atómica (AAS, barras blancas) y formación del complejo con o-fenantrolina (barras grises).

cuantificación del contenido de hierro de las siembras, lo cual resultaba fundamental para caracterizar las condiciones de cada incubación.

Como se mencionó en el apartado 4.6.1.2., las concentraciones variaron en el rango $50\text{-}200\ \mu\text{M}$, por lo tanto podían cuantificarse tanto por espectrometría de absorción atómica (AAS; apartado 3.3.5.) como por la formación del complejo con o-fenantrolina

(apartado 3.3.4). La Fig.171 muestra que los valores obtenidos para distintas muestras por

ambas metodologías resultaron similares. Debido a las altas diluciones realizadas para la determinación por AAS (aproximadamente 1/50), lo cual introducía una fuente adicional de variabilidad, se empleó finalmente el método de la o-fenantrolina.

5.1.3. Análisis de liposomas HSPC por calorimetría de barrido diferencial

Los liposomas mejor caracterizados en la bibliografía, comparables a los HSPC preparados en este trabajo, son los compuestos por el fosfolípido sintético dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC). Luego de muchos años de mediciones de numerosos lotes de DPPC, se ha asumido que la temperatura de transición de las bicapas compuestas por un 100% de DPPC es de $41,3 \pm 0,05$ °C (Biltonen y Lichtenberger, 1993). Tal es así, que cualquier variación respecto de este rango en un termograma de liposomas compuestos por DPPC, suele atribuirse a la presencia de impurezas o defectos de empaquetamiento debidos a una preparación poco eficiente.

En el presente trabajo se caracterizaron liposomas preparados con HSPC, una materia prima formada mayoritariamente por fosfatidilcolina que presenta una mezcla de cadenas de ácidos grasos que han sido sometidos a la hidrogenación. La composición aproximada de estos ácidos grasos es: 17% de palmítico (16:0), y 83% de ácido esteárico (18:0), proveniente de la hidrogenación de los ácidos insaturados 18:1, 18:2 y 18:3. Los valores de T_m para los fosfolípidos simétricos DPPC (2 cadenas de 16:0) y DSPC (2 cadenas de 18:0) están tabulados: 41,3 y 55,3°C respectivamente (Gruner, 1992). Suponiendo (a) una mezcla conteniendo 17% de DPPC y 83% de DSPC y (b) que para una diferencia de longitud de cadena pequeña ($\Delta n=2$), se puede considerar lineal la curva "Tm vs. número de átomos de carbono (cadenas acílicas)", podría obtenerse la temperatura de transición de la mezcla como el promedio pesado de las temperaturas individuales para DPPC y DSPC. Realizando estos cálculos, este promedio pesado resultó igual a 52,94°C, un valor cercano al obtenido experimentalmente para la HSPC. En efecto, la temperatura de transición promedio obtenida para los liposomas MLVs homogeneizados a 55°C y en condiciones C5-P4 fue de $52,15 \pm 0,17$ °C ($n=7$), como se describió en el apartado 4.4.7. En cuanto a la entalpía molar de transición, el valor medio hallado para los liposomas HPSC fue de $33,8 \pm 2,7$ kJ/K·mol, bastante similar al valor de 28,9 kJ/K·mol tabulado para liposomas compuestos por DPPC (Chen, 1992).

5.1.4. Determinación del pH interno en liposomas

El balance entre el mantenimiento y la disipación de gradientes de concentración a través de las membranas celulares es crucial para el funcionamiento de los sistemas biológicos. Numerosos procesos bioquímicos requieren que las membranas se comporten como barreras efectivas para la difusión pasiva de iones, particularmente de protones. Desde que se descubrió que las velocidades de permeación de los protones eran 5 ó 6 órdenes de magnitud mayores que lo esperado, en base a la comparación con otros cationes monovalentes como el Na^+ ó K^+ (Dreameer y Nichols, 1989), se realizaron numerosos estudios intentando explicar los mecanismos que facilitaban el movimiento de los protones a través de las bicapas lipídicas. Para monitorear el pH de la fase acuosa interna y la permeabilidad de las membranas, se empleó la

sonda fluorescente HPTS (piranina), que ya había demostrado su eficiencia en la medición del pH interno de liposomas (Kano y Fendler, 1978).

Esta sonda fluorescente tiene características únicas. Como puede verse en la Fig.23 (Materiales y Métodos), sus tres grupos sulfonato permanecen ionizados en un gran rango de pH, lo cual la convierte en una molécula altamente hidrosoluble y con una baja afinidad por los lípidos de membrana. Esto impide que la HPTS atraviese las bicapas, al menos cuando éstas se encuentran intactas. En segundo lugar, como se mencionó en el apartado 3.5.2. (Resultados), el hidroxilo en posición 8, que es el grupo sensible al pH, tiene un pK_a de 7,41, lo cual permite aplicaciones en la mayoría de los sistemas biológicos. Además, posee dos longitudes de onda cuya intensidad de fluorescencia depende del pH, y una independiente de él (el punto isobéptico), que permite monitorear el contenido total de la sonda. Finalmente, el empleo de la HPTS en conjunto con el quencher DPX, que tampoco atraviesa las bicapas lipídicas y que se añade en el seno de la solución, asegura que el pH medido proviene exclusivamente del compartimiento en donde se encuentra encapsulada la HPTS, y no de la sonda que pudiera haberse desencapsulado (Barreto y Lichtenberger, 1992).

Para esta sonda, las dos longitudes de onda de excitación sensibles al pH son 454 nm y 403 nm (otros autores emplean otras próximas como 460-405 nm), mientras por excitación a 417 nm, el punto isobéptico, se obtiene una emisión independiente del pH que sólo depende de la concentración de la sonda. Para la emisión, suele emplearse una longitud de onda entre 507 y 511 nm. En la mayoría de los casos, para la medición del pH se emplea el cociente R454/417 (ratio), que se calcula entre la longitud de onda que indica el nivel de la HPTS ionizada ($Py-O^-$) y la que indica el nivel de la HPTS total. Sin embargo, también puede emplearse el cociente entre las dos longitudes de onda sensibles al pH: 454/403, como ya había sido aplicado para la caracterización del pH interno de levaduras (Aguedo et al., 2001). En el presente trabajo, se demostró que el cociente R454/403 presenta un rango lineal mayor que el cociente R454/417 en la determinación de pH (Fig.122, apartado 4.4.4.2.). Por lo tanto, la elección de este cociente permitió determinar el pH interno de liposomas en el rango comprendido entre 4,6 y 7,8, que resultó más extendido que los hallados en estudios previos de otros autores (Barreto y Lichtenberger, 1992).

Existen algunos estudios sobre la existencia de artefactos metodológicos que pueden llevar a errores en la determinación del pH mediante la HPTS. Uno de ellos postula que la HPTS, a pesar de su carácter polianiónico, interacciona con las vesículas de fosfatidilcolina, de modo tal que su pK_a difiere del que presenta la sonda en medio acuoso (Fernandez y Politi, 1997). Estudios más recientes demuestran que el pK_a de la HPTS varía con la composición del medio (Avnir y Barenholz, 2005). En particular, se observa que en presencia de cationes divalentes, como el Mg, Ca y Ba, el pH calculado es mayor que el pH real. Por ejemplo, el pH calculado empleando HPTS en presencia de una solución de $MgCl_2$ 0,2 M, resultó 0,6 unidades de pH mayor que el pH determinado mediante un pHmetro. En el presente trabajo se ha encontrado un efecto similar en presencia de FeAA 0,24 M, solo que, en este caso, el ΔpH fue mucho menor (0,2 unidades de pH) y el efecto desaparecía a $pH > 5,5$ (ver apartado 4.5.2.1.).

Este tipo de interferencias puede llevar a errores cuando el cociente R454/403 se mide en un sistema complejo, y el pH se interpola en una curva de calibración obtenida con la HPTS

en solución, lo cual es un procedimiento habitual. En este trabajo, la curva de calibración del pH se determinó en presencia de las posibles interferencias, como se indica en las curvas de calibración de las Figuras 123 y 154. En el primer caso, la regresión se calculó partiendo de valores correspondientes a soluciones de HPTS y a liposomas conteniendo HPTS e incubados con gramicidina. Como se había mencionado previamente, este péptido formador de canales permite un intercambio más rápido del pH entre el medio interno y el medio externo, que los transportadores móviles, como la nigericina (Jyothi et al., 1990 ; Venema et al., 1993). En el caso de los liposomas conteniendo FeAA, la calibración incluyó valores hallados en presencia de dicha solución (con una concentración de hierro de 0,24 M), así como valores obtenidos con liposomas conteniendo FeAA y HPTS, incubados con gramicidina. En ninguno de los casos se hallaron diferencias entre la calibración con HPTS en solución o encapsulada en liposomas. De este modo, la calibración resulta válida, ya que tiene en cuenta cualquier posible efecto de los componentes de las muestras.

Con respecto a los ensayos realizados con OG-514, la sonda empleada para medir el pH en medio ácido, se confirmó que el cociente entre las longitudes de onda de excitación 510/450 resultaba más sensible al pH que el cociente 510/470 (apartado 4.4.5.1.), según lo descrito previamente (Lin et al., 1999). La desventaja del empleo de esta sonda, es que, a pHs muy ácidos, puede atravesar las bicapas lipídicas (Avnir y Barenholz, 2005). Esto se debe a que el grupo hidroxilo sensible al pH (ver estructura química en la Fig.27), tiene un pK_a de 4,4 aproximadamente, con lo cual a pH 2 habrá una considerable cantidad de sonda no ionizada que podría atravesar una membrana hidrofóbica. Este efecto fue observado en el presente trabajo, evidenciado por una disminución en las intensidades de fluorescencia. Sin embargo, la concentración de OG-514 remanente fue suficiente para la determinación de la caída inicial del pH interno que alcanzó casi instantáneamente valores de por lo menos 2,8 (límite inferior de la sonda).

5.2. EVALUACIÓN DE LOS MÉTODOS PREPARATIVOS

5.2.1. Optimización de la preparación de liposomas MLVs

En este apartado se discuten los dos objetivos que se persiguieron durante la optimización de la preparación de los liposomas HSPC-Chol. Por un lado, se buscaba que el método de obtención fuera fácilmente escalable, evitando en lo posible el uso de solventes tóxicos. Por otro lado, se pretendía constatar la desaparición de la transición de fases, hecho que confirmaría la homogeneidad de las bicapas de los liposomas y, por tanto, la validez del método de preparación de los MLVs.

El primer criterio se aplicó en la preparación de las suspensiones de MLVs para liposomas SPC y HSPC. En ambos casos, los lípidos sólidos se agregaron al buffer o a la solución FeAA precalentada a 40 y 55°C respectivamente. Luego de la agitación magnética, se obtenían suspensiones homogéneas y estables, que eran posteriormente procesadas mediante el homogeneizador de alta presión. El agregado de sólidos a soluciones acuosas y su dispersión

mediante la agitación mecánica, son operaciones comúnmente empleadas para la preparación de suspensiones a escala industrial.

Por otro lado, se sabe que los liposomas conteniendo fosfolípidos insaturados no presentan transiciones de fases en el rango 25-80°C, contrariamente a los liposomas conteniendo lípidos saturados (Gruner, 1992). Generalmente estos estudios se realizan basándose en fosfolípidos sintéticos, con estructuras químicas conocidas. En este trabajo se verificó que los liposomas SPC, compuestos por ácidos grasos saturados (21%) e insaturados (79%) como se mostró en la Tabla 2 (apartado 1.2.), no presentaban una transición en el rango de temperaturas estudiado, mientras que los liposomas HSPC, compuestos por lípidos saturados, mostraban una clara transición alrededor de los 52°C (ver apartado 4.4.7. Resultados).

En el caso de los liposomas HSPC-Chol, se buscaba obtener liposomas físicamente estables, en los cuales hubiera desaparecido la transición característica de los liposomas HSPC, lo que sería un indicador de la homogeneidad de las bicapas. Según la bibliografía, el agregado de colesterol a DPPC en un 50% molar (relación 1:1 molar), reduce la entalpía de transición a un valor no detectable (New, 1990). Sin embargo, se ha visto que las vesículas conteniendo más de un 50% molar de colesterol se vuelven inestables, por la reducción del número de interacciones intermoleculares que estabilizan las bicapas. Probablemente sea esta la causa por la cual la mayoría de los investigadores haya optado por agregarlo en relaciones molares entre 5:1 y 3:2 fosfolípido/colesterol, es decir entre el 17 y el 40% molar de colesterol (Rogers y Anderson, 1998). En este trabajo se eligió la máxima concentración de colesterol dentro de dicho rango, preparándose vesículas compuestas por HSPC-Chol 3:2. Pero debía determinarse si los liposomas obtenidos a esa concentración de colesterol presentaban una transición de fases detectable o si la misma había desaparecido. También debía estudiarse si este efecto resultaba independiente del método de preparación.

Como se describió en el apartado 4.2.1., cuando las suspensiones de MLVs se prepararon agregando los lípidos sólidos a las soluciones acuosas (mezclas), la transición no desaparecía y su entalpía molar permanecía prácticamente constante (ver Tabla 16). La única preparación que presentó una disminución significativa de la entalpía molar de transición fue la procesada por recirculación durante 10 minutos a 55°C.

Se determinó además, si era posible obtener bicapas homogéneas empleando un solvente poco tóxico, como lo es el etanol. Si bien los liposomas preparados a partir de películas etanólicas presentaron valores bajos de entalpía de transición (ver Tabla 16, apartado 4.2.1.), ésta no está completamente eliminada, probablemente por tratarse de un solvente poco eficiente para lograr una mezcla íntima de los fosfolípidos con el colesterol.

Finalmente, se prepararon liposomas con la misma composición, pero empleando el método de la película lipídica previamente disuelta en cloroformo. Como se observa en las formulaciones correspondientes, la transición apenas resulta detectable en los termogramas y las entalpías calculadas a partir de los mismos son menores a los 2 kJ/K·mol, es decir que han disminuido hasta valores menores al 10% de los iniciales.

Por lo tanto, la desaparición de la transición no solo depende de la concentración relativa de colesterol, sino del método de obtención de las vesículas. Evidentemente, en las

mezclas de sólidos agregados a soluciones acuosas, no existe una mezcla íntima de los fosfolípidos con el colesterol. Es probable que en este caso, no se formen mayoritariamente liposomas HSPC-Chol sino liposomas HSPC, micelas de colesterol y/o bicapas con diversos dominios, como parece demostrar la comparación entre las entalpías de transición de estas mezclas (entre 16 y 23 kJ/K·mol; Tabla 16) y la correspondiente a liposomas HSPC, que es de $33,8 \pm 2,7$ kJ/K·mol.

En cuanto al escalado de esta metodología deberá realizarse un paso previo a la dispersión de los lípidos: su solubilización y la evaporación del solvente. Este proceso, junto con los controles necesarios para asegurar la total eliminación del cloroformo, tendrá influencia en el costo final del producto.

Por otro lado, debe recordarse que el presente estudio se ha realizado en las condiciones de homogenización menos favorables (presión de entrada de 0,8 bar, 1 ciclo o recirculación durante 10 minutos) para asegurar que las bicapas serán homogéneas en cualquier otra combinación de presiones y ciclos abaricable por el instrumento. Por este motivo, no debe descartarse el empleo del etanol en el caso en que los liposomas se procesen a presiones mayores. Unas condiciones más enérgicas deberían producir unas mejores mezclas de los lípidos utilizados y, por lo tanto, bicapas más homogéneas. Si la homogeneización a 0,8 bar produce una notable disminución de la entalpía de transición, es probable que presiones más elevadas proporcionen liposomas con entalpías tan pequeñas como las obtenidas con los liposomas preparados a partir de la disolución de los lípidos en cloroformo.

5.2.2. Optimización de la preparación de liposomas por homogeneización a alta presión

Como fue comentado anteriormente (apartado 1.6. Introducción), la homogeneización a alta presión fue empleada por primera vez hace más de dos décadas. En esa oportunidad, se obtuvieron liposomas mediante un Microfluidizer 100S, el equipo utilizado en este trabajo (Mayhew et al., 1984). El empleo de homogeneizadores se difundió para numerosas aplicaciones, debido a que permiten la producción a gran escala. Entre las aplicaciones se encuentran: la reducción del diámetro de liposomas hasta valores por debajo de los 200 nm (Vemuri et al., 1990), la obtención de emulsiones o/w a partir de las cuales se preparan microcápsulas con omega-3 (Keogh et al., 2001), las microemulsiones estabilizadas con lecitina, como sistemas de liberación controlada de fármacos (Sjostrom y Bergenstahl, 1992) y la preparación de nanopartículas biodegradables (Lamprecht et al., 1999), entre otras.

Debido a que cada marca tiene su propio diseño, que está protegido por registros de propiedad intelectual, los homogeneizadores comercializados no son necesariamente equivalentes. Uno de los factores que debe tenerse en cuenta para evaluar la intercambiabilidad, es la presión de homogeneización (P_{hom}). Esta presión, que es la presión que soporta la muestra dentro de la cámara de homogeneización, generalmente se expresa como la presión de entrada multiplicada por un factor, característico de una marca y un modelo determinado. En el Microfluidizer, por ejemplo, la P_{hom} es igual a la presión de entrada multiplicada por 230, por lo tanto la máxima P_{hom} que se aplicó en este trabajo fue de 920 bar (equivalente a 4 bar de entrada). Teniendo en cuenta este factor, los resultados obtenidos en este trabajo (apartado

4.2.2. Resultados) son, como mínimo, orientativos para la preparación de liposomas con otros homogeneizadores.

Uno de los factores que debe ser estudiado es la recuperación de los fosfolípidos después de la homogeneización. Cuando se obtienen liposomas mediante extrusores, es habitual que haya importantes pérdidas de lípidos que van obturando las membranas, especialmente cuando se trata de poros de 200 nm o menores, cuando la suspensión es muy concentrada (≥ 50 mg/ml) y/o cuando se emplean fosfolípidos saturados. En el apartado 4.2.2. (Resultados), se verificó que la extrusión manual de liposomas HSPC y HSPC-Chol es muy dificultosa aún cuando se realiza a través de una membrana de 800 nm y precalentando el dispositivo de extrusión a temperaturas por encima de los 55°C.

Algunos autores demostraron que en ciertos casos, la homogeneización de alta presión ocasionaba importantes pérdidas de lípidos. Cuando se procesaban por ejemplo, suspensiones conteniendo fosfolípidos saturados (como HSPC) a concentraciones mayores o iguales a 100 mg/ml, se obtenían recuperaciones entre el 25 y el 75% según la composición de los liposomas, aún cuando las suspensiones se homogeneizaban a 70°C (Talsma et al., 1989). Estudios más recientes verificaron que no existían pérdidas significativas para liposomas compuestos por fosfolípidos insaturados a 50 mg/ml (Barnadas-Rodriguez y Sabes, 2001), ni siquiera aumentando la concentración a 100 mg/ml (Barnadas-Rodriguez, 1999).

En este trabajo, la concentración de lípidos empleada fue más baja (25 mg/ml), pero se incluyó el procesamiento a 55°C de liposomas con fosfolípidos saturados. Estas vesículas, que se encuentran en estado gel a temperatura ambiente (ver apartado 4.4.7. Resultados), pueden provocar obturaciones en el homogeneizador que den como resultado pérdidas de lípidos si la temperatura no tiene un control adecuado. Como se vio en el apartado 4.2.2., los liposomas HSPC presentan altos valores de recuperación de lípidos post-homogeneización, teniendo en cuenta que la incertidumbre del método de cuantificación utilizado es del 5%. Tampoco se observan pérdidas de fosfolípidos para los liposomas HSPC-Chol en los cuales la transición fue eliminada como se describió en el apartado 4.4.7. (Resultados). Cabe aclarar que en este caso, se cuantificó únicamente la concentración de HSPC, no así la de colesterol, por lo tanto el valor teórico fue de 15 mg/ml (el 60% de 25 mg lípidos/ml). Habiendo demostrado que el colesterol y los fosfolípidos forman una fase homogénea, puede suponerse que la recuperación del mismo es similar al de la HSPC. Curiosamente, los liposomas insaturados SPC presentan las menores recuperaciones, si bien se encuentran por encima del 90%, lo que resulta aceptable para cualquier proceso industrial.

En el caso de que los resultados obtenidos fueran transferidos a un homogeneizador con extrusión en línea, como es el caso del EmulsiFlex C-50, deberían repetirse los ensayos para evaluar la recuperación en las nuevas condiciones y para cada tipo de membrana utilizada. También deberán evaluarse las recuperaciones si se requiere aumentar la concentración de lípidos en las formulaciones, una estrategia común para aumentar el porcentaje de incorporación de sustancias hidrosolubles.

Como se describió en el apartado 3.5.9. (Materiales y Métodos), la estabilidad química de las formulaciones liposomales se determinó mediante la cuantificación de las formas liso que se originan por degradación de los fosfolípidos. Si bien esta determinación se realizó

fundamentalmente para evaluar el efecto de la digestión *in vitro* sobre los liposomas, los resultados obtenidos para las muestras homogenizadas antes de la digestión, permiten evaluar si el procesamiento aumenta el contenido de formas liso, cuando se compara con los valores declarados para las materias primas en sus respectivos certificados de análisis. Como se desprende de los resultados obtenidos (Tabla 34, apartado 4.4.8.2.), los valores de liso PC en las muestras sin digerir (PRE) son similares a los contenidos declarados por los proveedores de los fosfolípidos, lo cual demuestra que la homogeneización de las suspensiones no produce una lisis apreciable de los fosfolípidos para ninguna de las formulaciones ensayadas. Estos resultados coinciden con los hallados para el procesamiento de suspensiones obtenidas a partir de proliposomas (Barnadas-Rodriguez y Sabes, 2001). El índice de oxidación, determinado por el método de Klein, no aumentaba como resultado de la homogeneización, lo cual sugería que el proceso no promovía las reacciones de radicales libres que llevan a la formación de dienos o trienos conjugados en los ácidos grasos.

En el apartado 4.2.2. (Resultados) se obtuvieron las ecuaciones y las superficies de respuesta que explican el comportamiento del diámetro en función del número de ciclos y la presión de entrada para las tres formulaciones de liposomas convencionales. La Tabla 44 permite comparar los diámetros medios calculados mediante dichas ecuaciones con los obtenidos experimentalmente, para distintas condiciones de homogeneización.

Tabla 44: Comparación entre los diámetros calculados a partir de las ecuaciones obtenidas en el apartado 4.2.2. (Resultados) y los obtenidos experimentalmente para liposomas SPC, procesados a temperatura ambiente, y liposomas HSPC y HSPC-Chol procesados a 55°C. MLVs: vesículas multilamelares obtenidas mediante agitación mecánica. Para los valores experimentales, n=3. ND: no determinado.

Formulación	Diámetros calculados (nm)					Diámetros medios experimentales (nm)		
	MLVs	C1-P0,8	C5-P0,8	C5-P4	C9-P4	MLVs	C5-P0,8	C5-P4
SPC	2.182	1.472	1.267	82	-123	ND	1.264	88
HSPC	4.473	3.373	2.860	792	728	ND	2.891	747
HSPC-CHOL	2.434	1.805	1.582	783	740	ND	1.608	748

Las suspensiones de MLVs preparadas por agitación mecánica tienen diámetros fuera del rango de medición del analizador empleado (indicados como ND). Sin embargo, las ecuaciones permiten extrapolar los valores que tendrían los diámetros de liposomas sin procesar (C0-P0). Si se tienen en cuenta los valores calculados, a una presión baja (0,8 bar) la mayor reducción del diámetro se observará con el primer ciclo de homogeneización (C1-P0,8), mientras que los ciclos subsiguientes no provocarán cambios muy importantes (compárese con C5-P0,8). Esta suposición puede realizarse debido a la similitud hallada entre los diámetros calculados y los experimentales para todas las condiciones ensayadas.

Como era de esperar, la máxima reducción en el diámetro medio se obtuvo para una presión de 4 bar. Analizando los valores correspondientes a las condiciones C5-P4, tanto para los diámetros calculados como para los experimentales, se observa la diferencia entre los diámetros mínimos alcanzados por las distintas formulaciones a dicha presión. Así, los liposomas compuestos por fosfolípidos insaturados (SPC) alcanzan valores menores a los 100

nm, mientras que los compuestos por fosfolípidos saturados (HSPC) no bajan de los 700 nm, independientemente de que contengan o no colesterol. Tampoco se observa una acusada disminución adicional cuando se incrementa el número de ciclos. En este aspecto (véase columna C9-P5), se confirma que a partir de los 5 ciclos de procesamiento, no se producen variaciones significativas del diámetro, según lo descrito previamente (Talsma et al., 1989). La excepción es el valor calculado para el diámetro de los liposomas SPC C9-P4 (en rojo). La ecuación predice un valor negativo que carece de sentido, pero debe recordarse que realmente la combinación C9-P4 se trata de una extrapolación, con las limitaciones que posee este tipo de cálculos. Por lo tanto, debería realizarse un estudio más profundo para determinar si realmente, por encima de 5 ciclos, hay un efecto sobre el diámetro, lo cual está fuera del alcance de este trabajo.

Tampoco se observó un efecto descrito para liposomas compuestos por PC de soja o mezclas de PC de soja con colesterol, según el cual se obtiene un diámetro mínimo a una presión intermedia y luego un aumento del mismo, a presiones mayores (Brandl et al., 1990 ; Bachmann et al., 1993). Por el contrario, para las tres formulaciones la presión tiene un efecto continuo en la reducción del diámetro medio dentro del rango estudiado (0-4 bar), como había sido descrito para liposomas preparados a partir de mezclas de fosfolípidos insaturados (Barnadas-Rodriguez y Sabes, 2003).

En cuanto a las distribuciones de diámetros obtenidas, fueron mayoritariamente bimodales, hecho evidenciado por los elevados valores de anchura que proporciona el analizador, que fueron del orden del 80-100% del valor obtenido para el diámetro medio (mV). En este sentido y a la hora de sacar conclusiones, debe tenerse en cuenta que el mV se obtiene como un promedio pesado calculado con la distribución de tamaños y, por lo tanto, en caso de preparaciones no unimodales, a partir de poblaciones de distintos mVs. Por lo tanto, en distribuciones polimodales, su valor no indica que los liposomas formen una única población de vesículas centrada en ese valor de diámetro. Debido a que los valores de anchura media fueron prácticamente independientes de las variaciones de ciclos y presión, carecía de sentido estudiar esta variable mediante un diseño experimental. En otros casos, las ecuaciones y superficies de respuestas obtenidas permiten inferir en qué condiciones se obtienen poblaciones unimodales (Barnadas-Rodriguez, 1999).

Respecto al volumen incorporado, éste se comporta en forma similar al diámetro medio: en general, al aumentar la presión y en menor medida, a mayor número de ciclos, se observa una disminución de su valor. Este hecho se debe a que el volumen acuoso interno es función del diámetro de las vesículas y de su lamelalidad (número de bicapas). Para el caso de un liposoma unilamelar de diámetro D , expresado en nm, y una anchura de bicapa, b , de 4 nm (Cornell et al., 1980), el volumen acuoso incorporado, expresado en litros, sería de:

$$V(l) = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{D}{2} - 4 \right)^3 \cdot 10^{-24} \cdot \frac{\text{dm}^3}{\text{nm}^3} \quad \text{Ec. 1}$$

En el caso de contener más de una bicapa, puede obtenerse la expresión del volumen considerando que las existentes sean concéntricas, que se distribuyan progresivamente desde el exterior hacia el interior del liposoma, y suponiendo que el volumen de agua contenido entre ellas sea despreciable. Con esta simplificación, en el caso de contener b bicapas, el sistema equivaldría a un liposoma con una bicapa de anchura $4b$ y, en consecuencia, el volumen

$$V(l) = \frac{4}{3} \pi \left(\frac{D}{2} - 4b \right)^3 \cdot 10^{-24} \cdot \frac{\text{dm}^3}{\text{nm}^3} \quad \text{Ec. 2}$$

incorporado sería de:

Realmente existe una capa de agua entre las bicapas, por lo cual el volumen de agua incorporada disminuye más lentamente con el número de bicapas de lo que indica la ecuación, aunque esta desviación es poco importante en el caso de liposomas de gran tamaño.

Por otro lado, los moles de fosfolípido contenidos en un liposoma pueden calcularse a partir del área transversal de dichas moléculas. Asumiendo para la EPC un valor de $0,73 \text{ nm}^2$ (Cornell et al., 1980), los moles de fosfolípido, F , contenidos en un liposoma unilamelar de diámetro D están dados por la expresión:

$$\begin{aligned} \text{mol } F &= \left[4\pi \left(\frac{D}{2} \right)^2 + 4\pi \left(\frac{D}{2} - 4 \right)^2 \right] \cdot \frac{\text{molécula de F}}{0,73 \text{ nm}^2} \cdot \frac{1 \text{ mol F}}{6,023 \cdot 10^{23} \text{ moléculas de F}} = \\ &= 2,86 \cdot 10^{-23} \left[\left(\frac{D}{2} \right)^2 + \left(\frac{D}{2} - 4 \right)^2 \right] \frac{\text{mol F}}{\text{nm}^2} \quad \text{Ec. 3a} \end{aligned}$$

En ella, el primer sumando contenido en el corchete está dado por los fosfolípidos contenidos en la monocapa externa y el segundo, por los contenidos en la interna. Teniendo en cuenta lo apuntado anteriormente para el cálculo del volumen en el caso de liposomas con más de una bicapa, pueden calcularse los moles de fosfolípido en estos liposomas a partir de las expresiones siguientes:

Si contienen dos bicapas,

$$\begin{aligned} \text{mol } F &= 2,86 \cdot 10^{-23} \left[\left(\frac{D}{2} \right)^2 + \left(\frac{D}{2} - 4 \right)^2 + \left(\frac{D}{2} - 4 \right)^2 + \left(\frac{D}{2} - 2 \cdot 4 \right)^2 \right] \frac{\text{mol F}}{\text{nm}^2} = \\ &= 2,86 \cdot 10^{-23} \left[\left(\frac{D}{2} \right)^2 + 2 \cdot \left(\frac{D}{2} - 4 \right)^2 + \left(\frac{D}{2} - 2 \cdot 4 \right)^2 \right] \frac{\text{mol F}}{\text{nm}^2} \quad \text{Ec. 3b} \end{aligned}$$

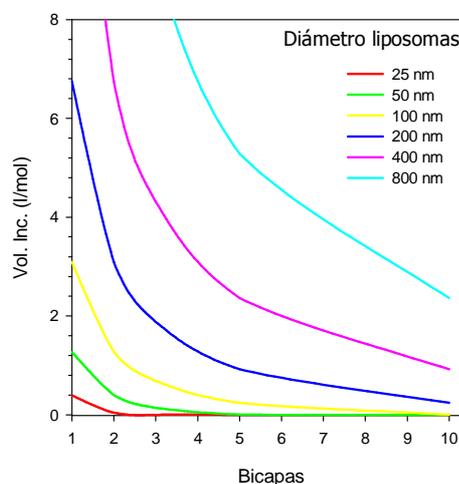
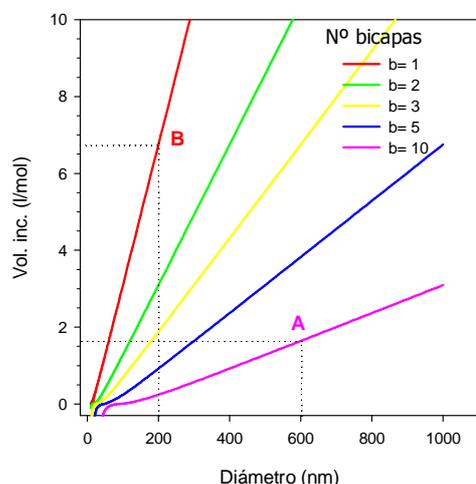
en el caso de tener tres bicapas,

$$\text{mol } F = 2,86 \cdot 10^{-23} \left[\left(\frac{D}{2} \right)^2 + 2 \cdot \left(\frac{D}{2} - 4 \right)^2 + 2 \cdot \left(\frac{D}{2} - 2 \cdot 4 \right)^2 + \left(\frac{D}{2} - 3 \cdot 4 \right)^2 \right] \frac{\text{mol F}}{\text{nm}^2} \quad \text{Ec. 3c}$$

y así sucesivamente para el caso de b bicapas. Consecuentemente, a partir del cociente entre las ecuaciones 1 y la 3 (aplicada ésta al caso de b bicapas), puede obtenerse el volumen incorporado para los liposomas de un determinado diámetro, que tiene la expresión:

$$V_{inc.}(l/mol F) = 0,146 \cdot \frac{\left(\frac{D}{2} - 4b\right)^3}{\left[\left(\frac{D}{2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{D}{2} - b \cdot 4\right)^2\right]} \cdot \frac{dm^3}{mol F \cdot nm} \quad \text{Ec. 4}$$

A partir de esta ecuación se obtuvieron las Figuras 172 y 173, en las que puede apreciarse el efecto de la variación del diámetro y la lamelaridad sobre volumen incorporado. Si el número de bicapas se mantiene constante, la eficiencia de encapsulación disminuye linealmente con el diámetro.



Se observa que la única manera de aumentar el volumen encapsulado al disminuir el diámetro es mediante una importante disminución del número de bicapas de las vesículas, un efecto que consigue, por ejemplo, la extrusión de la muestra combinada con la congelación-descongelación (obviamente, un menor número de bicapas por liposoma permite que, a una concentración determinada de fosfolípidos, se forme un mayor número de vesículas). Para comprender mejor esta situación, pueden compararse los liposomas del punto A con los del punto B (Fig.172). Los liposomas multilamelares ($b=10$) del punto A tienen un diámetro medio de 600 nm y un volumen incorporado cercano a los 2 l/mol. Si se procesaran estos mismos liposomas para reducir su diámetro hasta un valor de 200 nm, manteniendo el número de bicapas constante, el volumen incorporado sería mucho menor. Para obtener un mayor volumen incorporado junto con una disminución del diámetro, debe reducirse el número de lamelas. Así por ejemplo, los liposomas del punto B, unilamelares, presentan un diámetro de 200 nm y un volumen incorporado que triplica el valor correspondiente al punto A.

Los valores absolutos de volumen incorporado de las figuras no son aplicables a las preparaciones obtenidas en el presente trabajo, ya que los gráficos mencionados solo son aplicables a poblaciones unimodales de liposomas. A pesar de ello, la tendencia que muestran sí que pone en evidencia el comportamiento de la homogenización a alta presión, en la que la mayoría de combinaciones de presión y ciclos ha proporcionado suspensiones bimodales, con mayor o menor población relativa de cada tipo de vesícula. Teniendo presente por lo tanto que los diámetros de las figuras del apartado 4.2.2. son representativos de la media de la población, pueden extraerse igualmente algunas conclusiones al comparar, para cada tipo de liposoma, la variación del diámetro y la del volumen incorporado.

Como ya se mencionó anteriormente, en la mayoría de las homogenizaciones se observa que un aumento de la presión o del número de ciclos causa una disminución concomitante del diámetro y del volumen incorporado. Esta es la situación que muestran, por ejemplo, los liposomas SPC y HSPC-Chol procesados 1 y 5 ciclos respectivamente a diferentes presiones (ver Fig.174). De acuerdo con las Figuras 172 y 173, la progresiva disminución del diámetro con la presión de homogenización no va acompañada de una reducción suficiente del número de bicapas que atenúe la disminución del tamaño de los liposomas y, por tanto, la del volumen incorporado. Puede verse que la variación es diferente para cada caso, resultando más intensa para los HSPC-Chol. Por lo tanto, la reducción del diámetro por efecto de la presión no causa

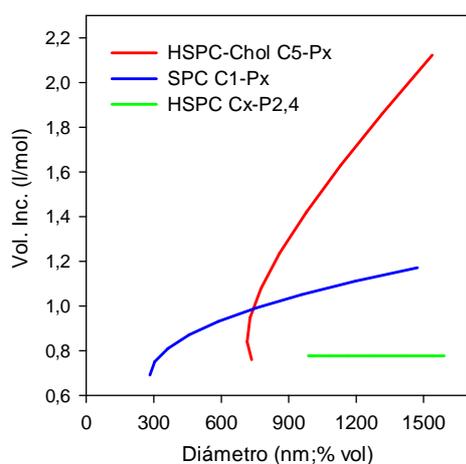


Fig.174: Variación del volumen incorporado en función del diámetro para liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol. Las curvas fueron obtenidas a partir de las ecuaciones calculadas en el apartado 4.2.2.

una disminución del número de bicapas tan acusada como la que tiene lugar para los liposomas de SPC. Ello puede ser debido a que los liposomas HSPC-Chol tienen un volumen incorporado inicial mayor y, por lo tanto, para un diámetro determinado, el número de bicapas será menor al de los liposomas SPC, resultando más difícil reducirlo mediante el procesamiento.

Durante la homogenización, los liposomas HSPC presentan un comportamiento diferente al de los anteriores (Fig.174). Como se aprecia, al mantener la presión constante a 2,4 bar, el incremento del número de ciclos causa una disminución del diámetro, pero no va acompañada de una disminución del volumen incorporado. Si se vuelve a la Fig.172, esto significaría avanzar por una línea paralela al eje correspondiente al diámetro (eje

x) hacia valores menores, lo cual implica necesariamente que el número de lamelas disminuye.

En la Tabla 45, se comparan los porcentajes de incorporación y los volúmenes incorporados, obtenidos para las formulaciones de liposomas estudiadas conteniendo HPTS 2 mM o bien FeAA 1:2 0,24M. Como puede verse, los valores obtenidos para los porcentajes de incorporación de los liposomas convencionales son entre 2 y 3%, lo cual coincide con lo descrito previamente para MLVs compuestos por DODPC conteniendo sacarosa o BSA (Okada et al., 1995). La incorporación de hierro no altera los resultados, excepto para los liposomas SPC,

en los cuales los valores son menores respecto a los hallados para la incorporación de la HPTS. Los porcentajes de incorporación se duplican cuando se emplea el lípido catiónico DC-Chol en reemplazo del colesterol, y prácticamente se cuadruplican cuando los liposomas con carga negativa (10% DPPA) se preparan a una concentración lipídica de 10 mg/ml con el agregado de quitosano a 2 mg/ml. Esto significa que aumentando la concentración de lípidos, podría incrementarse aún más el porcentaje de incorporación. En este sentido, algunos autores postulan que la presencia de lípidos cargados podría provocar repulsión entre las bicapas, lo cual llevaría a un aumento del volumen incorporado (Kulkarni et al., 1995).

Tabla 45: Valores de porcentajes de incorporación obtenidos para las formulaciones de liposomas estudiadas conteniendo HPTS 2 mM o FeAA 1:2 0,24M. Los resultados se expresan como el promedio \pm sd, para $n \geq 3$.

Liposomas	% Incorporación	
	HPTS 2 mM	FeAA 1:2 0,24M
SPC	3,5 \pm 0,4	2,0 \pm 0,3
HSPC	2,9 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1
HSPC-CHOL	3,5 \pm 0,1	3,2 \pm 0,6
HSPC/DC-CHOL	ND	6,1 \pm 1,5
HSPC-CHOL-DPPA10-FEAA-CHI2	ND	11,3 \pm 1,2

Los volúmenes incorporados varían entre los 0,65 l/mol y los 1,51 l/mol para liposomas convencionales. Estos valores se encuentran entre los obtenidos para MLVs extrusionados, compuestos por SPC (1,5 l/mol) (Barnadas-Rodriguez, 1999) y los más bajos, del orden de los 0,5 l/mol, hallados para distintas composiciones de MLVs sin extrusionar (Perkins et al., 1993). En ambos casos, el cálculo del volumen incorporado se realizó a partir de un soluto encapsulado, con lo cual las comparaciones establecidas son válidas. Como es sabido, cuando se emplea esta metodología para determinar el volumen encapsulado, los resultados experimentales pueden ser algo menores que los reales. Este efecto se debe a una menor difusión del soluto hacia los espacios acuosos entre bicapas, lo cual lleva a subestimar el volumen encapsulado total, ya que solo se cuantifica el soluto y no el solvente.

Se calculó además, la concentración de hierro en la suspensión, expresada como mg hierro por cada 100 ml, teniendo en cuenta que la concentración lipídica es de 25 mg/ml. A partir de liposomas convencionales, podrían obtenerse entre 27 y 40 mg de hierro; los liposomas HSPC/DC-Chol permitirían obtener alrededor de 60 mg de hierro encapsulado, mientras que los liposomas con DPPA al 10% y quitosano 2 mg/ml proporcionarían valores de hierro encapsulado superiores a los 100 mg por cada 100 ml de suspensión, un nivel adecuado para su empleo en la terapia contra la anemia. Teniendo en cuenta que la concentración lipídica de los liposomas mucoadhesivos es de 10 mg/ml, el contenido de hierro podría incluso ser mayor, aumentando la concentración de lípidos hasta 50 e incluso 100 mg/ml.

5.2.3. Preparación de liposomas con quitosano

La necesidad de contar con nuevas formas farmacéuticas para la administración oral de sustancias inestables en el tracto gastrointestinal o de baja absorción intestinal, llevó al

desarrollo de sistemas de liberación mucoadhesivos. Debido a sus propiedades bioadhesivas y como "enhancer" de absorción, se ha empleado el quitosano para mejorar la biodisponibilidad de fármacos prolongando el tiempo de residencia en el sitio de absorción (Guputa et al., 1990). Sus características fisicoquímicas y su comportamiento *in vivo* (ver apartado 1.4.2. Introducción), lo han convertido en uno de los polímeros más promisorios para el desarrollo de sistemas de liberación para péptidos hidrosolubles, DNA y antígenos (Paul y Sarma, 2000).

Una de las estrategias para la obtención de estos sistemas mucoadhesivos, consiste en recubrir los liposomas con quitosano, aprovechando el conocimiento previo sobre la obtención y caracterización de estas vesículas lipídicas. Si bien desde principios de los 90 existen antecedentes sobre estos sistemas mixtos, denominados "quitosomas" (Henriksen et al., 1994), resulta difícil realizar un análisis comparativo entre la bibliografía existente y los nuevos resultados que se obtienen. Esto se debe a los múltiples factores que intervienen en su preparación, que llevan a la obtención de productos con diferencias estructurales y con distintos comportamientos tanto *in vivo* como *in vitro*. Entre estos factores, pueden mencionarse los siguientes:

- Características fisicoquímicas del quitosano empleado: origen, aspecto, peso molecular, grado de desacetilación, reproducibilidad lote a lote.
- Concentración del quitosano en la solución de partida.
- Medio de disolución del quitosano.
- Relación entre la concentración de quitosano y la concentración de lípidos.
- Método empleado para la preparación de los liposomas.
- Composición lipídica de los liposomas.
- Método empleado para recubrir los liposomas con quitosano.
- Separación o no, del quitosano no asociado a liposomas.
- Características fisicoquímicas de los quitosomas obtenidos: diámetro medio y distribución de diámetros, potencial Z, volumen incorporado.

El primer factor a tener en cuenta es el origen del quitosano empleado. En la actualidad existe una gran variedad de productos comercializados para distintas aplicaciones. En algunos casos son provistos con certificados de análisis del peso molecular (PM), el grado de desacetilación (DDA) y el contenido de humedad; en otros casos solo se especifican rangos para estos parámetros o bien simplemente se indica si se trata de un quitosano de alta o baja viscosidad, lo cual apenas permite estimar el peso molecular.

Entre los quitosanos que aparecen en la bibliografía se encuentran algunos productos japoneses, como el quitosano Katakurachikkarin (aprox. 150.000 Da; 85% DDA) y los Daichitosan H (alta viscosidad; 500.000-800.000 Da) y VH (muy alta viscosidad; aprox. 1.400.000) Dainichiseika Co; los productos alemanes Wella high viscosity (HV) o low viscosity (LV) y la serie F-LMW (150.000 Da; DDA 84,5%), F-MMW (400.000 Da; 84,7%) F-HMW (600.000 Da; 85% DDA) de Fluka; el de origen canadiense Nova-Chem HV (1.965.000 Da; 75% DDA), así como los productos noruegos Seacure Cl 213 (213.000 Da; 87,5% DDA) y Protasan G 113 (113.000 Da; 87% DDA) comercializados por Pronova Biomedical. En la actualidad estos últimos son los más difundidos para las aplicaciones farmacéuticas, por ser provistos con una caracterización bastante completa, por su aspecto de polvo fino homogéneo y

por su reproducibilidad lote a lote. Sin embargo se trata de un producto que aún tiene un costo muy elevado para aplicaciones que requieran la manipulación de cantidades importantes de polímero. En cuanto a los productos con PM superior a los 500.000 Da, no se hallaron hasta la fecha aplicaciones de los mismos para la preparación de quitosomas, probablemente por la dificultad del manejo de fluidos de tan alta viscosidad.

En este trabajo se empleó el quitosano Grado Práctico (GP) provisto por SIGMA. Si bien se trata de un producto en escamas, más difícil de manipular y solubilizar que los Pronova, pueden prepararse soluciones stock a la concentración deseada y en el medio adecuado para la obtención de los quitosomas. El quitosano GP fue analizado para determinar su grado de desacetilación (DDA) que resultó del 85,2%, similar al resto de las materias primas utilizadas (apartado 4.1.9. Resultados). En cuanto al peso molecular se tuvo en cuenta el rango suministrado por el proveedor, calculado en base a su viscosidad: 190.000 a 375.000 Da, con lo cual se trataría de un quitosano de viscosidad media a baja.

En este sentido existen controversias respecto a la influencia del peso molecular del quitosano en sus propiedades mucoadhesivas y su actividad biológica. Existen estudios que vinculan los altos pesos moleculares con valores elevados de mucoadhesividad (Filipovic-Grcic et al., 2001). Cuando se evaluó la fuerza de despegue de películas preparadas a partir del polímero empleando mucosa intestinal porcina se hallaron los mayores valores para los productos de mayor PM, si bien el quitosano GP SIGMA presentó un valor aceptable (Lehr et al., 1992). Contrariamente a estos resultados, otros autores hallaron que polímeros de bajo PM, alrededor de los 150.000 Da, eran los que presentaban mejores propiedades mucoadhesivas evaluadas mediante un nuevo ensayo *in vitro* empleando partículas de mucina (Takeuchi et al., 1999).

El empleo de quitosanos con pesos moleculares entre intermedios y bajos también fue reivindicado más recientemente, al verificar que los polímeros con altos PMs en solución son más susceptibles de ser fragmentados a lo largo del tiempo, con lo cual el producto final sería menos estable (Kasaai et al., 2003). Además, la mayor solubilidad de los quitosanos de menor PM a distintos pHs, llevaron a aplicar métodos ya conocidos para su fragmentación, como la degradación enzimática (Chang et al., 1998), o a desarrollar nuevas metodologías, como la despolimerización con NaNO_2 (Mao et al., 2004) y la fragmentación del quitosano en medio ácido mediante homogeneización de alta presión (Kasaai et al., 2003). En este último trabajo, el peso molecular de un quitosano de alta viscosidad disminuye de 1.965.000 Da a 824.000 Da, cuando una solución preparada en ácido acético 0,1M / NaCl 0,02M a una concentración de 2 mg/ml es procesada 5 ciclos a 103 MPa. Resultados similares se hallaron en el presente trabajo cuando se homogeneizó 5 ciclos a 92 MPa (equivalente a 4 bar de entrada) una solución de quitosano a la misma concentración, pero preparada en FeAA 1:2 0,24M (ácido ascórbico 0,48 M). El resultado fue una disminución del 50% en la viscosidad, lo cual implicaría una reducción equivalente del peso molecular (apartado 4.2.4. Resultados).

Como ya se mencionó, la viscosidad de las soluciones de quitosano es función del PM y de la concentración del polímero, por lo tanto una vez seleccionada la materia prima, debe fijarse la concentración de la solución de quitosano a partir de la cual se obtienen los quitosomas. En general, se parte de soluciones de quitosano entre 1 y 10 mg/ml preparadas en

medio ácido. Una excepción es el trabajo de Galovic Rengel et al, en el que parten de una solución mucho más diluida (0,01 mg/ml). Atribuyen a esta elevada dilución, una cobertura uniforme del polímero sobre las vesículas que evitaría la agregación de las mismas (Galovic Rengel et al., 2002). En el presente trabajo, como se mencionó en el apartado 4.2.3.5. (Resultados), se emplearon concentraciones entre 2 y 4 mg/ml en ácido ascórbico concentrado (0,48M; pH<3), obteniéndose suspensiones de viscosidad intermedia que facilitaron el procesamiento de la muestra. En otros trabajos, los medios de disolución suelen ser buffers acético-acetato pH 4,4 con concentraciones entre 0,1 y 1N, o también NaCl 0,9% o PBS, ajustando el pH por debajo de 5.

Existen además variaciones en cuanto a la relación quitosano a fosfolípidos ([CHI]/[PLs]). En el trabajo de Galovic Rengel et al. (quitosano 0,01 mg/ml), la solución del polímero era agregada a una suspensión de liposomas con una concentración lipídica de 12 mg/ml, con lo cual resultaba una relación polímero/lípido de $8 \cdot 10^{-4}$ p/p. En el presente trabajo, la relación [CHI]/[PLs] empleada estuvo entre 0,2 y 0,4, lo cual coincide con otros trabajos previos (Takeuchi et al., 1996 ; Takeuchi et al., 2003). Exceptuando los estudios de Galovic Rengel et al., en los que las relaciones empleadas estuvieron entre 0,1 y 2,5.

La preparación de los liposomas a los cuales se agrega el quitosano, se realiza mediante los métodos convencionales, como ser la hidratación de la película lipídica, el método de deshidratación-rehidratación (Kirby y Gregoriadis, 1984) y el método de preparación de proliposomas (Perret et al., 1991). Por lo general se obtienen suspensiones de MLVs, que en algunos casos son extrusionadas por membranas para controlar su tamaño. En cuanto a la composición de los liposomas, ya había sido comentado en la Introducción (apartado 1.4.2.), que si bien la tendencia general es partir de liposomas con una cierta carga negativa, también pueden obtenerse quitosomas a partir de liposomas neutros compuestos por EPC (Henriksen et al., 1994 ; Galovic Rengel et al., 2002). Esto indica que las interacciones entre los componentes fosfolipídicos y el quitosano no son simplemente electrostáticas, como surge de estudios del efecto del mismo sobre la temperatura de transición de bicapas compuestas por DPPC, la cual depende de la concentración del polímero (Fang et al., 2001). Esta situación llevó a incluir en este trabajo la preparación de liposomas neutros conteniendo quitosano (HSPC-Chol-FeAA-CHI). Con ellos se realizaron los ensayos de pH interno y de pérdida de contenido durante la digestión *in vitro*, y de absorción de hierro mediante cultivos celulares para evaluar su comportamiento (apartados 4.5.2., 4.5.3. y 4.6.2.). Confirmando los hallazgos de otros autores, estos liposomas tuvieron un comportamiento similar al observado para liposomas aniónicos recubiertos por quitosano.

La diferencia principal entre los trabajos previos sobre la preparación de quitosomas y el presente trabajo es que en éste, el quitosano es agregado durante la preparación de los liposomas, y no una vez preparados. En todos los antecedentes encontrados, la solución de quitosano y la suspensión de liposomas se mezclan una vez preparadas y en ellos la discusión es acerca del orden de los agregados. Aparentemente, a partir de los trabajos realizados por Henriksen et al, existe un acuerdo en agregar la suspensión de liposomas sobre la solución de quitosano, para que permanentemente haya un exceso de polímero disponible y de este modo lograr un buen recubrimiento. De este modo se obtienen suspensiones ligeramente más turbias

que las originales, pero estables y con un buen aspecto macro y microscópico (Henriksen et al., 1994). La turbidez observada está relacionada con agregados multivesiculares, observados mediante criofractura y microscopía electrónica, que no llegan a inestabilizar la suspensión obtenida.

Otro aspecto a tener en cuenta es el procedimiento empleado para la separación entre los quitosomas y el quitosano libre o en exceso, que podría ser la causa de los agregados. En algunos casos, como es el de Galovic Rengel et al., no se realiza separación alguna, probablemente por que la concentración de quitosano es muy baja respecto a la de los lípidos, como se mencionó previamente (aunque no dan ningún tipo de justificación a este hecho). En otros trabajos, se emplean distintas condiciones de ultracentrifugación según el tipo de vesículas en cuestión, de modo tal que los quitosomas permanezcan en el pellet resultante y el quitosano en exceso, en el sobrenadante. En el presente trabajo, la ultracentrifugación no resultó de utilidad para lograr la separación entre los quitosomas y el quitosano en exceso, como quedó demostrado en el apartado 4.2.3.5. (Fig.82). En ella se observa cómo el quitosano precipita junto con un porcentaje minoritario de los liposomas, luego de la centrifugación durante 30 minutos a 40.000 g, condiciones normalmente empleadas por otros autores.

La determinación del potencial Z permitió estudiar el comportamiento de cada sistema a lo largo del proceso separativo. En la Tabla 46 se muestra una comparación entre los resultados obtenidos para los liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% FeAA 1:2 conteniendo quitosano a concentraciones de 2 y 4 mg/ml, obtenidos según el apartado 4.2.3., y los dos trabajos originales que describen la preparación de quitosomas.

Tabla 46: Comparación entre las determinaciones de potencial Z obtenidas en el apartado 4.2.3.5. (Resultados) durante la puesta a punto de la obtención y purificación de liposomas aniónicos con quitosano, y los valores hallados para Takeuchi et al, 1996 y Henriksen et al, 1994. La formulación estudiada fue HSPC-Chol-DPPA 10% 10 mg/ml con FeAA 1:2 0,24 M y quitosano a 2 y 4 mg/ml, agregado antes de homogeneizar a 55°C y C5-P4. Quitosomas M0: vesículas a las que no se a eliminado el quitosano no asociado; quitosomas M1-SEC: vesículas separadas por SEC y quitosomas pellet: vesículas con quitosano precipitadas por ultracentrifugación. Para los valores experimentales, n≥2. ND: no determinado.

	Resultados apartado 4.2.3.5		Takeuchi et al. (1996)		Henriksen et al. (1994)
	0,2	0,4	0,25	0,5	1,6
[CHI]/[PLS]	0,2	0,4	0,25	0,5	1,6
% Lípidos aniónicos	10	10	20	20	10
Potencial Z liposomas sin CHI (mV)	-17,0 ± 0,4	-17,0 ± 0,4	-23	-23	-25
Potencial Z quitosomas M0 (mV)	-6,5 ± 0,9	+2,1 ± 0,5	-15	-2	+88
Potencial Z quitosomas M1-SEC (mV)	6,0 ± 0,9	7,5 ± 1,0	ND	ND	ND
Potencial Z quitosomas pellet (mV)	ND	ND	ND	ND	+32

Si bien los potenciales Z no son comparables en forma absoluta, ya que los entornos químicos son diferentes en cada caso, pueden sacarse algunas conclusiones de la relación entre los valores. Los potenciales Z de los liposomas originales son claramente negativos, lo cual está de acuerdo con la presencia de fosfolípidos aniónicos en todas las formulaciones (10-20%).

Según los resultados del presente trabajo, presentados en el apartado 4.2.3.5., cuando se agrega quitosano a estos liposomas aniónicos, el potencial Z se vuelve menos negativo debido a que el polímero con carga positiva contrarresta la carga de los liposomas. Este potencial crece aún más al aumentar la concentración de quitosano de 2 a 4 mg/ml. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Takeuchi et al, con la diferencia de que en este último caso, los potenciales Z son más negativos, probablemente debido a que la concentración de fosfolípidos aniónicos es mayor (20% vs. 10%), si bien el medio podría contribuir a la diferencia. En este sentido, el valor hallado por Henriksen et al. es altamente positivo, pero debe tenerse en cuenta que en este caso, la relación $[CHI]/[PLs]$ es mucho mayor (1,6). Estos autores separan el quitosano libre mediante ultracentrifugación, seguida de dos lavados del pellet resultante. El potencial Z obtenido para el pellet de quitosomas es positivo, pero significativamente menor que el correspondiente a la muestra original, lo cual es atribuido a la eliminación del quitosano no asociado a liposomas.

Como puede apreciarse en la Fig.175 (obtenida a partir de la Fig.82), tanto el trabajo de Takeuchi et al. como los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran, para la preparaciones M0 (sin la eliminación el polímero no asociado), un incremento lineal del potencial Z a medida que aumenta la relación CHI/PLs.

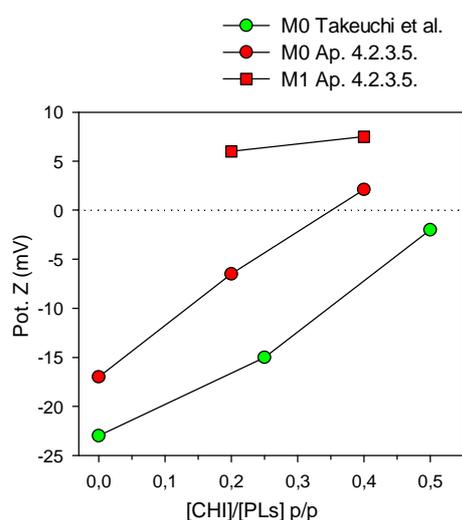


Fig.175: Variación del potencial Z en función de la relación $[CHI]/[PLs]$ para los resultados obtenidos por Takeuchi et al. (1996) y para los resultados presentados en el apartado 4.2.3.5.

En estas condiciones (M1), el potencial detectado proviene exclusivamente de los quitosomas, por lo que los resultados indican que no se produce un incremento notable de la cantidad de polímero asociado a las vesículas.

Esta afirmación queda reforzada si se tiene en cuenta que los liposomas sin quitosano sometidos a SEC también deben tener un potencial negativo, por la presencia del fosfolípidos DPPA (no determinado). Puede sorprender que los potenciales de la muestras M1 resulten más positivos que los de las respectivas muestras M0. Debe tenerse en cuenta que, sin embargo, el entorno químico ha cambiado radicalmente, ya que en las muestras M1 la cromatografía se ha realizado eluyendo con HCl a pH 2. Por lo tanto, además del quitosano libre, se ha eliminado un

El potencial Z a medida que aumenta la relación CHI/PLs. Debe tenerse en cuenta que las soluciones de quitosano en FeAA tienen un potencial Z cercano a los +10 mV, como fue determinado en el apartado 4.2.3.5. Por lo tanto, el aumento del potencial Z debido al incremento de la cantidad de polímero en la suspensión de liposomas no puede justificarse únicamente por el apantallamiento que éste efectúa de las cargas negativas de los liposomas, sino que también puede ser debido a su presencia como polímero libre no asociado. Este último aspecto queda evidenciado en el caso de las muestras tratadas mediante SEC, en las que se ha eliminado el quitosano no asociado a las vesículas. En este caso, el aumento del potencial al duplicar la concentración de quitosano no es muy acusado, con una pendiente que es claramente menor a la de las

elevado porcentaje del hierro y ácido ascórbico totales presentes en el medio. Por este motivo los valores absolutos de las muestras M0 y M1 no son comparables.

Otro aspecto fundamental que puede limitar las aplicaciones de los quitosomas es su diámetro medio. En este sentido, la mayoría de los autores obtiene vesículas multilamelares de gran tamaño, con distribuciones de diámetros muy amplias. En algunos casos, los quitosomas llegan a los 5 μm , lo cual se atribuye a fenómenos de agregación (Takeuchi et al., 1996). En otros casos, partiendo de liposomas neutros compuestos por DPPC y agregando quitosano en relación 0,75 p/p respecto a los fosfolípidos, llegan a diámetros de hasta 27 μm que se atribuyen a la fusión de las vesículas, según lo observado por microscopía de polarización (Fang et al., 2001). Otros autores encuentran un aumento del 25% del diámetro original luego del agregado de quitosano (Galovic Rengel et al., 2002). En este caso, extrusionan las vesículas antes de agregar el polímero, para partir de un diámetro menor y lograr que los quitosomas resultantes no excedan los 1.000 nm. Por lo visto, los resultados obtenidos hasta la fecha no son muy concluyentes.

En este trabajo, los diámetros medios obtenidos cuando el quitosano se agregó antes de la homogeneización (PRE) estuvieron alrededor de los 1.000 nm, mientras que curiosamente, los obtenidos por la mezcla del quitosano con los liposomas ya homogeneizados (POST) fueron menores (600-700 nm) y de igual diámetro medio que sus homólogos sin quitosano (compárese la Tabla 21, apartado 4.2.3.5., con la Tabla 20, apartado 4.2.3.4.). Este hecho podría explicarse por una menor eficiencia de la homogeneización como consecuencia del aumento en la viscosidad de la suspensión de MLVs debido al agregado del quitosano.

Finalmente, no se han hallado antecedentes de que el recubrimiento con quitosano produzca alguna variación en el porcentaje de incorporación o el volumen incorporado. En este trabajo, la incorporación de hierro aumenta en un factor de 10 respecto a los liposomas convencionales (comparar Tabla 23 vs. Tabla 18). Este elevado valor puede tener dos causas diferentes. En primer lugar, existen antecedentes sobre la formación de complejos hierro-quitosano, en los cuales los átomos del metal están coordinados con los grupos $-\text{NH}_2$ y $-\text{OH}$ del polímero (Bhatia y Ravi, 2003). De esta manera, el polímero podría favorecer una mayor encapsulación y evitar, además, que el hierro sea desencapsulado durante la separación por SEC. Por otro lado, dado que el quitosano en este trabajo se agrega antes de la homogeneización, parte del mismo puede encapsularse en el interior acuoso del liposoma, sobretodo teniendo en cuenta que la homogeneización disminuye su peso molecular. De este modo, el contenido en hierro de los liposomas no sería función únicamente de su volumen acuoso interno, sino también de la cantidad de quitosano asociado a las vesículas.

5.2.4. Separación de liposomas de enzimas y extracto de bilis

La purificación de los liposomas del medio de digestivo conteniendo enzimas y sales biliares se estudió para proteger los cultivos celulares del contacto con un medio potencialmente agresivo. Algunos autores habían observado que la suspensión resultante de las muestras digeridas resultaba tóxica para los cultivos de Caco-2 (Gangloff et al., 1996a). Según estos resultados, otros autores evitaron el contacto de las células con las enzimas digestivas mediante membranas de diálisis (con un corte de 12.000 Da), que sólo eran atravesadas por el

hierro soluble (Glahn et al., 1996), o bien inactivaban las enzimas mediante un tratamiento a 100°C durante unos pocos minutos (Jovani et al., 2001). Estos tratamientos tenían como objeto prevenir que la actividad enzimática disminuyera la adhesión de las monocapas a la placa, lo cual podía implicar una pérdida de material. Sin embargo, no evitaban el efecto de las sales biliares sobre las uniones estrechas intercelulares, lo cual podía alterar las mediciones de transporte. Este efecto había sido empleado como estrategia para favorecer la absorción paracelular, como se indicó en el apartado 1.9.3. (Introducción). Sin embargo, otros autores no hallaron variaciones morfológicas ni tampoco en los valores de resistencia eléctrica transepitelial (ver apartado 5.5.) cuando se incubaron las células Caco-2 a una concentración de 6,8 mM de taurocolato de sodio, un valor mucho mayor que la empleada en las siembras en este trabajo (Degim et al., 2004).

En el presente trabajo, la utilización de una membrana de diálisis no era posible, ya que habría impedido la interacción de los liposomas con las células. Tampoco era factible aplicar un tratamiento a 100°C que podría alterar las características fisicoquímicas de los liposomas. Esta situación llevó a realizar ensayos tendientes a obtener liposomas digeridos libres de enzimas o sales biliares.

Teniendo en cuenta algunos antecedentes del empleo de SEC en Biogel para separar liposomas de proteínas séricas (Chonn et al., 1991), se realizaron ensayos empleando BioGel A-0,5m y A-15m para evaluar si era posible utilizarlos para separar los liposomas del medio digestivo. Ambos son geles de agarosa ampliamente empleados para la separación de macromoléculas biológicas como proteínas, polisacáridos y ADN.

La separación entre liposomas y pancreatina resultaba crítica, ya que la pancreatina es una mezcla de enzimas que contiene lipasa y fosfolipasa, enzimas que podrían degradar los liposomas durante el proceso de incubación de las células (posterior a la digestión *in vitro* de la muestra). Aunque también se estudió la separación entre la pepsina y los liposomas, esta enzima tiene muy baja actividad al pH neutro al cual se incuban las células, con lo cual su separación no resultaba tan crítica.

Como se demostró en el apartado 4.2.5. (Resultados), la separación entre los liposomas y el medio digestivo resultó adecuada cuando se emplearon columnas de BioGel A-15m. Sin embargo, este método separativo no fue empleado finalmente para purificar los liposomas antes de ser incubados con las células. Esta decisión se tomó al observar que las vesículas de la mayoría de las formulaciones de liposomas que contenían FeAA, sufrían un marcado incremento del volumen medio por efecto de la digestión *in vitro* (apartado 4.5.1.). Estos cambios estructurales impidieron una correcta elución a través de las columnas de BioGel, a pesar del empleo de una bomba peristáltica. Por lo tanto los cultivos celulares debieron incubarse con los liposomas sin separar del medio digestivo.

Por este motivo se verificó que las enzimas y las sales biliares no tienen ningún efecto sobre las monocapas de células. Como se mostró en el apartado 4.6.1., las células incubadas con liposomas digeridos presentaron un comportamiento similar al de las células blanco (incubadas con buffer uptake, sin liposomas) en cuanto al aspecto microscópico, el contenido de hierro basal y el contenido de proteína en los extractos celulares correspondientes. Tampoco se hallaron diferencias para la absorción de hierro a partir de soluciones FeAA digeridas en

presencia o no de enzimas y sales biliares. Una posible explicación para estos resultados es el valor de las diluciones realizadas sobre las muestras digeridas antes de la incubación, necesarias para obtener una determinada concentración teórica de hierro total (alrededor de los 100 μM). Probablemente, estas diluciones hayan tenido el efecto de suprimir o al menos disminuir hasta valores no detectables, la acción de las enzimas y las sales biliares sobre los cultivos celulares. De hecho, la concentración de sales biliares en las muestras digeridas evaluadas mediante los cultivos celulares fue de 0,2 mM como máximo, realizando el cálculo en base a las muestras cuyas diluciones fueron menores.

5.3. ESTUDIOS DE SOLUBILIZACIÓN DE LIPOSOMAS

5.3.1. Solubilización con TX-100

Debido a sus propiedades como agente solubilizante de proteínas de membrana, el Triton X-100 ha sido objeto de un gran número de estudios para establecer las condiciones de solubilización de distintas formulaciones. En algunos casos, el objetivo es caracterizar el comportamiento de las membranas biológicas frente a agentes surfactantes, empleando como modelos distintas formulaciones de liposomas. En otros, los estudios están orientados a optimizar el diseño de sistemas de liberación. En este sentido, el TX-100 resulta más activo que algunos surfactantes fisiológicos, con lo cual puede emplearse para predecir el comportamiento de los liposomas en presencia de otros tensioactivos, de cinéticas más lentas (Okada et al., 1995).

En el presente trabajo, los ensayos de solubilización con TX-100 se realizaron con el objeto de obtener soluciones ópticamente transparentes a partir de suspensiones de liposomas, de manera que no interfirieran en las determinaciones cuantitativas de las sustancias incorporadas, ya sea por fluorimetría o por espectrofotometría. Teniendo en cuenta esto, se empleó únicamente la turbidimetría para monitorear los cambios en la densidad óptica de los liposomas incubados con concentraciones crecientes de tensioactivo.

Como se describió en el apartado 3.5.5., la concentración de lípidos se fijó en un valor adecuado para las mediciones y se obtuvieron las condiciones que permitieron la completa solubilización de distintas preparaciones de las tres formulaciones de liposomas convencionales. Para unificar el protocolo final de solubilización, se adoptaron para todas las formulaciones las condiciones halladas para las preparaciones más resistentes. Por lo tanto, aunque el objetivo de los ensayos realizados con TX-100 es analítico, esto no resulta un impedimento para que los datos obtenidos también permitan caracterizar parcialmente las preparaciones obtenidas.

En la Tabla 47 se muestra un resumen de las condiciones de solubilización con TX-100 para liposomas HSPC, SPC y HSPC-Chol, en base a los resultados mostrados en el apartado 4.3.1. Las concentraciones indicadas en ella, son las mínimas que causan la solubilización total y se expresan en mM para poder realizar comparaciones con la bibliografía (a diferencia de lo indicado en Resultados, donde se expresan en mg/ml por motivos prácticos). En el caso de las mezclas HSPC/Chol 3:2 mol/mol, se ha utilizado el peso molecular promedio (604,7 Da). En este caso, y debido al desarrollo experimental en el cual no se han obtenido curvas de

solubilización, los resultados presentan una elevada incertidumbre. Por otro lado, debe tenerse en cuenta que, en el método analítico, las concentraciones de tensioactivo utilizadas han sido mayores con la finalidad de asegurar la completa solubilización de las vesículas.

Tabla 47: Condiciones necesarias para la solubilización de liposomas convencionales con TX-100 y estimación de R_e^{sol} . Las condiciones corresponden a las requeridas para solubilizar aquellas preparaciones más resistentes al tensioactivo. (*) Los valores de R_e^{sat} son aproximados.

Liposomas	[Lípidos] (mM)	[TX-100] (mM)	[Lípidos]/[TX-100]	R_e^{sol} (mM) (estimada)	Temperatura (°C)	Tiempo
SPC	0,80	2,32	2,9	2,60	25	SEG
HSPC	0,88	0,62	0,70	0,43	55	SEG - MIN
HSPC-CHOL	0,41	15-46	37-112	36-112	55	3-19 H

Como se desprende de la Tabla, todas las preparaciones de liposomas SPC se solubilizan casi instantáneamente, a temperatura ambiente (25°C) cuando la relación molar TX-100/lípidos es mayor o igual a 2,9. Esta relación no es equivalente al R_e^{sol} , ya que corresponde a un único punto de la curva de solubilización y, al no haberse determinado la D_w^{sol} , no es posible calcularlo con precisión (ver apartado 1.5.3., Introducción). Ahora bien, debido a que la CMC de los tensioactivos es del mismo orden que la D_w^{sol} , puede realizarse una estimación de R_e^{sol} a partir del valor de la CMC del TX-100 (0,24 mM). Este cálculo proporciona una R_e^{sol} de 2,6, un valor cercano a 3,6, que fue hallado para MLVs compuestos por EPC (Partearroyo et al., 1992) y algo menor que el valor de 5,3 obtenido para LUVs de la misma composición (López et al., 1998). De todos modos, los resultados obtenidos coinciden con los primeros estudios de solubilización de bicapas con TX-100, que postulan la necesidad de una relación mayor que 2 para lograr una solubilización completa (Dennis, 1974).

Con respecto a los tiempos de incubación, si bien los trabajos mencionados emplean 24 horas, no muestran cinéticas a tiempos menores que fundamenten la necesidad de emplear tiempos de incubación tan prolongados para vesículas compuestas por EPC ó SPC. Otros autores demostraron que con liposomas compuestos por EPC:EPA (9:1), se alcanzaba el equilibrio al cabo de unos 2 ó 3 minutos y que la turbidez permanecía constante luego de 5 horas, independientemente de si se trataba de SUVs, MLVs ó LUVs (Paternostre et al., 1988). Estos resultados contradecían los hallados por otros autores sobre los largos tiempos de equilibrio requeridos por los MLVs, debido a la partición del tensioactivo en las distintas bicapas lipídicas (Goñi et al., 1986). Más recientemente, se confirmó que SUVs compuestos por fosfolípidos insaturados (palmitoil-oleil-fosfatidilcolina) y a una R_e^{sol} de 2,5 se solubilizaban completamente en menos de 2 minutos a temperaturas entre 10 y 37°C, empleando relaciones tensioactivo/fosfolípido mayores a la R_e^{sol} del sistema (Schnitzer et al., 2003).

En cuanto a las curvas "Absorbancia vs. Concentración de tensioactivo", los perfiles correspondientes a la solubilización de liposomas SPC SUVs (ver Fig.96), presentaron un incremento en la turbidez de casi el 200%, como había sido descrito previamente (Paternostre et al., 1988). Por el contrario, los MLVs de igual composición mostraron perfiles en los cuales el máximo de turbidez no era detectable.

Hasta hace unos años, existían muy pocos antecedentes de estudios de solubilización con TX-100 para liposomas compuestos por lípidos saturados. En estos estudios se realizaban mediciones puntuales inmediatamente después de mezclar los lípidos con el tensioactivo (Nyholm y Slotte, 2001) o bien al cabo de 1 hora de incubación (Patra et al., 1998) sin verificar que se llegara al equilibrio, lo cual se manifiesta mediante la lectura constante de la densidad óptica. Además, se incubaba en todos los casos a temperatura ambiente.

Los ensayos realizados con MLVs HSPC a una temperatura de 25°C, demostraron que al cabo de 30 minutos de incubación a una relación molar TX-100/fosfolípido de 0,70, la turbidez solo había disminuido alrededor de un 20% (ver Fig.91, apartado 4.3.1.1.) y mostraba una clara tendencia a permanecer constante.

Estos resultados son comparables a los estudios sistemáticos realizados por Schnitzer et al., que demostraron que la solubilización de los liposomas saturados ocurre muy lentamente cuando se incuban a temperaturas por debajo de la T_m (Schnitzer et al., 2003). Así, la

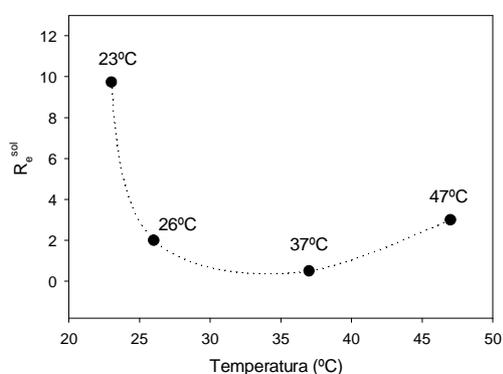


Fig.176: Variación de la R_e^{sol} con la temperatura de incubación para SUVs de DPPC incubados durante 18 h (Schnitzer et al., 2003).

solubilización a 26°C de SUVs compuestos de DPPC, se alcanzaba en forma rápida (unos 50 minutos), recién a partir de una relación molar tensioactivo/fosfolípidos mayor que 6,5; mientras que a relaciones molares menores que 6, la solubilización ocurría a tiempos mucho mayores (varias horas) y los perfiles presentaban los típicos máximos de turbidez observados para vesículas pequeñas. Para una relación de aproximadamente 1, por ejemplo, no había solubilización ni siquiera al cabo de 13 horas de incubación.

En el caso de los liposomas de HSPC cabe esperar una mayor resistencia a la solubilización de la que muestran los de DPPC, ya que en el primer caso la longitud promedio las cadenas hidrocarbonadas es mayor (ver Tabla 2, apartado 1.2., Introducción), lo que da origen a bicapas más compactas con una mayor temperatura de transición que las de DPPC. Es por este motivo que se descartó la posibilidad de realizar las solubilizaciones a temperatura ambiente.

Las incubaciones de los liposomas HSPC a 55°C, una temperatura levemente superior a su T_m (52°C), muestran que en la mayoría de formulaciones la solubilización se produce a relaciones molares mayores o iguales a 0,70 (Fig.95, apartado 4.3.1.1.). Cabe aclarar que la solubilización total, evidenciada por valores de absorbancia no detectables, no se revirtió una vez que la muestra se llevó a 25°C, por lo menos durante el tiempo necesario para permitir las determinaciones analíticas sin interferencias.

Si se aplica el mismo criterio que el utilizado para los liposomas de SPC, se estima una R_e^{sol} de 0,43. Los estudios de Schnitzer et al. con liposomas SUV de DPPC ($T_m = 41^\circ\text{C}$), muestran, a 3°C por encima de la T_m , una R_e^{sol} situada entre 1 y 2 (Fig.176).

Un comportamiento diferente se observó en las formulaciones de HSPC C5-P2,4 y C5-P4 homogeneizadas a 55°C, que requerían una relación molar TX-100/fosfolípidos de 18 para su

solubilización a 55°C, un valor muy elevado si se compara con los anteriores. No se ha encontrado explicación para este fenómeno en suspensiones cuya única diferencia respecto a las anteriores es la distribución de tamaños de sus vesículas, como consecuencia de las condiciones de homogeneización. Por lo tanto, se consideran excepciones al proceso de solubilización de este tipo de liposomas, a pesar de haberse empleado sus condiciones de solubilización como las habituales en las determinaciones analíticas, para asegurar valores de absorbancia no detectables en todas las muestras.

Con respecto a los tiempos de equilibrio, las formulaciones de HSPC con una R_e^{sol} aproximada de 0,43, lo alcanzan en unos 10 minutos, valor que puede considerarse inmediato si se tiene en cuenta que las muestras parten de 25°C y se les aplica una rampa de temperatura hasta 55°C. Este resultado coincide con el de los SUVs de DPPC preparados por

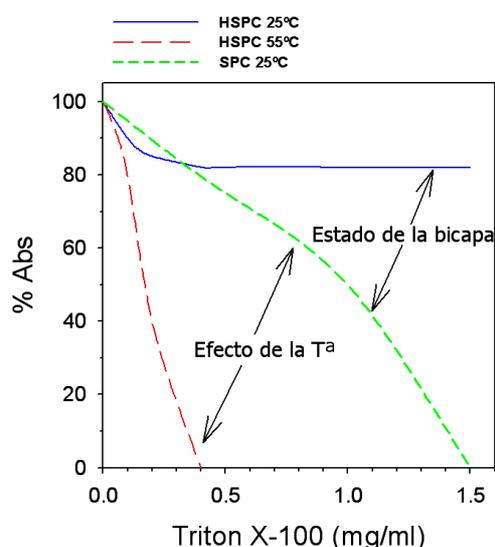


Fig.177: Variación de la absorbancia en función de la concentración de TX-100 para distintas formulaciones de liposomas MLVs a temperaturas superiores o inferiores a sus respectivas T_m . Se indican las variaciones que dependen del estado de la bicapa y las que dependen de la temperatura.

Schnitzer, que experimentan a 47°C, una solubilización inmediata a la R_e^{sol} correspondiente (mientras que para que sea inmediata a 37°C debe emplearse una relación tensioactivo/lípidos que triplique la R_e^{sol} a esa temperatura).

Nuevamente, se observan diferencias en las formulaciones de HSPC C5-P2,4 y C5-P4 homogeneizadas a 55°C, que muestran una velocidad de solubilización mucho menor. A 55°C, y con una relación molar TX-100/fosfolípido de 18, son necesarios entre 30 y 60 min para que se alcance una absorbancia prácticamente nula (ver Tabla 26, apartado 4.3.1.1.).

Por lo tanto, la solubilización de las vesículas lipídicas de HSPC con TX-100 depende del estado físico de las bicapas. Los dos factores más importantes que determinan la susceptibilidad a la solubilización son la concentración del tensioactivo requerida y la temperatura del proceso. El equilibrio de solubilización no es necesariamente instantáneo, y puede alcanzarse en horas y hasta días, según la temperatura de incubación y la relación tensioactivo/lípidos. Si las mediciones se realizan sin tener en cuenta si el sistema se encuentra en equilibrio, los valores de R_e^{sol} obtenidos pueden ser erróneos.

La comparación de los resultados discutidos hasta el momento permite determinar, por separado, el efecto del estado de las bicapas y de la temperatura sobre la solubilización de los liposomas. En efecto, si se comparan los resultados de las solubilizaciones de MLVs de SPC con los de HSPC a 25°C, se observa en qué grado el estado de la bicapa facilita el proceso de solubilización por TX-100 (Fig.177).

Complementariamente, las curvas correspondientes a SPC a 25°C y a HSPC a 55°C permiten observar los cambios en el proceso debidos únicamente a la diferencia de temperatura,

ya que en ambas formulaciones las bicapas están en estado cristal-líquido y están compuestas por fosfatidilcolina de soja con cadenas hidrocarbonadas de la misma longitud (hidrogenadas en el caso de la HSPC).

Por otro lado, la aceleración de la interacción entre el tensioactivo y los liposomas también se pone de manifiesto en las cinéticas de absorbancia a 511 nm. Como puede apreciarse, en presencia de pequeñas cantidades de TX-100 la absorbancia disminuye rápidamente incluso antes de alcanzar la temperatura de pre-transición. Contrariamente, en ausencia del tensioactivo la variación de la absorbancia es lenta hasta alcanzar dicha temperatura (Fig.92). Por lo tanto, la temperatura acelera notablemente la inserción del tensioactivo en la bicapa aunque ésta se encuentre todavía en estado gel-sólido.

Finalmente, el agregado de colesterol a los liposomas HSPC a una relación molar fosfolípidos:colesterol 3:2, tiene un efecto notable sobre el comportamiento frente al TX-100. En las formulaciones obtenidas a partir de películas clorofórmicas, es decir, aquéllas en las que ha desaparecido la transición de fase debido a la homogeneidad de la bicapa, la solubilización con TX-100, a una temperatura de 55°C, muestra una relación molar tensioactivo/lípidos situada entre 37 y 112, y se requieren entre 3 y 19 horas para llegar al equilibrio. Ese valor es,

como mínimo, unas 53 veces la relación molar tensioactivo/lípidos requerida para los liposomas HSPC (sin colesterol) mostrada en la Tabla 47. Este hecho da idea de la gran estabilidad de los liposomas de HSPC/Colesterol frente al TX-100.

Las formulaciones con HSPC/Chol que presentan transición de fase, es decir, las obtenidas a partir de películas en etanol o por mezcla de los componentes sólidos, muestran un comportamiento algo diferente de las anteriores. Al incubarlas con TX-100 a 55°C, alcanzan el equilibrio (o bien lecturas prácticamente no detectables de absorbancia) más lentamente (Tabla 28, apartado 4.3.1.3.). Este fenómeno refuerza la idea de la existencia de heterogeneidades en las membranas,

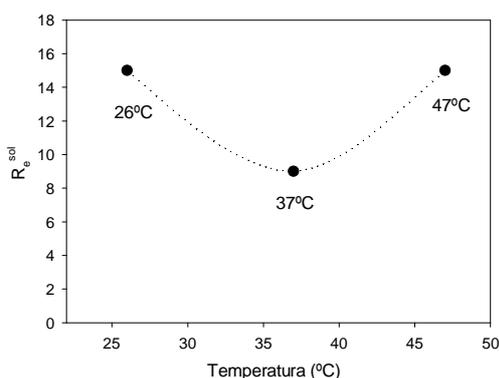


Fig.178: Variación de la R_e^{sol} con la temperatura de incubación para SUVs de DPPC-Chol 2:1 incubados entre 2 y 3 horas (Schnitzer et al., 2005).

con dominios ricos en colesterol en las bicapas resistentes a la solubilización, como sugerían los termogramas obtenidos por DSC.

La existencia de esta cinética tan lenta llevó en algunos casos a reemplazar el método de obtención de soluciones con TX-100, por el método de la mezcla monofásica descrito en el apartado 3.3.4.3. (Materiales y Métodos).

Las cinéticas de solubilización de liposomas compuestos por mezclas HSPC/colesterol con TX-100 habían sido estudiadas previamente, pero los resultados obtenidos son cuestionables, ya que la solubilización se medía 1 hora después de la mezcla de los lípidos con el tensioactivo (Saez-Cirion et al., 2000 ; Sot et al., 2002). Recientemente, estudios realizados con liposomas SUVs compuestos por DPPC/Chol (2:1 mol/mol), demostraron que, como en los liposomas de HSPC, también en este sistema la R_e^{sol} pasa por un valor mínimo a 37°C,

temperatura a la cual los liposomas son menos resistentes a la solubilización. Por lo tanto se repite el comportamiento de los liposomas DPPC sin colesterol, sólo que, en este caso, los valores de R_e^{sol} (entre 12 y 14) son mucho mayores que para los liposomas DPPC, como se observa en la Fig.178 (Schnitzer et al., 2005).

En el presente trabajo no se han obtenido curvas de solubilización para las formulaciones de HSPC/colesterol, ya que dada su estabilidad, se procedió a determinar, por exceso, la concentración y tiempo necesarios para solubilizar este tipo de liposomas. Por este motivo no puede realizarse una estimación fiable de la R_e^{sol} : los cálculos dan un rango de valores que oscila entre 36 y 112. A pesar de esto, y como ya ha sido indicado, los valores de las relaciones molares tensioactivo/lípido permiten apreciar que, como en el caso de Schnitzer, la inclusión del colesterol incrementa de forma extraordinaria la cantidad de TX-100 necesaria para la solubilización de los liposomas. Asimismo, como en el caso de los liposomas HSPC, la solubilización total de los liposomas no resulta reversible cuando se estabilizan las muestras a 25°C, por lo menos durante el tiempo que dura la determinación analítica correspondiente (espectrofotométrica o fluorimétrica).

En la Tabla 48 se presenta una comparación entre los liposomas preparados en el presente trabajo y los descritos en la bibliografía mencionada.

Tabla 48: Comparación entre las condiciones halladas para la solubilización con TX-100 de diferentes tipos de liposomas caracterizados según la bibliografía mostrada y el presente trabajo. En los casos en que las vesículas se componen de fosfolípidos saturados, las temperaturas de incubación (T_{inc}) se encuentran 3°C por encima de las T_m de dichos lípidos.

	Bibliografía			HERMIDA (2006)		
Liposomas	T_{inc}/T_m (°C)	R_e^{sol}	Tiempo	T_{inc}/T_m (°C)	R_e^{sol} (estimada)	Tiempo
PC	25 / <0	2 a 5,3	seg a min	37 / <0	2,6	seg
Tipo de vesícula	MLVs y SUVs			MLVs y SUVs		
PC saturada	44 / 41	1 a 2	seg	55 / 52	0,43	seg a min
Tipo de vesícula	SUVs DPPC			MLVs HSPC		
PC saturada y colesterol	44 / 41	12 a 14	2 a 3 h	55 / 52	36 a 112	3 a 19 h
Tipo de vesícula	SUVs DPPC/Chol 2:1 mol/mol			MLVs HSPC-Chol 3:2 mol/mol		

En los casos en que se estudian liposomas compuestos por fosfolípidos saturados, los valores de las R_e^{sol} se obtuvieron a temperaturas 3°C superiores a la T_m del fosfolípido considerado.

Como se observa, independientemente de que se trate de SUVs o MLVs, los liposomas compuestos únicamente de PC saturada e incubados a una temperatura superior a su T_m , tienen una R_e^{sol} inferior a los formados por PC insaturada. Esta menor resistencia a la solubilización, como ya se ha explicado, es una consecuencia de la temperatura a la que se realiza el proceso. En el caso de los liposomas compuestos por PC saturada y colesterol, la resistencia a la solubilización es notable, y se hace más evidente si se tienen en cuenta los tiempos en que se alcanza el equilibrio.

En ambos casos la R_e^{sol} es muy superior al de las otras formulaciones. Por otro lado, es probable que las diferencias entre los HSPC/Chol y los DPPC/Chol se deban a la estructura de vesículas multilamelares presente en los liposomas estudiados en el presente trabajo y a su mayor contenido de colesterol: un 40 % en los MLVs de HSPC-Chol 3:2 mol/mol, frente a un 33 % en los SUVs de DPPC 2:1 mol/mol.

Los resultados obtenidos indican que no sólo la composición sino también el método de obtención y por lo tanto la estructura de las vesículas obtenidas, influyen en su comportamiento frente a los tensioactivos. Los liposomas MLVs que contienen colesterol han demostrado una menor susceptibilidad a la solubilización respecto a los SUVs, lo cual, *a priori*, los convierte en un buen modelo para resistir la acción de tensioactivos naturales, como las sales biliares.

5.3.2. Solubilización con extracto de bilis

En el apartado 4.3.2. se mostraron las curvas "Concentración de tensioactivo vs. Concentración de lípidos" obtenidas para la solubilización de los tres tipos de liposomas convencionales con el extracto de bilis (Ver Figuras 101, 106 y 110).

En dicha sección, las concentraciones se expresaban en mg/ml por razones de

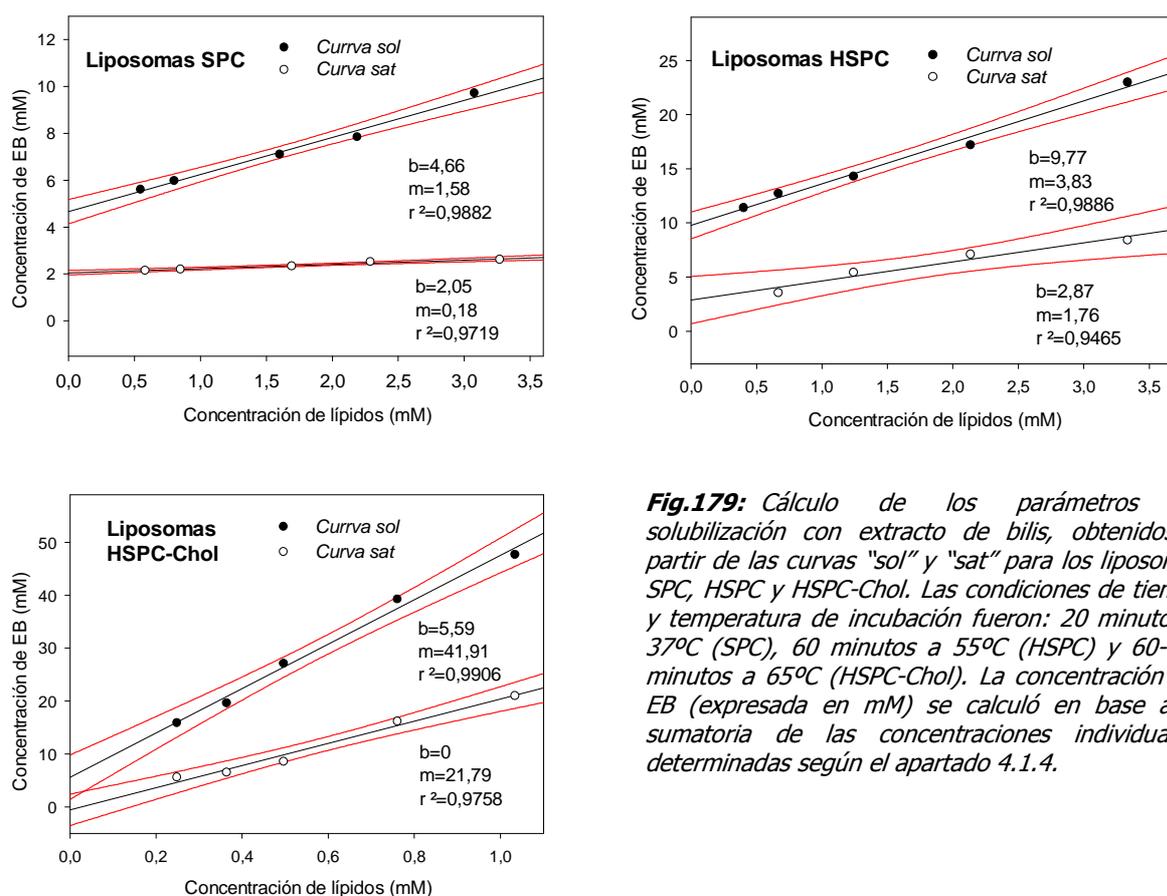


Fig.179: Cálculo de los parámetros de solubilización con extracto de bilis, obtenidos a partir de las curvas "sol" y "sat" para los liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol. Las condiciones de tiempo y temperatura de incubación fueron: 20 minutos a 37°C (SPC), 60 minutos a 55°C (HSPC) y 60-120 minutos a 65°C (HSPC-Chol). La concentración del EB (expresada en mM) se calculó en base a la sumatoria de las concentraciones individuales, determinadas según el apartado 4.1.4.

practicidad. Sin embargo, el cálculo de los parámetros que caracterizan las distintas etapas de la solubilización y la comparación con la bibliografía sobre el tema, requiere transformar ambas concentraciones en mmoles/l (mM). En el caso de los lípidos no es problemático, ya que suele

emplearse un peso molecular promedio de 750 Da, tanto para la SPC como para la HSPC. Para los liposomas HSPC-Chol 3:2, la conversión se realiza calculando un peso molecular medio (604,7 Da), que es un promedio pesado obtenido a partir de los pesos moleculares de la HSPC y el colesterol.

Para expresar la concentración de EB en mM, se calculó la concentración de cada sal biliar en el extracto, según la composición determinada en el apartado 4.1.4., y se obtuvo un valor total en mM, a partir de la sumatoria de las concentraciones individuales (2 mg/ml de EB = 3,74 mM EB). Una vez realizadas estas conversiones, se graficaron nuevamente las curvas "sat" y "sol" para cada formulación, obteniéndose las curvas de la Fig.179. Como se explicó en el apartado 1.5.3. (Introducción), la pendiente de la recta "sat" es el parámetro R_e^{sat} , que indica la relación tensioactivo/lípidos en las vesículas saturadas con tensioactivo, mientras que la ordenada al origen es el parámetro D_w^{sat} , que representa la concentración de detergente monomérico en la fase acuosa, en equilibrio con las vesículas saturadas.

Del mismo modo se obtuvieron los parámetros correspondientes a las curvas "sol". Los coeficientes de correlación (r^2) fueron mayores que 0,94 en todos los casos, lo cual implica un alto grado de correlación entre los datos, teniendo en cuenta que la asignación de los puntos D_t^{sat} y D_t^{sol} en los perfiles "Absorbancia vs. concentración de tensioactivo" suele tener asociada una alta incertidumbre.

Con los valores hallados se confeccionó la Tabla 49, en la que comparan las condiciones de solubilización con EB halladas para las tres formulaciones de liposomas convencionales estudiadas.

Tabla 49: Parámetros que caracterizan la solubilización de liposomas convencionales con extracto de bilis. Los valores de R_e y D_w se calcularon a partir de las pendientes y ordenadas al origen respectivamente, de las curvas "sol" y "sat" de la Fig.179. El valor K es el cociente entre R_e^{sat} y D_w^{sat} . ND: no determinado.

Liposomas	R_e^{sat}	D_w^{sat} (mM)	K (mM ⁻¹)	R_e^{sol}	D_w^{sol} (mM)	R_e^{sol} / R_e^{sat}	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
SPC	0,18	2,05	0,088	1,58	4,66	8,78	37	20
HSPC	1,76	2,87	0,613	3,83	9,77	2,18	55	60
HSPC-Chol	21,81	ND	ND	41,9	5,59	1,92	65	60-120

El parámetro que mejor expresa la resistencia o susceptibilidad a la solubilización con un tensioactivo a una determinada temperatura es el R_e^{sol} , que es la relación efectiva tensioactivo/lípidos presente en las micelas mixtas. Como se desprende de la Tabla 49, los liposomas HSPC presentan una R_e^{sol} 2,4 veces mayor que sus homólogos insaturados, incluso a una temperatura por encima de su T_m (alrededor de los 52 °C). La incorporación de colesterol a los liposomas saturados aumenta la resistencia a la solubilización en un orden de magnitud, incluso teniendo en cuenta que la mayoría de los ensayos se realizó, en este caso, a una temperatura aun mayor (65°C). Como ya se comentó en los resultados, el aumento de 10°C en la temperatura de incubación respecto a la empleada con los liposomas HSPC, se implementó con el objeto de acelerar la cinética de solubilización. Los R_e^{sol} de los pocos ensayos realizados a 55°C fueron equivalentes a los obtenidos a 65°C, y sólo varió tiempo necesario para alcanzar valores estables de absorbancia, que resultó menor a la temperatura más elevada.

Por otro lado, se observa que el valor de R_e^{sol} obtenido para liposomas HSPC a 55°C solubilizados con el EB ($R_e^{sol}=3,83$; Tabla 49) es mayor que el estimado para los mismos liposomas empleando TX-100 ($R_e^{sol}=0,43$; Tabla 48, apartado 5.3.1.), con lo cual se deduce que las sales biliares son menos eficientes que el TX-100 para solubilizar estos liposomas. En el caso de los liposomas HSPC/Chol, la efectividad del EB resulta comparable a la del TX-100. Respecto a los liposomas SPC, no pueden realizarse comparaciones debido a que la temperatura de incubación es de 25°C cuando se utiliza TX-100 y de 37°C al emplear EB. En este caso, la aparente mayor efectividad de solubilización con el EB podría ser debida a la mayor temperatura de incubación.

En cuanto a los valores de R_e^{sat} , se observa un comportamiento similar a los R_e^{sol} con la diferencia de que el valor obtenido para los liposomas saturados (HSPC) es en este caso un orden mayor a los insaturados (SPC). El mismo incremento se observa entre los liposomas HSPC y HSPC-Chol. Por lo tanto, nuevamente, y a pesar de la mayor temperatura, los liposomas que incorporan fosfolípidos saturados con o sin colesterol muestran una mayor resistencia a la solubilización. El mayor valor de R_e^{sat} indica, en este caso, que aunque la temperatura respecto de los liposomas de SPC sea mayor, es necesaria una mayor concentración de EB para saturar las membranas e iniciar la solubilización de las vesículas.

Estos hechos coinciden con numerosos estudios previos que postulan que la inserción de sales biliares se ve dificultada por la presencia de fosfolípidos saturados en la composición de la bicapa y más aún en presencia de colesterol. En los primeros estudios de estabilidad frente a las sales biliares, se había demostrado que los liposomas en fase gel-sólido compuestos por DSPC ($T_m=58^\circ\text{C}$) resistían la solubilización por sales biliares a concentraciones de 10 mM, mientras que los liposomas en fase fluida a 37°C, como los DMPC ($T_m=23^\circ\text{C}$) eran solubilizados completamente, liberando su contenido (Rowland y Woodley, 1980). Posteriormente, Nacka et al. hallaron un valor de 15,4 para R_e^{sol} , lo cual resultaba excesivo en comparación con los resultados de otros autores, teniendo en cuenta además, que los liposomas estaban compuestos por fosfolípidos insaturados (Nacka et al., 2001a). Este hecho fue atribuido a la presencia de un 27% de colesterol en la mezcla lipídica con la que se preparaban los liposomas. Previamente se había observado que a medida que aumentaba la concentración de colesterol en la bicapa, se requería una mayor concentración de tensioactivo para llegar a la saturación de las mismas (Schubert et al., 1986). Otros trabajos hallaron valores de 0,5 para la R_e^{sat} de liposomas de EPC incubados a temperatura ambiente con taurodesoxicolato. El agregado de un 20% y un 50% de colesterol, incrementó dicho valor a 1 y 2 respectivamente, lo cual evidenciaba una mayor resistencia a la micelización (Verkade et al., 1996). Empleando colato de sodio, Kokkona et al. compararon la disminución del 50% en el diámetro medio hallada para liposomas DPPC, luego de la incubación durante 24 h a 37°C (relación molar colato/lípidos=4), con la de los liposomas DPPC-Chol, que no presentaban variación alguna (Kokkona et al., 2000).

Prácticamente todos los antecedentes sobre estudios de solubilización con sales biliares fueron realizados con liposomas pequeños o grandes unilamelares (SUVs ó LUVs). Como se mencionó en el apartado anterior (solubilización con TX-100), los MLVs tienen comportamientos más complejos de interpretar, debido a que el tensioactivo o en este caso la mezcla de tensioactivos, debe insertarse en las múltiples bicapas. Probablemente este hecho explique que

los valores de R_e^{sat} y R_e^{sol} presentados en la Tabla 49, sean mucho mayores que los hallados para liposomas SUVs compuestos por DPPC (similares a los HSPC) cuando se incubaron con colato y desoxicolato de sodio, a una temperatura de 60°C (Hildebrand et al., 2004). En este caso, los valores obtenidos para R_e^{sat} y R_e^{sol} fueron de 0,21 y 0,32 respectivamente para el colato de sodio y de 0,19 y 0,38 respectivamente para el desoxicolato. En cuanto a los valores obtenidos para D_w^{sat} y D_w^{sol} , fueron de 5,5 y 6,5 mM respectivamente para el colato de sodio y de 1,39 y 1,75 mM respectivamente para el desoxicolato, lo cual evidencia una mayor eficiencia de éste último. Si se compara con los valores de la Tabla 49, puede verse que el valor de D_w^{sat} de los liposomas HSPC está dentro del mismo rango (2,87 mM), lo cual tiene sentido si se tiene en cuenta que el extracto de bilis está compuesto por una mezcla de sales biliares. Las diferencias entre MLVs y SUVs parecerían ser menores para liposomas compuestos por lípidos insaturados. En efecto, liposomas SUVs compuestos por EPC-EPA (9:1) solubilizados con colato de sodio, presentaron valores de 0,3; 2,18 mM y 0,9 para los parámetros R_e^{sat} , D_w^{sat} y R_e^{sol} respectivamente (Rigaud et al., 1995), muy similares a los mostrados para los liposomas SPC en la Tabla 49.

En los modelos de solubilización más simples se consideraba que las curvas "sat" y "sol" se interceptaban en el eje correspondiente a la concentración del tensioactivo (concentración de lípidos = 0) y el valor resultante era el D_w . Esta era la concentración de tensioactivo presente como monómero en la solución acuosa en equilibrio con vesículas y micelas, por lo tanto era igual a la concentración micelar crítica (CMC) en presencia de lípidos (Lichtenberg et al., 1983). Como se mencionó anteriormente (apartado 1.5.3. Introducción), en los modelos más recientes, se sostiene que las concentraciones D_w correspondientes a la saturación y la solubilización son distintas, y que la D_w^{sat} suele ser del orden o algo menor que la CMC del tensioactivo empleado (Rigaud et al., 1995 ; Lichtenberg et al., 2000). Esto significa que en el equilibrio entre vesículas y micelas mixtas, el tensioactivo se encuentra mayoritariamente como monómero, con lo cual prácticamente no hay formación de micelas puras de tensioactivo. Sin embargo, se ha visto que en general esto es válido para valores de R_e^{sat} relativamente bajos (Schnitzer et al., 2003). En el presente caso, las sales biliares presentes en el EB tienen valores de CMC entre 2 y 15 (New, 1990), por lo tanto los valores de D_w^{sat} correspondientes a los liposomas SPC y HSPC están dentro del rango esperado. En el caso de los liposomas HSPC-Chol, la extrapolación del valor de D_w^{sat} proporcionó un valor negativo que tenía asociado un elevado error relativo. Una posible causa de esto es que la elevada densidad óptica de los liposomas obligó a trabajar a concentraciones lipídicas demasiado bajas (mínima concentración: 0,15 mM). El efecto de la desviación de la linealidad a bajas concentraciones de lípidos se había descrito previamente para concentraciones inferiores a 0,5 mM (Roth et al., 2000).

En el apartado 1.5.3. (Introducción), se definió el coeficiente K como una medida aproximada de la partición del tensioactivo entre las bicapas y el medio acuoso, ya que resulta del cociente R_e^{sat} / D_w^{sat} . El coeficiente K hallado para los liposomas SPC (0,088 mM⁻¹) resultó muy similar al indicado por Paternostre et al. para liposomas LUVs compuestos por EPC (0,11 mM⁻¹) cuando fueron incubados con colato de sodio (Paternostre et al., 1988), y levemente inferior al valor de 0,13 mM⁻¹ obtenido para los liposomas EPC-EPA (9:1) mencionados anteriormente con el mismo tensioactivo (Rigaud et al., 1995). También es similar al hallado

para estudios más recientes realizados con SUVs compuestos por EPC e incubados con taurocolato de sodio ($0,10 \text{ mM}^{-1}$) (Andrieux et al., 2004). En cuanto a los liposomas saturados, los valores de K hallados para liposomas HSPC incubados con el EB a 55°C ($0,613 \text{ mM}^{-1}$) resultaron similares a los obtenidos para liposomas DPPC incubados a 60°C con colato de sodio ($0,65 \text{ mM}^{-1}$) o con desoxicolato de sodio ($0,50 \text{ mM}^{-1}$) (Hildebrand et al., 2004).

Algunos autores han propuesto que el proceso de inserción de las sales biliares en las bicapas lipídicas es muy lento y su cinética depende de la velocidad de agregado (Ramaldes et al., 1996). Sin embargo, los valores de R_e^{sol} hallados para liposomas SUVs de EPC ó REVs de EPC-EPA incubados con taurocolato de sodio (TC) a 25°C , resultaron independientes de la velocidad de agregado, variando entre $0,4-0,6$ (Andrieux et al., 2004). En el presente trabajo, la mezcla entre el extracto de bilis y la suspensión de liposomas se realizó en forma inmediata, que equivale a la máxima velocidad de agregado, aunque la incubación se prolongó el tiempo necesario para permitir que el sistema llegara al equilibrio. El valor de R_e^{sol} en nuestro caso fue tres veces mayor que en los estudios de Andrieux et al. (quienes realizaron los agregados a velocidad lenta y controlada) y 1,8 veces el encontrado por Rigaud citado anteriormente, pero debe tenerse en cuenta que (a) se trata de liposomas MLVs, que en general requieren una relación tensioactivo/lípidos mucho mayor que los SUVs y (b) que el agregado instantáneo del EB podría generar un perfil de solubilización diferente poco comparable a los descritos.

Con respecto a los tiempos de incubación, como ya se mencionó anteriormente, era fundamental que los liposomas incubados con sales biliares llegaran al equilibrio a la temperatura de trabajo. Como resulta lógico, para una misma formulación, el tiempo requerido disminuye a medida que aumenta la relación tensioactivo/lípidos. Por una cuestión de practicidad, se incubaron las mezclas a distintas relaciones durante un tiempo fijo (ver Tabla 49). Sin embargo, se observó que para relaciones EB/lípidos superiores a 2, los liposomas SPC se solubilizaban casi instantáneamente (ver Fig.100, apartado 4.3.2.1.). Un comportamiento similar fue descrito previamente para SUVs compuestos por EPC: cuando se incubaron a relaciones EB/lípidos superiores a 10 y a una temperatura de 25°C , la absorbancia disminuía hasta valores no detectables en menos de un segundo (Nagata et al., 1988). En un trabajo posterior, los mismos autores postulan que los liposomas MLVs con distribuciones de diámetros heterogéneas, presentan cinéticas más complejas que los SUVs (Nagata et al., 1990). Esto fue observado en el presente trabajo para liposomas HSPC con o sin colesterol, pero los liposomas SPC presentaron cinéticas relativamente simples, como se mostró en el apartado 4.3.2.1.

En la Tabla 49 aparece el cociente R_e^{sol}/R_e^{sat} , una relación que no aparece descrita en la bibliografía pero que proporciona información complementaria a la que, por si sola, proporciona cada R_e . Para una determinada cantidad de fosfolípidos, una R_e^{sat} elevada indica que debe incorporarse una gran cantidad de tensioactivo a la membrana antes de que empiece la solubilización, de manera que durante esta etapa se forman nuevas estructuras. Por otro lado, R_e^{sol} informa la concentración efectiva de tensioactivo necesaria para solubilizar totalmente los liposomas. Teniendo en cuenta que las ordenadas al origen de las respectivas curvas son del mismo orden, el cociente propuesto indica qué cantidad del tensioactivo necesario para solubilizar totalmente los liposomas, es utilizado durante la etapa de formación de micelas mixtas (Etapa II). Complementariamente, también pone de manifiesto cuanto de este

tensioactivo ha estado formando parte de estructuras mixtas no micelares, es decir, vesículas con tensioactivo en las membranas (Etapa I). Así por ejemplo, un valor de 2 para dicho cociente indica que la mitad del tensioactivo necesario para solubilizar totalmente una suspensión de liposomas ha estado previamente formando parte de vesículas mixtas. Como puede observarse, el valor mínimo del cociente, 1,92, corresponde a los liposomas HSPC-Chol. Este hecho, unido a un elevado valor de R_e^{sat} en comparación con las otras preparaciones, pone de manifiesto que se forman estructuras mixtas vesiculares durante gran parte de las solubilizaciones. El caso opuesto corresponde a los liposomas de SPC. El elevado valor del cociente es indicativo de que gran parte del tensioactivo utilizado hasta el final del proceso ha estado formando parte de micelas mixtas, de manera que no ha contribuido en gran medida a la formación de vesículas. Esta hipótesis se ve reforzada por los gráficos que muestran el diámetro medio de la población en función de la concentración de EB (apartado 4.3.2.). En ellas se aprecia que en el caso de los liposomas SPC el diámetro medio disminuye progresivamente desde las primeras adiciones de EB hasta llegar al rango micelar (Fig.101). Contrariamente, el diámetro medio oscila en el caso de los de HSPC hasta un valor crítico de EB, a partir del cual disminuye abruptamente (Fig.107). En el caso de los HSPC-Chol el comportamiento es similar, pero los diámetros elevados se mantienen hasta concentraciones del EB cercanas a 50 mM (25 mg/ml; Fig.111). Incluso a esta concentración fuera del rango de los valores fisiológicos, la presencia de micelas se evidencia sólo a través del diámetro medio de la distribución en número y no de la distribución en volumen, lo que indica que aún persisten vesículas mixtas de tamaño mayor a los 100 nm.

Finalmente, si bien el interés de los estudios de solubilización suele ser que el modelo de liposomas elegido resista la incubación con las sales biliares, recientemente ha crecido el interés por los sistemas de micelas mixtas compuestos por fosfolípidos con sales biliares (Song et al., 2005). Estos sistemas, que son tan exitosos para la solubilización y absorción de lípidos *in vivo*, se están estudiando como alternativas para la vehiculización de fármacos liposolubles. De hecho se comercializan productos a base de mezclas de SPC y ácido cólico para mejorar la biodisponibilidad del diazepam y la vitamina K (Hildebrand et al., 2004). Si bien algunas sales biliares ya se habían empleado como enhancers de la absorción, como por ejemplo en el producto lanzado recientemente para la administración de insulina por inhalación (Johansson et al., 2002), el agregado de fosfolípidos a las formulaciones disminuyó los daños celulares causados por las sales biliares, que habían sido descritos hacía mucho tiempo (Steffen y Schmidt, 1978).

Por lo tanto, el criterio de mantener la estabilidad estructural de los liposomas como vesículas parecería estar siendo reemplazado por el objetivo de mantener el porcentaje de incorporación de la sustancia encapsulada, a pesar de la micelización o de la formación de vesículas mixtas. La relación entre el efecto de la incubación con las sales biliares y el contenido residual será estudiada a continuación, en el apartado 5.3.3.

5.3.3. Incubación de liposomas con extracto de bilis a 37°C

La incubación de las formulaciones de liposomas convencionales con concentraciones crecientes de extracto de bilis se realizó para contestar algunos interrogantes planteados en el

apartado anterior (5.3.2.). Si las sales biliares ejercen efectos sobre la integridad estructural de los liposomas, ¿cómo se refleja este efecto sobre la pérdida del contenido de la sustancia incorporada en su interior acuoso? ¿Existen formulaciones capaces de minimizar esta pérdida cuando se someten a altas concentraciones de sales biliares? Para intentar responder a estas preguntas fue necesario emplear metodologías que permitieran monitorear los cambios estructurales en los liposomas, como la medición de la absorbancia y el diámetro medio en función del tiempo, y combinarlas con estudios que determinaran el contenido de sustancia encapsulada, como el monitoreo de la intensidad de fluorescencia en el punto isobéptico.

Debe tenerse en cuenta que los ensayos se realizaron a una temperatura y pH fisiológicos (37°C y 6,5 respectivamente) y que se fijó un tiempo de 1 hora, estimado como tiempo medio de residencia en el sitio de absorción. De este modo, sólo en el caso de los liposomas SPC puede asegurarse que el sistema ha llegado al equilibrio (apartado 4.3.2.1.). No puede asegurarse lo mismo en los otros sistemas, si bien los liposomas HPSC a bajas concentraciones e incubados con EB a más de 4 mg/ml, habrían alcanzado la solubilización con una incubación lo suficientemente larga (ver Fig.142, apartado 4.4.9.). Sin embargo, el objetivo de este estudio no es evaluar el sistema en equilibrio, sino estudiar su comportamiento en forma integral, a determinadas condiciones de tiempo de incubación, pH y temperatura. Por lo tanto, ya que no se puede hablar de un valor D_t^{sat} por no poder afirmar en todos los casos que se esté en equilibrio, se ha definido D_t^{max} como la concentración del EB a la cual la absorbancia es máxima en el rango de concentraciones de EB y lípidos estudiado. A esta concentración del EB no puede asegurarse que las bicapas están saturadas de tensioactivo, pero se trata probablemente, del punto de máximo cambio en la estructura de las vesículas que se detecta en las condiciones de trabajo.

Ya se comentó con anterioridad que los liposomas de SPC no son solubilizados durante la digestión *in vitro* pero, como se vió, en estas condiciones no están muy alejados de la zona en la que se inicia la Etapa II (Fig.104 apartado 4.3.2.2.). En el caso de los liposomas HSPC y HSPC-Chol, los resultados de las curvas "Absorbancia vs. concentración de EB" a 37°C (Figuras 142 y 143) muestran que, a esa temperatura, los liposomas no se solubilizan en el rango de concentraciones de EB y de lípidos estudiado. En los liposomas HSPC (Fig.142), el aumento de la concentración lipídica provoca el desplazamiento de D_t^{max} a concentraciones mayores, a la vez que aumenta también el correspondiente valor de la absorbancia. Por otro lado, el análisis del tamaño de las vesículas indica que en la zona previa a la D_t^{max} se produce un aumento del diámetro medio, por lo que se confirman cambios en la estructura de los liposomas, que no implican en absoluto su solubilización. Los liposomas HSPC-Chol muestran un aumento menos acentuado de la absorbancia respecto a los HSPC, y además no se observa un máximo local de absorbancia que permita determinar con precisión un valor de D_t^{max} .

La Fig.146 (apartado 4.4.9.) muestra que, durante la hora de incubación, las tres formulaciones ensayadas pierden parte del material encapsulado aunque no se produzca la solubilización de los liposomas, es decir, que durante la Etapa I hay una clara alteración de la permeabilidad de las bicapas. La Tabla 50 permite comparar la pérdida del material encapsulado en relación a los valores de D_t^{max} .

El primer hecho que llama la atención es que el valor de D_t^{max} obtenido para los liposomas HSPC a una concentración de 0,67 mM (0,5 mg/ml) es levemente menor que el hallado para liposomas SPC a una concentración de 0,60 mM. Físicamente, esto implicaría que, durante la hora de incubación, los liposomas de HSPC, en estado gel-sólido, experimentan los máximos cambios en su estructura a una concentración de EB similar a la que los causa en liposomas de SPC (en estado cristal-líquido).

Como se desprende de los valores de %F417 (Tabla 50) y de los gráficos de la Fig.146, a una concentración de EB próxima a D_t^{max} , los liposomas SPC pierden prácticamente toda la sonda encapsulada. Dado que para estos liposomas D_t^{max} y D_t^{sat} tienen el mismo valor, esto implica que pierden prácticamente la totalidad de su contenido antes de que se inicie la solubilización.

Tabla 50: Parámetros que caracterizan la incubación durante 1 hora a pH 6,5 y 37°C de liposomas convencionales con extracto de bilis, calculados a partir de la Fig.146, apartado 4.4.9. El valor de D_t^{max} es la concentración del EB correspondiente a la máxima absorbancia a 600 nm. El porcentaje de fluorescencia a 417 nm (excitación) respecto al valor inicial (%F417) a dicha concentración (D_t^{max}) se indica como %F417. También se muestran los valores de %F417 y el porcentaje de la absorbancia a 600 nm respecto de la inicial (%A600) a una concentración de EB de 10 mM (5,3 mg/ml EB). (*): el valor de D_t^{max} se halla a una zona estable de absorbancia (Fig.146). (**): valor promedio en el intervalo indicado.

Liposomas	[Lípidos] (mM)	D_t^{max} (mM)	%F417 (D_t^{max})	%F417 (10 mM)	% A600 (10 mM)
SPC	0,60	2,03	4,1	7,0	5,6
HSPC	0,67	1,79	4,6	7,1	246,2
HSPC-Chol	0,50	0,9-10 (*)	52 (**)	49,3	66,1

Se observa el mismo fenómeno para los liposomas HSPC, con la diferencia que no se puede afirmar que en este caso D_t^{max} corresponda al inicio de la Etapa II, como se explicará a continuación. Este hecho, unido a la brusca disminución de la fluorescencia a bajas concentraciones de EB, indica que también en este caso, la pérdida de la sonda fluorescente tiene lugar de forma intensa durante la Etapa I.

Para explicar la pérdida de contenido a concentraciones relativamente bajas de tensioactivos, Schubert et al. propusieron un modelo de formación de poros transitorios causados por la inserción del detergente en una de las dos capas de fosfolípidos de la bicapa externa (Schubert et al., 1986). Esto generaría una asimetría que puede alterar el empaquetamiento de los lípidos. Este efecto sucede a relaciones detergente/lípidos por debajo de las requeridas para la saturación de las vesículas y se supone que los poros se cierran cuando se completa la incorporación del detergente en la capa interna de la bicapa más externa. Otros autores hallaron que para SUVs compuestos por EPC, la lisis de las vesículas, y por lo tanto la pérdida del contenido, era máxima a relaciones molares sal biliar/lípido de 2 a 3 (O'Connor et al., 1985). Según los valores de la Tabla 50, el 95% del contenido se desencapsula a relaciones EB/lípidos ($D_t^{max}/[\text{lípidos}]$) menores a 3,4 y 2,7 para liposomas SPC y HSPC respectivamente, lo cual coincide con los resultados de O'Connor et al., pero cabe destacar que en este caso no se ha producido la lisis de los liposomas. Por lo tanto son los

cambios en la estructura y/o la permeabilidad de las membranas lo que causa la desencapsulación.

Si bien se ha visto que los liposomas SPC y HSPC no resultan eficientes para retener la sonda encapsulada aún en contacto con bajas concentraciones de sales biliares, el comportamiento estructural de ambas formulaciones liposomales a concentraciones superiores a D_t^{max} , es muy diferente. Para una concentración de EB igual a 10 mM, por ejemplo, el porcentaje de absorbancia respecto al valor inicial (%A600) es de apenas el 5,6% para los liposomas SPC, lo que implica un alto grado de micelización (Fig.101, apartado 4.3.2.2.).

Por el contrario, los liposomas HSPC incubados 1 h a 37°C evolucionan hacia estructuras cuya absorbancia alcanza valores del 250 al 500 % respecto del inicial, según la concentración lipídica. El diámetro medio determinado para muestras de 0,93 mg/ml de lípidos (2.135 ± 979 nm, Fig.181), permite estimar que las estructuras que se formen a una concentración de 0,5 mg/ml también tendrán un diámetro medio superior a los 1.000 nm.

Incluso en algunos casos, se observó la aparición de estructuras macroscópicas que

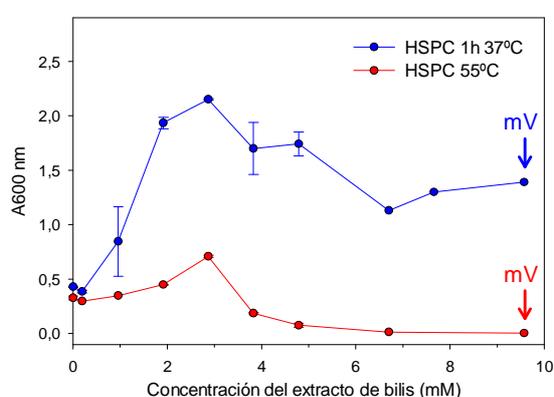


Fig.180: Variación de la absorbancia a 600 nm con la concentración de EB para liposomas HSPC 1,24 mM incubados a 37°C durante 1 hora (línea azul) o a 55°C hasta absorbancia constante (línea roja). Las flechas indican los puntos en los que se determinó la distribución de diámetros y el diámetro medio (mV).

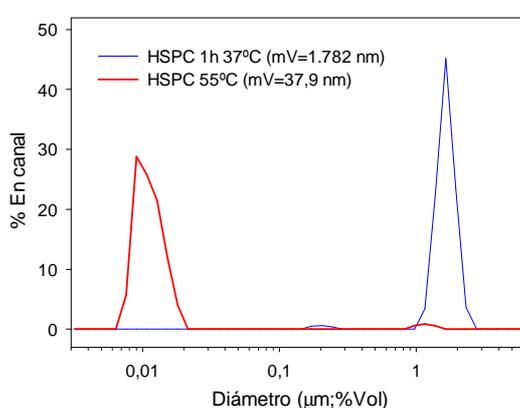


Fig.181: Distribuciones de diámetros obtenidas a las concentraciones de EB señaladas en la Fig.180. para liposomas HSPC incubados con durante 1 hora a 37°C (línea azul) o bien a 55°C hasta absorbancia constante. La ordenada indica el porcentaje de vesículas en cada canal del analizador. Se indica el diámetro medio obtenido para cada distribución.

aumentaban el ruido en la adquisición de la señal, tanto para las determinaciones espectrofotométricas como fluorimétricas. Este fenómeno de aparición de dos fases macroscópicas también fue observado previamente para mezclas DPPC/TX-100 incubadas a 37°C, a relaciones detergente/fosfolípidos por debajo de las requeridas para el inicio de la solubilización (Schnitzer et al., 2003). Sin embargo aún no se ha elucidado si se trata de agregados de vesículas que contienen detergente o bien a la transformación de las mismas en estructuras de mayor diámetro.

La comparación de los resultados de la Fig.106 (apartado 4.3.2.3, solubilización con EB a 55°C) con los de la Fig.142 (apartado 4.4.9., incubación con EB a 37°C) a una concentración lipídica de 1,24 mM (0,93 mg/ml), permite determinar que a 37°C y a una concentración de EB 9,5 mM (5 mg/ml) se forman macroestructuras, mientras que si la incubación tiene lugar a 55°C, se obtienen micelas. Como se observa en la Fig.180, a 55°C se produce la solubilización

de estos liposomas a una concentración del EB de 9,5 mM, según se confirma por la presencia de micelas en la distribución de diámetros correspondiente (Fig.181, línea roja). Cabe aclarar que si bien el diámetro medio de esta distribución (expresada en porcentaje en volumen) es de 37,9 nm, este valor se debe a la sobreestimación de una pequeña población situada alrededor de los 1.000 nm y la población mayoritaria corresponde a estructuras micelares, caracterizadas por diámetros cercanos a los 10 nm.

Por el contrario, la incubación a la misma concentración durante 1 h a 37°C, aún presenta una absorbancia de más del 300% respecto de la inicial. Este valor se explica a través de la distribución de diámetros, que ha dejado de ser bimodal, como lo era la muestra antes de incubar con EB, para dar lugar a una única señal centrada a diámetros mayores que 1 µm, como se observa en la Fig.181 (línea azul). Cabe destacar que la representación de esta distribución de diámetros como porcentaje en número tampoco detectó ningún tipo de estructura micelar, lo que sugiere la presencia de vesículas mixtas exclusivamente. Por consiguiente, los liposomas HSPC al cabo de 1 h a 37°C aún están atravesando la Etapa I del proceso de solubilización. A partir de estos resultados se infiere que, en las condiciones de digestión *in vitro* (25 mg/ml de lípidos y 2 mg/ml de EB), tampoco se producirá la solubilización, y que las vesículas estarán en los primeros estadios de la Etapa I. Esta previsión coincide plenamente con la que cabría esperar del gráfico de solubilización a 55°C (Fig.106, Apartado 4.3.2.3.). A esta temperatura y en las condiciones de concentración de la digestión *in vitro*, las vesículas se encuentran en las primeras fases de la Etapa I, por lo que, a 37°C la situación será todavía más favorable en lo que respecta a su integridad física.

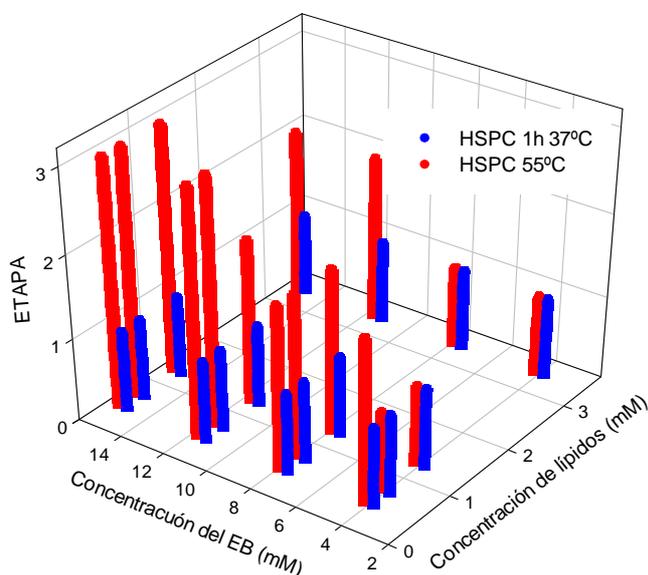


Fig.182: Comportamiento de los liposomas HSPC frente a la incubación con extracto de bilis (EB) a 37°C durante 1 h (barras azules) y a 55°C hasta absorbancia constante (barras rojas). Las Etapas 1, 2 y 3 corresponden a las descritas en el apartado 1.5.3. (Introducción).

También se observó que cuando estas estructuras resultantes de la incubación a 37°C, se incubaban a 55°C, se solubilizaban completamente transformándose en micelas, y que su posterior incubación a 37°C revertía la solubilización, recuperándose los altos valores de absorbancia (Fig.146, apartado 4.4.9.).

En la bibliografía aparecen antecedentes de incrementos en los valores de absorbancia para liposomas SUVs compuestos por DPPC incubados a 37°C con TX-100 a concentraciones inferiores a la de solubilización, como se mencionó previamente (Schnitzer et al., 2003). Se describió, además, que el fenómeno era dependiente de la temperatura, obteniéndose la máxima

turbidez a 37°C. Otros autores postularon que dichos incrementos observados en liposomas sonicados incubados con TX-100 u octil glucósido, se debían a la aparición de fenómenos de

agregación masiva y/o fusión de vesículas (Paternostre et al., 1988). Long et al. describieron la formación de agregados micelares para mezclas EPC/taurocolato de sodio 1:1 mol:mol a 12,8 mM de EPC (Long et al., 1994). En este caso, el radio hidrodinámico de las

micelas aumentaba de 10 a 50 nm por la formación de estructuras mixtas (lípidos/sales biliares). Sin embargo no se hallaron, según nuestro conocimiento hasta la fecha, estudios de este efecto realizados con liposomas MLVs, a concentraciones de sales biliares inferiores a las de solubilización, ni tampoco formando parte de un extracto natural, como el EB.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se obtuvo el gráfico de la Fig.182, que muestra el comportamiento integral de los liposomas HSPC frente a la incubación con el extracto de bilis durante 1 h a 37°C y a 55°C (hasta absorbancia constante en este caso). A 37°C, el sistema se encuentra en la Etapa I, en todo el rango de concentraciones de EB y HSPC estudiado. Por el contrario, cuando los liposomas se incuban a 55°C, el sistema evoluciona entre las Etapas I, II y III según la relación EB/HSPC.

Los liposomas HSPC-Chol muestran un comportamiento diferencial, prácticamente en todo el rango de concentraciones de EB. Por un lado, no es factible asignar un valor para D_t^{max} (Tabla 50, Fig.143; apartado 4.4.9), si bien a altas concentraciones de lípidos se observa un claro aumento de la absorbancia. En particular, para las mayores concentraciones de lípidos estudiadas, y a partir de concentraciones de EB mayores que 15 mM (8 mg/ml), la absorbancia aumenta hasta valores que superan la absorbancia de la suspensión original (ver Fig.143). La ausencia de D_t^{max} podría indicar que los liposomas HSPC-Chol a 37°C presentan una la mayor resistencia a la incorporación de sales biliares de la que tienen las otras formulaciones

estudiadas, un hecho, por otro lado, confirmado a partir de los ensayos de solubilización a 55°C (Ver Tabla 49, apartado 5.3.2.).

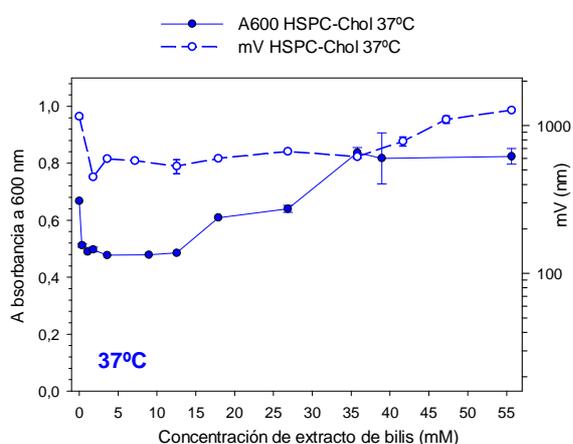


Fig.183: Variación de la absorbancia a 600 nm (línea azul continua) y el diámetro medio de la distribución en volumen (mV; línea azul discontinua) con la concentración de EB para liposomas HSPC-Chol 1,07 mM incubados durante 1 hora a 37°C.

ambos fenómenos apuntan hacia la formación de vesículas mixtas impermeables a partir de una relación crítica fosfolípidos/EB. Esta retención del material encapsulado se vería favorecida en las condiciones en las que se realiza la digestión *in vitro*, ya que la concentración lipídica es mucho mayor (25 mg/ml, es decir 41 mM).

La formación de estas estructuras se ve reforzada por los resultados del análisis de los diámetros medios. En el caso de suspensiones 1,07 mM de lípidos, se evidencia la formación de vesículas de mayor tamaño recién a partir de concentraciones de EB mayores a 35 mM (Fig.183). Por otro lado, las distribuciones de tamaño de la Fig.145 (apartado 4.4.9.) confirman que los cambios de tamaño de los liposomas, debidos a la incorporación de sales biliares, no conducen a la formación de micelas mixtas ni siquiera a altas relaciones EB/lípidos. Los perfiles de las poblaciones parecen indicar la presencia de vesículas mixtas grandes u otras estructuras no micelares formadas por la combinación de fosfolípidos, colesterol y sales biliares.

Por lo tanto, los resultados presentados permiten afirmar que los liposomas HSPC-Chol constituyen el sistema más resistente frente a solubilización con sales biliares.

5.4. EFECTOS DE LA DIGESTIÓN *IN VITRO* SOBRE LOS LIPOSOMAS

A continuación se discutirán los efectos de la digestión *in vitro* sobre la estructura física, la integridad de la membrana y el contenido de los liposomas con HPTS. Posteriormente se compararán estos resultados con los obtenidos para aquellos casos en que se incorpora hierro en los liposomas y se evaluará la validez del modelo planteado. Nota: he sacado todo lo que era analítico o ensayos de caracterización para dejar sólo el efecto de la digestión. Por ejemplo: discusión sobre determinación del pH interno c/HPTS

5.4.1. Liposomas modelo con HPTS

Los liposomas convencionales presentan, en mayor o menor medida, variaciones del diámetro medio y de la distribución de tamaños como consecuencia de los cambios de pH que tienen lugar durante las diferentes etapas de la digestión *in vitro*.

En los liposomas SPC y, especialmente, en los HSPC, luego de 2 horas a pH 2,0 y 37°C, se observan cambios en la distribución de diámetros que afectan principalmente a las vesículas de mayor tamaño. El resultado obtenido es que su diámetro medio disminuye respectivamente a un 44 y 27% del valor inicial (Tabla 29 apartado 4.4.1.). Los liposomas HSPC-Chol muestran un comportamiento diferente: presentan una leve disminución del diámetro a pH 2,0 que es consecuencia de pequeñas variaciones en la distribución de tamaños. En todos los casos se aprecia un ligero incremento del volumen incorporado, pero su variación no es estadísticamente significativa. Estos datos indican que el elevado gradiente de concentración de protón que se genera en este proceso – del orden de 10^5 – entre el interior y el exterior liposomal no afecta de manera importante a la integridad de las vesículas, ya que el volumen incorporado apenas se modifica, aunque sí ocasiona cambios en su tamaño. El mayor efecto que se aprecia en los HSPC podría estar relacionado con su estado gel-sólido a 37°C. A esta temperatura sus membranas presentan una rigidez que no tienen las de SPC ni las de HSPC-Chol, en las que el colesterol actúa fluidificándolas. Por lo tanto, se puede afirmar que la etapa ácida de la digestión no afecta de manera importante a la estabilidad física de los liposomas, y más teniendo en cuenta que, en los casos mencionados, la incubación se ha realizado durante dos

horas para equiparar estos experimentos con otras etapas ácidas de digestiones *in vitro* descritas en la bibliografía.

Los datos del apartado 4.4.2. muestran que al final del proceso digestivo los liposomas han experimentado nuevas alteraciones. Los liposomas SPC son afectados levemente por él, de manera que, a su pH final (6,5), el diámetro se recupera en un 75% respecto al valor inicial y la variabilidad de la distribución de diámetros no es significativamente diferente respecto al control. Este hecho, unido a la constancia del volumen incorporado, indicaría que estas vesículas recuperan casi totalmente sus características físicas iniciales después de la digestión *in vitro*. La afirmación anterior es coherente con los resultados de la solubilización/incubación con sales biliares a 37°C (apartado 4.3.2.2.). Por limitaciones instrumentales, la concentración máxima empleada en este caso fue 2,5 mg/ml de SPC, diez veces menor que la de la digestión. Por lo tanto, durante este proceso, las vesículas se encuentran claramente en la Etapa I de la solubilización en la cual muestran, a lo sumo, una leve disminución de la absorbancia, que se corresponde con una disminución del diámetro medio que es, precisamente, lo que se aprecia al final de la digestión *in vitro*. Por lo tanto cabe pensar que son las sales biliares el agente que modifica en mayor grado la estructura física de los liposomas a lo largo del proceso.

Como se mostró en el apartado 4.4.2., el diámetro medio (mV) de los liposomas HSPC-Chol disminuye por efecto de la digestión, al mismo tiempo que aumenta el volumen incorporado. Según las curvas "Volumen incorporado vs. Diámetro" para diferentes números de bicapas (Fig.172, apartado 5.2.2.), esta aparente contradicción puede explicarse por la formación de nuevas vesículas con un menor número de lamelas, y por lo tanto, un mayor volumen encapsulado. Como surge de la distribución de diámetros correspondiente (Fig.119), la digestión promueve la desaparición de un alto porcentaje de las vesículas de mayor diámetro, lo que explica la disminución del diámetro medio. Éste era en realidad, el comportamiento esperado, teniendo en cuenta que en los MLVs las sales biliares alteran la integridad de las bicapas más externas, como se describió previamente (Nagata et al., 1990). Nuevamente, los efectos comentados y su explicación pueden atribuirse mayoritariamente a la acción del EB, ya que las incubaciones a 37°C (apartado 4.4.9.) muestran que a bajas relaciones EB/lípidos se produce una disminución del diámetro medio (y de la absorbancia) siendo, además, las distribuciones de diámetro en esta zona similares a las obtenidas tras la digestión *in vitro* (concentración de EB 1,8 mM en la Fig.145 apartado 4.4.9.).

Los liposomas HSPC presentan un comportamiento diferente de las formulaciones anteriores. Por un lado, se observa un marcado efecto del proceso sobre la distribución de diámetros, que lleva a la desaparición de las vesículas de menor diámetro, como se vio en la Fig.118. Sin embargo esta gran variabilidad observada entre las distribuciones Pre y Post-digestión no se refleja en el diámetro medio, que prácticamente no se ve alterado (ver Tabla 30, apartado 4.4.2). Las incubaciones con EB a 37°C (apartado 4.4.9.) muestran que, a bajas relaciones EB/lípidos, las absorbancias se mantienen aproximadamente constantes o se incrementan, poniendo en evidencia, como ocurre en la digestión, la aparición de vesículas mixtas de mayor tamaño. Por otro lado, tras el proceso *in vitro* se observa una drástica disminución del volumen incorporado, que podría estar explicada por la formación de vesículas con un mayor número de bicapas formadas, probablemente, a partir de los liposomas de unos

50 nm que se detectan en la muestra original. Estos hechos, sumados al aumento del mV desde valores de 1.000 nm a 5.000 nm hallado para el pellet de liposomas mediante el cual se caracterizó su comportamiento termotrópico (ver Tabla 32, apartado 4.4.7.), explica la dificultad hallada para separar estos liposomas mediante SEC luego de la digestión (apartado 5.2.4.). Por lo tanto, es probable que los fenómenos de agregación que tienen lugar durante la digestión de los liposomas HSPC promuevan la aparición de estructuras con diámetros superiores al micrón, que caen mayoritariamente fuera del rango de detección del equipo empleado. Lamentablemente, los trabajos que estudian el efecto de los procesos de digestión *in vitro* sobre las características físicas de los liposomas son escasos. En general no hacen referencia a las distribuciones de diámetros y a su variabilidad, sino que se limitan a comparar diámetros medios, lo cual dificulta enormemente la interpretación de los resultados. En lo referente al efecto del pH sobre el diámetro de los liposomas, Nacka et al. observaron resultados similares a los nuestros para vesículas gigantes (diámetro > 5 μm). Cuando el pH era llevado de 7,4 a 1,5, la densidad óptica de la suspensión aumentaba por la formación de agregados de vesículas (Nacka et al., 2001b). Sin embargo, como se observó mediante microscopía de contraste de fases, el pH ácido provocaba en realidad una disminución del diámetro de aproximadamente el 50% luego de 30 minutos de incubación a pH 1,5. Al neutralizar, el efecto se revertía parcialmente. La disminución del diámetro de los liposomas por efecto de la acidificación fue explicada mediante diferentes mecanismos dependientes de la temperatura, que incluyen el shock osmótico y/o la vesiculación de la membrana debida a la modificación química de los lípidos, como la oxidación e hidrólisis (Nacka et al., 2001a).

Otra forma de estudiar los cambios en la estructura física de los liposomas HSPC, por efecto de la digestión *in vitro*, es a través de su comportamiento termotrópico. Dado que se trata de poblaciones bimodales, fue necesario centrifugar la muestra original para obtener por separado una población de vesículas pequeñas (probablemente SUVs) y otra de vesículas grandes (apartado 4.4.7.). Como ya había sido observado, el efecto del proceso digestivo sobre los SUVs fue muy marcado (ver Fig.139): la señal ensanchada con dos máximos correspondiente al sobrenadante PRE (53 ± 20 nm) se transformó en una única señal aguda, coincidiendo con un aumento en el diámetro medio (sobrenadante POST: 289 ± 165 nm).

Ya se había descrito que las transiciones para SUVs menores a los 70 nm dependen del método de medición (Lichtenberger et al., 1984). Cuando los termogramas se obtienen en el modo "enfriamiento" (de mayor a menor temperatura), los SUVs compuestos por DPPC muestran una transición a menores temperaturas que los MLVs mayores a los 100 nm y de igual composición (37°C vs. $41,4^\circ\text{C}$ respectivamente) y una señal mucho más ancha. Cuando el termograma se adquiere en el modo "calentamiento", el termograma tiene dos poblaciones: la señal ancha característica de los SUVs (a 37°C) y una señal más aguda a la T_m de los MLVs, que se atribuye a los fenómenos de fusión que estarían favorecidos para los SUVs en fase gel (Lichtenberger et al., 1981). Este perfil coincide con el hallado en este trabajo para el sobrenadante PRE, teniendo en cuenta que (a) los termogramas del presente trabajo fueron adquiridos en el modo "calentamiento" y (b) las vesículas del sobrenadante tienen un diámetro medio menor a los 70 nm. Por lo tanto, la transición cuyo máximo se sitúa en $50,6 \pm 0,2$ $^\circ\text{C}$ corresponde a las vesículas de menor tamaño contenidas en el sobrenadante, mientras que el

máximo secundario a $52,4 \pm 0,1$ °C, debe asignarse a la población de liposomas de más de 100 nm que, como se mostró en la Fig.138, también está presente en la distribución. Cuando estos liposomas son digeridos, se produce un aumento del diámetro debido a fenómenos de fusión y/o agregación de las vesículas para dar MLVs, que presentan una señal estrecha a $51,3 \pm 0,10$ °C. Como puede verse, la digestión no sólo afecta el ancho medio del termograma sino que provoca cambios en la T_m , lo cual podría deberse a alteraciones de las bicapas. En particular, para la población correspondiente al pellet PRE (MLVs > 1.000 nm) éste es el único efecto observado, con un corrimiento de la T_m de $52,2 \pm 0,07$ a $51,5 \pm 0,10$ °C (Pellet POST). Nótese que esta nueva T_m es prácticamente idéntica a la que proporciona el sobrenadante digerido.

Existen numerosos estudios sobre la sensibilidad del comportamiento termotrópico a alteraciones del empaquetamiento de las bicapas. En general, si el empaquetamiento es menos ordenado, aumenta la entropía de los lípidos y la transición ocurre a una menor temperatura (Ye y Biltonen, 1994). Por lo tanto, cualquier impureza o sustancia que interfiera en el empaquetamiento de los fosfolípidos reduce la T_m y la entalpía de transición. Esto fue demostrado por ejemplo, para la dibucaína, un anestésico local que debido a su estructura altamente hidrofóbica, se inserta en las bicapas provocando una disminución de la T_m y del ΔH según su concentración (Van Osdol et al., 1992). Según lo expuesto anteriormente, cabe pensar que los resultados obtenidos en el apartado 4.4.7. puedan ser debidos a una posible perturbación de las bicapas por efecto de las sales biliares. Teniendo en cuenta la relación entre extracto de bilis y fosfolípidos presente en la digestión *in vitro* (0,08 p/p respectivamente), el sistema se encuentra en la zona correspondiente a las vesículas, como se observa en la Fig.109 (apartado 4.3.2.3.). Sin embargo, por tratarse de un equilibrio, habrá una cierta cantidad de sales biliares incorporadas a las membranas de los liposomas. Dado que las sales biliares tienen una estructura semejante al colesterol, pueden intercalarse entre los fosfolípidos en forma similar, y disminuir el grado de empaquetamiento. Este efecto se traduciría en una disminución de la T_m como consecuencia de la digestión *in vitro*, que es precisamente lo que surge del análisis térmico. Esta hipótesis queda reforzada por la desaparición de la pre-transición que muestran los liposomas del pellet una vez se han digerido. Como ya había sido estudiado, la fase ondulada que la origina se debe a un empaquetamiento específico de las moléculas de fosfolípidos (New, 1990), que resulta muy sensible a cualquier alteración de la composición de la bicapa.

El efecto de la digestión sobre la integridad de la membrana para liposomas SPC y HSPC-Chol no pudo ser estudiado mediante DSC, ya que ninguna de estas formulaciones presenta transiciones de fase en el rango de medición del equipo.

Otros estudios que permiten monitorear los cambios estructurales en las bicapas cuando son sometidas a un proceso de digestión simulada, son la evaluación de la permeabilidad y la estabilidad química de los lípidos que las componen. Este último aspecto se evaluó mediante la determinación del contenido de formas liso por ^{31}P -RMN a partir del método de Glonek. Su adaptación en el presente trabajo para la determinación de la estabilidad química de los liposomas post-digestión, permite observar la inestabilización cuando todavía es incipiente, ya que se detectan contenidos de formas liso a niveles tan bajos como el 1%.

Como se describió previamente (ver apartado 3.5.9.), los liposomas SPC son los únicos que presentan un aumento significativo de las formas liso (de $1,77 \pm 0,32$ a $8,14 \pm 1,33$), como resulta previsible, teniendo en cuenta el alto grado de insaturación de sus cadenas de ácidos grasos. Con respecto a las dos formulaciones que contienen HSPC, los porcentajes de formas liso obtenidos por efecto de la digestión *in vitro* aumentaron muy poco, siendo finalmente algo superiores al 2%.

Existen antecedentes de estudios de formas liso post-digestión en los cuales se cuantifican las mismas por TLC con densitometría (Nacka et al., 2001a). Estos autores hallaron valores cercanos al 8% de LPC, cuando incubaron durante 3 h a pH 1,5, liposomas compuestos por PC conteniendo cadenas de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs). Estos valores son similares a los hallados en el presente trabajo para los liposomas SPC luego de la digestión completa, aunque las condiciones de incubación son claramente diferentes. También se hallaron coincidencias para los valores obtenidos antes del tratamiento, que en los trabajos de Nacka et al. variaron entre el 0,8 y el 1,4%, comparables al valor hallado en el presente trabajo para los liposomas SPC preparados por homogeneización a alta presión ($1,77 \pm 0,32$ % de formas liso).

Algunos estudios previos demostraron que se requería una hidrólisis del 10%, evaluada mediante el contenido de formas liso, para que se evidenciara la pérdida de la sustancia encapsulada en liposomas (Grit y Crommelin, 1993). De este modo, los liposomas SPC digeridos están cerca de la concentración de formas liso que puede acelerar la pérdida de su contenido. Sin embargo, cuando en dichos trabajos se monitoreaban cambios en la densidad óptica o se medía el diámetro de las vesículas, los niveles de hidrólisis necesarios para que se apreciara el efecto de las formas liso sobre la integridad estructural de los liposomas, eran superiores al 40% (Zuidam et al., 1995), un valor muy alejado de los que presentan las formulaciones SPC, HSPC y HSPC-Chol ensayadas.

Para evaluar el efecto de la digestión sobre la permeabilidad de las bicapas se comparó la permeabilidad de las membranas sin digerir con la de las digeridas, una vez que las mismas eran separadas del medio digestivo mediante SEC. Como se describió en el apartado 4.4.3., el contenido de sonda fluorescente al cabo de 1 hora a 37°C a pH 7,4, apenas disminuía entre el 5 y el 10% en las vesículas digeridas respecto a las no digeridas, independientemente de su composición.

Estos resultados pueden parecer contradictorios con los obtenidos en los procesos de incubación con EB a 37°C (apartado 4.4.9.). Allí quedó demostrado que la incubación con sales biliares durante 1 hora a 37°C, produce un brusco aumento de la permeabilidad a concentraciones del EB menores a las requeridas para solubilizar los liposomas. Por lo tanto, cabría esperar que los liposomas sometidos a digestiones *in vitro* mostrasen mayor permeabilidad que los que no han experimentado este proceso. Ahora bien, debe tenerse en cuenta que las muestras digeridas son purificadas mediante SEC, de manera que se diluyen a medida que circulan por la columna. De este modo, se altera el equilibrio entre las sales biliares incorporadas a las membranas y las inicialmente presentes en el medio de digestión, disminuyendo de esta manera el contenido de sales biliares en las bicapas. Por lo tanto, lo que evalúa la medida de la permeabilidad post-digestión, es el estado de las membranas una vez se han eliminado los componentes digestivos. Consecuentemente, lo que pone de manifiesto la

leve variación de la permeabilidad detectada, es que las formas liso que se generan durante la digestión no alteran significativamente esa propiedad de las bicapas.

Finalmente, uno de los puntos más críticos que debe ser evaluado es el efecto de la digestión *in vitro* sobre el contenido de los liposomas, que fue estudiado desde dos aspectos: la desencapsulación de la sustancia incorporada y las variaciones del pH interno, que podrían afectar la estabilidad de la sustancia en la fase acuosa interna.

Se han encontrado numerosas aplicaciones del par HPTS-DPX para medir el pH interno de membranas naturales o artificiales, pero hasta la fecha no se habían hallado antecedentes de su empleo para monitorear el pH interno de liposomas cuando son sometidos a un proceso de digestión *in vitro*. La Fig.184 muestra la variación del pH interno hallada para liposomas convencionales conteniendo buffer T10 y sonda fluorescente durante la digestión *in vitro*. Como puede verse, existe una marcada diferencia en el comportamiento de los liposomas SPC, compuestos por lípidos insaturados, respecto a los HSPC y HSPC-Chol. Evidentemente, la permeabilidad a los protones es mucho mayor para los liposomas SPC, como se aprecia al

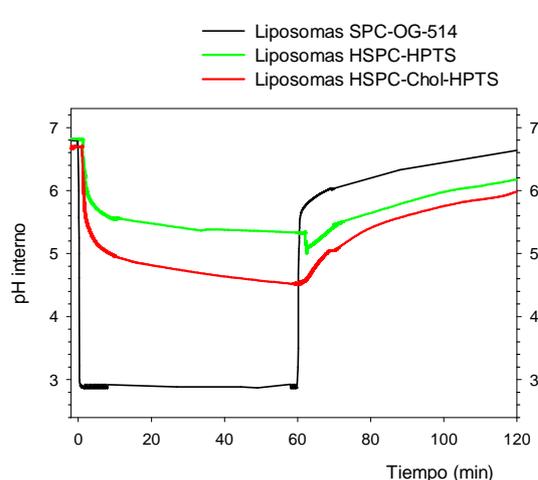


Fig.184: Determinación del pH interno para liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol conteniendo buffer T10 y sonda fluorescente.

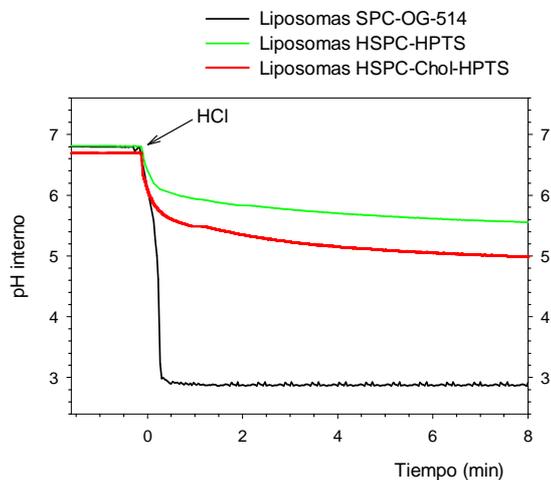


Fig.185: Ampliación de la zona de la digestión en medio ácido de la Fig.184. El agregado de pepsina en ácido clorhídrico hasta pH 2 se indica como HCl.

comparar las pendientes iniciales de cada curva (Fig.185). Además, si bien el límite inferior para la determinación del pH fue de 2,8 (límite de la sonda OG-514), el pH interno de los liposomas SPC luego del agregado de la mezcla pep/HCl (pH externo=2), probablemente resulte igual al externo, como se desprende de la brusca caída del pH.

Según los experimentos de Barreto y Lichtenberger, cuando liposomas de EPC preparados a pH 7,5 son sometidos a un $\Delta\text{pH}=6$ por el agregado de H_2SO_4 hasta pH 1,5, la permeabilidad hacia los protones aumentaba en forma lineal con la concentración de HCl agregado al medio externo (Barreto y Lichtenberger, 1992). Los autores argumentan que en soluciones a pH 1,5, la concentración de HCl no ionizado, una molécula muy permeable a través de las bicapas (3 cm/s) respecto del anión cloruro (10^{-9} cm/s), es suficiente como para producir un marcado incremento en la permeabilidad. En el presente trabajo, el medio externo contiene exclusivamente HCl, y el gradiente de pH entre el medio externo e interno es de 4,9 unidades

(desde 6,9 hasta 2). Probablemente sea ésta la razón por la cual se establece un equilibrio inmediato entre el medio externo e interno en los liposomas SPC.

En cuanto a los liposomas conteniendo lípidos saturados, su menor permeabilidad está relacionada, sin duda, con la estructura de las bicapas. El mayor orden de las cadenas acílicas saturadas en un caso, y el efecto impermeabilizador del colesterol en el otro, hacen que la respuesta al cambio de pH externo (de 4,9 unidades) al cabo de una hora de incubación sea de 1,6 y 2,3 unidades de pH para liposomas HSPC y HSPC-Chol respectivamente.

Al comienzo de la digestión "intestinal", cuando el pH externo es llevado de 2 a 6,5 por el agregado de la solución pan/EB alcalinizada mediante NaHCO_3 , la permeabilidad de los liposomas SPC al cambio de pH es nuevamente mayor respecto a la de las formulaciones con HSPC. En este sentido, se publicó una serie de trabajos sobre el rol del bicarbonato como un eficiente transportador de protones a través de las membranas lipídicas (Norris y Powell, 1990, 1992). En el presente trabajo, también podría ser ésta una de las causas del incremento de la permeabilidad en liposomas insaturados, pero además debe tenerse en cuenta un posible efecto adicional por la presencia de las sales biliares, considerando que tienen un efecto mucho más marcado en los liposomas insaturados que en los saturados.

Por lo tanto, una sustancia incorporada en el interior acuoso de los liposomas SPC, sufrirá variaciones de pH a lo largo de la digestión similares a las que experimentaría si estuviera fuera de las vesículas, lo cual representa una desventaja para sustancias afectadas por los cambios de pH. En principio, las otras dos formulaciones son más impermeables a estos cambios, particularmente los liposomas HSPC. Sin embargo, debe evaluarse además, si la formulación conserva un alto porcentaje de la sustancia encapsulada al final de la digestión *in vitro*, para realmente ejercer una protección de la misma a lo largo del proceso.

El contenido de HPTS remanente en los liposomas convencionales después de la digestión *in vitro*, se determinó mediante dos métodos complementarios. Uno fue la medición de la intensidad de fluorescencia en el punto isobéptico al final de la digestión (ver apartado 4.4.4.4.), y el otro método consistió en cuantificar la sonda encapsulada en los liposomas digeridos una vez purificados por (ver apartado 4.4.6). Como se muestra en la Tabla 51, se obtuvieron resultados similares por ambas metodologías, a pesar de que el proceso digestivo se aplicó a distintas concentraciones de lípidos. En el caso del monitoreo en el punto isobéptico, la concentración lipídica fue muy baja para evitar las interferencias de los liposomas en las medidas de fluorescencia, mientras que en el método por SEC se trabajó prácticamente a las concentraciones de las muestras originales. Por lo tanto, la similitud entre los resultados, resulta una forma de validar el método fluorimétrico para el cálculo de la encapsulación resultante al final de la digestión *in vitro*.

Tabla 51: Comparación entre los porcentajes de HPTS encapsulada después de la digestión *in vitro* (POST), determinados por SEC o por monitoreo del punto isobéptico. Los resultados se expresan como el promedio \pm desviación estándar ($n \geq 2$).

Muestra	% HPTS encapsulada SEC	% HPTS encapsulada Isobéptico
Liposomas SPC POST	91 \pm 5	86 \pm 3
Liposomas HSPC POST	46 \pm 5	54 \pm 3
Liposomas HSPC-Chol POST	77 \pm 2	81 \pm 3

De la Tabla 51 se desprende que existe una diferencia significativa entre el comportamiento de los liposomas HSPC y las otras dos formulaciones. Estos liposomas, que poseen una transición de fases cercana a los 52°C, pierden prácticamente el 50% de su contenido luego del proceso digestivo. El monitoreo de la fluorescencia en el punto isobéptico durante la digestión permitió además, determinar que hay una importante desencapsulación por efecto del agregado de la solución pan/EB. Como se demostró anteriormente (ver Fig.127), el porcentaje de fluorescencia en el punto isobéptico pasa de 83 a 62% sólo 10 minutos después de comenzada la digestión "intestinal". Por el contrario, la disminución del mismo al final de la etapa "estomacal" estuvo entre el 10 y el 20% respecto del valor inicial, sin diferencias apreciables entre las distintas formulaciones.

Por lo tanto, si bien los liposomas HSPC son los más impermeables a los cambios de pH a lo largo de la digestión *in vitro*, liberan un alto porcentaje de su contenido. Dado que su T_m está por encima de la temperatura de trabajo (37°C), se puede atribuir esta pérdida, fundamentalmente al efecto de inserción de las sales biliares en las bicapas, y a los cambios en la estructura física constatados por el análisis de la distribución de diámetros, del volumen incorporado, y de su comportamiento termotrópico. En efecto, por un lado, durante la incubación a 37°C con EB (apartado 4.4.9.), son los liposomas HSPC son los que muestran una mayor pérdida del contenido en la zona de formación de vesículas mixtas, estado en el que se encuentran durante la digestión *in vitro*. Por otro lado, los cambios de tamaño, volumen incorporado y temperatura de transición, evidencian la desaparición de los liposomas de menor tamaño que, probablemente, se reorganizan formando liposomas mayores a la vez que su contenido se diluye en el medio.

Debido a la gran variabilidad hallada entre los distintos modelos de digestión *in vitro* que aparecen en la bibliografía, las comparaciones deben realizarse con cuidado, teniendo en cuenta los numerosos factores que influyen en los resultados obtenidos. Entre ellos se encuentran la composición de los liposomas así como el método de preparación de los mismos, la duración de cada etapa y el pH de cada una, la actividad y origen de las enzimas empleadas, la concentración y origen de las sales biliares y la relación lípidos/sales biliares. Debe prestarse especial atención a los últimos dos factores, ya que ha quedado demostrado que las sales biliares son los más potentes desestabilizadores de las bicapas lipídicas (Patel et al., 2000). Entre ellas, el taurocolato de sodio tiene la mayor capacidad de solubilizar las lecitinas, como había sido demostrado previamente (Carey y Small, 1978). Teniendo en cuenta esto, cabe aclarar que en este trabajo se fijó la relación lípidos/EB en base a estudios de absorción de hierro a partir de alimentos fortificados (Glahn et al., 1996). Por lo tanto se fijó una concentración de 2 mg/ml de EB (Contenido de sales biliares medio: 3,74 mM), que fue incubada con concentraciones lipídicas entre 20 y 25 mg/ml. Los ensayos fluorimétricos requirieron trabajar con concentraciones de lípidos mucho menores, razón por la cual se diluyó en igual medida la concentración de EB, para mantener constante la relación lípidos/EB. Otros autores mantienen la concentración de sales biliares en valores fisiológicos (3-45 mM) pero diluyen las suspensiones de liposomas hasta concentraciones entre 1 y 6 mg/ml, alterando la relación lípidos/sales biliares, con lo cual los resultados obtenidos podrían sobreestimar los efectos desestabilizantes.

La desencapsulación de sustancias por efecto de la digestión fue ampliamente estudiada, ya sea como una sumatoria de etapas, o bien como un proceso unificado, en el que podrían aparecer interacciones sinérgicas o antagónicas entre los distintos agentes digestivos. Como ejemplos del primer caso, se realizaron numerosos estudios sobre la influencia de la acidificación en la pérdida de contenido. Se observó que luego de una incubación de 2 h a pH 2 y 37°C, la desencapsulación de la carboxifluoresceína variaba entre el 20 y el 60% según la composición de los liposomas (Aramaki et al., 1993). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que el empleo de la carboxifluoresceína puede sobreestimar la pérdida de sonda, ya que la misma permea las bicapas de PC a pH neutro, y lo hace a mayor velocidad cuanto menor es el pH. En el presente trabajo se ha utilizado la HPTS como sonda marcadora del interior acuoso. Al ser ésta una molécula que no atraviesa las bicapas que están en buen estado, su desencapsulación pone en evidencia las alteraciones importantes que pueden experimentar las bicapas durante los procesos ensayados. Otros autores hallaron que liposomas MLVs preparados a partir de DSPC, eran relativamente estables a pH 2 y más aún en mezclas con colesterol en relaciones entre 2:1 y 7:2 DSPC:Chol, obteniendo porcentajes de desencapsulación menores al 10% (Chiang y Weiner, 1987 ; Han et al., 1997).

En cuanto al efecto de la lipasa pancreática, se observó que las formulaciones más estables a su efecto eran, nuevamente, MLVs compuestos por mezclas DSPC y colesterol, los cuales solo liberaban un 20% de su contenido luego de ser incubados durante 2 h a 37°C en presencia de un nivel fisiológico de la actividad enzimática (Rowland y Woodley, 1980). Más estables aún resultaron los arqueosomas, ya que la enzima no es eficiente para romper la unión éter presente en los lípidos de arqueobacterias (Choquet et al., 1994). Rowland y Woodley también observaron que el efecto de la fosfolipasa es más marcado para los fosfolípidos, cuando estos se encuentran a una temperatura cercana a la de su transición. En nuestro trabajo, si bien no se estudió el efecto de la lipasa en forma individual, debe tenerse en cuenta que la digestión "intestinal" incluye los efectos combinados de la lipasa pancreática y las sales biliares.

La influencia del tipo de vesículas sobre la resistencia a las sales biliares también ha sido estudiada. Se ha demostrado que los liposomas MLVs son más estables frente a la solubilización por sales biliares que los ULVs (unilamelares) o los SUVs, como se desprende de los menores valores hallados para la desencapsulación de carboxifluoresceína (Patel et al., 2000). Una vez más, los MLVs compuestos por DSPC-Chol 2:1 resultaron los liposomas más resistentes frente a una concentración de 10 mM de sales biliares, perdiendo sólo un 24% de sonda fluorescente luego de 2 h a 37°C (Chiang y Weiner, 1987).

Como se ha visto, diversos estudios coinciden a la hora de señalar a los liposomas compuestos por mezclas de fosfolípidos saturados con colesterol como los más estables frente a los distintos agentes presentes a lo largo del TGI. Así, liposomas compuestos por DPPC presentaron una pérdida de carboxifluoresceína del 80% una hora después de la incubación con colato de sodio a una relación molar tensioactivo/lípidos de 4 y a 37°C (Kokkona et al., 2000). Por el contrario, el agregado de un 50% de colesterol disminuye la pérdida de la sonda encapsulada hasta un 30%.

Algunos autores incluso, atribuyen a los liposomas compuestos por DSPC una resistencia singular, que estaría causada por una menor permeabilidad de las bicapas debido a su elevada temperatura de transición (58°C) (Bakouche y Gerlier, 1986). El agregado de colesterol, disminuiría aún más la fluidez de estas membranas, aumentando su estabilidad (Vemuri y Rhodes, 1995). En el presente trabajo, los liposomas compuestos por HSPC poseen un 83% de ácido esteárico en sus cadenas acílicas, con lo cual los liposomas HSPC-Chol (3:2) se asemejan estructuralmente a los liposomas DSPC-Chol indicados como los más estables.

5.4.2. Liposomas con hierro

Como se mencionó anteriormente, la solución de hierro estabilizada con ácido ascórbico se empleó como modelo de sustancia hidrosoluble fácilmente oxidable. La incorporación de la misma en liposomas permitió evaluar si estos sistemas lipídicos contribuyen a la estabilización de la especie reducida del hierro (Fe^{2+}), cuando es sometida a un proceso de digestión simulada. Se incluyen en esta discusión los liposomas catiónicos y mucoadhesivos, que fueron preparados exclusivamente con FeAA, ya que el objetivo principal de su obtención era evaluar el efecto de su composición sobre la captación de hierro por los cultivos celulares.

Cuando se sometieron los liposomas con FeAA a los ensayos de caracterización realizados para los liposomas con HPTS, se hallaron dificultades relacionadas con la presencia de la solución ferrosa. En particular, las determinaciones que implicaban la separación de los liposomas digeridos por SEC eran dificultosas debido a la presencia de hierro precipitado, así como al aumento del diámetro de las vesículas. Esto impidió determinar los volúmenes incorporados y la permeabilidad Post-digestión. Además, la interferencia de la solución FeAA en el rango de pH estudiado no permitió monitorear la pérdida de contenido como consecuencia del proceso digestivo (ver Fig.152 apartado 4.5.2.1.).

Teniendo en cuenta las limitaciones planteadas, el efecto de la digestión sobre la estructura física de los liposomas con FeAA se evaluó a través del comportamiento del diámetro medio y la distribución de diámetros. La Fig.147 (apartado 4.5.1.) permite ver que luego de la etapa "estomacal" de la digestión *in vitro*, hay una reducción del diámetro medio para todas las formulaciones de liposomas, tal como se había observado para los liposomas con HPTS. Al final del proceso digestivo, los liposomas SPC recuperan los valores originales. Por el contrario, el resto de las formulaciones muestra un aumento significativo del diámetro medio, que en algunos casos alcanza valores que están fuera del rango confiable de medición del analizador empleado. Este efecto no se había observado en los liposomas con HPTS, lo que indica que existen alteraciones en la estructura física de las bicapas causadas por la digestión en presencia de la solución FeAA. Algunas formulaciones, como los liposomas HSPC-Chol muestran distribuciones que continúan siendo bimodales, sólo que desplazadas hacia valores mayores de diámetros. Otras, como los liposomas CHI, dan lugar a distribuciones prácticamente unimodales por la desaparición de las poblaciones de menores diámetros, como muestra la Fig.148. Las formulaciones más afectadas en su estructura física son los liposomas HSPC/DC-Chol (catiónicos) y CHI (mucoadhesivos), en los cuales el aumento de diámetro está acompañado por una intensa inestabilización que llega a ser visible incluso a nivel macroscópico. Esta diferencia del comportamiento respecto los liposomas modelo puede estar relacionada con el

shock osmótico que tiene lugar en las vesículas que encapsulan Fe^{2+} . En el caso de incorporar HPTS, las concentraciones utilizadas eran muy inferiores a las que se utilizan con los sistemas FeAA. En el primer caso, el medio interno constaba de buffer Tris 10 mM con HPTS 2 mM, mientras que en el segundo caso, los liposomas encapsulaban hierro 0,24 M con ácido ascórbico 0,48 M. Por otro lado, es de esperar que tanto el quitosano como el fosfolípido catiónico DC-Chol se insolubilizan a pHs cercanos al neutro, lo que contribuiría a la inestabilización que se acentúan en estas vesículas.

La integridad de la membrana por efecto de la digestión *in vitro* también se ve alterada en los liposomas que encapsulan hierro. Como se observa en la Tabla 52, los liposomas con FeAA presentan contenidos de liso PC significativamente mayores a sus homólogos con HPTS. En particular, los liposomas SPC son los más afectados, mientras que los HSPC-Chol nuevamente son los más resistentes. Los elevados valores obtenidos para los liposomas SPC (insaturados) coinciden con estudios previos sobre cambios en la permeabilidad, debidos a la peroxidación de liposomas insaturados en presencia de hierro y ácido ascórbico (Asayama et al., 1992). En este caso, se relacionaban las mediciones de permeabilidad, la liberación de una sonda fluorescente y el contenido de formas liso determinado por HPLC, cuando distintas formulaciones de liposomas se incubaban con una solución de Fe^{2+} estabilizada con ácido ascórbico. Como era de esperarse, al aumentar el número de insaturaciones, se observaba un aumento de la peroxidación acompañado por un incremento en la desencapsulación de la sonda.

Tabla 52: Cuantificación de liso PC por ^{31}P -RMN en liposomas convencionales con HPTS (apartado 4.4.8.) y FeAA 1:2 (apartado 4.5.3.) después de la digestión *in vitro* (n=2). Los porcentajes se calcularon como el % del área correspondiente respecto al área total.

Tipo de formulación	% Liso PC Liposomas con HPTS	% Liso PC Liposomas con FeAA
SPC Post	8,1 ± 1,3	44,0 ± 4,4
HSPC Post	2,6 ± 0,4	16,5 ± 1,1
HSPC-Chol Post	2,3 ± 0,5	9,6 ± 0,2

El análisis por RMN de ^{31}P realizado para los liposomas no convencionales digeridos presentaba una pequeña señal correspondiente a la PC, con una intensidad cercana al límite de detección. Este hecho, sumado a la ausencia de la señal correspondiente a la liso PC, se atribuyó a la formación de especies insolubles en cloroformo, como resultado de los fenómenos de inestabilización de estos liposomas frente al proceso digestivo. Debe tenerse en cuenta que esta labilidad puede estar relacionada tanto con su composición, como con la encapsulación de la solución FeAA, tal como ocurría en el caso de los liposomas convencionales.

En la bibliografía se mencionan algunos ejemplos sobre la inestabilidad de liposomas recubiertos con polisacáridos frente a procesos de digestión simulada, pero no se han hallado estudios sobre los efectos adicionales al incorporar una sal de hierro. O'Connor et al demostraron que liposomas SUVs con una cobertura de o-palmitoilpululano eran más susceptibles a la incorporación y solubilización por distintas sales biliares, como se observó a través de una incrementada pérdida del contenido (O'Connor et al., 1985).

Según lo expuesto, de todas las formulaciones estudiadas, los liposomas HSPC-Chol-FeAA son los que resultan más estables fisicoquímicamente cuando son sometidos a la digestión *in vitro*, tal como ocurre con los liposomas que contienen HPTS.

Para los liposomas con hierro encapsulado, la evaluación del contenido tiene dos aspectos importantes que están relacionados: el pH interno y el grado de oxidación del Fe²⁺ incorporado.

Según se mostró en el apartado 4.5.2., la determinación del pH interno empleando HPTS también se aplicó para caracterizar el comportamiento de distintas formulaciones de liposomas conteniendo FeAA 0,24 M, preparados a un pH inicial menor que 3. En este caso, los valores de pH durante la etapa "estomacal" se encuentran fuera del rango de medición de la sonda, pero los valores de pH esperados no tendrían ningún efecto en el estado de oxidación del hierro encapsulado, que es estable a pHs ácidos. Por el contrario, los resultados muestran que el agregado de la solución pan/EB y el bicarbonato hasta un pH de 6,5, que marca el comienzo de la etapa "intestinal", produce un aumento del pH interno lo cual puede inducir a la oxidación del hierro.

Como se había visto en la Fig.155, la mayor permeabilidad al pH se observa en los liposomas SPC, tal como sucedía con los liposomas con HPTS, y su pH final resulta mayor que el hallado en las formulaciones a base de lípidos saturados (HSPC y HSPC-Chol). Las formulaciones no convencionales estudiadas (liposomas catiónicos y mucoadhesivos), presentan un cambio de pH aún mayor (ver Fig.156) que casi instantáneamente, adquiere el valor de pH del medio externo. Este marcado efecto puede tener varias causas no excluyentes, como un incremento en la permeabilidad de la bicapa lipídica por efecto de la digestión, o una importante pérdida del contenido liposomal, que disminuiría la concentración del FeAA encapsulado y, por lo tanto, la capacidad buffer del ácido ascórbico. A estas hipótesis se suman los importantes cambios en la distribución de diámetros que experimentan estas vesículas (apartado 4.5.1.). Como se vio, el cambio del pH hasta valores de 6,5 causa una gran desestabilización. Por lo tanto, el brusco cambio de pH interno detectado indica que el interior las nuevas macroestructuras que se forman es mucho más accesible al OH⁻ y/o permite la salida del H⁺ en mayor medida que la de los liposomas convencionales.

En la Tabla 53 se comparan los valores obtenidos para el pH interno (apartado 4.5.2.) y el porcentaje de Fe²⁺ determinado por espectroscopía Mössbauer (apartado 4.5.4.) en los liposomas convencionales con FeAA 1:2 ó FeAA 1:5 al final de la digestión *in vitro*.

Como puede verse, los liposomas que encapsulan FeAA 1:5 presentan pHs finales similares en el rango 5,2-5,4, lo cual se refleja en porcentajes de Fe²⁺ cercanos al 60% que no difieren significativamente, teniendo en cuenta la elevada variabilidad de estas determinaciones.

Tabla 53: Comparación entre el pH interno (pH_f) y el porcentaje de Fe²⁺ determinado por espectroscopía Mössbauer, al final de la digestión *in vitro*. Los resultados se expresan como el promedio ± sd (n≥2).

Muestra	FeAA 1:5		FeAA 1:2	
	pH _f	% Fe ²⁺	pH _f	% Fe ²⁺
SPC-FeAA	5,44 ± 0,54	67 ± 17	5,17 ± 0,52	50 ± 12
HSPC-FeAA	5,29 ± 0,53	56 ± 14	4,76 ± 0,48	26 ± 7
HSPC-Chol-FeAA	5,20 ± 0,52	60 ± 15	4,77 ± 0,48	37 ± 9

Los liposomas con FeAA 1:2 presentan valores de pH interno levemente inferiores a los anteriores, cercanos al límite de medición del pH con HPTS. En todos los casos, estos liposomas presentan en general menores porcentajes de Fe^{2+} remanente que los de los liposomas FeAA 1:5 homólogos. En lo que respecta al contenido de Fe^{2+} , el menor valor lo presentan los liposomas HSPC y no coincide con un mayor pH interno final. Por lo tanto, en lo referente a este catión, su estabilidad no está condicionada por los diferentes cambios de pH que experimentan los tres tipos de liposomas. Contrariamente, se aprecia una mayor estabilidad del Fe^{2+} en el caso de los liposomas con una relación FeAA 1:5 encapsulada, lo cual indica que, en el rango de pHs que se ha determinado, la mayor presencia de ácido ascórbico estabiliza químicamente a dicho catión.

Si se comparan los valores obtenidos para liposomas con el comportamiento de una solución FeAA sin encapsular (<10% Fe^{2+}), en todos los casos la incorporación en liposomas protegió a la solución de la oxidación mediada por el pH de la etapa "intestinal" de la digestión *in vitro*, como ya había sido mencionado en el apartado 4.5.5. Por lo tanto, si bien se observa un elevado grado de oxidación del Fe^{2+} , aún para los liposomas HSPC-Chol-FeAA 1:2, ésta resulta la formulación más estable frente a la digestión y la más impermeable al cambio de pH.

5.5. EVALUACIÓN DE LA ABSORCIÓN DE HIERRO INCORPORADO EN LIPOSOMAS

Como se mencionó en el apartado 1.11.2.5., los cultivos de células Caco-2 poseen numerosas características morfológicas y bioquímicas similares a los enterocitos. Entre ellas, las más relacionadas con la absorción del hierro y las interacciones con liposomas son las siguientes:

- El transporte de hierro desde la membrana apical hasta la basal es un proceso que depende del estado de oxidación del elemento y del nivel de hierro basal de las células, tal como ocurre *in vivo* (Alvarez-Hernandez et al., 1991). De este modo, cuando el nivel de ferritina intracelular disminuye, aumenta la captación de hierro (Gangloff et al., 1996b).
- Resultan sensibles a los mismos inhibidores y/o favorecedores de la absorción que las células intestinales normales (Au y Reddy, 2000).
- Presentan actividad de la glicoproteína P (P-gp) en la membrana apical, que es responsable del transporte polarizado de diversas sustancias, en particular, los fosfolípidos (Lo, 2000).
- Poseen microvellosidades y uniones estrechas intercelulares, que pueden ser alteradas para favorecer la absorción paracelular (Johansson et al., 2002).

Sin embargo, existen algunas limitaciones del modelo que deben tenerse en cuenta. Dado que los cultivos no contienen células de Goblet, las monocapas carecen de la capa de mucina que recubre los enterocitos en el epitelio intestinal. Esto debe tenerse en cuenta a la hora de evaluar la eficacia de formulaciones mucoadhesivas, como los liposomas recubiertos por quitosano. Por otro lado, la resistencia eléctrica transepitelial (TEER), un parámetro que caracteriza la integridad de una monocapa, es más alta que la hallada en el intestino delgado, siendo más similar a la presente en el colon (Neuhoff, 2005). Tampoco se encontró una buena

correlación entre el contenido de ferritina intracelular y el transporte, como ocurre *in vivo* (Gangloff et al., 1996b).

Estos hechos, sumados a una menor actividad de componente responsable de la salida de hierro de la célula (ver Ireg1, apartado 1.10.2., Introducción), han llevado a postular que la línea celular Caco-2 resulta adecuada para las mediciones de captación de hierro pero cuestionable para las medidas de transporte.

Entre los numerosos factores que pueden influir en los resultados obtenidos para la captación de hierro empleando células Caco-2 se encuentran:

- Las condiciones en que se cultivan las monocapas, como por ejemplo la densidad de siembra, el número de repique, el grado de diferenciación, el tiempo de cultivo en las placas, la composición del medio de cultivo, entre otras.
- El diseño del experimento: si las células se siembran en placas convencionales, o en placas Transwell, como se verá en el apartado 5.5.1.
- El contenido de hierro basal de las células, generalmente caracterizado por el contenido de ferritina intracelular.
- La concentración de hierro en la siembra.
- El estado de oxidación del hierro evaluado, que está relacionado con la presencia de quelantes y/o reductores.
- El pH y la temperatura a la que se incuban durante el ensayo de absorción.
- El agregado de hierro radiactivo al hierro intrínseco de una formulación, lo cual implica suponer que ambas especies se intercambian completamente, y por lo tanto la radiactividad será un indicador del comportamiento del hierro presente en la muestra original.
- El empleo de reactivos específicos que eliminen el hierro insoluble adsorbido a la membrana apical de las células, y la remoción cuantitativa de los mismos una vez aplicados.
- La solubilización adecuada de los extractos celulares.
- El método de determinación del hierro captado en los cultivos celulares.

Como se desprende de los factores mencionados, los diseños experimentales empleados pueden tener una variabilidad muy alta, lo cual dificulta enormemente las comparaciones. A continuación se discutirán los factores más relevantes que han sido estudiados en este trabajo.

5.5.1. Aspectos metodológicos

El tiempo requerido para que las células Caco-2 se diferencien, hace necesario el agregado de antibióticos y antifúngicos al medio de cultivo, como se observó sin excepciones en todos los protocolos de cultivo indicados. Aún así, se trata de cultivos muy susceptibles a la contaminación, como se vio durante el desarrollo de este trabajo, razón por la cual se eligieron las condiciones que permitieran el menor tiempo de cultivo posible.

En nuestro caso, las células alcanzaron la confluencia al cabo de 5-6 días de sembradas sobre placas convencionales, lo cual coincide con trabajos previos (Glahn et al., 1995 ; Han et al., 1995a). Por otro lado, existe una cierta variabilidad en los tiempos de cultivo previos a los estudios de absorción. Cuando se realizan estudios de transporte, resulta fundamental trabajar a la máxima TEER. Este parámetro indica que la monocapa está sellada al pasaje de sustancias entre las células, con lo cual si existe transporte, será exclusivamente transcelular. Álvarez

Hernández et al. determinaron que el valor máximo se alcanza a los 18 días de cultivo (Alvarez-Hernandez et al., 1991), y estas condiciones fueron adoptadas por otros investigadores (Tallkvist et al., 2000 ; Song et al., 2002). Para medidas de captación, se demostró que de 8 a 10 días después de alcanzada la confluencia, eran suficientes para lograr la maduración de las células (Hidalgo et al., 1989), y éste fue el período pre-incubación adoptado por numerosos autores (Glahn et al., 1995 ; Han et al., 1995a ; Au y Reddy, 2000 ; Jovani et al., 2001). En el presente trabajo, los ensayos de captación de hierro se realizaron según este criterio, entre los 12 y los 15 días después de la siembra.



Fig.186: Microfotografía de una monocapa de células Caco-2 14 días después de ser sembradas en placas convencionales (x40; Servicio de Cultivos Celulares, Universidad Autónoma de Barcelona).

En cuanto al número de repique al que se utilizaron las células, éste varía mucho según el origen de la línea celular y no tiene sentido emplear un criterio externo; sólo procurar que todos los experimentos se realicen empleando números de repiques similares, para evitar un factor más de variabilidad. De este modo, se cultivaron células provenientes de los repiques 54 a 57 (ver Fig.186).

Un factor fundamental a la hora de evaluar la absorción de hierro, es el contenido del mismo en el medio de cultivo. Este nivel determina el estado basal que tendrán las células maduras y por lo tanto, su capacidad de absorción.

En el presente trabajo, se emplearon células "normales", es decir con contenidos de ferritina similares a los existentes en enterocitos de individuos con reservas de hierro normales. Para esto se cultivaron con un medio conteniendo 10% suero fetal bovino (FBS), cuya cuantificación arrojó un valor de 4,2 μM , similar al valor de 4,4 μM hallado previamente (Gangloff et al., 1996b). Aún así, existen variaciones entre los niveles de hierro presentes en los medios de cultivo, y suelen considerarse valores normales de hierro a los comprendidos en el rango 2,5-10 μM .

En otros casos se emplean células cultivadas en medios en los cuales el hierro ha sido eliminado mediante quelantes, cuyos niveles de hierro son menores a 0,25 μM . En estas condiciones se obtienen células "anémicas", con una mayor capacidad de absorción. Sin embargo, se había sugerido que la ausencia de FBS podía alterar la integridad de las monocapas y/o disminuir el contenido de proteínas (Hashimoto y Shimizu, 1993). Otros autores no observaron estas diferencias, pero hallaron menores valores de TEER, con lo cual estaría afectado el transporte, debido al aumento de la permeabilidad (Gangloff et al., 1996b).

Otro factor fundamental es el diseño del experimento. En este sentido pueden realizarse ensayos de captación empleando placas convencionales (Fig.187(A)), ensayos de captación empleando placas Transwell (Fig.187(B)) o ensayos de captación y transporte empleando placas Transwell (Fig.187(C)). En el primer caso, que corresponde al diseño empleado en el presente trabajo, las células se cultivan sobre el fondo de una placa convencional (Jovani et al., 2001). Al cabo del tiempo necesario para su maduración, se incuban agregando la siembra directamente sobre la monocapa. La ventaja de este diseño es su simplicidad, lo cual disminuye

los artefactos metodológicos. Como desventaja principal puede mencionarse que el contacto directo de la siembra con los cultivos podría alterar la integridad de la monocapa, especialmente en el caso de muestras previamente digeridas.

En el segundo caso, las células se cultivan en la base de una placa bicameral Transwell, que se caracteriza por poseer dos compartimientos (el superior o donador, y el inferior o receptor) separados por una membrana, generalmente con un corte de 15.000 Da (Fig.187(B)). Este diseño permite aplicar la siembra en el compartimiento superior, de modo que no entre en contacto con la monocapa (Glahn et al., 1996). En el caso del hierro, sólo la fracción soluble logra atravesar la membrana por difusión. Por lo tanto, el artefacto principal es la retención en la membrana de especies de alto peso molecular conteniendo hierro y de factores promotores o inhibidores de la absorción. Otro ejemplo de los artefactos asociados al empleo de membranas, se observa en los altos valores de captación hallados para una fórmula infantil a base de soja, la cual había demostrado presentar inhibidores de la absorción *in vivo* (Etcheverry et al., 2004). Los autores postulan que los inhibidores, generalmente de estructura proteica, han quedado retenidos por la membrana de diálisis.

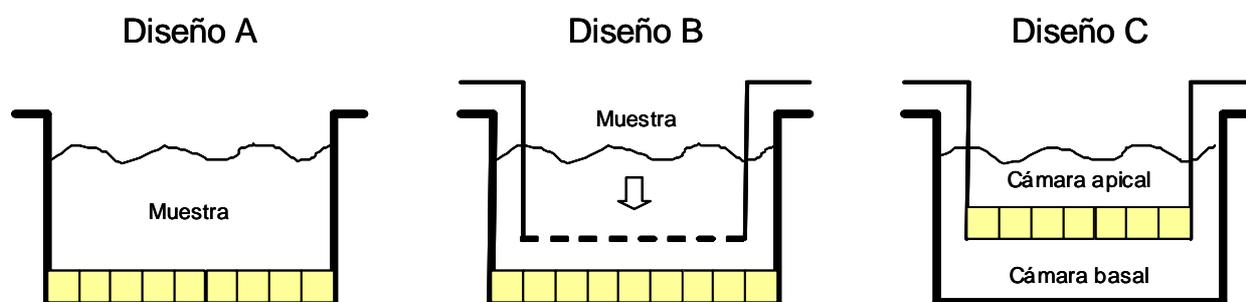


Fig.187: Diferentes diseños experimentales empleados en los ensayos con cultivos de células Caco-2. El diseño A corresponde al cultivo sobre la base de una placa convencional. El diseño B es similar al A, pero la muestra se encuentra separada de la monocapa por una membrana porosa. En el diseño C las células se siembran sobre la membrana, dejando una cámara apical (superior), donde se aplica la muestra y una basal (inferior), en la cual se realizan las medidas de transporte.

Finalmente, para realizar estudios de transporte a través de las células, se cultivan las mismas sobre una membrana con poros de 3 μm de diámetro de poro cubierta con colágeno, ubicada entre dos cámaras, como se muestra en la Fig.187(C). Este diseño permite realizar estudios de captación y transporte en forma simultánea, si bien sobreestima el valor real del transporte, ya que incluye el hierro transferido por la vía paracelular

Los valores de captación representan la cantidad de hierro retenido por las células. En diseños como los mostrados en las Figuras A y B, los valores de captación incluirán los correspondientes al transporte, aunque no se hayan medido. Debe tenerse en cuenta que cuando se realiza un experimento combinado de captación y transporte empleando la misma monocapa, la retención del hierro por las células es menor, ya que un porcentaje ha sido transportado a través de las células hacia la cámara receptora. Por lo tanto sólo la suma entre captación y transporte es comparable con la captación determinada mediante los otros dos diseños.

Un factor fundamental en el diseño de experimentos de captación de hierro con cultivos de Caco-2 es el empleo de reactivos que permitan eliminar el hierro insoluble que pueda depositarse sobre las monocapas. La idea de emplear un reactivo específico para descartar estos precipitados (REH) surgió al observar que las células incubadas con altas concentraciones de hidróxido férrico, presentaban una alta captación de hierro pero un transporte no detectable (Glahn et al., 1995). Estos resultados sugerían que los elevados valores obtenidos para la captación respondían a un artefacto analítico, teniendo en cuenta que se trata de la forma del hierro con menor biodisponibilidad en seres humanos (Heinrich, 1987). Según lo observado por Glahn et al. en una serie de artículos (1995-1998), el hierro en solución sin quelantes, o en menor medida con quelantes, cuando es incubado a un pH mayor que 2, forma con el tiempo hidróxidos férricos poliméricos y amorfos. Estas especies se suspenden en forma coloidal y se adsorben a las membranas celulares. Una vez depositado, este hierro insoluble no se elimina mediante lavados sucesivos, ni con quelantes, según lo estudiado con EDTA. Para eliminarlo en forma eficiente, se requiere la reducción del Fe^{3+} y una quelación irreversible del Fe^{2+} formado. Esta doble acción se logra mediante la combinación del reductor ditionito de sodio y el quelante disulfonato de batofenantrolina, cuyo complejo con el hierro tiene una alta constante de formación. Una de las limitaciones del empleo del REH es que el reactivo no diferencia el hierro adsorbido a la superficie de las membranas celulares del hierro unido a un transportador. Con lo cual podría haber hierro unido específicamente que fuese eliminado, y los resultados obtenidos serían menores a los reales.

Otro factor que también debe tenerse en cuenta es el efecto del REH sobre la integridad de las monocapas. En el presente trabajo, luego de los 10 minutos de incubación con el reactivo a una concentración de 1 mM, se apreciaba una tendencia de las células a despegarse de la placa, confirmada por una leve disminución del contenido de proteínas determinado en el extracto celular. Estos resultados parecen diferir de los obtenidos en los trabajos de Glahn et al., en los cuales no se observaban daños en la membrana apical ni en las uniones intercelulares, así como tampoco disminuía la viabilidad al cabo de 60 minutos de incubación con REH a la máxima concentración estudiada (5 mM).

Con respecto a la concentración de trabajo, los primeros estudios de Glahn et al. sugieren el empleo de una concentración de 5 mM. En trabajos posteriores, los autores postulan que una concentración de 1 mM es igualmente eficiente para eliminar un alto porcentaje de hierro insoluble a partir de una siembra 100 μM , pero no presentan los resultados (Glahn et al., 1998 ; Puyfoulhoux et al., 2001). Por este motivo se evaluó en el presente trabajo, si el empleo del REH a 1 mM presentaba igual eficiencia que a 5 mM. Los resultados obtenidos para la captación de hierro a partir de una solución de FeAA 1:2 sembrada a una concentración de 100 μM , fueron de $8,57 \pm 0,05$ y $6,96 \pm 0,52$ nmol Fe/mg proteína para REH 5 mM y 1 mM respectivamente. Es decir, que el empleo de una menor concentración de REH parecía incluso más eficiente. En realidad, teniendo en cuenta la alta dispersión de los resultados obtenidos (hasta un 25%), esta diferencia no se consideró significativa, por lo que en los ensayos posteriores se trabajó a una concentración 1 mM de REH.

La Tabla 54, cuyos valores se calcularon a partir de los resultados presentados en el apartado 4.6.1.1., muestra la necesidad de emplear el REH tanto para soluciones FeAA como

para liposomas, incluso para aquellos purificados por SEC (M1). En cuanto a los lavados posteriores a su aplicación, se evaluó la posibilidad de realizar sólo uno para reducir al mínimo la manipulación de los cultivos, si bien otros autores realizaban dos lavados con buffer (Gangloff et al., 1996b). Como se desprende de la Tabla 54, para eliminar completamente el complejo Fe^{2+} -batofenantrolina luego de la siembra de una solución de FeAA 1:2 fueron necesarios 2 lavados. Las muestras de liposomas sin purificar (M0) se comportaron de la misma manera, ya que contienen mayoritariamente FeAA no encapsulado. Las muestras M1, si bien es suficiente el empleo de 1 lavado post-REH, se trataron finalmente de igual manera que las suspensiones M0, para evitar diferencias en el tratamiento de las monocapas.

Tabla 54: Efecto del REH y de los lavados posteriores a su aplicación sobre la concentración de hierro determinada en células Caco-2. Los resultados se expresan como porcentaje respecto al valor inicial y fueron calculados a partir de la Fig.164 (apartado 4.6.1.).

Muestra	% Hierro total		
	Sin REH	REH + 1 Lavado	REH + 2 Lavados
Solución FeAA 1:2	100	67	39
Liposomas HSPC-Chol-FeAA (M1)	100	30	36

El hecho de que los liposomas M1 requieran de al menos un lavado con REH resulta llamativo, ya que todo el hierro aportado inicialmente a la siembra está contenido en las vesículas. Ya había sido descrito que el REH no tiene influencia en los valores de captación obtenidos para especies solubles, como por ejemplo el complejo Fe^{3+} -NTA (ácido nitrilo acético) (Glahn et al., 1995). En el caso de los liposomas M1, es probable que el reactivo elimine el hierro desencapsulado durante la hora de incubación a pH 7,4 (buffer uptake), que a dicho pH se oxida a Fe^{3+} y puede depositarse sobre la monocapa. Apoyando esta hipótesis, se ha descrito un importante grado de oxidación para soluciones de Fe^{2+} aún en presencia de ácido ascórbico, a partir de los 20 minutos de incubación a pHs entre 6,8 y 7,4 (Dorey et al., 1993).

Resulta interesante la comparación entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores en los casos más desfavorables, para verificar la eficiencia del lavado con el REH. En el presente trabajo, la muestra que contiene una mayor concentración de Fe^{3+} en suspensión, que es susceptible de depositarse sobre las células, es la solución FeAA 1:2 sometida a la digestión *in vitro* (POST-digestión). Como se demostró en el apartado 4.5.5., esta solución presenta un contenido del 68% de hierro insoluble y se siembra a una concentración total de 100 μM (68 μM insoluble), sin una centrifugación previa. Las células incubadas de esta forma, se lavan con REH a una concentración de 1 mM. En los trabajos de Glahn et al., se incubó Fe^{3+} sin quelante (solubilidad: 0,2%) a una concentración de 200 μM (199,8 μM insoluble) y se demuestra que se remueve el 65% del hierro insoluble con REH 2 mM, es decir 130 μM (Glahn et al., 1995). Suponiendo un comportamiento lineal, puede estimarse que el REH aplicado a una concentración de 1 mM, será capaz de remover una concentración de hierro insoluble de 68 μM .

A pesar de las evidencias sobre la utilidad del REH para obtener buenas correlaciones en las medidas de absorción, muchos autores no lo han adoptado, y lavan las monocapas con EDTA o simplemente con un buffer (Han et al., 1995a ; Au y Reddy, 2000 ; Tallkvist et al., 2000 ; Jovani et al., 2001). Este hecho debe tenerse en cuenta cuando se realizan

comparaciones, ya que es uno de los factores que mayor influencia tiene sobre los resultados obtenidos.

5.5.2. Absorción de hierro mediante cultivos de Caco-2

La elección de una concentración de hierro de 100 μM para la incubación de las células Caco-2 en este trabajo se basó en los estudios de Glahn et al., quienes hallaron, a esa concentración, una actividad máxima de la ferrirreductasa presente en la membrana apical (Glahn et al., 1995). Estos autores describen además, que el mecanismo de captación de hierro se satura a concentraciones mayores a 200 μM . Sin embargo, en lo referente a la concentración de las siembras, hay una gran variabilidad en la bibliografía consultada, como se muestra en la Tabla 55.

En el presente trabajo, una vez determinada la concentración total de hierro en los liposomas purificados por SEC (muestras M1 que, por lo tanto, inicialmente tienen todo el hierro encapsulado), las muestras sin digerir se diluyeron hasta una concentración de 100 μM en buffer uptake antes de sembrarse en las monocapas. En las muestras digeridas, la determinación de hierro se realizó antes de la digestión, y la dilución, realizada inmediatamente después de la digestión, se realizó hasta una concentración teórica de 100 μM , sin tener en cuenta cualquier posible pérdida de hierro soluble durante el proceso digestivo. De esta forma se imitan los efectos de los procesos digestivos sobre la dosis administrada y, por consiguiente, sobre cómo éstos influirán sobre la captación del hierro.

Con respecto a los mecanismos de absorción, se observó mediante estudios cinéticos que en la absorción del Fe^{2+} intervienen dos componentes: uno saturable y otro no saturable. Por el contrario, para la absorción de hierro férrico sólo intervendría un componente no saturable, y la absorción resultaría independiente del contenido de hierro de las células (Gangloff et al., 1996b). La existencia de componentes saturables y no saturables fue demostrada tanto para Fe^{2+} como para Fe^{3+} en ratas (Carpenter y Ummadi, 1995) y ratones (Raja et al., 1987). Si bien los estudios cinéticos exceden el objeto del presente trabajo, se observó en nuestro caso un comportamiento saturable tanto para la solución FeAA sin digerir (100% Fe^{2+} al comienzo de la incubación) como para la solución FeAA digerida (menos del 10% de Fe^{2+} al comienzo de la incubación), como había sido descrito previamente (Glahn et al., 1995). Como puede apreciarse en el apartado 4.6.1.2., la solución FeAA 1:2 no digerida la saturación se alcanzó a una concentración situada entre, aproximadamente, 40 y 100 μM , mientras que para la digerida, la saturación se alcanza para concentraciones iniciales de hierro superiores a 100 μM . Debe recordarse que durante la incubación, y debido a que ésta se realiza a un pH de 7,4, el hierro experimenta un proceso oxidativo, de manera que durante la hora que dura el proceso la siembra con un porcentaje inicial de Fe^{2+} del 100% también presentará la especie Fe^{3+} .

Como se mostró en el apartado 4.6.2., el contenido de hierro basal determinado para las células Caco-2 cultivadas en un medio conteniendo 4,2 μM (10% FBS) e incubadas con buffer uptake, fue de 0,54 nmol Fe/mg prot/h (n=4). En la bibliografía no suelen incluirse los valores basales, y en muchos casos se restan directamente de los valores de absorción. Álvarez-Hernández et al. obtuvieron un valor basal mucho menor (0,025 nmol Fe/mg prot/h) a partir de

células incubadas con un medio con menor contenido de hierro (1 μM) (Alvarez-Hernandez et al., 1991). Otra comparación que puede realizarse es respecto al valor obtenido por Glahn et al., cuando se incubaron las monocapas con hierro sin reductores ni quelantes (99,8% insoluble), o con Fe^{3+} -NTA a pH 6,7 y posteriormente se lavaron con REH a 5 mM (Glahn et al., 1995). Se trata de dos formas de hierro con muy baja absorción, la primera debido a la precipitación del hierro insoluble, sensible al REH y la segunda debido a su estado de oxidación, a pesar de su elevada solubilidad. Los valores obtenidos para el contenido de hierro intracelular fueron de 0,6 y 0,4 nmol Fe/mg prot/h respectivamente, similares al obtenido para el nivel basal en nuestro caso. Por otro lado se han publicado valores mucho menores (0,1 nmol Fe/mg prot/h) para el complejo Fe^{3+} -NTA incubado a 10 μM en ausencia de ácido ascórbico, incluso sin el empleo del REH (Han et al., 1995a). La similitud entre los valores obtenidos y los descritos por la bibliografía validan los cultivos empleados, así como los métodos de análisis de hierro y de proteína.

La Tabla 55 muestra una comparación entre los valores de absorción de hierro por células Caco-2 hallados en este trabajo y los encontrados por los principales autores que han estudiado el tema. Para poder realizar comparaciones, los resultados obtenidos se expresan en nmol Fe/mg de proteína/h, una unidad que incluye las correcciones por el contenido proteico de los wells y el tiempo de incubación. En algunos trabajos no se informa sobre los contenidos de proteínas, sino que simplemente se indican valores de nmol o μg Fe por well; en otros, no se muestran valores absolutos, sino relaciones entre los valores obtenidos para las muestras y las soluciones empleadas como control. En ambos casos, la captación de hierro se indica como NI (no informado) por lo que sólo pueden compararse los valores de porcentaje de absorción. En la mayoría de los ensayos realizados con diseños de tipo C (Figura 187, apartado 5.5.1.), estos valores (% Absorción) se obtienen sumando la captación y el transporte. La indicación de NI para el porcentaje de absorción se aplica a los casos en que los autores expresan el transporte como velocidad (pmol/h.cm^2) y no se dispone de los datos para calcularlo en las mismas unidades que la captación. Cabe aclarar que sólo se han volcado los valores correspondientes a células "normales", es decir, que han sido cultivadas en medios con contenidos de hierro entre 2,5 y 10 μM . Además, los valores informados corresponden a muestras sin digerir, excepto que se indique lo contrario.

Como se desprende de la Tabla 55, la solución control utilizada por la mayoría de los autores es FeAA, pero existe una gran variabilidad respecto a la relación Fe:AA y a la concentración de siembra. La primera diferencia observada entre nuestros resultados y los extraídos de la bibliografía consultada es el empleo, en nuestro caso, de una relación menor (Fe:AA 1:2), con la excepción de García et al. que se discutirá a continuación. Como es sabido, el AA es uno de los más potentes promotores naturales de la absorción del hierro, y se ha postulado que esto se debe a su capacidad como quelante del hierro, previniendo la formación de complejos polinucleares, pero en mayor medida, debido a su poder reductor, que lo convierte en la especie biodisponible (Dorey et al., 1993).

En los enterocitos y también en las células Caco-2, se estudió un mecanismo por el cual el Fe^{3+} no hemínico es reducido por AA u otros reductores, como la ferrirreductasa (proteína de membrana), para luego ser traslocado como Fe^{2+} al interior celular (Raja et al., 1992).

Tabla 55: Comparación entre valores obtenidos para la absorción de hierro por células Caco-2 por distintos autores. Lipos. Pre/Post: liposomas HSPC-Chol-FeAA 1:2 antes y después de la digestión *in vitro*. El tipo de diseño se corresponde con los modelos A, B y C presentados en la Fig.187, apartado 5.5.1. Los valores de absorción de Hermida (2006) fueron tomados de la Tabla 42, apartado 4.6.2. La captación de hierro representa su contenido en los extractos celulares, mientras que el porcentaje de absorción incluye el transporte, además del contenido celular. ND: no determinado. IF: Infant formulas.

Fuente	Especie	Concentrac. siembra (μM)	pH	Tipo de diseño	REH	Captación de Fe (nmol/(mg prot·h))	% Absorción
Hermida (2006)	FeAA 1:2 pre	100	7,4	A	sí	$5,3 \pm 0,6$	5,6
	FeAA 1:2 post	100 ⁽¹⁾	7,4	A	sí	$3,4 \pm 0,2$	3,7
	Lipos. Pre	100	7,4	A	sí	$2,3 \pm 0,2$	3,1
	Lipos. Post	100 ⁽¹⁾	7,4	A	sí	$7,2 \pm 0,6$	8,0
Álvarez (1991)	FeAA 1:1.000	500	7,4	C	no	0,61	ND
Glahn (1995)	FeAA 1:5	200	6,8	B	sí	1,6	1,3
Han (1995)	FeAA 1:100	10	7,0	A	no	1,4	17
Glahn (1996)	FeAA 1:20	10	7,4	B	sí	1,8	ND
Gangloff (1996)	FeAA 1:20	10	6,7	C	sí	0,7	ND
	FeAA 1:20	100	6,7	C	sí	$1,0$ ⁽²⁾	ND
García (1996)	FeAA 1:2	500	5,5	C	no	ND	21 ⁽³⁾
	carne digerida	500	5,5	C	no	ND	11,2
Au (2000)	FeAA 1:20	10	6,8	C	no	ND	9-13
Jovaní (2001)	Fe ³⁺ -NTA	88	7,0	A	no	ND	no detectable
	IFs	50-90	7,0	A	no	ND	7-14

(1) Concentración determinada antes de la digestión *in vitro*. (2) Valor hallado tanto para hierro soluble como insoluble. (3) Determinado como desaparición del hierro en la cámara apical sumado al hierro transportado.

De hecho, ya en los primeros ensayos con Caco-2 se observó la absorción preferencial del hierro en su forma reducida, como surge de la comparación entre el valor de 0,61 nmol/mg prot/h obtenido para una solución de FeAA 1:1000 en comparación con 0,03 nmol/mg prot/h obtenido para una solución soluble de Fe³⁺-NTA (Alvarez-Hernandez et al., 1991). Otros autores hallaban valores no detectables cuando incubaban las monocapas con hierro en su forma oxidada, independientemente de su solubilidad (Han et al., 1994 ; Jovani et al., 2001). El efecto del AA sobre la absorción de hierro por cultivos de Caco-2 también se verificó en fórmulas infantiles (IF), estimando la captación del mismo a través del nivel de ferritina intracelular (Etcheverry et al., 2004).

En nuestro caso, el objetivo principal era evaluar la absorción de FeAA encapsulado en liposomas, por lo tanto la relación Fe:AA debía ser compatible con las formulaciones lipídicas. En un principio se vio que, a la concentración inicial de hierro (0,24 M), la mínima relación que permitía obtener una suspensión de liposomas estables era 1:5 (Fe:AA). Cualquier incremento en la concentración de AA se traducía en suspensiones heterogéneas aún para las condiciones más energéticas de procesamiento. Por otro lado, los liposomas conteniendo FeAA 1:5 habían resultado levemente más permeables al cambio de pH (apartado 4.5.2.3.) durante la digestión *in vitro* respecto a los liposomas con FeAA 1:2, y mostraban una cierta heterogeneidad a nivel macroscópico a menores tiempos de almacenamiento. Todo esto, sumado a que los ensayos preliminares de absorción de hierro con relaciones FeAA 1:5, libre o encapsulado en liposomas, no causaron un incremento de la absorción respecto los realizados con FeAA 1:2, llevaron a descartar la relación Fe:AA 1:5. Por el contrario, cuando se sembraron los liposomas HSPC-

Chol-FeAA 1:5 digeridos, se obtuvo una captación de $4,3 \pm 0,4$ nmol Fe/mg prot/h ($n=3$), menor a la hallada para liposomas HSPC-Chol-FeAA 1:2 ($7,2 \pm 0,6$ nmol Fe/mg prot/h ($n=8$)). En forma similar, García et al. no habían encontrado diferencias en la captación cuando incubaron soluciones de FeAA a relaciones entre 1:2 y 1:100, mientras que veían alteraciones en las monocapas a partir de 1:50, lo que los llevó a seleccionar la relación con menor contenido de AA (García et al., 1996).

Otro factor que aporta variabilidad es el pH del medio de incubación. Como había sido demostrado previamente, el efecto reductor del AA es dependiente del pH, con un máximo a 5,5 (Bothwell et al., 1979). Este hecho fue verificado mediante cultivos de células Caco-2, cuando se encontró que la absorción de hierro a partir de una solución de FeAA 1:2 era máxima a pH 5,5 respecto a pH 5 ó 7 (García et al., 1996). A este pH hallaron un 21% absorción (captación más transporte), como se observa en la Tabla 55, mientras que el porcentaje se redujo a la mitad a pH 7. La influencia del pH también fue observada cuando el agregado de AA a un alimento modelo no aumentaba el porcentaje de absorción a pH 6,8. Sólo mediante la reducción del mismo a 6,0, se incrementó la absorción en un factor de 6-7 veces (Au y Reddy, 2000). Por el contrario, el hierro hemínico no se absorbía prácticamente a ese pH, lo cual demostraba que cada fuente de hierro se absorbe a un pH diferente. En nuestro caso, la incubación se realizó a pH 7,4, de acuerdo con Glahn et al. (1995). Estos hechos, conjuntamente con la inestabilidad de los liposomas observada cuando se incrementó la relación de AA respecto al hierro, podrían explicar que no se observase ningún efecto positivo en la absorción al realizar los ensayos con la relación FeAA 1:5.

Por otro lado, como se observa en la Tabla 55, el porcentaje de absorción para una solución FeAA 1:2 es menor al obtenido por García et al., pero debe tenerse en cuenta (a) que la concentración de la siembra en nuestro caso fue menor (100 μ M vs. 500 μ M), (b) que se empleó el REH para la eliminación del hierro insoluble y (c), en nuestro caso el pH fue superior, de manera que la absorción de hierro no se ve tan favorecida.

En lo que respecta a los valores de captación de hierro, existe disparidad entre los presentados por los diversos autores. Estrictamente, sólo podrían compararse los obtenidos empleando un diseño del mismo tipo, ya que, como se explicó anteriormente, algunos de ellos suelen subestimar la absorción de hierro. Además, deberían considerarse sólo los experimentos realizados con siembras de concentraciones similares de hierro. Por lo tanto, los resultados presentados en este trabajo para la solución FeAA sólo son comparables a los de Han et al. por el tipo de diseño, pero por la concentración sembrada (10 μ M).

Teniendo presente estas limitaciones, se aprecia que los valores obtenidos para la captación de hierro son mayores que los informados por otros autores, no habiéndose encontrado una explicación para este hecho. Sin embargo, la disparidad presentada por la bibliografía induce a pensar que, en lo que respecta a la captación, quizás únicamente deberían compararse los valores obtenidos en las mismas condiciones dentro de un mismo trabajo. Así por ejemplo, resulta sorprendente el hecho de que en el caso de Glahn se obtengan valores similares realizando incubaciones con siembras de 10 y 200 μ M (1996 y 1995 respectivamente), utilizando REH en ambos casos, y realizándose los experimentos con diseños diferentes. Tal vez sea por esto que la bibliografía pone más énfasis en los resultados de porcentajes de absorción,

siendo el parámetro más ampliamente usado para caracterizar las incubaciones. El estudio comparativo muestra que los valores obtenidos en el presente trabajo son algo menores que los hallados por otros autores, tanto para alimentos como para el control de FeAA (ver valores de % Absorción de Han et al. 1995, García et al. 1996, Au et al. 2000 y Jovaní et al. 2001). Debe notarse sin embargo, que ninguno de estos autores emplea el REH para la remoción del hierro insoluble, el cual debería añadirse al hierro no absorbido, lo que podría justificar los valores más elevados. Tampoco se han hallado estudios de hierro incorporado en liposomas con cultivos de Caco-2, que permitan establecer rangos de absorción.

Con respecto a los valores hallados *in vivo* con seres humanos, el hierro no hemínico se absorbe en un rango entre 2 y el 20%, dependiendo del nivel de hierro en el individuo y de los factores promotores e inhibidores de la absorción (Monsen, 1988). En particular, para el ascorbato ferroso administrado a individuos sanos, se hallaron valores de absorción del 8,7%, mientras que la leche fortificada con liposomas (SPC-FeAA 1:2) administrada a un mismo nivel de hierro, resultó en una absorción del 2% (Uicich et al., 1999). Los valores hallados en el presente trabajo se encuentran dentro del rango informado para la absorción *in vivo*, pero llama la atención que la absorción de los liposomas digeridos sea mayor que la correspondiente a liposomas sin digerir. En este sentido, el aumento del porcentaje de absorción de hierro por efecto de la digestión ya se había observado en ensayos con Caco-2. García et al. hallaron que el valor de 6,3% determinado para una muestra de carne aumentaba hasta un 10% cuando la muestra era digerida, pero no encontraron una explicación para este hecho (García et al., 1996). Con respecto a nuestros resultados, debe descartarse que el incremento en los valores post-digestión se debiera a una acción poco eficiente del REH. En caso contrario debería haberse observado el mismo efecto para la solución FeAA post-digestión (la cual presenta más especies insolubles de hierro), hecho que no sucede. Por lo tanto, los valores indican que, de alguna manera, los liposomas tienen algún efecto promotor de la absorción del Fe³⁺ que se forma durante la digestión.

Para una más completa interpretación de los resultados, debe tenerse cuenta que el protocolo llevado a cabo con los liposomas plantea la situación más desfavorable para la captación de hierro. Ello es así porque durante la digestión *in vitro* una parte del hierro se desencapsula y se oxida a pH 6,5. Este hierro no entra en contacto con las células hasta que el proceso se completa al realizar la siembra. En una situación fisiológica, la digestión intestinal se realiza en presencia de los enterocitos, permitiendo la absorción *in situ* del hierro biodisponible, ya sea encapsulado o en forma libre. Por lo tanto, el modelo empleado plantea la situación más desfavorable para la captación de hierro. Para evitar estas condiciones desfavorables, podría haberse empleado un Diseño tipo B, en el cual la digestión se realiza en forma simultánea a la absorción, separando el medio digestivo de las células mediante una membrana de diálisis. Sin embargo, este diseño habría impedido toda interacción entre los liposomas y las células, como se mencionó en el apartado 5.5.1.

A continuación se comparan los resultados obtenidos para diferentes ensayos de caracterización de liposomas conteniendo FeAA, con los valores de captación de hierro determinados mediante células Caco-2.

Tabla 56: Comparación entre los resultados obtenidos para la captación de hierro (Fig.166) y otros parámetros que caracterizan a los liposomas convencionales con FeAA 1:2 Pre/Post digestión, antes de la dilución e incubación con células Caco-2. Los valores de captación de hierro, pH final (interno en el caso de los liposomas digeridos), porcentaje de Fe²⁺ por Mössbauer (y de Fe del pellet), y el porcentaje de HPTS encapsulado, se obtuvieron en los apartados 4.6.2., 4.4.4., 4.5.4, y 4.4.6. ND: no determinado. Los resultados se expresan como el promedio \pm sd, excepto para los valores de captación de Fe (promedio \pm sem).

Muestra	Captación de Fe (nmol/mg prot/h)	pH final (t=120 min)	% Fe ²⁺ Mössbauer	% Fe pellet Mössbauer	% HPTS encapsulado
FeAA 1:2 Pre	5,3 \pm 0,6	3 (1)	88 \pm 21	-	-
SPC-FeAA 1:2 Pre	2,0 \pm 0,2	3	84 \pm 21	ND	-
HSPC-FeAA 1:2 Pre	2,9 \pm 0,2	3	100 \pm 25	ND	-
HSPC-Chol-FeAA 1:2 Pre	2,3 \pm 0,2	3	100 \pm 25	ND	-
FeAA 1:2 Post	3,4 \pm 0,2	6,5 (2)	< 10 (3)	-	-
SPC-FeAA 1:2 Post	6,4 \pm 0,5	5,13 \pm 0,06	50 \pm 12	51 \pm 6	86 \pm 3
HSPC-FeAA 1:2 Post	6,1 \pm 0,6	4,75 \pm 0,05	26 \pm 7	70 \pm 9	54 \pm 3
HSPC-Chol-FeAA 1:2 Post	7,2 \pm 0,6	4,78 \pm 0,05	37 \pm 9	50 \pm 6	81 \pm 3

(1) pH de una solución FeAA 1:2 0,24M. (2) pH final de la solución FeAA 1:2 digerida. (3) Valor hallado para una solución FeAA 12 mM (límite de cuantificación para el ensayo).

En la Tabla 56 puede verse que la captación de hierro a partir de FeAA encapsulado en liposomas no está relacionada exclusivamente con su estado de oxidación, ya que los valores de captación correspondientes a liposomas digeridos (y por lo tanto con menores porcentajes de Fe²⁺), son mayores de los que muestran los no digeridos. La solución FeAA, por el contrario, se comporta según lo esperado: cuando se incuba esta solución partiendo de un valor de 88% de Fe²⁺ (FeAA 1:2 Pre), la captación es mucho mayor que la observada al partir de una solución digerida que prácticamente no contiene Fe²⁺. Aún así, el valor obtenido para la solución digerida es bastante elevado, teniendo en cuenta su alto contenido de la especie oxidada. Debe recordarse, sin embargo, que esta solución aún contiene un 32% de hierro soluble, como se determinó en el apartado 4.5.5.

En cuanto al comportamiento de los liposomas, se observan semejanzas entre los SPC y los HSPC-Chol en todos los parámetros determinados. Por otro lado, los valores correspondientes al sobrenadante de la ultracentrifugación de las muestras digeridas (previos al análisis de Mössbauer), que permiten determinar el contenido de hierro residual en los liposomas, indican que dicho contenido Post-digestión es menor al previsto según los valores hallados mediante liposomas con HPTS. Esto podría deberse a que la HPTS no es un buen indicador de la desencapsulación del hierro y también, al tiempo durante el cual tiene lugar la ultracentrifugación (incluso cabría plantearse la posibilidad de que la ultracentrifugación causase desencapsulación en los liposomas digeridos). Lamentablemente, la interferencia de la solución FeAA sobre la determinación del contenido residual de HPTS por excitación en el punto isobéptico (apartado 4.5.2.1.) no permitió monitorear la desencapsulación de la sonda en estos liposomas sin la introducción de artefactos metodológicos.

Los liposomas HSPC-FeAA presentan un comportamiento diferenciado, como ya se había discutido a lo largo del apartado 4.5. Si bien el pH interno final que alcanzan es similar a los otros dos tipos de liposomas, presentan los menores valores de Fe^{2+} . Estas diferencias, sin embargo, no se ven reflejadas en la captación de hierro, que es similar para las tres formulaciones, lo cual también podría ser explicado por la saturación del mecanismo de absorción.

Una causa posible de los elevados valores obtenidos para la captación en presencia de liposomas convencionales digeridos, frente a los que no lo están, es que las vesículas que han incorporado sales biliares favorezcan la captación de hierro, como se había observado en trabajos previos con insulina incorporada en liposomas con taurocolato de sodio. La presencia de la sal biliar (7% molar) en liposomas compuestos por DPPC-Chol aumentó significativamente la permeabilidad de la insulina a través de cultivos de Caco-2 (Degim et al., 2004). Sin embargo, cabría esperar que durante la incubación los liposomas digeridos fuesen perdiendo parte de las sales biliares incorporadas en las bicapas. Ello estaría causado por la dilución previa la siembra en las monocapas que se realiza para ajustar la concentración de hierro a 100 μM .

Otra diferencia entre liposomas convencionales Pre y Post-digestión que podría explicar la mayor efectividad de los segundos es la posible interacción entre el Fe^{3+} , o especies derivadas de él, y los grupos fosfato de los fosfolípidos. La existencia de estas interacciones ha sido demostrada por Morrill et al. (Morrill et al., 2004) en el estudio por ^1H -RMN del comportamiento entre dicho catión y los fosfolípidos. De hecho, también han sido detectadas en el presente trabajo mediante ^{31}P -RMN. En el apartado 4.5.3. se indicó que fue necesario eliminar el hierro libre de las muestras no digeridas para evitar el ensanchamiento de la señal proveniente del grupo fosfato, indicación inequívoca de la interacción entre dicho grupo y el hierro presente. Debido a que la preparación de las muestras para RMN se realiza a pH 6, es de esperar que al final del protocolo de preparación gran parte de este ión se encuentre oxidado. Por lo tanto, el hecho de que el Fe^{3+} interactúe con las bicapas fosfolipídicas abre la posibilidad a que, a medida que se desencapsula y oxida al entrar en contacto con un medio a pH 6,5 durante la digestión *in vitro*, este catión quede asociado a ellas. De este modo, durante la hora de incubación, éste podría estar más disponible para las células que el hierro que todavía estuviese incorporado en los liposomas.

Un aspecto a resaltar es que, en todos los casos, las células tratadas con liposomas digeridos mostraron una captación de hierro mucho mayor que la captación a partir de los productos comerciales analizados, hallándose una eficiencia de 5 a 10 veces mayor. Este hecho lleva a considerar las formulaciones de hierro con liposomas como posibles vehículos para mejorar su absorción, pero deberán estudiarse metodologías que permitan la estabilización de las suspensiones. De hecho, los ensayos preliminares de liofilización en presencia de crioprotectores realizados con el objeto de obtener un producto sólido, produjeron una considerable oxidación, evidenciada por la aparición de las formas de oxidación estudiadas en el apartado 4.2.3.1. Por otro lado, las suspensiones en forma líquida, sólo resultan estables durante unos 15-30 días, lo cual limita su aplicación a productos alimenticios de rápido consumo, como es el caso del hierro liposomal para la fortificación de productos lácteos (Boccio et al., 1995).

En cuanto a las formulaciones de liposomas con quitosano, se destacan los altos valores de captación de hierro correspondientes a las vesículas sin digerir, que alcanzan los niveles de la solución FeAA Pre. Dado que el agregado de quitosano a la solución FeAA no había producido un incremento en la captación (Fig.167), el efecto evidentemente está relacionado con la presencia de quitosano asociado a las membranas, tal y como se había descrito previamente para liposomas mucoadhesivos evaluados mediante ensayos *ex vivo* (Takeuchi et al., 1994). Por lo tanto, se observa un efecto promotor de la absorción empleando un polímero mucoadhesivo a pesar de que las células Caco-2 carezcan de la capa de mucina, como se mencionó previamente. Además, según lo determinado en el apartado 4.2.3.5., estos liposomas tienen una incorporación de hierro 10 veces mayor a los convencionales, lo cual podría favorecer la absorción.

Tal como se mencionó en el apartado 4.6.2. (Fig.167), el agregado de quitosano a liposomas HSPC-Chol-FeAA sin DPPA produce el mismo aumento en la captación de hierro por las células que cuando éstas se incuban con liposomas HSPC-Chol-FeAA con 2,5 o 10% de DPPA. Lo mismo ocurre para el agregado de quitosano a 2 ó 4 mg/ml. Probablemente esto se deba a que las muestras separadas por SEC (M1) tienen contenidos de quitosano y potenciales Z similares (ver apartado 4.2.3.5. Fig.84 y Tabla 22). Sin embargo, cuando los liposomas HSPC-Chol-DPPA 10% CHI 2 mg/ml se incuban una vez digeridos, los valores de captación de hierro disminuyen hasta alcanzar niveles comparables a los productos comerciales (menores a los de una solución FeAA digerida). Esto podría explicarse por la alta permeabilidad de estos liposomas durante la digestión *in vitro* (Ver Fig.156), que promueve la oxidación del Fe²⁺ encapsulado, o bien por la formación de agregados macroscópicos durante el proceso digestivo, que liberan su contenido. Por lo tanto, si bien son evidentes los beneficios del agregado de quitosano a los liposomas, deberán estudiarse en mayor profundidad las causas de su degradación ante la digestión *in vitro* y buscar estrategias que permitan la estabilización de las formulaciones mucoadhesivas obtenidas. El hecho de que las muestras no digeridas sean especialmente eficientes durante la incubación con las células, hace pensar en que sean la digestión *in vitro* (a un pH de 6,5) y la posterior incubación de las células (a pH 7,4), los factores determinantes de la pérdida de eficacia que muestran las formulaciones digeridas. Es sabido que, en medios acuosos, el quitosano solo es soluble a pHs ácidos. Por lo tanto, cabe pensar en una progresiva desestabilización de las vesículas que lo incorporan durante dichas etapas. Las estrategias alternativas podrían estar orientadas hacia la estabilización del quitosano a pHs cercanos al neutro o hacia la minimización del tiempo de contacto de las vesículas con el medio de la etapa intestinal de la digestión.

El incremento en la captación de hierro a partir de liposomas recubiertos por quitosano y no digeridos coincide con los elevados niveles de fluorescencia observados en las microfotografías confocales (apartado 4.6.3.). Los liposomas con CHI presentan niveles de fluorescencia mayores que los de la HPTS en solución (sin digerir), y mucho mayores que los correspondientes a liposomas HSPC-Chol. Su distribución intracelular también resultó diferente, lo cual será objeto de futuras investigaciones.

Finalmente, los liposomas catiónicos HSPC/DC-Chol no digeridos presentan niveles de captación de hierro similares a los mucoadhesivos y a la solución FeAA sin digerir. También en

ellos se han obtenidos mayores niveles de incorporación de hierro (alrededor del doble de los liposomas convencionales), aunque son inferiores a los de los mucoadhesivos. Por otro lado, el elevado potencial Z hallado para estos liposomas podría favorecer las interacciones con las monocapas y explicar los elevados porcentajes de absorción. En forma similar a los liposomas con quitosano, la permeabilidad al cambio de pH durante la digestión *in vitro* es muy elevada, lo que resulta desfavorable para el Fe^{2+} encapsulado. Además, la inestabilidad física de estos liposomas durante el proceso digestivo es extrema, obteniéndose un precipitado a los pocos minutos de iniciarse. Este comportamiento impidió la determinación de la captación de hierro a partir de estos liposomas digeridos. Nuevamente, y en forma similar a los mucoadhesivos, se trata de una formulación con un elevado potencial para incrementar la biodisponibilidad del hierro, pero cuya inestabilidad ante la digestión deberá ser estudiada con mayor profundidad, teniendo en cuenta que se trata de uno de los lípidos más empleados para la obtención de liposomas catiónicos para terapia génica.

6. CONCLUSIONES

Con respecto a la obtención de las formulaciones de liposomas,

- La obtención de liposomas compuestos por HSPC y colesterol en relación molar 3:2 mediante homogeneización a alta presión requiere la obtención de MLVs a partir de películas de lípidos disueltas en cloroformo. El uso de este solvente evita la formación de dominios en las bicapas que ocasionan la aparición de una transición de fases, aún a dicha concentración relativa de colesterol. El empleo de metodologías más compatibles con la producción a mayor escala, como la mezcla de polvos o el reemplazo del cloroformo por solventes de menor toxicidad, no conduce a la obtención de sistemas con estructuras lipídicas homogéneas.
- El diseño multifactorial de experimentos ha permitido obtener liposomas convencionales empleando materias primas grado industrial (SPC, HSPC y colesterol) y procesos escalables, como es, en particular, la homogeneización a alta presión. Dicho diseño ha permitido establecer las condiciones de procesamiento de modo tal de obtener el mayor volumen incorporado manteniendo el diámetro medio de las vesículas dentro de un rango aceptable para su posterior caracterización.
- Se han aplicado las condiciones optimizadas para las formulaciones convencionales, a la obtención de liposomas catiónicos, que contienen DC-Chol en su composición, y mucoadhesivos, preparados mediante el recubrimiento de liposomas aniónicos o neutros con quitosano.
- Los estudios realizados sobre la estabilidad de soluciones conteniendo hierro/ascórbico, han permitido establecer las condiciones para incorporar a las formulaciones de liposomas una sal de Fe^{2+} estabilizada con ácido ascórbico en relación molar 1:2, de modo tal de minimizar su oxidación.

Con respecto a la caracterización de las formulaciones de liposomas modelo con HPTS,

- Las suspensiones de liposomas obtenidas presentan distribuciones de diámetros bimodales o multimodales y diámetros medios entre los 400 y los 1.100 nm.
- Los volúmenes incorporados de estos liposomas varían entre 0,8 y 1,5 l/mol y la pérdida de sonda encapsulada es inferior al 10% luego de una hora de incubación a 37°C en buffer Tris 10 mM - NaCl 145 mM a pH 7,4.
- El procesamiento de las suspensiones por homogeneización a alta presión no aumenta significativamente el porcentaje de formas liso respecto al contenido en la materia prima, lo que indica una alta estabilidad química de los fosfolípidos frente al proceso de obtención en condiciones de alta presión, y en algunos casos, de alta temperatura (liposomas HSPC y HSPC-Chol).

Con respecto a la estabilidad fisicoquímica de los liposomas modelo con HPTS frente a la digestión in vitro,

- La digestión *in vitro* genera alteraciones físicas y químicas en los liposomas sometidos a este proceso.
- Los liposomas SPC y HSPC-Chol presentan una disminución del diámetro medio por efecto del proceso digestivo. En el caso de los HSPC-Chol, esta variación está además acompañada de un incremento del volumen incorporado. Los liposomas HSPC, en fase gel-sólido a 37°C, presentan un gran cambio en su distribución de diámetros. El análisis térmico de estas suspensiones confirma que la digestión provoca un aumento importante en el tamaño de las vesículas. Contrariamente a los liposomas HSPC-Chol, se produce una disminución de su volumen encapsulado.
- Las diferentes vesículas pierden parcialmente su contenido durante la digestión *in vitro* en diferente grado. Los liposomas SPC y HSPC-Chol conservan más del 80% del mismo, mientras que los liposomas HSPC, en fase gel-sólido a 37°C, sólo retienen alrededor del 50%.
- Finalizada la digestión, y tras la dilución de las vesículas mixtas obtenidas por la inserción de las sales biliares en las bicapas, los liposomas convencionales no experimentan ningún cambio de permeabilidad.
- El contenido de formas liso no aumenta significativamente por efecto de la digestión para los liposomas conteniendo lípidos saturados. El aumento observado para los liposomas insaturados (SPC) del 1,7 al 8,1% no está relacionado con la pérdida de la sustancia encapsulada.
- Los liposomas más permeables al cambio de pH son los SPC, de modo que una sustancia incorporada en su interior acuoso se encontrará, a lo largo de la digestión *in vitro*, prácticamente al mismo pH que si se encontrara disuelta en la fase acuosa externa. Los liposomas HSPC son los que experimentan una menor disminución de su pH interno (1,4 unidades) frente al gradiente de pH de 4,9 unidades. Los liposomas HSPC-Chol presentan una permeabilidad intermedia respecto a los anteriores.
- La retención de la sonda que muestran los liposomas HSPC-Chol durante la digestión *in vitro*, sumada a su estabilidad físicoquímica, y el relativo mantenimiento del pH interno, los convierten en potenciales sistemas de vehiculización de sustancias por vía oral.

Con respecto al comportamiento de los liposomas con HPTS frente al extracto de bilis,

- La resistencia a la solubilización por sales biliares aumenta según la secuencia: SCP<HSPC<<HSPC-Chol. En particular, esta última formulación resulta sumamente estable frente al efecto del extracto de bilis sobre la estructura de las bicapas lipídicas. Tal es así, que la relación molar sales biliares/lípidos necesaria para la transformación total de las vesículas en micelas es de 41,9, frente a los valores de 1,58 y 3,83 requeridos por los liposomas SPC y HSPC respectivamente. Además, la solubilización de los liposomas compuestos por lípidos saturados requiere temperaturas superiores a la de transición de

fases (52°C). Este comportamiento permite predecir que los liposomas HSPC-Chol serán estables en condiciones fisiológicas (37°C a concentraciones de sales biliares entre 3 y 15 mM).

- Cada formulación modelo presenta un comportamiento característico cuando se incuba a 37°C con concentraciones crecientes de sales biliares. Así, los liposomas SPC pierden alrededor del 95% de la sustancia encapsulada a concentraciones del extracto biliar inferiores a las necesarias para su solubilización. Los liposomas HSPC presentan una pérdida similar de la sustancia incorporada, pero no se observa la micelización ni siquiera a una concentración del extracto de bilis de 18,7 mM. Los liposomas HSPC-Chol se diferencian de los otros modelos, ya que presentan estructuras no micelares que resisten las altas concentraciones de sales biliares (alrededor de 20 mM), manteniendo un 40% de la sustancia incorporada.

Con respecto a la incorporación de hierro en las formulaciones de liposomas y a su comportamiento durante la digestión in vitro,

- La incorporación de una solución de hierro/ácido ascórbico 1:2 mol:mol a las formulaciones de liposomas convencionales (SPC, HSPC y HSPC-Chol) no altera su diámetro medio respecto a los liposomas modelo preparados en las mismas condiciones.
- Los liposomas catiónicos con DC-Chol presentan un porcentaje de incorporación que duplica el obtenido para los liposomas convencionales (6% vs. 3%). Esto implica una concentración de hierro encapsulado de 60 mg por cada 100 ml de suspensión. El porcentaje de incorporación para los liposomas mucoadhesivos con quitosano es cercano al 11%. La suspensión en este caso, contiene unos 100 mg de hierro incorporado en liposomas por cada 100 ml de suspensión. Dado que la concentración de lípidos en este caso es de 10 mg/ml, el contenido de hierro podría ser aún mayor si se aumenta la concentración lipídica.
- La digestión *in vitro* de los liposomas con FeAA produce alteraciones fisicoquímicas en las vesículas. Por un lado aumenta notablemente el diámetro medio. Por otro, aumenta significativamente el porcentaje de formas liso según la secuencia: SPC>>HSPC>HSPC-Chol. En los liposomas convencionales, el pH interno al final de la digestión *in vitro* se mantiene entre 4,7 y 5,2.
- El proceso digestivo afecta en gran medida a los liposomas catiónicos y mucoadhesivos. En estos casos se observa la formación de agregados a nivel macroscópico, que evidencian la inestabilidad de estos sistemas frente a la digestión *in vitro*, lo cual se verifica por su alta permeabilidad a los cambios de pH y por la disminución del contenido de fosfolípidos extraíble para el análisis por ³¹P-RMN.
- En todos los casos estudiados, la incorporación de Fe²⁺ en liposomas lo protege de la oxidación mediada por el pH de la etapa "intestinal" de la digestión *in vitro*. En efecto, los valores hallados para el contenido de la especie reducida en liposomas luego del proceso digestivo son significativamente mayores (26-50%), que el contenido de Fe²⁺ determinado en una solución FeAA sin encapsular (menor al 10%).

Con respecto a la absorción de hierro en liposomas evaluada mediante cultivos de células Caco-2,

- Los valores obtenidos para la captación de hierro por cultivos de Caco-2 a partir de liposomas convencionales son significativamente mayores a los obtenidos para los productos comerciales analizados, sin apreciarse variaciones según la composición de las bicapas.
- Los liposomas convencionales digeridos originan una captación de hierro mayor que cuando no han experimentado dicho proceso, superando los valores obtenidos para la solución control (FeAA en relación molar 1:2).
- Los porcentajes de absorción calculados para las muestras estudiadas varían entre el 2 y el 8%, con lo cual se encuentran dentro del rango esperado para soluciones y muestras complejas conteniendo hierro.
- Los liposomas catiónicos y mucoadhesivos no digeridos inducen altos niveles de captación de hierro, similares a la solución control de FeAA. Sin embargo, una vez digeridos, los valores disminuyen significativamente, en especial para los liposomas catiónicos, lo cual está de acuerdo con la inestabilidad que presentan frente al proceso de digestión simulada.
- La captación de HPTS en forma libre o incorporada a liposomas HSPC-Chol y mucoadhesivos se verifica por microscopía confocal, que permite diferenciar las interacciones características de cada tipo de liposoma con los cultivos de células Caco-2.
- Los ensayos con esta línea celular permiten estimar la biodisponibilidad de las formulaciones estudiadas, evitando el empleo de modelos animales.

7. RESUMEN

El objetivo de la presente tesis fue la obtención de diferentes suspensiones de liposomas para realizar el estudio de su comportamiento durante la digestión *in vitro* y la evaluación su eficacia como promotores de la absorción de hierro en cultivos celulares de Caco-2.

En primer lugar, se realizó la puesta a punto de los métodos de análisis necesarios para llevar a cabo los experimentos previstos. Las diferentes suspensiones se obtuvieron mediante la aplicación del diseño experimental multifactorial a los factores implicados en la homogeneización a alta presión, un proceso directamente transferible a escala industrial. Se obtuvieron suspensiones de liposomas convencionales (SPC, HSPC, HSPC/colesterol 3:2 mol/mol), catiónicos (HSPC/DC-colesterol 3:2 mol/mol) y mucoadhesivos (con quitosano), determinándose su distribución de tamaños, volumen incorporado y potencial Z. En una primera fase, durante su preparación, se agregó piranina 2 mM al medio acuoso de los liposomas convencionales para determinar su comportamiento durante la digestión *in vitro*, analizándose los cambios en el pH interno, en el volumen incorporado, la pérdida de la sonda encapsulada, variaciones de la permeabilidad de la membrana, la degradación de los fosfolípidos de las bicapas, la distribución de tamaño de las vesículas, y el comportamiento termotrópico. Los resultados más promisorios correspondieron a los liposomas HSPC-Chol, que, en la etapa ácida de la digestión, mostraron una disminución del pH interno de 2 unidades frente a un cambio en el medio externo de 5, un incremento de 1,5 unidades en la etapa intestinal (con un cambio externo de 4,5), un incremento en el volumen incorporado (de 1,51 l/mol pasó a 2,45 l/mol), una pérdida de la sonda fluorescente inferior al 20%, ningún cambio apreciable de la permeabilidad de sus membranas, un leve incremento en el contenido de formas liso determinadas por ^{31}P -RMN (un 2,3 % final), y una disminución del tamaño medio de los liposomas.

Los liposomas HSPC-Chol también resultaron los más estables frente al Triton X-100. La solubilización de los liposomas convencionales con extracto de bilis (EB) proporcionó los siguientes parámetros: SPC (a 37°C): $R_{\text{sat}} = 0,18$ y $R_{\text{sol}} = 1,58$; HSPC (a 55°C): $R_{\text{sat}} = 1,76$ y $R_{\text{sol}} = 3,83$; HSPC-Chol (a 65°C): $R_{\text{sat}} = 21,8$ y $R_{\text{sol}} = 41,9$. La extrapolación de los resultados indica que todas las preparaciones presentarían vesículas en las condiciones de la digestión *in vitro*, siendo las menos afectadas las de HSPC-Chol. La incubación de los liposomas convencionales con EB a 37°C muestra que los SPC pueden perder toda la sonda encapsulada antes de ser solubilizados y que a esa temperatura pueden ser destruidos formando micelas mixtas por encima de R_{sat} . Los HSPC pueden perder la totalidad del contenido, como los SPC, pero a elevadas concentraciones de EB forman macroestructuras que son solubilizadas si la temperatura se eleva a 55°C. Los HSPC-Chol no pierden totalmente el contenido ni siquiera a altas concentraciones de EB, reteniendo del orden del 50% del valor inicial, y formando también macroestructuras con un exceso de EB.

Se encapsuló FeAA 1:2 en liposomas convencionales, catiónicos y mucoadhesivos. Durante la digestión *in vitro* las dos últimas formulaciones mostraron los mayores cambios en las distribuciones de tamaño y en el pH interno. En los SPC se generó un 44% de formas liso, un 16,5 % en HSPC, y un 9,6 % en HSPC-Chol, no pudiéndose analizar las suspensiones digeridas de catiónicos y mucoadhesivos debido a la formación de agregados insolubles. No se encontraron diferencias significativas en el contenido de Fe^{2+} post digestión entre los diferentes liposomas convencionales situándose, como promedio, en el 38% del hierro total. Las

disoluciones de FeAA 1:2 digeridas contuvieron menos del 10% de Fe²⁺ (límite de detección por espectroscopia Mössbauer).

Se realizaron incubaciones de células Caco-2 a pH 7,4 con preparaciones no digeridas de: FeAA 1:2, liposomas convencionales, catiónicos y mucoadhesivos, a una concentración de hierro de 100 µM. La captación de hierro por las células siguió la siguiente secuencia: liposomas Chi (aprox. 7 nmol Fe/ (mg proteína·h)) > FeAA 1:2 > liposomas DC-Chol > liposomas convencionales > blanco.

Cuando las células fueron incubadas con muestras sometidas a la digestión *in vitro*, y con una concentración teórica total de hierro 100 µM, la captación siguió el siguiente orden: liposomas HSPC-Chol > liposomas SPC > liposomas HSPC > FeAA 1:2 > liposomas Chi > productos comerciales > blanco. Los liposomas catiónicos no pudieron ser evaluados ya que originaron un precipitado adherido a la monocapa celular. Los liposomas convencionales digeridos originaron en las células una captación de hierro situada alrededor de 7 nmol Fe/ (mg proteína·h), un valor superior al que, a excepción de los liposomas Chi, causaron las preparaciones no digeridas. Los porcentajes de absorción se situaron en niveles fisiológicos, siendo el mayor el correspondiente a los liposomas HSPC-Chol digeridos (8% del hierro aplicado en la incubación). Los resultados muestran que los liposomas convencionales digeridos favorecen la absorción del hierro en células Caco-2.

Se realizaron incubaciones con HPTS en solución, con liposomas HSPC-Chol y con liposomas Chi. La microscopía confocal reveló tres patrones de comportamiento distintos. La HPTS en solución causó fluorescencia difusa por el citoplasma. Los liposomas HSPC/-Chol causaron una distribución citoplasmática de puntos fluorescentes. Los liposomas Chi causaron una fluorescencia citoplasmática difusa, acompañada de una fuerte tinción nuclear.

Si bien no resultaron estables frente a la digestión *in vitro*, los liposomas mucoadhesivos pueden incorporar hasta 100 mg de hierro por cada 100 ml de suspensión, a una concentración lipídica de 10 mg/ml.

Abreviaturas:

Chi: quitosano; Chol: colesterol; DC-Chol: Dimetilamino-carbamoil-Colesterol; EB: extracto de sales biliares de origen natural; FeAA 1:2 : solución de FeSO₄ 0,24 M/ácido ascórbico 0,48 M; HSPC: fosfatidilcolina de soja hidrogenada; SPC: fosfatidilcolina de soja.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agnihotri, S.A.; Mallikarjuna, N.N. and Aminabhavi, T.M., 2004. **Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery.** J Control Release, 100: 5-28.
- Aguedo, M.; Wache, Y. and Belin, J.M., 2001. **Intracellular pH-dependent efflux of the fluorescent probe pyranine in the yeast *Yarrowia lipolytica*.** FEMS Microbiol Lett, 200: 185-189.
- Akhrem, A.A.; Vorobyev, M.S.; Kisel, M.A.; Tsybovsky, I.S.; Zabarovskaya, Z.V. and Kholodova, E.A., 1995. **Kyperinsulinemia in rats with alloxan diabetes after oral administration of insulin-containing negatively charged liposomes.** Problemy Endokrinologii, 41: 37-45.
- Al-Meshal, M.A.; Khidr, S.H.; Bayomi, M.A. and Al-Angary, A.A., 1998. **Oral administration of liposomes containing cyclosporine: a pharmacokinetic study.** Int J Pharm, 168: 163-168.
- Alamelu, S. and Rao, K.P., 1991. **Studies on the carboxymethyl chitosan-containing liposomes for their stability and controlled release of dapsone.** J Microencaps, 8: 505-519.
- Albaldawi, A.; Brennan, C.S.; Alobaidy, K.; Alammari, W. and Aljumaily, D., 2005. **Effect of flour fortification with haem liposome on bread and bread doughs.** Intl J Food Sci and Technol, 40: 825-831.
- Alvarez-Hernandez, X.; Nichols, G.M. and Glass, J., 1991. **Caco-2 cell line: a system for studying intestinal iron transport across epithelial cell monolayers.** Biochim Biophys Acta, 1070: 205-208.
- Alving, C.R., 1991. **Liposomes as carriers of antigens and adjuvants.** J Immunol Methods, 140: 1-13.
- Allen, T.M., 1981. **A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles.** Biochim Biophys Acta, 640: 385-397.
- Allen, T.M.; Hansen, C.; Martin, F.; Redemann, C. and Yau-Young, A., 1991. **Liposomes containing synthetic lipid derivatives of poly(ethylene glycol) show prolonged circulation half-lives in vivo.** Biochim Biophys Acta, 1066: 29-36.
- Allen, T.M.; Ahmad, I.; Lopes de Menezes, D.E. and Moase, E.H., 1995. **Immunoliposome-mediated targeting of anti-cancer drugs in vivo.** Biochem Soc Trans, 23: 1073-1079.
- Allison, A.G. and Gregoriadis, G., 1974. **Liposomes as immunological adjuvants.** Nature, 252: 252.
- Amselem, S.; Friedman, D.; Yogev, A.; Anderson, W.R.; Helton, D.O.; Loftsson, T.; Bodor, N.; Pop, E. and Brewster, M.E., 1995. **Formulation development for a zidovudine chemical delivery system 2. Towards oral and non-parenteral dosage forms.** Int J Pharm, 125: 31-37.
- Anderson, K.E.; Stevenson, B.R. and Rogers, J.A., 1999. **Folic acid-PEO-labeled liposomes to improve gastrointestinal absorption of encapsulated agents.** J Control Release, 60: 189-198.
- Anderson, K.E.; Eliot, L.A.; Stevenson, B.R. and Rogers, J.A., 2001. **Formulation and evaluation of a folic acid receptor-targeted oral vancomycin liposomal dosage form.** Pharm Res, 18: 316-322.
- Andrieux, K.; Forte, L.; Lesieur, S.; Paternostre, M.T.; Ollivon, M. and Grabielle-Madellmont, C., 2004. **Insertion and partition of sodium taurocholate into egg phosphatidylcholine vesicles.** Pharm Res, 21: 1505-1516.
- Aneja, R. US6699499 (2004). **Amphiphilic materials and liposome formulations thereof.** Nutrimed Biotech.

- AOAC, O.M., 1996. **Determination of Lecithin Phospholipids by HPLC.**
- Aprahamian, M.; Michel, C.; Humbert, W.; Devissaguet, J.P. and Damge, C., 1987. **Transmucosal passage of polyalkylcyanoacrylate nanocapsules as a new drug carrier in the small intestine.** Biol Cell, 61: 69-76.
- Aramaki, Y.; Tomizawa, H.; Hara, T.; Yachi, K.; Kikuchi, H. and Tsuchiya, S., 1993. **Stability of liposomes in vitro and their uptake by rat Peyer's patches following oral administration.** Pharm Res, 10: 1228-1231.
- Arien, A.; Goigoux, C.; Baquey, C. and Dupuy, B., 1993. **Study of *in vitro* and *in vivo* stability of liposomes loaded with calcitonin or indium in the gastrointestinal tract.** Life Sci, 53: 1279-1286.
- Artursson, P. and Karlsson, J., 1991. **Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.** Biochem Biophys Res Commun, 175: 880-885.
- Asayama, K.; Aramaki, Y.; Yoshida, T. and Tsuchiya, S., 1992. **Permeability changes by peroxidation of unsaturated liposomes with ascorbic acid/Fe²⁺.** J Liposome Res, 2: 275-287.
- Au, A.P. and Reddy, M.B., 2000. **Caco-2 cells can be used to assess human iron bioavailability from a semipurified meal.** J Nutr, 130: 1329-1334.
- Avnir, Y. and Barenholz, Y., 2005. **pH determination by pyranine: medium-related artifacts and their correction.** Anal Biochem, 347: 34-41.
- Bachmann, D.; Brandl, M. and Gregoriadis, G., 1993. **Preparation of liposomes using a Mini-Lab 8.30 H high-pressure homogenizer.** Int J Pharm, 91: 69-74.
- Bakouche, O. and Gerlier, D., 1986. **Enhancement of immunogenicity of tumor virus antigen by liposomes: the effect of lipid composition.** Immunology, 58: 507-513.
- Bandilla, D. and Skinner, C.D., 2004. **Capillary electrochromatography of peptides and proteins.** J Chromatogr A, 1044: 113-129.
- Bangham, A.D., 1963. **Physical Structure and Behavior of Lipids and Lipid Enzymes.** Adv Lipid Res, 64: 65-104.
- Bangham, A.D.; Standish, M.M. and Watkins, J.C., 1965. **Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids.** J Mol Biol, 13: 238-252.
- Bangham, A.D. and Papahadjopoulos, D., 1966. **Biophysical properties of phospholipids. I. Interaction of phosphatidylserine monolayers with metal ions.** Biochim Biophys Acta, 126: 181-184.
- Bangham, A.D.; Standish, M.M.; Watkins, J.C. and Weissmann, G., 1967. **The diffusion of ions from a phospholipid model membrane system.** Protoplasma, 63: 183-187.
- Bangham, A.D., 1968. **Membrane models with phospholipids.** Prog Biophys Mol Biol, 18: 29-95.
- Bangham, A.D. and Bangham, D.R., 1968. **Very long-range structuring of liquids, including water, at solid surfaces.** Nature, 219: 1151-1152.
- Bangham, A.D. and Haydon, D.A., 1968. **Ultrastructure of membranes: biomolecular organization.** Br Med Bull, 24: 124-126.
- Bangham, A.D., 1972. **Model membranes.** Chem Phys Lipids, 8: 386-392.
- Bangham, A.D., 1972. **Lipid bilayers and biomembranes.** Annu Rev Biochem, 41: 753-776.
- Barnadas-Rodriguez, R., 1999. **Optimació de formulacions amb fosfolípids per a ús dermatològic.** Unitat de Biofísica, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Bellaterra, Universitat Autònoma de Barcelona.

- Barnadas-Rodriguez, R. and Sabes, M., 2001. **Factors involved in the production of liposomes with a high-pressure homogenizer.** *Int J Pharm*, 213: 175-186.
- Barnadas-Rodriguez, R. and Sabes, M., 2003. **Liposomes prepared by high-pressure homogenizers.** *Methods Enzymol*, 367: 28-46.
- Barreto, J. and Lichtenberger, L.M., 1992. **Vesicle acidification driven by a millionfold proton gradient: a model for acid influx through gastric cell membranes.** *Am J Physiol*, 262: G30-34.
- Bartlett, G.R., 1959. **Colorimetric assay methods for free and phosphorylated glyceric acids.** *J Biol Chem*, 234: 469-471.
- Batzri, S. and Korn, E., 1973. **Single bilayer liposomes prepared without sonication.** *Biochim Biophys Acta*, 298: 1015-1019.
- Bedu-Addo, F.K.; Tang, P.; Xu, Y. and Huang, L., 1996. **Interaction of polyethyleneglycol-phospholipid conjugates with cholesterol-phosphatidylcholine mixtures: sterically stabilized liposome formulations.** *Pharm Res*, 13: 718-724.
- Bertrand, R.; Derancourt, J. and Kassab, R., 2000. **Fluorescence characterization of structural transitions at the strong actin binding motif in skeletal myosin affinity labeled at cysteine 540 with novel spectroscopic cysteaminy mixed disulfides.** *Biochemistry*, 39: 14626-14637.
- Betageri, G.V. and Yatvin, M. US2005008688 (2005). **Liposome drug delivery.**
- Bhatia, S.C. and Ravi, N., 2003. **A Mossbauer study of the interaction of chitosan and D-glucosamine with iron and its relevance to other metalloenzymes.** *Biomacromolecules*, 4: 723-727.
- Biltonen, R.L. and Lichtenberger, L.M., 1993. **The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations.** *Chem Phys Lipids*, 64: 129-142.
- Black, C.D. and Gregoriadis, G., 1976. **Interaction of liposomes with blood plasma proteins.** *Biochem Soc Trans*, 4: 253-256.
- Boccio, J.R.; Zubillaga, M.B.; Caro, R.A.; Gotelli, C.A.; Gotelli, M.J. and Weill, R., 1995. **New procedure to fortify fluid milk and derivatives with iron: a comparative study in mice.** *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 41: 619-626.
- Boccio, J.R.; Zubillaga, M.B.; Caro, R.A.; Gotelli, C.A.; Gotelli, M.J. and Weill, R., 1996. **Bioavailability and stability of microencapsulated ferrous sulfate in fluid milk: studies in mice.** *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 42: 233-239.
- Boccio, J.R.; Zubillaga, M.B.; Caro, R.A.; Lysionek, A.; Gotelli, C.A.; Gotelli, M.J. and Weill, R., 1998. **Bioavailability, absorption mechanism, and toxicity of microencapsulated iron (I) sulfate: studies in mice.** *Biol Trace Elem Res*, 62: 65-73.
- Boender, C.A. and Verloop, M.C., 1969. **Iron absorption, iron loss and iron retention in man: studies after oral administration of a tracer dose of $^{59}\text{FeSO}_4$ and $^{131}\text{-BaSO}_4$.** *Br J Haematol*, 17: 45-58.
- Bosch, I.; Dunussi-Joannopoulos, K.; Wu, R.L.; Furlong, S.T. and Croop, J., 1997. **Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein.** *Biochemistry*, 36: 5685-5694.
- Bothwell, T.; Charlton, R.; Cook, J.D. and Finch, C.A. **Iron metabolism in man.** Oxford, UK., 1979.
- Bowen, J.C.; Alpar, H.O.; Phillpotts, R. and Brown, M.R., 1992. **Mucosal delivery of herpes simplex virus vaccine.** *Res Virol*, 143: 269-278.

- Brandl, M.; Bachmann, D.; Drechsler, M. and Bauer, K.H., 1990. **Liposome preparation by new high-pressure homogenizer Gaulin Micron LAB 40.** Drug Dev Ind Pharm, 16: 2167-2191.
- Brandtzaeg, P. and Bjerke, K., 1990. **Immunomorphological characteristics of human Peyer's patches.** Digestion, 46 Suppl 2: 262-273.
- Bridges, J.F.; Millard, P.C. and Woodley, J.F., 1978. **The uptake of liposome-entrapped ¹²⁵I-labelled poly(vinylpyrrolidone) by rat jejunum in vitro.** Biochim Biophys Acta, 544: 448-451.
- Brise, H. and Hallberg, L., 1962. **Absorbability of different iron compounds.** Acta Med Scand Suppl, 376: 23-37.
- Brise, H. and Hallberg, L., 1962. **A method for comparative studies on iron absorption in man using two radioiron isotopes.** Acta Med Scand Suppl, 59: 7-22.
- Carey, M.C. and Small, D.M., 1978. **The physical chemistry of cholesterol solubility in bile.** J Clin Invest, 61: 998-1026.
- Carey, M.C.; Small, D.M. and Bliss, C.M., 1983. **Lipid digestion and absorption.** Annu Rev Physiol, 45: 651-677.
- Carpenter, C.E. and Ummadi, M., 1995. **Iron status alters the adsorption, uptake and absorption capacities of rat duodenum for ferrous and ferric iron.** Nutr Res, 15: 1129-1138.
- Celis, H.; Estrada, S. and Montal, M., 1974. **Model translocators for divalent and monovalent ion transport in phospholipid membranes.** J of Membr Biol, 18: 187-199.
- Cevc, G. and Blume, G., 2004. **Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage.** Biochim Biophys Acta, 1663: 61-73.
- Clark, M.A.; Blair, H.; Liang, L.; Brey, R.N.; Brayden, D. and Hirst, B.H., 2002. **Targeting polymerised liposome vaccine carriers to intestinal M cells.** Vaccine, 20: 208-217.
- Cohen, S.; Alonso, M.J. and Langer, R., 1994. **Novel approaches to controlled-release antigen delivery.** Int J Technol Assess Health Care, 10: 121-130.
- Cooper, J.W.; Wang, Y. and Lee, C.S., 2004. **Recent advances in capillary separations for proteomics.** Electrophoresis, 25: 3913-3926.
- Copland, M.J.; Baird, M.A.; Rades, T.; McKenzie, J.L.; Becker, B.; Reck, F.; Tyler, P.C. and Davies, N.M., 2003. **Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells.** Vaccine, 21: 883-890.
- Cornell, B.A.; Middlehurst, J. and Separovic, F., 1980. **The molecular packing and stability within highly curved phospholipid bilayers.** Biochim Biophys Acta, 598: 405-410.
- Chang, C.S.; Liao, Y. and Li, S., 1998. **Preparation of low molecular weight chitosan and chito-oligosaccharides by the enzymatic hydrolysis of chitosan.** Adv.Chitin Sci., 3: 233-238.
- Chen, H. **Main transition. The Structure of Biological Membranes.** P. Yeagle, CRC Press, Boca Ratón, 1992, 79.
- Chen, H. and Langer, R. US6387397 (2002). **Polymerized liposomes targeted to M cells and useful for oral or mucosal drug delivery.** MIT, US.
- Chiang, C.M. and Weiner, N., 1987. **Gastrointestinal uptake of liposomes.II.In vivo studies.** Int J Pharm, 40: 143-149.

- Childers, N.K.; Zhang, S.S. and Michalek, S.M., 1995. **Oral immunization with dehydrated liposomes containing Streptococcus mutans glucosyltransferase (GTF) in humans.** Adv Exp Med Biol, 371B: 1481-1484.
- Chlebowski, R.T., 1979. **Adriamycin (doxorubicin) cardiotoxicity: a review.** West J Med, 131: 364-368.
- Choi, J.S.; Lee, E.J.; Jang, H.S. and Park, J.S., 2001. **New cationic liposomes for gene transfer into mammalian cells with high efficiency and low toxicity.** Bioconjug Chem, 12: 108-113.
- Choi, W.J.; Kim, J.K.; Choi, S.H.; Park, J.S.; Ahn, W.S. and Kim, C.K., 2004. **Low toxicity of cationic lipid-based emulsion for gene transfer.** Biomaterials, 25: 5893-5903.
- Chonn, A.; Semple, S.C. and Cullis, P.R., 1991. **Separation of large unilamellar liposomes from blood components by a spin column procedure: towards identifying plasma proteins which mediate liposome clearance in vivo.** Biochim Biophys Acta, 1070: 215-222.
- Choquet, C.G.; Patel, G.B.; Beveridge, T.J. and Sprott, G.D., 1994. **Stability of pressure-extruded liposomes made from archaeobacterial ether lipids.** Appl Microbiol Biotechnol, 42: 375-384.
- Daftary, G.V. WO2004058140 (2004). **Non-pegylated long-circulating liposomes.**
- Danesi, R.; Agen, C.; Grandi, M.; Nardini, V.; Bevilacqua, G. and Del Tacca, M., 1993. **3'-Deamino-3'-(2-methoxy-4-morpholinyl)-doxorubicin (FCE 23762): a new anthracycline derivative with enhanced cytotoxicity and reduced cardiotoxicity.** Eur J Cancer, 29A: 1560-1565.
- Dapergolas, G. and Gregoriadis, G., 1976. **Hypoglycaemic effect of liposome-entrapped insulin administered intragastrically into rats.** Lancet, 2: 824-827.
- Das, N.; Basu, M.K. and Das, M.K., 1988. **Oral application of insulin encapsulated liposomes.** Biochem Int, 16: 983-989.
- De La Maza, A.; Coderch, L.; López, O. and Parra, J.L., 1998. **Transmission electron microscopy and light scattering studies on the interaction of a nonionic/anionic surfactant mixture with phosphatidylcholine liposomes.** Microscopy research and technique, 40: 63-71.
- De Paoli, T. and Hager, A.A. US5534268 (1996). **Liposomes containing bioavailable iron (II) and process for obtaining them.** Ferroni, J.C. Lipotech S.A.
- Dean, H.; Bucher, K. and Bolotin, E. WO0067779 (2000). **Polymerized liposomes for the delivery of mammalian growth hormone.** Endorex Corp.
- Degim, Z.; Unal, N.; Essiz, D. and Abbasoglu, U., 2004. **The effect of various liposome formulations on insulin penetration across Caco-2 cell monolayer.** Life Sci, 75: 2819-2827.
- Delmotte, C. and Delmas, A., 1999. **Synthesis and fluorescence properties of oregon green 514 labeled peptides.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 9: 2989-2994.
- Deming, S.N., Morgan, S.L. **Experimental design: a chemometric approach.** Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, 1987.
- Dennis, E.A., 1974. **Formation and characterization of mixed micelles of the nonionic surfactant Triton X-100 with egg, dipalmitoyl, and dimyristoyl phosphatidylcholines.** Arch Biochem Biophys, 165: 764-773.
- Desai, K.G. and Hyun, J.P., 2005. **Recent developments in microencapsulation of food ingredients.** Drying Technol, 27: 1361-1394.

- Deshmukh, D.S.; Bear, W.D. and Brockerhoff, H., 1981. **Can intact liposomes be absorbed in the gut?** *Life Sci*, 28: 239-242.
- Dietzfelbinger, H., 1987. **Bioavailability of bi- and trivalent oral iron preparations. Investigations of iron absorption by postabsorption serum iron concentrations curves.** *Arzneimittelforschung*, 37: 107-112.
- Doe, W.F., 1989. **The intestinal immune system.** *Gut*, 30: 1679-1685.
- Dong, C. and Rogers, J.A., 1991. **Quantitative determination of carboxymethyl chitin in polymer-coated liposomes.** *J Microencaps*, 8: 153-160.
- Dong, C. and Rogers, J.A., 1992. **Poly(4-vinylpyridine)-coated liposomes: stability studies and release of acetylsalicylic acid.** *J Microencaps*, 9: 437-448.
- Dong, C. and Rogers, J.A., 1993. **Acacia-gelatin microencapsulated liposomes: preparation, stability, and release of acetylsalicylic acid.** *Pharm Res*, 10: 141-146.
- Dorey, C.; Cooper, C.; Dickson, D.P.; Gibson, J.F.; Simpson, R.J. and Peters, T.J., 1993. **Iron speciation at physiological pH in media containing ascorbate and oxygen.** *Br J Nutr*, 70: 157-169.
- Dreamer, D.W. and Nichols, J.W., 1989. **Proton flux mechanisms in model and biological membranes.** *J Membr Biol*, 107: 91-103.
- Eagles, J.; Fairweather-Tait, S.J. and Self, R., 1985. **Stable isotope ratio mass spectrometry for iron bioavailability studies.** *Anal Chem*, 57: 469-471.
- Egbaria, K. and Weiner, N., 1990. **Liposomes as topical drug delivery system.** *Adv Drug Deliv Rev*, 5: 287-300.
- Ekenved, G., 1976. **Absorption from different types of iron tablets - correlation between serum iron increase in total absorption of iron.** *Scand J Haematol Suppl*, 28: 51-63.
- Elamrani, K. and Blume, A., 1983. **Effect of the lipid phase transition on the kinetics of H⁺/OH⁻ diffusion across phosphatidic acid bilayers.** *Biochim Biophys Acta*, 727: 22-30.
- Eldridge, J.H.; Hammond, C.J.; Meulbroek, J.A.; Staas, J.K.; Gilley, R.M. and Tice, T.R., 1990. **Controlled release in the gut associated lymphoid tissues.I: Orally administered biodegradable microspheres target the Peyer's patches.** *J Control Rel*, 11: 205-214.
- Engelmann, M.D.; Davidsson, L.; Sandstrom, B.; Walczyk, T.; Hurrell, R.F. and Michaelsen, K.F., 1998. **The influence of meat on nonheme iron absorption in infants.** *Pediatr Res*, 43: 768-773.
- Etcheverry, P.; Wissler, J.; Wortley, G.M. and Glahn, R.P., 2004. **Caco-2 cell iron uptake from human milk and infant formula.** *Nutr Res*, 24: 573-579.
- Fairweather-Tait, S.J.; Balmer, S.E.; Scott, P.H. and Minski, M.J., 1987. **Lactoferrin and iron absorption in newborn infants.** *Pediatr Res*, 22: 651-654.
- Fairweather-Tait, S.J.; Portwood, D.E.; Symss, L.L.; Eagles, J. and Minski, M.J., 1989. **Iron and zinc absorption in human subjects from a mixed meal of extruded and nonextruded wheat bran and flour.** *Am J Clin Nutr*, 49: 151-155.
- Fairweather-Tait, S.J.; Fox, T.; Wharf, S.G. and Eagles, J., 1995. **The bioavailability of iron in different weaning foods and the enhancing effect of a fruit drink containing ascorbic acid.** *Pediatr Res*, 37: 389-394.
- Fang, N.; Chan, V.; Mao, H.Q. and Leong, K.W., 2001. **Interactions of phospholipid bilayer with chitosan: effect of molecular weight and pH.** *Biomacromolecules*, 2: 1161-1168.

- Fernandez, C. and Politi, M.J., 1997. **Effects of probe-amphiphile interaction on pyranine proton transfer reactions in lecithin vesicles.** J Photochem Photobiol Chem, 104: 165-172.
- Field, M.; Seki, M.; Mitchell, M.L. and Chalmers, T.C., 1960. **Studies in iron absorption. I. Determination in rats by measurement of total body radioactivity.** J Lab Clin Med, 55: 929-935.
- Filipovic-Grcic, J.; Skalko-Basnet, N. and Jalsenjak, I., 2001. **Mucoadhesive chitosan-coated liposomes: characteristics and stability.** J Microencaps, 18: 3-12.
- Florence, A.T.; Hillery, A.M.; Hussain, N. and Jani, P.U., 1995. **Factors affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: histological and analytical evidence.** J Drug Target, 3: 65-70.
- Florence, A.T., 1997. The oral absorption of micro- and nanoparticles: neither exceptional nor usual. Pharm Res, 14: 259-265.
- Forbes, A.L.; Arnaud, M.J.; Chichester, C.O.; Cook, J.D.; Harrison, B.N.; Hurrell, R.F.; Kahn, S.G.; Morris, E.R.; Tanner, J.T.; Whittaker, P. and et al., 1989. **Comparison of in vitro, animal, and clinical determinations of iron bioavailability: International Nutritional Anemia Consultative Group Task Force report on iron bioavailability.** Am J Clin Nutr, 49: 225-238.
- Ford, J.M. and Hait, W.N., 1993. **Pharmacologic circumvention of multidrug resistance.** Cytotechnology, 12: 171-212.
- Forth, W. and Rummel, W., 1973. **Iron absorption.** Physiol Rev, 53: 724-792.
- Frazer, D.M. and Anderson, G.J., 2003. **The orchestration of body iron intake: how and where do enterocytes receive their cues?** Blood Cells Mol Dis, 30: 288-297.
- Freund, O.; Amedee, J.; Roux, D. and Laversanne, R., 2000. **In vitro and in vivo stability of new multilamellar vesicles.** Life Sci, 67: 411-419.
- Frezard, F., 1999. **Liposomes: from biophysics to the design of peptide vaccines.** Braz J Med Biol Res, 32: 181-189.
- Fu, Y.C. and Laughlin, R.G., 1980. **Distearoylphosphatidyl choline/ammoniohexanoate surfactant interactions.** Chem Phys Lipids, 26: 121-139.
- Fukunaga, M.; Miller, M.M. and Deftos, L.J., 1991. **Liposome-entrapped calcitonin and parathyroid hormone are orally effective in rats.** Horm Metab Res, 23: 166-167.
- Galovic Rengel, R.; Barisic, K.; Pavelic, Z.; Zanic Grubisic, T.; Cepelak, I. and Filipovic-Grcic, J., 2002. **High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes.** Eur J Pharm Sci, 15: 441-448.
- Gangloff, M.B.; Glahn, R.P.; Miller, D.D. and Van Campen, D., 1996. **Assessment of iron availability using combined *in vitro* digestion and Caco-2 cell culture model.** Nutr Res, 126: 479-487.
- Gangloff, M.B.; Lai, C.; Van Campen, D.R.; Miller, D.D.; Norvell, W.A. and Glahn, R.P., 1996. **Ferrous iron uptake but not transfer is down-regulated in Caco-2 cells grown in high iron serum-free medium.** J Nutr, 126: 3118-3127.
- Gao, X. and Huang, L., 1991. **A novel cationic liposome reagent for efficient transfection of mammalian cells.** Biochem Biophys Res Commun, 179: 280-285.
- Garcia, M.N.; Flowers, C. and Cook, J.D., 1996. **The Caco-2 cell culture system can be used as a model to study food iron availability.** J Nutr, 126: 251-258.
- Garsez, J.; Bonila, A. and Palente, A. EP0855179 (1998). **New preparation improving oral biological utilizing ability of hardly absorbable medicine.** Lipotec SA.

- Garsez, J.; Bonila, A. and Palente, A. JP10203964 (1998). **New preparation improving oral biological utilizing ability of hardly absorbable medicine.** Lipotec SA.
- Gillies, E.R. and Frechet, J.M., 2005. **Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery.** Drug Discov Today, 10: 35-43.
- Glahn, R.P.; Gangloff, M.B.; Van Campen, D.R.; Miller, D.D.; Wien, E.M. and Norvell, W.A., 1995. **Bathophenanthroline disulfonic acid and sodium dithionite effectively remove surface-bound iron from Caco-2 cell monolayers.** J Nutr, 125: 1833-1840.
- Glahn, R.P.; Wien, E.M.; Van Campen, D.R. and Miller, D.D., 1996. **Caco-2 cell iron uptake from meat and casein digests parallels in vivo studies: use of a novel in vitro method for rapid estimation of iron bioavailability.** J Nutr, 126: 332-339.
- Glahn, R.P.; Lee, O.A.; Yeung, A.; Goldman, M.I. and Miller, D.D., 1998. **Caco-2 cell ferritin formation predicts nonradiolabeled food iron availability in an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model.** J Nutr, 128: 1555-1561.
- Glonek, T., 1998. **³¹P Nuclear magnetic resonance phospholipid analysis of anionic-enriched lecithins.** JAOCS, 75: 569-573.
- Goñi, F.M.; Urbaneja, M.A.; Arrondo, J.L.; Alonso, A.; Durrani, A.A. and Chapman, D., 1986. **The interaction of phosphatidylcholine bilayers with Triton X-100.** Eur J Biochem, 160: 659-665.
- Goodman, L.S. and Gilman, A. **Hematopoietic agents: growth factors, minerals and vitamins.** Pharmacological Basis of Therapeutics. 2003,
- Gordon, K.B.; Tajuddin, A.; Guitart, J.; Kuzel, T.M.; Eramo, L.R. and VonRoenn, J., 1995. **Hand-foot syndrome associated with liposome-encapsulated doxorubicin therapy.** Cancer, 75: 2169-2173.
- Gregoriadis, G., 1976. **The carrier potential of liposomes in biology and medicine (first of two parts).** New Engl J Med, 295: 704-710.
- Gregoriadis, G. **Liposomes as carriers of drugs: recent trends and progress.** Wiley, 1988.
- Gregoriadis, G., 1989. **Liposomes as carriers of drugs. Observations on vesicle fate after injection and its control.** Subcell Biochem, 14: 363-378.
- Gregoriadis, G., 1990. **Immunological adjuvants: a role for liposomes.** Immunol Today, 11: 89-97.
- Gregoriadis, G., 1991. **Overview of liposomes.** J Antimicrob Chemother, 28 Suppl B: 39-48.
- Gregoriadis, G., 1994. **The immunological adjuvant and vaccine carrier properties of liposomes.** J Drug Target, 2: 351-356.
- Gregoriadis, G.; Saffie, R. and de Souza, J.B., 1997. **Liposome-mediated DNA vaccination.** FEBS Lett, 402: 107-110.
- Gregoriadis, G.; Fernandes, A.; Mital, M. and McCormack, B., 2000. **Polysialic acids: potential in improving the stability and pharmacokinetics of proteins and other therapeutics.** Cell Mol Life Sci, 57: 1964-1969.
- Gregoriadis, G.; Bacon, A.; Caparros-Wanderley, W. and McCormack, B., 2002. **A role for liposomes in genetic vaccination.** Vaccine, 20 Suppl 5: B1-9.
- Grit, M. and Crommelin, D.J., 1993. **Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability.** Chem Phys Lipids, 64: 3-18.
- Gruner, S.M. **Nonlamellar Lipid Phases. The Structure of Biological Membranes.** P. Yeagle, CRC Press, Boca Ratón, 1992, 211-223.
- Guinez, C.; Laversanne, R. and Amedee, J. FR2803202 (2000). **Compositions pharmaceutiques destinees a une administration par voie orale.** Capsulis SA.

- Gunshin, H.; Mackenzie, B.; Berger, U.V.; Gunshin, Y.; Romero, M.F.; Boron, W.F.; Nussberger, S.; Gollan, J.L. and Hediger, M.A., 1997. **Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter.** *Nature*, 388: 482-488.
- Guo, J.; Ping, Q. and Chen, Y., 2001. **Pharmacokinetic behavior of cyclosporin A in rabbits by oral administration of lecithin vesicle and Sandimmun Neoral.** *Int J Pharm*, 216: 17-21.
- Gupta, P.K.; Leung, H.S. and Robinson, J.R. **Bioadhesives/mucoadhesives in drug delivery to the gastrointestinal tract.** *Bioadhesive Drug Delivery Systems*. C. Press, 1990, 65-92.
- Gustafsson, U.; Sahlin, S. and Einarsson, C., 2003. **High level of deoxycholic acid in human bile does not promote cholesterol gallstone formation.** *World J Gastroenterol*, 9: 1576-1579.
- Guthrie, D. and Gibson, A.L., 1977. **Doxorubicin cardiotoxicity: possible role of digoxin in its prevention.** *Br Med J*, 2: 1447-1449.
- Hahn, P.F.; Bale, W.F.; Lawrence, E.O. and Whipple, G.H., 1939. **Radioactive iron and its metabolism in anemia. Its absorption, transportation, and utilization.** *J Exp Med*, 69: 739-753.
- Hallberg, L., 1981. **Bioavailability of dietary iron in man.** *Annu Rev Nutr*, 1: 123-147.
- Hallberg, L.; Hulthen, L. and Gramatkovsky, E., 1997. **Iron absorption from the whole diet in men: how effective is the regulation of iron absorption?** *Am J Clin Nutr*, 66: 347-356.
- Hallberg, L. and Hulthen, L., 2002. **Perspectives on iron absorption.** *Blood Cells Mol Dis*, 29: 562-573.
- Han, O.; Failla, M.L.; Hill, A.D.; Morris, E.R. and Smith, J.C., Jr., 1994. **Reduction of Fe(III) is required for uptake by human caco-2 cells.** *FASEB J*, 8(5): A921.
- Han, O.; Failla, M.L.; Hill, A.D.; Morris, E.R. and Smith, J.C., Jr., 1995. **Reduction of Fe(III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells.** *J Nutr*, 125: 1291-1299.
- Han, M.; Watarai, S.; Kobayashi, K. and Yasuda, T., 1997. **Application of liposomes for development of oral vaccines: study of in vitro stability of liposomes and antibody response to antigen associated with liposomes after oral immunization.** *J Vet Med Sci*, 59: 1109-1114.
- Harding, J.A.; Engbers, C.M.; Newman, M.S.; Goldstein, N.I. and Zalipsky, S., 1997. **Immunogenicity and pharmacokinetic attributes of poly(ethylene glycol)-grafted immunoliposomes.** *Biochim Biophys Acta*, 1327: 181-192.
- Harokopakis, E.; Childers, N.K.; Michalek, S.M.; Zhang, S.S. and Tomasi, M., 1995. **Conjugation of cholera toxin or its B subunit to liposomes for targeted delivery of antigens.** *J Immunol Methods*, 185: 31-42.
- Hashimoto, K. and Shimizu, M., 1993. **Epithelial properties of human intestinal Caco-2 cells cultured in a serum-free medium.** *Cytotechnology*, 13: 175-184.
- Heinrich, H.C., 1987. **Intestinal absorption of ⁵⁹Fe form neutron-activated commercial oral iron(III)-citrate and iron(III)-hydroxide polymaltose complexes in man.** *Drug Res*, 37: 105-107.
- Helenius, A. and Simons, K., 1975. **Solubilization of membranes by detergents.** *Biochim Biophys Acta*, 415: 29-79.
- Hemker, H.C.; Hermens, W.T.; Muller, A.D. and Zwaal, R.F., 1980. **Oral treatment of haemophilia A by gastrointestinal absorption of factor VIII entrapped in liposomes.** *Lancet*, 1: 70-71.

- Henriksen, I.; Smistad, G. and Karlsen, J., 1994. **Interactions between liposomes and chitosan**. *Int J Pharm*, 101: 227-236.
- Hermelin, M.S. and Grimshaw, M. **US2003/0190355** (2003). **Modified release minerals**. Nath & Associates PLLC.
- Hidalgo, I.J.; Raub, T.J. and Borchardt, R.T., 1989. **Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability**. *Gastroenterology*, 96: 736-749.
- Hildebrand, A.; Beyer, K.; Neubert, R.; Garidel, P. and Blume, A., 2004. **Solubilization of negatively charged DPPC/DPPG liposomes by bile salts**. *J Colloid Interface Sci*, 279: 559-571.
- Hirano, S.; Seino, H.; Akiyama, Y. and Nonaka, I., 1988. **Bio-compatibility of chitosan by oral and intravenous administration**. *Polym Eng Sci*, 59: 897-901.
- Hirotsuka, M.; Taniguchi, H.; Narita, H. and Kito, M., 1984. **Calcium fortification of soy milk with calcium-lecithin liposome system**. *J Food Sci*, 49: 1111-1112.
- Hisayasu, S.; Orimo, H.; Migita, S.; Ikeda, Y.; Satoh, K.; Shinjo, S.; Hirai, Y. and Yoshino, Y., 1992. **Soybean protein isolate and soybean lectin inhibit iron absorption in rats**. *J Nutr*, 122: 1190-1196.
- Hodges, G.M.; Carr, E.A.; Hazzard, R.A. and Carr, K.E., 1995. **Uptake and translocation of microparticles in small intestine. Morphology and quantitation of particle distribution**. *Digest Dis Sci*, 40: 967-975.
- Hofmann, A.F., 1963. **The function of bile salts in fat absorption. the solvent properties of dilute micellar solutions of conjugated bile salts**. *J Biochem*, 39: 57-68.
- Howard, L.; Buchowski, M.S.; Wang, B.J. and Miller, D.D., 1993. **Bioavailability of electrolytic iron in fortified infant cereal determined by hemoglobin repletion in piglets**. *Nutr Res*, 13: 287-295.
- Hu, L.; Tang, X. and Cui, F., 2004. **Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs**. *J Pharm Pharmacol*, 56: 1527-1535.
- Hu, L.D.; Tang, X. and Cui, F.D., 2005. **Preparation of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid and their evaluation in vitro and in vivo**. *Yao Xue Xue Bao*, 40: 71-75.
- Huang, C., 1969. **Studies on phosphatidylcholine vesicles. Formation and physical characteristics**. *Biochemistry*, 8: 344-352.
- Hulthen, L.; Gramatkovsky, E.; Glerup, A. and Hallberg, L., 1995. **Iron absorption from the whole diet. Relation to meal composition, iron requirements and iron stores**. *Eur J Clin Nutr*, 49: 794-808.
- Hunt, J.R.; Gallagher, S.K.; Johnson, L.K. and Lykken, G.I., 1995. **High- versus low-meat diets: effects on zinc absorption, iron status, and calcium, copper, iron, magnesium, manganese, nitrogen, phosphorus, and zinc balance in postmenopausal women**. *Am J Clin Nutr*, 62: 621-632.
- Inoue, K. and Kitagawa, T., 1974. **Effect of exogenous lysolecithin on liposomal membranes. Its relation to membrane fluidity**. *Biochim Biophys Acta*, 363: 361-372.
- Ishida, T.; Harashima, H. and Kiwada, H., 2002. **Liposome clearance**. *Biosci Rep*, 22: 197-224.
- Ishizuno, A.; Imanaka, H.; Kotani, M. and Fujita, A. (2004). **Liposome-containing composition for oral administration**. Sunstar INC.

- Iwanaga, K.; Ono, S.; Morimoto, K.; Kakemi, M.; Yamashita, S. and Oku, N., 1996. **Oral delivery of insulin by using polyethyleneglycol-coated liposomes.** J Liposome Res, 6: 820-826.
- Iwanaga, K.; Ono, S.; Narioka, K.; Kakemi, M.; Morimoto, K.; Yamashita, S.; Namba, Y. and Oku, N., 1999. **Application of surface-coated liposomes for oral delivery of peptide: effects of coating the liposome's surface on the GI transit of insulin.** J Pharm Sci, 88: 248-252.
- Jain, R.K., 1989. **Delivery of novel therapeutic agents in tumors: physiological barriers and strategies.** J Natl Cancer Inst, 81: 570-576.
- Jani, P.U.; Florence, A.T. and McCarthy, D., 1992. **Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene nanospheres in the rat.** Int J Pharm, 84: 245-249.
- Johansson, F.; Hjertberg, E.; Eirefelt, S.; Tronde, A. and Hultkvist Bengtsson, U., 2002. **Mechanisms for absorption enhancement of inhaled insulin by sodium taurocholate.** Eur J Pharm Sci, 17: 63-71.
- Jovani, M.; Barbera, R.; Farre, R. and Martin de Aguilera, E., 2001. **Calcium, iron, and zinc uptake from digests of infant formulas by Caco-2 cells.** J Agric Food Chem, 49: 3480-3485.
- Jyothi, G.; Mitra, C.K. and Krishnamoorthy, G., 1990. **Studies on the kinetics of gramicidin channels in liposomes.** Bioelectrochem Bioenerg, 24: 297-304.
- Kaiser, S. and Hoffmann, H., 1996. **Transport of ions through vesicle bilayers.** J Colloid Interfase Sci, 184: 1-10.
- Kamioka, R.; Matsumoto, Y. and Nakajima, K. **JP2002069000** (2002). **Oral medicine for treating diabetes mellitus.** Kimigafuchi Gakuen.
- Kamp, F.; Zakim, D.; Zhang, F.; Noy, N. and Hamilton, J.A., 1995. **Fatty acid flip-flop in phospholipid bilayers is extremely fast.** Biochemistry, 34: 11928-11937.
- Kano, K. and Fendler, J.H., 1978. **Pyranine as a sensitive pH probe for liposome interiors and surfaces. pH gradients across phospholipid vesicles.** Biochim Biophys Acta, 509: 289-299.
- Kararli, T.T., 1995. **Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals.** Biopharm Drug Dispos, 16: 351-380.
- Kasaai, M.R.; Charlet, G.; Paquin, P. and Arul, J., 2003. **Fragmentation of chitosan by microfluidization process.** Inn Food Sci Emerg Technol, 4: 403-413.
- Kastenmayer, P.; Davidsson, L.; Galan, P.; Cherouvrier, F.; Hercberg, S. and Hurrell, R.F., 1994. **A double isotope technique for measuring iron absorption in infants.** Br J Nutr, 71: 411-424.
- Keller, B.C., 2001. **Liposomes in nutrition.** Trends Food Sci Technol, 12: 25-31.
- Keller, B.C. US2002039595 (2002). **Oral liposome delivery system.**
- Keogh, M.K.; O'Kennedy, B.T.; Kelly, J.; Auty, M.A.; Kelly, R.M.; Fureby, A. and Haahr, A.M., 2001. **Stability to oxidation of spray-dried fish oil powder microencapsulated using milk ingredients.** J Food Sci, 66: 217-224.
- Kheadr, E.E.; Vuilleumard, J.C. and El-Deeb, S.A., 2003. **Impact of liposome-encapsulated enzyme cocktails on cheddar cheese ripening.** Food Res Int, 36: 241-252.
- Kim, J.G. and Kim, J.D., 1991. **Vesicle to micelle transitions of egg phosphatidylcholine liposomes induced by nonionic surfactants, poly(oxyethylene) cetyl ethers.** J Biochem, 110: 436-442.

- Kirby, C. and Gregoriadis, G., 1984. **Dehydration-Rehydration Vesicles: A simple method for high yield drug entrapment in liposomes.** *Biotechnology*, 2: 979-984.
- Kirby, C.; Whittle, C.J.; Rigby, N.; Coxon, D.T. and Law, B.A., 1991. **Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes.** *Food Sci Technol*, 26: 437-449.
- Kirilenko, V.N. and Gregoriadis, G., 1993. **Fat soluble vitamins in liposomes: studies on incorporation efficiency and bile salt induced vesicle disintegration.** *J Drug Target*, 1: 361-368.
- Kisel, M.A.; Kulik, L.N.; Tsybovsky, I.S.; Vlasov, A.P.; Vorob'yov, M.S.; Kholodova, E.A. and Zabarovskaya, Z.V., 2001. **Liposomes with phosphatidylethanol as a carrier for oral delivery of insulin: studies in the rat.** *Int J Pharm*, 216: 105-114.
- Klibanov, A.L.; Maruyama, K.; Torchilin, V.P. and Huang, L., 1990. **Amphipathic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes.** *FEBS Lett*, 268: 235-237.
- Kokkona, M.; Kallinteri, P.; Fatouros, D. and Antimisiaris, S.G., 2000. **Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: effect of lipid composition.** *Eur J Pharm Sci*, 9: 245-252.
- Kreuzer, M. and Kirchgessner, M., 1991. **Endogenous iron excretion. A quantitative means to control iron metabolism?** *Biol Trace Elem Res*, 29: 77-92.
- Kulkarni, S.B.; Betageri, G.V. and Singh, M., 1995. **Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes.** *J Microencaps*, 12: 229-246.
- Kuzjakova, L.M.; Efremenko, V.; Kalmykova, L.; Afanas, E.; Umnov, A. and Taran, I.F. **RU2158587** (2000). **Antibacterial agent for treatment of farm animals and poultry.** *Umnyj Inst.*
- Lamprecht, A.; Ubrich, N.; Hombeiro Pérez, M.; Lehr, C.M.; Hoffmann, M. and Maincent, P., 1999. **Biodegradable monodispersed nanoparticles prepared by pressure homogenization-emulsification.** *Int J Pharm*, 184: 97-105.
- Lasch, J. and Wohlrab, W., 1986. **Liposome-bound cortisol: a new approach to cutaneous therapy.** *Biomed Biochim Acta*, 45: 1295-1299.
- Lasic, D.D. **Liposomes, from physics to applications.** E. S. B.V., Amsterdam, 1993.
- Lavertu, M.; Xia, Z.; Serreqi, A.N.; Berrada, M.; Rodrigues, A.; Wang, D.; Buschmann, M.D. and Gupta, A., 2003. **A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan.** *J Pharm Biomed Anal*, 32: 1149-1158.
- Lawaczek, R. and Pitterich, H., 1988. **Pathways of water through erythrocyte membranes. Routes along defect structures.** *J Theor Biol*, 135: 401-407.
- Lee, E.H.; Kim, A.; Oh, Y.K. and Kim, C.K., 2005. **Effect of edge activators on the formation and transfection efficiency of ultradeformable liposomes.** *Biomaterials*, 26: 205-210.
- Lehr, C.M.; Bouwstra, J.A.; Schacht, E.H. and Junginger, H.E., 1992. **In vitro evaluation of mucoadhesive properties of chitosan and some other natural polymers.** *Int J Pharm*, 78: 43-48.
- Levy, D.; Gulik, A.; Seigneuret, M. and Rigaud, J.L., 1990. **Phospholipid vesicle solubilization and reconstitution by detergents. Symmetrical analysis of the two processes using octaethylene glycol mono-n-dodecyl ether.** *Biochemistry*, 29: 9480-9488.
- Lichtenberg, D.; Robson, R.J. and Dennis, E.A., 1983. **Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects.** *Biochim Biophys Acta*, 737: 285-304.

- Lichtenberg, D.; Opatowsky, D. and Kozlov, M.M., 2000. **Phase boundaries in mixtures of membrane-forming amphiphiles and micelle-forming amphiphiles.** *Biochim Biophys Acta*, 1508: 1-19.
- Lichtenberger, D.; Freire, E.; Schmidt, C.; Barenholz, Y.; Felgner, P.L. and Thompson, T.E., 1981. **Effect of surface curvature on stability, thermodynamic behavior, and osmotic activity of dipalmitoylphosphatidylcholine single lamellar vesicles.** *Biochemistry*, 20: 4309-4315.
- Lichtenberger, D.; Menashe, M.; Donaldson, S. and Biltonen, R.L., 1984. **Thermodynamic characterization of the pretransition of unilamellar dipalmitoyl-phosphatidylcholine vesicles.** *Lipids*, 19: 395-400.
- Lin, H.J.; Szmecinski, H. and Lakowicz, J.R., 1999. **Lifetime-based pH sensors: indicators for acidic environments.** *Anal Biochem*, 269: 162-167.
- Lo, Y.-L., 2000. **Phospholipids as multidrug resistance modulators of the transport of epirubicin in human intestinal epithelial Caco-2 cell layers and everted gut sacs of rats.** *Biochem Pharmacol*, 60: 1381-1390.
- Long, M.A.; Kaler, E.W. and Lee, P.L., 1994. **Structural characterization of the micelle-vesicle transition in lecithin-bile salt solutions.** *Biophys J*, 67: 1733-1742.
- López, O.; De La Maza, A.; Coderch, L.; López-Iglesias, C.; Wehrli, E. and Parra, J.L., 1998. **Direct formation of mixed micelles in the solubilization of phospholipid liposomes by Triton X-100.** *FEBS Lett*, 426: 314-318.
- Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. **Protein measurement with the folin phenol reagent.** *J Biol Chem*, 193: 265-275.
- Lum, B.L.; Svec, J.M. and Torti, F.M., 1985. **Doxorubicin: alteration of dose scheduling as a means of reducing cardiotoxicity.** *Drug Intell Clin Pharm*, 19: 259-264.
- Lynch, S.R. and Stoltzfus, R.J., 2003. **Iron and ascorbic Acid: proposed fortification levels and recommended iron compounds.** *J Nutr*, 133: 2978S-2984S.
- Lysionek, A.E.; Zubillaga, M.B.; Salgueiro, M.J.; Sarabia, M.I.; Caro, R.A.; Weill, R. and Boccio, J.R., 2000. **Study of industrial microencapsulated ferrous sulfate by means of the prophylactic-preventive method to determine its bioavailability.** *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 46: 125-129.
- Lysionek, A.E.; Zubillaga, M.B.; Salgueiro, M.J.; Pineiro, A.; Caro, R.A.; Weill, R. and Boccio, J.R., 2002. **Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in powdered milk produced from fortified fluid milk: a prophylactic study in rats.** *Nutrition*, 18: 279-281.
- Ma, T.Y.; Hollander, D.; Bhalla, D.; Nguyen, H. and Krugliak, P., 1992. **A non transformed small intestinal cell line for studying epithelial permeability.** *J Lab Clin Med*, 120: 329-341.
- Maitani, Y.; Hazama, M.; Tojo, H.; Qi, X.R. and Nagai, T., 1995. **Effects of orally administered liposomes with soybean-derived sterols and their glucosides on rat body weight.** *Biol Pharm Bull*, 18: 1551-1555.
- Maitani, Y.; Hazama, M.; Tojo, Y.; Shimoda, N. and Nagai, T., 1996. **Oral administration of recombinant human erythropoietin in liposomes in rats: influence of lipid composition and size of liposomes on bioavailability.** *J Pharm Sci*, 85: 440-445.
- Maitani, Y.; Moriya, H.; Shimoda, N.; Takayama, K. and Nagai, T., 1999. Distribution characteristics of entrapped recombinant human erythropoietin in liposomes and its intestinal absorption in rats. *Int J Pharm*, 185: 13-22.
- Manjunath, K.; Reddy, J.S. and Venkateswarlu, V., 2005. **Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems.** *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 27: 127-144.

- Mannino, R.J.; Canki, M.; Feketeova, E.; Scolpino, A.J.; Wang, Z.; Zhang, F.; Kheiri, M.T. and Gould-Fogerite, S., 1998. **Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines.** *Adv Drug Deliv Rev*, 32: 273-287.
- Mao, G.; Liang, X. and Ng, K.Y.S. **Direct Force Measurement of Liposomes by Atomic Force Microscope.** *Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*. M. Dekker, Detroit, Michigan, 2004, 933-942.
- Mao, S.; Shuai, X.; Unger, F.; Simon, M.; Bi, D. and Kissel, T., 2004. **The depolymerization of chitosan: effects on physicochemical and biological properties.** *Int J Pharm*, 281: 45-54.
- Mariko, M.; Yoshie, Y. and Tsuneji, N. JP8301782 (1996). **Liposome oral preparation containing peptide medicinal substance.** Riyuukakusan KK.
- Matsumura, Y.; Gotoh, M.; Muro, K.; Yamada, Y.; Shirao, K.; Shimada, Y.; Okuwa, M.; Matsumoto, S.; Miyata, Y.; Ohkura, H.; Chin, K.; Baba, S.; Yamao, T.; Kannami, A.; Takamatsu, Y.; Ito, K. and Takahashi, K., 2004. **Phase I and pharmacokinetic study of MCC-465, a doxorubicin (DXR) encapsulated in PEG immunoliposome, in patients with metastatic stomach cancer.** *Ann Oncol*, 15: 517-525.
- Mayhew, E.; Lazo, R.; Vail, W.; King, J. and Green, A., 1984. **Characterization of liposomes prepared using a microemulsifier.** *Biochim Biophys Acta*, 775: 169-174.
- McKie, A.T.; Marciani, P.; Rolfs, A.; Brennan, K.; Wehr, K.; Barrow, D.; Miret, S.; Bomford, A.; Peters, T.J.; Farzaneh, F.; Hediger, M.A.; Hentze, M.W. and Simpson, R.J., 2000. **A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation.** *Mol Cell*, 5: 299-309.
- McKie, A.T.; Barrow, D.; Latunde-Dada, G.O.; Rolfs, A.; Sager, G.; Mudaly, E.; Mudaly, M.; Richardson, C.; Barlow, D.; Bomford, A.; Peters, T.J.; Raja, K.B.; Shirali, S.; Hediger, M.A.; Farzaneh, F. and Simpson, R.J., 2001. **An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron.** *Science*, 291: 1755-1759.
- Meneses, P. and Glonek, T., 1988. **High resolution 31P NMR of extracted phospholipids.** *J Lipid Res*, 29: 679-689.
- Mestecky, J., 1987. **The common mucosal immune system and current strategies for induction of immune responses in external secretions.** *J Clin Immunol*, 7: 265-276.
- Mezei, M.; Gaal, J.; Szekacs, G.; Szebeni, G.; Marmarosi, T. and Magyar, K. **BG101432** (1997). **Seleginine-containing liposome composition.** *Chinoin Gyogyszer es Vegyeszet*.
- Mikogami, T.; Heyman, M.; Spik, G. and Desjeux, J.F., 1994. **Apical-to-basolateral transepithelial transport of human lactoferrin in the intestinal cell line HT-29cl.19A.** *Am J Physiol*, 267: G308-315.
- Miller, D.D.; Schrickler, B.R.; Rasmussen, R.R. and Van Campen, D., 1981. **An in vitro method for estimation of iron availability from meals.** *Am J Clin Nutr*, 34: 2248-2256.
- Miller, J., 1982. **Assessment of dietary iron availability by rat hemoglobin repletion assay.** *Nutr Rep Int*, 26: 993-1005.
- Moghimi, S.M. and Patel, H.M., 1988. **Tissue specific opsonins for phagocytic cells and their different affinity for cholesterol-rich liposomes.** *FEBS Lett*, 233: 143-147.
- Moghimi, S.M. and Patel, H.M., 1989. **Serum opsonins and phagocytosis of saturated and unsaturated phospholipid liposomes.** *Biochim Biophys Acta*, 984: 384-387.
- Monsen, E.; Hallberg, L.; Layrissé, M.; Hegsted, D.M.; Cook, J.D.; Mertz, W. and Finch, C.A., 1978. **Estimation of available dietary iron.** *Am J Clin Nutr*, 31: 134-141.
- Moore, C.V. and Dubach, R., 1951. **Observations on the absorption of iron from foods tagged with radioiron.** *Trans Assoc Am Physicians*, 64: 245-256.

- Morilla, M.J., 2003. **Incorporación de drogas antichagásicas en liposomas**. Universidad Nacional de Quilmes.
- Morilla, M.J.; Montanari, J.; Frank, F.; Malchiodi, E.; Corral, R.; Petray, P. and Romero, E.L., 2005. **Etanidazole in pH-sensitive liposomes: design, characterization and in vitro/in vivo anti-Trypanosoma cruzi activity**. J Control Rel, 103: 599-607.
- Moutardier, V.; Tosini, F.; Vlieghe, P.; Cara, L.; Delpero, J.R. and Clerc, T., 2003. **Colloidal anticancer drugs bioavailabilities in oral administration models**. Int J Pharm, 260: 23-38.
- Muller, A., 1974. **Classification and properties of iron preparations**. Arzneimittelforschung, 24: 880-883.
- Muller, K. and Schuster, A., 1990. **Solubilization of multilamellar liposomes of egg yolk lecithin by the bile salt sodiumtaurodeoxycholate and the effect of cholesterol--a rapid-ultrafiltration study**. Chem Phys Lipids, 52: 111-127.
- Muller, R.H.; Radtke, M. and Wissing, S.A., 2002. **Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations**. Adv Drug Deliv Rev, 54 Suppl 1: S131-155.
- Muramatsu, K.; Maitani, Y. and Nagai, T., 1996. **Dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes with soybean-derived sterols and cholesterol as a carrier for the oral administration of insulin in rats**. Biol Pharm Bull, 19: 1055-1058.
- Muzzarelli, R.A., 1998. **Colorimetric determination of chitosan**. Anal Biochem, 260: 255-257.
- Nacka, F.; Cansell, M. and Entressangles, B., 2001. **In vitro behavior of marine lipid-based liposomes**. Influence of pH, temperature, bile salts, and phospholipase A2. Lipids, 36: 35-42.
- Nacka, F.; Cansell, M.; Gouygou, J.P.; Gerbeaud, C.; Meleard, P. and Entressangles, B., 2001. **Physical and chemical stability of marine lipid-based liposomes under acid conditions**. Colloids Surf B Biointerfaces, 20: 257-266.
- Nacka, F.; Cansell, M.; Meleard, P. and Combe, N., 2001. **Incorporation of alpha-tocopherol in marine lipid-based liposomes: in vitro and in vivo studies**. Lipids, 36: 1313-1320.
- Nagata, M.; Yotsuyanagi, T. and Ikeda, K., 1988. **A two-step model of disintegration kinetics of liposomes in bile salts**. Chem Pharm Bull (Tokyo), 36: 1508-1513.
- Nagata, M.; Yotsuyanagi, T. and Ikeda, K., 1990. **Bile salt-induced disintegration of egg phosphatidylcholine liposomes: a kinetic study based on turbidity changes**. Chem Pharm Bull (Tokyo), 38: 1341-1344.
- Nagayasu, A.; Uchiyama, K. and Kiwada, H., 1999. **The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs**. Adv Drug Deliv Rev, 40: 75-87.
- Naylor, G.P. and Harrison, J.D., 1995. **Gastrointestinal iron and cobalt absorption and iron status in young rats and guinea pigs**. Hum Exp Toxicol, 14: 949-954.
- Neuhoff, S., 2005. **Refined in vitro models for prediction of intestinal drug transport: role of pH**. Department of Pharmacy, Uppsala, Uppsala University.
- New, R.C.C. **Liposomes: a practical approach**. O. U. Press, New York, 1990.
- Nichols, J.W. and Deamer, D.W., 1980. **Net proton-hydroxyl permeability of large unilamellar liposomes measured by an acid-base titration technique**. Proc Natl Acad Sci U S A, 77: 2038-2042.

- Norris, F.A. and Powell, G.L., 1990. **The apparent permeability coefficient for proton flux through phosphatidylcholine vesicles is dependent on the direction of flux.** *Biochim Biophys Acta*, 1030: 165-171.
- Norris, F.A. and Powell, G.L., 1992. **Characterization of CO₂/carbonic acid mediated proton flux through phosphatidylcholine vesicles as model membranes.** *Biochim Biophys Acta*, 1111: 17-26.
- Nyholm, T. and Slotte, J.P., 2001. **Comparison of Triton X-100 penetration into phosphatidylcholine and sphingomyelin mono- and bilayers.** *Langmuir*, 17: 4724-4730.
- O'Connor, C.J.; Wallace, R.G.; Iwamoto, K.; Taguchi, T. and Sunamoto, J., 1985. **Bile salt damage of egg phosphatidylcholine liposomes.** *Biochim Biophys Acta*, 817: 95-102.
- O'Donnell, A.M. and Britos, S., 2002. **Reflexiones y propuestas en la emergencia alimentaria.** *Arch Arg Pediatr*, 100: 412-432.
- O'Hagan, D.T., 1996. **The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery.** *J Anat*, 189: 477-482.
- Ogawa, Y.; Yamamoto, M.; Okada, H.; Yashiki, T. and Shimamoto, T., 1988. **A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid.** *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 36: 1095-1103.
- Okada, J.; Cohen, S. and Langer, R., 1995. **In vitro evaluation of polymerized liposomes as an oral drug delivery system.** *Pharm Res*, 12: 576-582.
- Olivares, M.; Walter, T.; Hertrampf, E.; Pizarro, F. and Stekel, A., 1989. **Prevention of iron deficiency by milk fortification. The Chilean experience.** *Acta Paediatr Scand Suppl*, 361: 109-113.
- Olson, F.; Hunt, C.A.; Szoka, F.C.; Vail, W.J. and Papahadjopoulos, D., 1979. **Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes.** *Biochim Biophys Acta*, 557: 9-23.
- Olszon, E.; Isaksson, B.; Norrby, A. and Solvell, L., 1978. **Food iron absorption in iron deficiency.** *Am J Clin Nutr*, 31: 106-111.
- Orditura, M.; Quaglia, F.; Morgillo, F.; Martinelli, E.; Lieto, E.; De Rosa, G.; Comunale, D.; Diadema, M.R.; Ciardiello, F.; Catalano, G. and De Vita, F., 2004. **Pegylated liposomal doxorubicin: pharmacologic and clinical evidence of potent antitumor activity with reduced anthracycline-induced cardiotoxicity (review).** *Oncol Rep*, 12: 549-556.
- Papahadjopoulos, D., 1971. **Na⁺ + -K⁺ discrimination by "pure" phospholipid membranes.** *Biochim Biophys Acta*, 241: 254-259.
- Park, Y.W.; Mahoney, A.W. and Hendricks, D.G., 1983. **Bioavailability of different sources of ferrous sulfate iron fed to anemic rats.** *J Nutr*, 113: 2223-2228.
- Partearroyo, M.A.; Urbaneja, M.A. and Goñi, F.M., 1992. **Effective detergent/lipid ratios in the solubilization of phosphatidylcholine vesicles by Triton X-100.** *FEBS Lett*, 302: 138-140.
- Patel, H.M. and Ryman, B.E., 1976. **Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes.** *FEBS Lett*, 62: 60-63.
- Patel, H.M.; Tuzel, N.S. and Stevenson, R.W., 1985. **Intracellular digestion of saturated and unsaturated phospholipid liposomes by mucosal cells. Possible mechanism of transport of liposomally entrapped macromolecules across the isolated vascularly perfused rabbit ileum.** *Biochim Biophys Acta*, 839: 40-49.
- Patel, G.B.; Agnew, B.J.; Deschatelets, L.; Fleming, L.P. and Sprott, G.D., 2000. **In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems.** *Int J Pharm*, 194: 39-49.

- Paternostre, M.T.; Roux, D. and Rigaud, J.L., 1988. **Mechanisms of membrane protein insertion into liposomes during reconstitution procedures involving the use of detergents. 1.Solubilization of large unilamellar liposomes (prepared by reverse-phase evaporation) by Triton X-100, octyl glucoside, and sodium cholate.** *Biochemistry*, 27: 2668-2677.
- Patra, S.K.; Alonso, A. and Goñi, F.M., 1998. **Detergent solubilization of phospholipid bilayers in the gel state: the role of polar and hydrophobic forces.** *Biochim Biophys Acta*, 1373: 112-118.
- Paul, A.; Cevc, G. and Bachhawat, B.K., 1995. **Transdermal immunization with large proteins by means of ultradeformable drug carriers.** *Eur J Immunol*, 25: 3521-3524.
- Paul, W. and Sarma, C.P., 2000. **Chitosan, a drug carrier for the 21st century: a review.** *STP Pharma Sci*, 10: 5-22.
- Paula, S.; Volkov, A.G.; Van Hoek, A.N.; Haines, T.H. and Deamer, D.W., 1996. **Permeation of protons, potassium ions, and small polar molecules through phospholipid bilayers as a function of membrane thickness.** *Biophys J*, 70: 339-348.
- Pennell, M.D.; Wiens, W.; Rasper, J. and Motzok, I., 1975. **Factors affecting the relative biological value of food grade elemental iron powders for rats and humans.** *J Food Sci*, 40: 265-274.
- Perkins, W.R. and Cafiso, D.S., 1987. **Characterization of H⁺/OH⁻ currents in phospholipid vesicles.** *J Bioenerg Biomembr*, 19: 443-455.
- Perkins, W.R.; Minchey, S.R. and Janoff, A.S., 1993. **The determination of liposome captured volume.** *Chem Phys Lipids*, 64: 197-217.
- Perret, S.; Golding, M. and Williams, W.P., 1991. **A simple method for the preparation of liposomes for pharmaceutical applications-Characterization of the liposomes.** *J Pharm Pharmacol*, 43: 154-161.
- Perrie, Y.; Obrenovic, M.; McCarthy, D. and Gregoriadis, G., 2002. **Liposome (Lipodine)-mediated DNA vaccination by the oral route.** *J Liposome Res*, 12: 185-197.
- Phillips, N.C.; Gagne, L.; Ivanoff, N. and Riveau, G., 1996. **Influence of phospholipid composition on antibody responses to liposome encapsulated protein and peptide antigens.** *Vaccine*, 14: 898-904.
- Pigeon, C.; Ilyin, G.; Courselaud, B.; Leroyer, P.; Turlin, B.; Brissot, P. and Loreal, O., 2001. **A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload.** *J Biol Chem*, 276: 7811-7819.
- Porzio, M., 2004. **Flavor encapsulation: a convergence of science and art.** *Food Technol*, 58: 40-47.
- Prestidge, C.; Barnes, T. and Er, Y., 2005, **Current trends in liposomal drug delivery systems**, *Drug Del Comp Rep*, PharmaVentures.
- Puyfoulhoux, G.; Rouanet, J.M.; Besancon, P.; Baroux, B.; Baccou, J.C. and Caporiccio, B., 2001. **Iron availability from iron-fortified spirulina by an in vitro digestion/Caco-2 cell culture model.** *J Agric Food Chem*, 49: 1625-1629.
- Rahman, A.; More, N. and Schein, P.S., 1982. **Doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity and its protection by liposomal administration.** *Cancer Res*, 42: 1817-1825.
- Raja, K.B.; Simpson, R.J. and Peters, T.J., 1987. **Comparison of ⁵⁹Fe³⁺ uptake in vitro and in vivo by mouse duodenum.** *Biochim Biophys Acta*, 901: 52-60.
- Raja, K.B.; Simpson, R.J. and Peters, T.J., 1992. **Investigation of a role for reduction in ferric iron uptake by mouse duodenum.** *Biochim Biophys Acta*, 1135: 141-146.

- Ramaldes, G.A.; Fattal, E.; Puisieux, F. and Ollivon, F., 1996. **Solubilization kinetics of phospholipid vesicles by sodium taurocholate.** *Colloids Surf B*, 6: 363-371.
- Rao, J. and Jagadeesan, V., 1995. **Development of a rat model for iron deficiency and toxicological studies: comparison among Fisher 344, Wistar and Sprague Dawley strains.** *Lab Anim Sci*, 45: 393-397.
- Rapetti, M.C.; Donato, H.; de Galvagni, A.; Lubovitsky, M.; Lanzilotta, M.; Trepacka, E.; Burlando, G. and Weill, R., 1997. **Correction of iron deficiency with an iron-fortified fluid whole cow's milk in children: results of a pilot study.** *J Pediatr Hematol Oncol*, 19: 192-196.
- Reddy, M.B. and Cook, J.D., 1991. **Assessment of dietary determinants of nonheme-iron absorption in humans and rats.** *Am J Clin Nutr*, 54: 723-728.
- Regnault, C.; Soursac, M.; Roch-Arveiller, M.; Postaire, E. and Hazebroucq, G., 1996. **Pharmacokinetics of superoxide dismutase in rats after oral administration.** *Biopharm Drug Dispos*, 17: 165-174.
- Rigaud, J.L.; Pitard, B. and Levy, D., 1995. **Reconstitution of membrane proteins into liposomes: application to energy-transducing membrane proteins.** *Biochim Biophys Acta*, 1231: 223-246.
- Roerdink, F.H.; Dijkstra, J.; Spanjer, H.H. and Scherphof, G.L., 1984. **Interaction of liposomes with hepatocytes and Kupffer cells in vivo and in vitro.** *Biochem Soc Trans*, 12: 335-336.
- Rogers, J.A. and Anderson, K.E., 1998. **The potential of liposomes in oral drug delivery.** *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 15: 421-480.
- Rotenberg, M.; Rubin, M.; Bor, A.; Meyuhav, D.; Y., T. and Lichtenberg, D., 1991. **Physico-chemical characterization of Intralipid emulsions.** *Biochim Biophys Acta*, 1086: 265-272.
- Roth, Y.; Opatowsky, D.; Lichtenberg, D. and Kozlov, M.M., 2000. **Phase behavior of dilute aqueous solutions of lipid-surfactant mixtures: effects of finite size of micelles.** *Langmuir*, 16: 2052-2061.
- Rowland, R.N. and Woodley, J.F., 1980. **The stability of liposomes in vitro to pH, bile salts and pancreatic lipase.** *Biochim Biophys Acta*, 620: 400-409.
- Rowland, R.N. and Woodley, J.F., 1981. **The uptake of distearoylphosphatidylcholine/cholesterol liposomes by rat intestinal sacs in vitro.** *Biochim Biophys Acta*, 673: 217-223.
- Ruben, C. and Larsson, K., 1985. **Relations between antioxidant effect of alpha-tocopherol and emulsion structure.** *J Dispersion Sci Technol*, 6: 213-221.
- Ruozi, B.; Tosi, G.; Forni, F.; Fresta, M. and Vandelli, M.A., 2005. **Atomic Force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes.** *Eur J Pharm Sci*, 25: 81-89.
- Russell, M.W. and Mestecky, J., 1988. **Induction of the mucosal immune response.** *Rev Infect Dis*, 10 Suppl 2: S440-446.
- Saez-Cirion, A.; Alonso, A.; Goñi, F.M.; McMullen, T.P.; McElhancy, R.N. and Rivas, E.A., 2000. **Equilibrium and kinetics studies of the solubilization of phospholipids-cholesterol bilayers by C12E8: the influence of the lipid phase structure.** *Langmuir*, 16: 1960-1968.
- Sall Zhan-P, E.R. RU2214231 (2003). **Powder-like compositions of unilamellar liposomes.** *Lipozhel*.
- Salle, B.L.; Delvin, E. and Claris, O., 2005. **Fat-soluble vitamins in infants.** *Arch Pediatr*, 12: 1174-1179.

- Sandell, E.B. **Colorimetric Determination of Traces of Metals**. Interscience Publishers, Inc., New York, 1959.
- Santos Maia, C.; Mehnert, W.; Schaller, M.; Korting, H.C.; Gysler, A.; Haberland, A. and Schafer-Korting, M., 2002. **Drug targeting by solid lipid nanoparticles for dermal use**. *J Drug Target*, 10: 489-495.
- Sapra, P.; Stein, R.; Pickett, J.; Qu, Z.; Govindan, S.V.; Cardillo, T.M.; Hansen, H.J.; Horak, I.D.; Griffiths, G.L. and Goldenberg, D.M., 2005. **Anti-CD74 antibody-doxorubicin conjugate, IMMU-110, in a human multiple myeloma xenograft and in monkeys**. *Clin Cancer Res*, 11: 5257-5264.
- Sattler, S.; Schaefer, U.; Schneider, W.; Hoelzl, J. and Lehr, C.M., 1997. **Binding, uptake, and transport of hypericin by Caco-2 cell monolayers**. *J Pharm Sci*, 86: 1120-1126.
- Sawada, Y.; Shintaku, H.; Nakajima, T.; Imamura, T.; Tsubakio, Y.; Iwamura, C.; Isshiki, G. and Ohura, T., 1993. **Oral administration of liposomally entrapped tetrahydrobiopterin**. *Adv Exp Med Biol*, 338: 271-272.
- Saylor, L. and Finch, C.A., 1953. **Determination of iron absorption using two isotopes of iron**. *Am J Physiol*, 172: 372-376.
- Schafer, S. and Forth, W., 1984. **On the absorption of divalent and trivalent iron in living rats**. *Arzneimittelforschung*, 34: 1570-1574.
- Scherphof, G.; Daemen, J. and Hoekstra, D. **Interactions of liposomes with plasma proteins and components of the immune system**. G. Knight, Elsevier, Amsterdam, 1981.
- Scherphof, G. **In vivo behaviour of liposomes: interactions with the mononuclear phagocyte system and implications for drug targeting**. *Handbook of Experimental Pharmacology*. R. L. Juliano, Springer-Verlag, Berlin, 1991, 285-327.
- Schiffelers, R.; Storm, G. and Bakker-Woudenberg, I., 2001. **Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies**. *J Antimicrob Chemother*, 48: 333-344.
- Schmitz, H. and Muller, A., 1971. **Comparative study on the therapeutic effects of iron(II) and Iron(3)-antianemics applied orally**. *Arzneimittelforschung*, 21: 509-515.
- Schnitzer, E.; Lichtenberg, D. and Kozlov, M.M., 2003. **Temperature-dependence of the solubilization of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) by the non-ionic surfactant Triton X-100, kinetics and structural aspects**. *Chem Phys Lipids*, 126: 55-76.
- Schnitzer, E.; Kozlov, M.M. and Lichtenberg, D., 2005. **The effect of cholesterol on the solubilization of phosphatidylcholine bilayers by the non-ionic surfactant Triton X-100**. *Chem Phys Lipids*, 135: 69-82.
- Schnyder, A. and Huwyler, J., 2005. **Drug transport to brain with targeted liposomes**. *NeuroRx*, 2: 99-107.
- Schreier, H. and Bouwstra, J.A., 1994. **Liposomes and niosomes as topical drug carriers: dermal and transdermal drug delivery**. *J Control Rel*, 30: 1-15.
- Schubert, R.; Beyer, K.; Wolburg, H. and Schmidt, K.H., 1986. **Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate**. *Biochemistry*, 25: 5263-5269.
- See, N.A. and Bass, P., 1993. **Nutrient-induced changes in the permeability of the rat jejunal mucosa**. *J Pharm Sci*, 82: 721-724.
- Sehgal, S., 1994. **Formulation of pullulan-coated liposomes and release kinetics of water-soluble solutes**. Alberta, University of Alberta.
- Sehgal, S. and Rogers, J.A., 1995. **Polymer-coated liposomes: improved liposome stability and release of cytosine arabinoside (Ara-C)**. *J Microencaps*, 12: 37-47.

- Seifert, C.F.; Nesser, M.E. and Thompson, D.F., 1994. **Dexrazoxane in the prevention of doxorubicin-induced cardiotoxicity**. *Ann Pharmacother*, 28: 1063-1072.
- Senior, J. and Gregoriadis, G., 1982. **Stability of small unilamellar liposomes in serum and clearance from the circulation: the effect of the phospholipid and cholesterol components**. *Life Sci*, 30: 2123-2136.
- Senior, J.H., 1987. **Fate and behavior of liposomes in vivo: a review of controlling factors**. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 3: 123-193.
- Shabbits, J.A.; Krishna, R. and Mayer, L.D., 2001. **Molecular and pharmacological strategies to overcome multidrug resistance**. *Expert Rev Anticancer Ther*, 1: 585-594.
- Shears, G.E.; Neale, R.J. and Ledward, D.A., 1989. **Effects of dietary iron deficiency and tungsten supplementation on ⁵⁹Fe absorption and gastric retention from ⁵⁹Fe compounds in rats**. *Br J Nutr*, 61: 573-581.
- Shen, H.; Howles, P. and Tso, P., 2001. **From interaction of lipidic vehicles with intestinal epithelial cell membranes to the formation and secretion of chylomicrons**. *Adv Drug Deliv Rev*, 50 Suppl 1: S103-125.
- Shoemaker, D.G. and Nichols, J.W., 1992. **Interaction of lysophospholipid/taurodeoxycholate submicellar aggregates with phospholipid bilayers**. *Biochemistry*, 31: 3414-3420.
- Shwinke, D.L.; Ganesan, M.G. and Weiner, N.D., 1984. **In situ jejunal uptake from liposomal systems**. *Int J Pharm*, 20: 119-124.
- Sikic, B.I., 1999. **Modulation of multidrug resistance: a paradigm for translational clinical research**. *Oncology (Williston Park)*, 13: 183-187.
- Siling, W.; Desen, S. and Xueqiu, G. **CN1274605** (2000). **Oral insulin granule and its preparation**. Shenyang Pharmacy Univ.
- Sjostrom, B. and Bergenstahl, B., 1992. **Preparation of submicron drug particles in lecithin-stabilized o/w emulsions. I Model studies of the precipitation of cholesteryl acetate**. *Int J Pharm*, 84: 107-116.
- Slater, G.W.; Kenward, M.; McCormick, L.C. and Gauthier, M.G., 2003. **The theory of DNA separation by capillary electrophoresis**. *Curr Opin Mol Biotech*, 14: 58-64.
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, B.J.; Olson, B.J. and Klenk, D.C., 1985. **Measurement of protein using bicinchoninic acid**. *Anal Biochem*, 150: 76-85.
- Song, K.H.; Chung, S.J. and Shim, C.K., 2002. **Preparation and evaluation of proliposomes containing salmon calcitonin**. *J Control Rel*, 84: 27-37.
- Song, K.H.; Chung, S.J. and Shim, C.K., 2005. **Enhanced intestinal absorption of salmon calcitonin (sCT) from proliposomes containing bile salts**. *J Control Rel*, 106: 298-308.
- Sot, J.; Collado, M.I.; Arrondo, J.L.; Alonso, A. and Goñi, F.M., 2002. **Triton X-100-resistant bilayers: effect of lipid composition and relevance to raft phenomenon**. *Langmuir*, 18: 2828-2835.
- Steffen, H. and Schmidt, C. **DE2730570** (1978). Hofmann-La Roche.
- Stewart, J., 1959. **Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate**. *Anal Biochem*, 104: 10-14.
- Storm, G.; Wilms, H.P. and Crommelin, D.J., 1991. **Liposomes and biotherapeutics**. *Biotherapy*, 3: 25-42.
- Sun, D.; Lennernas, H.; Welage, L.S.; Barnett, J.L.; Landowsky, C.P.; Foster, D.; Fleicher, D.; Lee, K.D. and Amidon, G.L., 2002. **Comparison of human duodenum and Caco-2 gene**

- expression profiles for 12,000 gene sequence tags and correlation with permeability of 26 drugs.** *Pharm Res*, 19: 1400-1409.
- Sunamoto, J. and Iwamoto, K., 1986. **Protein-coated and polysaccharide-coated liposomes as drug carriers.** *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2: 117-136.
- Szoka, F. and Papahadjopoulos, D., 1978. **Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation.** *Proc Natl Acad Sci U S A*, 75: 4194-4198.
- Taira, M.C.; Chiaramoni, N.S.; Pecuch, K.M. and Alonso-Romanowski, S., 2004. **Stability of liposomal formulations in physiological conditions for oral drug delivery.** *Drug Deliv*, 11: 123-128.
- Takeshi, K.; Ryoji, M. and Tsuneji, N. JP8059503 (1996). **Liposome preparation for administering peptide or protein medicine through mouth or mucosa.** Teijin LTD.
- Takeuchi, H.; Yamamoto, H.; Niwa, T.; Hino, T. and Kawashima, Y., 1994. **Mucoadhesion of polymer-coated liposomes to rat intestine in vitro.** *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 42: 1954-1956.
- Takeuchi, H.; Yamamoto, H.; Niwa, T.; Hino, T. and Kawashima, Y., 1996. **Enteral absorption of insulin in rats from mucoadhesive chitosan-coated liposomes.** *Pharm Res*, 13: 896-901.
- Takeuchi, H.; Yamamoto, H. and Toyoda, T., 1998. **Physical stability of size controlled small unilamellar liposomes coated with a modified polyvinyl alcohol.** *Int J Pharm*, 164: 103-111.
- Takeuchi, H.; Matsui, Y.; Yamamoto, H. and Kawashima, Y., 1999. **A novel in vitro test for mucoadhesiveness of polymers using commercially available mucin particles for development of particulate mucoadhesive systems.** *Proc Strat Optimiz Oral Drug Del*, 164.
- Takeuchi, H.; Matsui, Y.; Yamamoto, H. and Kawashima, Y., 2003. **Mucoadhesive properties of carbopol or chitosan-coated liposomes and their effectiveness in the oral administration of calcitonin to rats.** *J Control Rel*, 86: 235-242.
- Talsma, H.; Ozer, A.Y.; Van Bloois, L. and Crommelin, D.J., 1989. **The size reduction of liposomes with a high pressure homogenizer (microfluidizer™). Characterization of prepared dispersions and comparison with conventional methods.** *Drug Dev Ind Pharm*, 15: 197-207.
- Tallkvist, J.; Bowlus, C.L. and Lonnerdal, B.O., 2000. **Functional and molecular responses of human intestinal Caco-2 cells to iron treatment.** *Am J Clin Nutr*, 72: 770-775.
- Tapiero, H.; Gate, L. and Tew, K.D., 2001. **Iron: deficiencies and requirements.** *Biomed Pharmacother*, 55: 324-332.
- Theakston, R.D.; Zumbuehl, O. and New, R.R., 1985. **Use of liposomes for protective immunisation in sheep against Echis carinatus snake venom.** *Toxicon*, 23: 921-925.
- Timerbaev, A.R., 2004. **Capillary electrophoresis of inorganic ions: an update.** *Electrophoresis*, 25: 4008-4031.
- Tomalia, D.; Baker, H.; Dewald, J.; Hall, M.; Kallos, G.; Martin, S.; Roeck, J.; Ryder, J. and Smith, P., 1984. **New class of polymers: starburst-dendritic macromolecules.** *Polymer Journal*, 17: 117-132.
- Tomizawa, H.; Aramaki, Y.; Fujii, Y.; Hara, T.; Suzuki, N.; Yachi, K.; Kikuchi, H. and Tsuchiya, S., 1993. **Uptake of phosphatidylserine liposomes by rat Peyer's patches following intraluminal administration.** *Pharm Res*, 10: 549-552.

- Torchilin, V.P., 1985. **Liposomes as targetable drug carriers**. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 2: 65-115.
- Toyoshima, Y. and Thompson, T.E., 1975. **Chloride flux in bilayer membranes: the electrically silent chloride flux in semispherical bilayers**. Biochemistry, 14: 1518-1524.
- Tsume, Y.; Taki, Y.; Sakane, T.; Nadai, T.; Sezaki, H.; Watabe, K.; Kohno, T. and Yamashita, S., 1996. **Quantitative evaluation of the gastrointestinal absorption of protein into the blood and lymph circulation**. Biol Pharm Bull, 19: 1332-1337.
- Tumer, A.; Kirby, C.; Senior, J. and Gregoriadis, G., 1983. **Fate of cholesterol-rich liposomes after subcutaneous injection into rats**. Biochim Biophys Acta, 760: 119-125.
- Uauy, R.; Hertrampf, E. and Reddy, M., 2002. **Iron fortification of foods: overcoming technical and practical barriers**. J Nutr, 132: 849S-852S.
- Uchida, T. and Mori, M. **JP2004043332** (2004). **Oral liposome preparation**. Nof Corp, Nat Inst of Infectious Disease.
- Ueno, M.; Nakasaki, T.; Horikoshi, I. and Sakuragawa, N., 1982. **Oral administration of liposomally-entrapped heparin to beagle dogs**. Chem Pharm Bull (Tokyo), 30: 2245-2247.
- Uicich, R.; Pizarro, F.; Almeida, C.A.; Díaz, M.; Boccio, J.; Zubillaga, M.; Carmuega, E. and O'Donnell, A., 1999. **Bioavailability of microencapsulated ferrous sulfate in fluid cow's milk. Studies in human beings**. Nutr Res, 19: 893-897.
- Van Echteld, C.J., De Kruijff, B., Mandersloot J.G., De Gier J., 1981. **Effects of lysophosphatidylcholines on phosphatidylcholine and phosphatidylcholine / cholesterol liposome systems as revealed by ³¹P-NMR, electron microscopy and permeability studies**. Biochim Biophys Acta, 649: 211-220.
- Van Hoek, R. and Conrad, M.E., Jr., 1961. Iron absorption. **Measurement of ingested iron⁵⁹ by a human whole-body liquid scintillation counter**. J Clin Invest, 40: 1153-1159.
- Van Osdol, W.W.; Ye, Q.; Johnson, M.L. and Biltonen, R.L., 1992. **Effect of the anesthetic dibucaine on the kinetics of the gel-liquid crystalline transition of dipalmitoylphosphatidylcholine multilamellar vesicles**. Biophys J, 63: 1011-1017.
- Vemuri, S.; Yu, C.; Wangsatorntanakun, V. and Roosdorp, N., 1990. **Large-scale production of liposomes by a microfluidizer**. Drug Dev Ind Pharm, 16: 2243-2256.
- Vemuri, S. and Rhodes, C.T., 1995. **Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery system: a review**. Pharm Acta Helvet, 70: 95-111.
- Venema, K.; Gibrat, R.; Grouzis, J.P. and Grignon, C., 1993. **Quantitative measurement of cationic fluxes, selectivity and membrane potential using liposomes multilabelled with fluorescent probes**. Biochim Biophys Acta, 1146: 87-96.
- Venkatesan, N. and Vyas, S.P., 2000. **Polysaccharide coated liposomes for oral immunization--development and characterization**. Int J Pharm, 203: 169-177.
- Verkade, H.J.; Bruijn, M.A.; Brink, M.A.; Talsma, H.; Vonk, R.J.; Kuipers, F. and Groen, A.K., 1996. **Interactions between organic anions, micelles and vesicles in model bile systems**. Biochem J, 320: 917-924.
- Viteri, F.E.; Garcia-Ibanez, R. and Torun, B., 1978. **Sodium iron NaFeEDTA as an iron fortification compound in Central America. Absorption studies**. Am J Clin Nutr, 31: 961-971.
- Watt, R.M., Voss, E.W., 1979. **Solvent perturbation of the fluorescence of fluorescein bound to specific antibody. Fluorescence quenching of the bound fluorophore by iodide**. J Biol Chem, 254: 1684-1690.
- Watts, A.; Marsh, D. and Knowles, P.F., 1978. **Characterization of dimyristoylphosphatidylcholine vesicles and their dimensional changes through the**

- phase transition: molecular control of membrane morphology.** *Biochemistry*, 17: 1792-1801.
- Webb, M.S.; Saxon, D.; Wong, F.M.; Lim, H.J.; Wang, Z.; Bally, M.B.; Choi, L.S.; Cullis, P.R. and Mayer, L.D., 1998. **Comparison of different hydrophobic anchors conjugated to poly(ethylene glycol): effects on the pharmacokinetics of liposomal vincristine.** *Biochim Biophys Acta*, 1372: 272-282.
- Weiner, N.; Lieb, L.; Niemiec, S.; Ramachandran, C.; Hu, Z. and Egbaria, K., 1994. **Liposomes: a novel topical delivery system for pharmaceutical and cosmetic applications.** *J Drug Target*, 2: 405-410.
- Weltzien, H.U.; Arnold, B.; Blume, A. and Kalkoff, H.G., 1976. **Molecular aggregation of the slow reacting hemolytic lysolecithin analog 1-octadecyl-2-benzyl-glycero-3-phosphorylcholine in aqueous solution.** *Chem Phys Lipids*, 16: 267-275.
- Wen, H.; Zhang, H.W.; Muhmut, M.; Zou, P.F.; New, R.R. and Craig, P.S., 1994. **Initial observation on albendazole in combination with cimetidine for the treatment of human cystic echinococcosis.** *Ann Trop Med Parasitol*, 88: 49-52.
- Wheby, M.S.; Suttle, G.E. and Ford, K.T., 3rd, 1970. **Intestinal absorption of hemoglobin iron.** *Gastroenterology*, 58: 647-654.
- Wienk, K.J.; Marx, J.J. and Beynen, A.C., 1999. **The concept of iron bioavailability and its assessment.** *Eur J Nutr*, 38: 51-75.
- Wissing, S.A.; Kayser, O. and Muller, R.H., 2004. **Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery.** *Adv Drug Deliv Rev*, 56: 1257-1272.
- Wolters, M.G.; Schreuder, H.A.; Van der Heuvel, G.; Van Lonkhuijsen, H.J.; Hermus, R.J. and Voragen, A.G., 1993. **A continuous *in vitro* method for estimation of the bioavailability of minerals and trace elements in foods: application to breads varying in phytic acid content.** *Br J Nutr*, 69: 849-861.
- Woodle, M.C. and Lasic, D.D., 1992. **Sterically stabilized liposomes.** *Biochim Biophys Acta*, 1113: 171-199.
- Yago, M.D.; Gonzalez, V.; Serrano, P.; Calpena, R.; Martínez, M.A.; Martínez-Victoria, E. and Mañas, M., 2005. **Effect of the type of dietary fat on biliary lipid composition and bile lithogenicity in humans with cholesterol gallstone disease.** *Nutrition*, 21: 339-347.
- Yatvin, M. and Betageri, G.V. **W00182897** (2001). **Liposome drug delivery.** Enzrel INC.
- Yatvin, M. **US2005152978** (2005). **Liposome drug delivery of polycyclic, aromatic, antioxidant or anti-inflammatory compounds.**
- Ye, Q. and Biltonen, R.L., 1994. **Differential scanning and dynamic calorimetric studies of cooperative phase transitions in phospholipid bilayer membranes.** *Subcell Biochem*, 23: 121-160.
- Yeung, V.W. and Nixon, J.R., 1988. **Preparation of microencapsulated liposomes.** *J Microencaps*, 5: 331-337.
- Zhou, F.; Kraehenbuhl, J.P. and Neutra, M.R., 1995. **Mucosal IgA response to rectally administered antigen formulated in IgA-coated liposomes.** *Vaccine*, 13: 637-644.
- Ziegler, M. and Penefsky, H.S., 1993. **The adenine nucleotide translocase modulates oligomycin-induced quenching of pyranine fluorescence in submitochondrial particles.** *J Biol Chem*, 268: 25320-25328.
- Zubritsky, E., 2002. **How analytical chemists saved the human genome project.** *Anal Chem*, 74: 1-10.

Zuidam, N.J.; Gouw, H.K.; Barenholz, Y. and Crommelin, D.J., 1995. **Physical instability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids.** *Biochim Biophys Acta*, 1240: 101-110.

TESIS: "Preparación y caracterización de formulaciones liposomales para administración por vía oral".

PRESENTADA POR: Laura Graciela Hermida, para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

RESUMEN (200 palabras)

En la presente tesis se aplicó el diseño experimental multifactorial para obtener, mediante homogeneización a alta presión, liposomas convencionales, catiónicos y mucoadhesivos. Se prepararon liposomas convencionales con piranina para caracterizar su comportamiento fisicoquímico durante un proceso de digestión *in vitro*, y establecer las condiciones de solubilización con TX-100 y con extracto de sales biliares. Los liposomas compuestos por fosfatidilcolina de soja hidrogenada y colesterol (en relación molar 3:2) resultaron los más estables y presentaron una menor pérdida de la sustancia incorporada respecto al resto de las formulaciones. Se encapsuló sulfato ferroso estabilizado con ácido ascórbico (solución FeAA) en las distintas formulaciones de liposomas y se determinó su estabilidad durante la digestión, incluyendo los cambios en el estado de oxidación del Fe²⁺. Se determinó, además, la captación de hierro por cultivos de células de carcinoma de colon (Caco-2), luego de su incubación con las formulaciones liposomales sometidas o no a digestión *in vitro*. En todos los casos, los liposomas produjeron un incremento en la absorción de hierro respecto a los productos comerciales analizados. Los niveles de captación obtenidos con los liposomas catiónicos y mucoadhesivos sin digerir, fueron similares a los obtenidos con la solución control de FeAA, pero mostraron una elevada inestabilidad frente al proceso digestivo.

TESIS: *"Preparation and characterization of liposome formulations for oral administration".*

PRESENTADA POR: Laura Graciela Hermida, para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires.

ABSTRACT (200 words)

Conventional, cationic and mucoadhesive liposomes were obtained by high pressure homogenization using a multifactorial experimental design. Conventional liposomes containing pyranine were prepared in order to characterize its physicochemical behaviour during in vitro digestion, and determine the solubilization conditions by TX-100 and bile extract. Liposomes composed by hydrogenated soy phosphatidylcholine and cholesterol (3:2 molar ratio) were the most stable, with the smallest pyranine leakage values. Ferrous sulphate stabilized with ascorbic acid (FeAA solution) was encapsulated in each liposome formulation and their stability during in vitro digestion was determined, including changes in the Fe²⁺ oxidation state. Iron uptake was evaluated using colon carcinoma cells (Caco-2) which were incubated with digested or non digested FeAA liposomes. In all the cases, liposomes improved iron absorption compared to commercial products. Uptake levels obtained with cells incubated with non digested cationic and mucoadhesive liposomes were similar to those obtained with FeAA control solution. However, they were highly unstable to in vitro digestion.