



Facultad  
de  
Ciencias

# Síntesis, optimización y caracterización de liposomas como transportadores moleculares.

(Synthesis, optimization and characterization of liposomes as molecular transporters.)

Trabajo de fin de grado  
para acceder al

**GRADO EN FÍSICA**

**Autor:** Danny Villanueva Alvaro

**Director:** Rafael Valiente Barroso

**Co-Director:** Lourdes Valdivia Fernández

Setiembre - 2019

## Resumen

Los liposomas se han convertido en una poderosa herramienta utilizada como vehículo de transporte de fármacos. Sus propiedades como capacidad de carga, alta especificidad, vida media, entre otros, dependen enormemente de sus cualidades morfológicas y composición, de ahí la importancia en efectuar una caracterización de estos. En este trabajo se han sintetizado liposomas cargados en superficie empleando sonicación en baño y en punta. Se ha realizado su caracterización morfológica utilizando técnicas de microscopía electrónica (TEM) y en base al número y distribución de tamaño de los liposomas obtenidos, se ha seleccionado la mejor opción o ruta de síntesis de las tres que se han explorado. Con la mejor opción se han desarrollado pruebas de encapsulación utilizando: Rodamina B (Rho.B) y 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC). Se han empleado algunos procesos para retirar el colorante no encapsulado o adsorbido, y las técnicas de espectroscopía de absorción UV-Vis y de fluorescencia han determinado cuantitativamente la concentración de lípidos, la concentración de colorante, la eficiencia de encapsulación, la carga útil y la adsorción en los liposomas.

**Palabras clave:** Liposomas, eficiencia de encapsulación, Rodamina B, Isotiocianato de Fluoresceína, caracterización de liposomas.

## Abstract

Liposomes have become a powerful tool used as a drug transport and delivery vehicle. Their properties such as load capacity, delivery efficiency, half-life, among others, depend greatly on its morphological qualities and composition, hence the importance of a good characterization. In this work, surface-charged liposomes have been synthesized using bath and probe sonication. A morphological characterization of these was performed using electron microscopy techniques (TEM) and based on the number and size distribution of the liposomes obtained, a selection of the best option or synthesis route of the three that have been explored. With the best option, encapsulation tests have been carried out using: Rhodamine B (Rho.B) and fluorescein 5-isothiocyanate (FITC) dyes. Some processes have been used to remove the non-encapsulated dyes, UV-Vis absorption and fluorescence spectroscopy techniques have been used to quantitatively determine lipid concentration, dye concentration, encapsulation efficiency, payload and adsorption of liposomes.

**Key words:** Liposomes, encapsulation efficiency, Rhodamine B, Fluorescein Isothiocyanate, liposome characterization.

# Índice

	Página
<b>1. Introducción y objetivos</b>	<b>3</b>
1.1. Los liposomas . . . . .	3
1.2. Clasificación . . . . .	6
1.3. Método de preparación . . . . .	7
1.4. Carga de agentes en liposomas . . . . .	9
1.5. Eficiencia de encapsulación y carga útil . . . . .	9
1.6. Moléculas encapsuladas . . . . .	10
1.7. Mecanismo de adsorción . . . . .	11
<b>2. Técnicas y desarrollo experimental</b>	<b>12</b>
2.1. Técnicas de microscopía . . . . .	12
2.2. Técnicas espectroscópicas . . . . .	14
2.2.1. Espectroscopía de absorción UV-Vis . . . . .	14
2.3. Liposomas y protocolo de síntesis . . . . .	14
2.4. Tinción de los liposomas . . . . .	16
2.5. Adsorción y encapsulación en los liposomas . . . . .	16
2.6. Lavado de liposomas . . . . .	17
2.7. Rotura de liposomas y medida de la eficiencia de encapsulación directa . . . . .	18
<b>3. Resultados</b>	<b>18</b>
3.1. Microscopía electrónica . . . . .	18
3.1.1. Síntesis de prueba . . . . .	19
3.1.2. Opc. 1: Sonicación en baño (Tiempos cortos de sonicación) . . . . .	20
3.1.3. Opc. 2: Sonicación en punta . . . . .	22
3.1.4. Opc. 3: Sonicación en baño (Tiempos largos de sonicación) . . . . .	23
3.1.5. Opciones de síntesis elegidas para la encapsulación . . . . .	25
3.1.6. Efectos del DMSO en la síntesis de liposomas . . . . .	26
3.2. Espectroscopía UV-Vis . . . . .	27
3.2.1. Disoluciones iniciales, antes del proceso de lavado . . . . .	27
3.2.2. Proceso de lavado . . . . .	30
3.2.3. Rotura de liposomas y eficiencia de encapsulación . . . . .	35
3.3. Microscopía confocal . . . . .	39
3.4. Fluorescencia . . . . .	40
<b>4. Conclusiones</b>	<b>42</b>
<b>References</b>	<b>43</b>
<b>5. Apéndice</b>	<b>45</b>
5.1. Apéndice A: Distribución de tamaños de los liposomas. . . . .	45
5.2. Apéndice B: Eliminación de la contribución por dispersión . . . . .	45
5.3. Apéndice C: Curvas de calibrado obtenidas. . . . .	46

# 1 Introducción y objetivos

El desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, constituye solo una victoria parcial para llegar a tratarlas. Esto se debe a que, aunque estos fármacos podrían ser efectivos para tratar ciertas enfermedades, estos presentan aún ciertas limitaciones como la baja especificidad, toxicidad y efectos secundarios.

Una solución a estos problemas se ha demostrado que puede ser el empleo de nanotransportadores. Los nanotransportadores más prometedores a la fecha son los liposomas por ser biocompatibles y biodegradables. Estos pueden transportar fármacos en su interior, y con ello permiten que el fármaco esté protegido en su biodistribución por el organismo. Además, es posible diseñarlos de tal forma que se dirija específicamente a las células diana evitando con ello que el fármaco se distribuya y ejerza su efecto en los tejidos sanos. Así, la protección y la especificidad que se obtendría al emplear los liposomas contribuiría a una disminución en la toxicidad y con ello un aumento de la eficiencia terapéutica [1].

Sin embargo, la aplicación terapéutica de los liposomas vendrá condicionada por su tamaño promedio y sus distribuciones de tamaño. Además, su comportamiento *in vivo* o *ex vivo* dependerá de sus características físicas y químicas. Por todo ello, es fundamental realizar inicialmente una caracterización de los liposomas [2].

Así, se ha decidido realizar un trabajo sobre este transportador. Se explorarán algunos procedimientos de síntesis que permitan obtener liposomas. Una vez conseguido esto, se ha intentado, empleando técnicas de dispersión mecánica, controlar sus distribuciones de tamaño. Todo ello con el objetivo de encontrar el mejor método con el que se consigan un gran número de liposomas con bajas dispersiones de tamaño. Por último, el método de síntesis óptimo se empleará a modo de prueba de concepto como transportador de colorante con el objetivo de estudiar la eficiencia de encapsulación y su carga útil.

## 1.1. Los liposomas

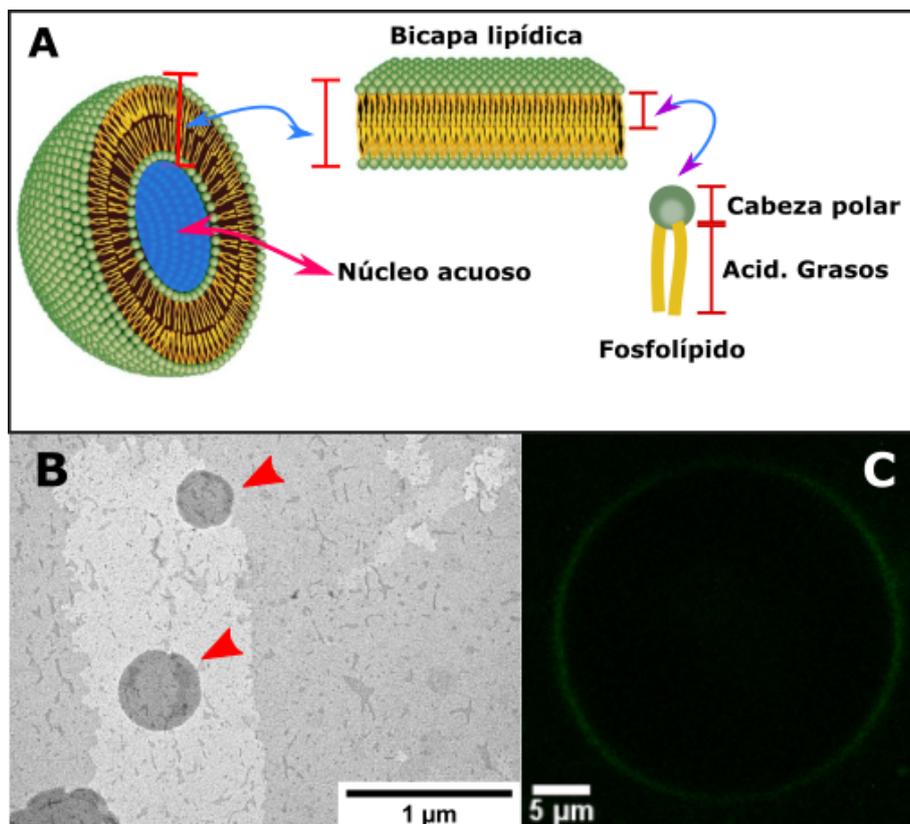
Los liposomas son estructuras vesiculares esféricas de pequeño tamaño y sintéticas formadas por una o más bicapas de fosfolípidos. Se indica un esquema de dicha estructura en la Fig.1A. En la Fig.1B y C se muestran dos ejemplos de cómo se observarían los liposomas a través de un microscopio electrónico de transmisión y confocal respectivamente.

En cuanto a la composición de los liposomas se conoce que su componente fundamental son los fosfolípidos. Estas moléculas se caracterizan por ser de naturaleza anfipática (o anfifílica), es decir, poseen una parte hidrófila formada por un grupo fosfato ( $PO_4^{-2}$ ), y una parte hidrófoba apolar formada por un par de cadenas de ácidos grasos. Estas dos partes se encuentran enlazadas a una molécula que generalmente es glicerol, por enlaces tipo éster, todo ello conforma la estructura básica de un fosfoglicérido o fosfolípido básico.

El grupo fosfato en muchos casos puede encontrarse unidos a moléculas de todo tipo por medio de un enlace fosfodiéster. En la Fig.2 se muestran algunos ejemplos.

El ejemplo de la Fig.2A se corresponde con el fosfolípido más simple anteriormente descrito, que no posee ninguna molécula adicional enlazado al grupo fosfato, éste es el llamado ácido fosfatídico a partir del cual se pueden derivar múltiples tipos de fosfolípidos como: la fosfatidiletanolamina (PE), mostrada en la Fig.2B o la fosfatidilcolina (PC), mostrada en la Fig.2C; donde el grupo fosfato se ha enlazado a una molécula de etanolamina y colina, respectivamente.

En este trabajo los fosfolípidos que se han empleado son precisamente la fosfatidileta-



**Figura 1.** (A) Esquema de los liposomas mostrando su característica estructura de bicapa lipídica. (B) y (C) son imágenes obtenidas en este trabajo con un microscopio TEM y uno confocal, respectivamente. (A) Imagen modificada de la ref.[3].

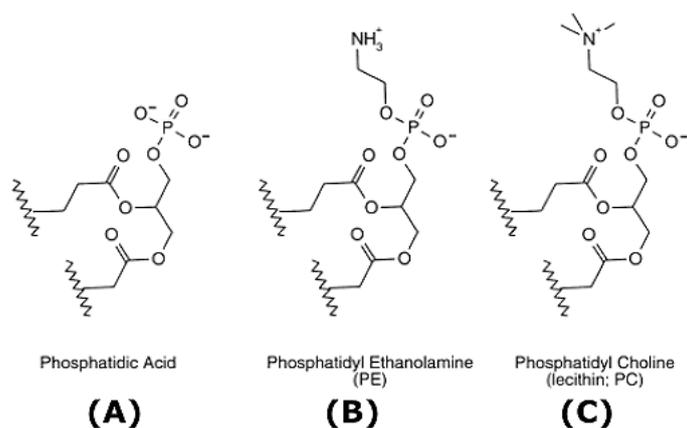
nolamina y la fosfatidilcolina. Éstos fosfolípidos, que poseen carga positiva a pH fisiológico [4], permitirán obtener liposomas cargados en superficie catiónicos y aniónicos, que se han denominado LC y LN, respectivamente. Más información al respecto en la Sec.2.3.

Por otro lado, otro elemento de los fosfolípidos son los ácidos grasos, los cuales constituyen la parte lipófila de los fosfolípidos. Estos pueden también ser muy variados, ya que se pueden encontrar cadenas de diferente longitud y con diferentes grados de insaturación.

La cualidad anfipática de los fosfolípidos es la responsable de que formen unas estructuras dinámicas ordenadas, las bicapas de fosfolípidos, cuando se encuentran en un medio acuoso, como se observa en la Fig.1A. Esto se produce debido a la tendencia de las cabezas polares de los fosfoglicéridos a interactuar entre sí, y a su vez, con el medio acuoso a través de puentes de hidrógeno, mientras que las cadenas de ácidos grasos lipófilos tienden a alejarse del medio acuoso, interactuando entre sí por interacciones de van der Waals, conformando así dos bloques de cadenas de ácidos grasos enfrentadas definiendo con ello una región lipófila, con las cabezas polares expuestas al medio acuoso [3, 4].

Como resultado, las membranas pueden generar estructuras cerradas de forma esférica con un compartimiento acuoso interno, este es el caso de los liposomas. En base solo a esto los liposomas presentan algunas ventajas significativas frente al resto de nanotransportadores, y es que, debido a su morfología, pueden ser capaces de encapsular dentro de su núcleo acuoso fármacos o biomoléculas polares, y a su vez, pueden almacenar dentro la zona intermembrana fármacos o biomoléculas apolares [1, 3, 5].

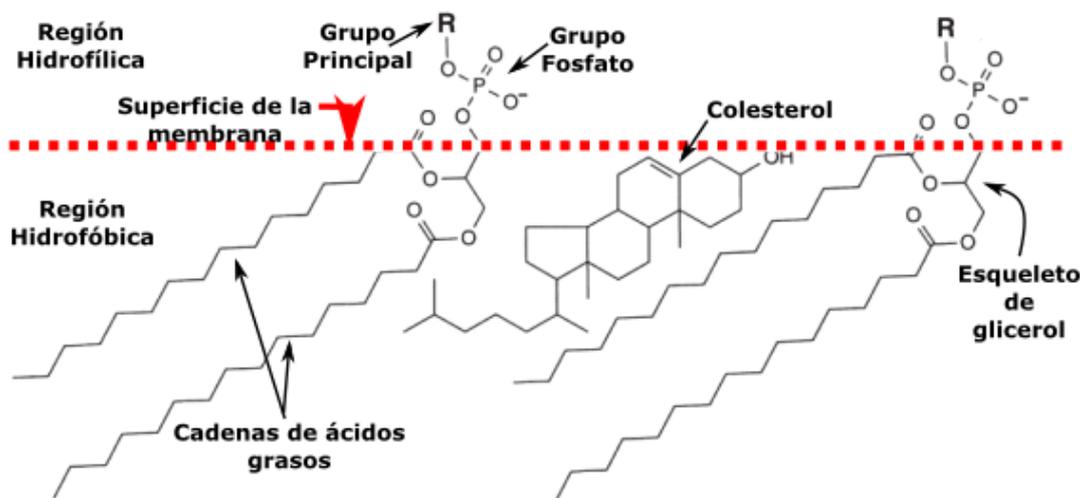
Otra ventaja se encuentra en que debido a su composición química, los liposomas son estructuras biocompatibles y biodegradables, aspecto importante para su posterior uso clínico.



**Figura 2.** Representación de los tres fosfoglicéridos más comunes: El ácido fosfatídico en (A), la fosfatidiletanolamina en (B), y la fosfatidilcolina en (C). La parte lipófila de los fosfolípidos no se encuentra representada. Esta imagen ha sido obtenida de la ref.[4].

Otro componente importante que suele estar presente en las formulaciones liposomales que se emplean con fines terapéuticos es el colesterol. Su presencia da lugar a estructuras de bicapas con una menor permeabilidad y una mayor estabilidad *in vivo* e *in vitro*, porque favorece la acumulación de fosfolípidos reforzando la bicapa. La molécula de colesterol se encontrará en las membranas de los liposomas, con su cabeza polar (-OH) dirigida hacia la región externa hidrófila [3, 4]. El colesterol también se encontrará presente en las formulaciones liposomales empleadas en este trabajo.

Una visión global de la ubicación de los componentes de los liposomas ya descritos se presenta en la Fig.3.



**Figura 3.** Esquema de la estructura de la membrana de los liposomas. En él se distinguen las regiones externas hidrófila, e interna, hidrófoba, de la membrana de los liposomas; y la situación de los componentes según su naturaleza química en los liposomas. Imagen modificada de la ref.[4].

## 1.2. Clasificación

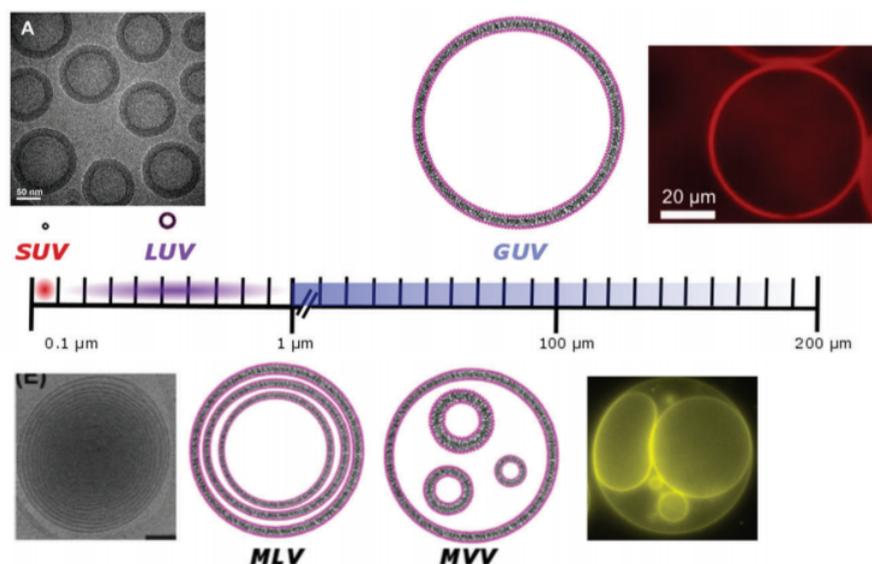
El criterio más común de clasificación es en base al tamaño y número de lamelas o membranas de los liposomas. Con ello, distinguimos tres clases de vesículas:

1. Vesículas unilamelares
2. Vesículas multilamelares
3. Vesículas multivesiculares

Las vesículas unilamelares son aquellas que poseen una sola membrana o lamela y pueden ser pequeñas (SUV), si tienen un tamaño entre 20 a 100 nm de diámetro; grandes (LUV), si su tamaño se encuentra entre 100 nm y 1  $\mu\text{m}$ ; o gigantes (GUV), si su diámetro es superior a 1  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, los liposomas pueden adquirir una configuración en la que tengan más de una lamela, en estos casos se habla de vesículas multilamelares (MLV), donde el número de lamelas concéntricas es variable y generalmente tiene tamaños comprendidos entre 500 nm y 10  $\mu\text{m}$ .

Por último, otra configuración posible es aquella en la que se dispongan vesículas no concéntricas dentro de una vesícula de mayor tamaño, en este caso se tienen vesículas multivesiculares, que suelen ser de mayor tamaño que las MLV para contener otras vesículas, generalmente su tamaño se encuentra entre 1,6 y 15  $\mu\text{m}$  [5, 6, 7].



**Figura 4.** Clasificación de los liposomas en base al tamaño y el número de lamelas que presentan. Se distinguen las vesículas unilamelares (SUV/LUV/GUV), las multilamelares (MLV) y las multivesiculares (MVV). La imagen ha sido extraída de la ref.[5].

Los liposomas también pueden clasificarse en base a su carga superficial como catiónicos, aniónicos o neutros. La carga es un factor importante si los liposomas se emplearán por ejemplo en terapias contra el cáncer, ya que determina su facilidad de penetración en los tejidos [8].

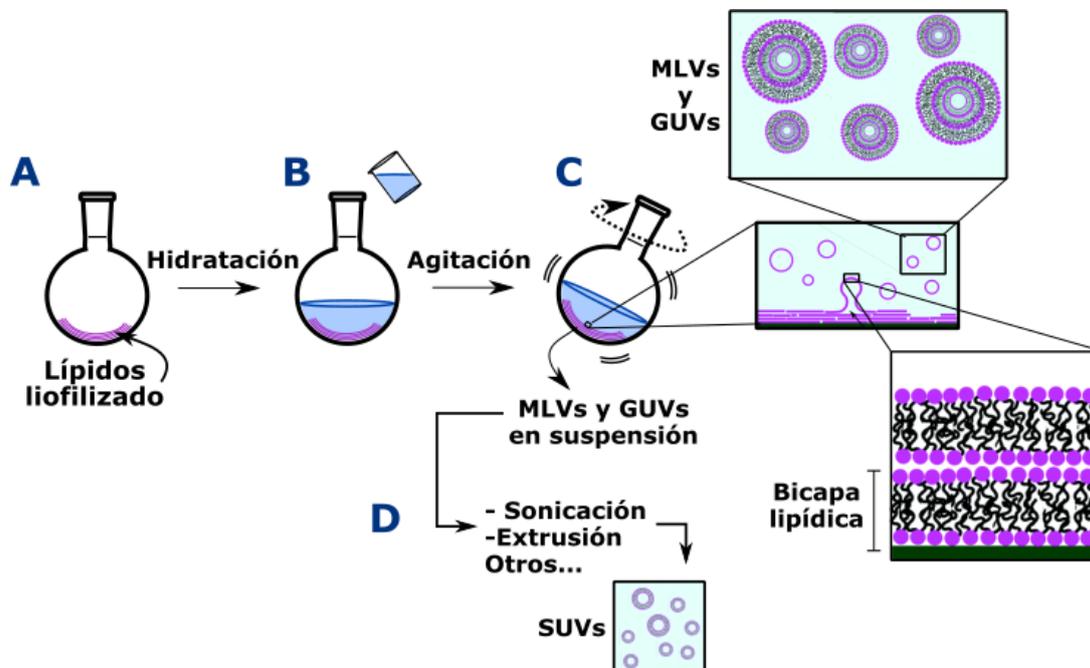
### 1.3. Método de preparación

Existen diferentes procesos generales para la formación de liposomas. Entre los más empleados se tienen: el método de *hidratación del film*, el método de inyección de etanol y el método de evaporación en fase inversa. En general estos métodos generan liposomas de gran tamaño como: MLV o LUV [2, 3].

El método más sencillo y que de acuerdo a la literatura [2] genera mejores resultados en cuanto a la estabilidad de los liposomas es el de *hidratación del film*. Entre los principales inconvenientes de este método se encuentran las bajas eficiencias de encapsulación de fármacos solubles en agua (5% - 15%) y problemas para obtener liposomas de pequeño tamaño, SUV [3]. Este método se desarrolla en tres etapas:

1. La mezcla de lípidos que van a conformar los liposomas en un solvente orgánico, como el cloroformo.
2. La eliminación del disolvente por evaporación, produciendo una delgada capa lipídica en el fondo del recipiente empleado.
3. La hidratación de la película lipídica delgada obtenida.

En la segunda etapa, la masa lipídica delgada sigue un proceso de liofilización hasta que se encuentre completamente seca. Algunas empresas comercializan esta masa lipídica liofilizada, para que sea necesario realizar la última etapa del proceso y terminar la síntesis de los liposomas. Este es nuestro caso, dado que se han empleado lípidos liofilizados, adquiridos a la compañía NANOVEX Biotechnologies, para desarrollar la síntesis de los liposomas.<sup>1</sup>



**Figura 5.** Método de síntesis de liposomas. Imagen modificada de la ref.[5].

Siguiendo el esquema presentado en la Fig.5, la última etapa del proceso de síntesis, consiste en añadir los lípidos liofilizados en un medio acuoso (Fig.5B) seguido de una

<sup>1</sup>Estrictamente el proceso de síntesis aquí desarrollado no es el de *hidratación del film* porque no se desarrolla todo el proceso completo, sino solo una parte.

agitación controlada (Fig.5C). Ya en este punto hay varios factores a tener en cuenta dado que la velocidad, la temperatura y el tiempo de agitación, así como el medio empleado y el tiempo de reposo de la mezcla influirán en la estabilidad y en la disponibilidad para el re-dimensionamiento de los liposomas que se formen [4, 9], por ello estos factores deben tenerse presentes y controlados.

La temperatura que se debe emplear durante la hidratación es conocida como la temperatura crítica del lípido ( $T_c$ ), ésta  $T_c$  delimita dos posibles fases de los lípidos, la fase gel y la fase fluida. Por encima de  $T_c$  los lípidos tienen una alta fluidez, es decir los lípidos en las bicapas se encontrarán menos empaquetados y tendrán gran capacidad de movimiento, esto favorecerá la unión de las bicapas durante la agitación para dar lugar a los liposomas, por ello es un factor a tener en cuenta. Por contra, por debajo de la  $T_c$  presentan un comportamiento totalmente opuesto a la otra fase. Esta  $T_c$  al igual que el tiempo de agitación durante la hidratación depende de la composición de los lípidos entre otros factores [1, 2, 9].

El resultado de este método de síntesis genera liposomas de gran tamaño: MLV y GUV. Así, para la reducción del tamaño de los liposomas ya formados, como se indica en la Fig.5D, se emplean comúnmente técnicas de dispersión mecánica como: la sonicación, extrusión entre otros.

La sonicación, que es el método que se empleó, permite obtener SUVs a partir de MLVs a través del suministro de energía mecánica. Aunque las distribuciones de tamaño que se obtienen dependerán de diversos factores como la temperatura de la muestra, la concentración de lípidos empleados, el tipo de lípidos empleados, el tiempo y la potencia de sonicación [2]. Esto explica por qué en la literatura se encuentran tiempos de sonicación muy variados.

Se distinguen dos métodos de sonicación, uno de ellos es la sonicación en punta que consiste en colocar una sonda de titanio en el interior de la muestra de liposomas en suspensión, la sonda agita fuertemente la muestra reduciendo con ello el tamaño de los liposomas [9]. Se deben elegir adecuadamente los parámetros de sonicación <sup>2</sup> como: la amplitud de la vibración de la sonda, el tiempo de cada pulso de sonicación y el periodo de cada pulso; dado que de estos dependerá enormemente la distribución de tamaños que se obtenga [3].

Los inconvenientes de este método de sonicación se encuentran en que el suministro de alta energía, puede llevar a un sobrecalentamiento de la muestra y en consecuencia una degradación de los liposomas [1] por roturas en los enlaces éster, por ello la importancia de controlar adecuadamente los parámetros ya indicados con anterioridad. Otro inconveniente se encuentra en que la sonda al encontrarse en contacto con la muestra puede contaminarla [1, 9].

Por otro lado, se tiene la sonicación en baño que consiste en colocar un recipiente estéril, que contiene la solución con liposomas, en un baño de ultrasonidos. Este método se suele emplear más frecuentemente que el anterior, ya que ahora la muestra está protegida de la contaminación y porque permite un control de la temperatura. Éste último parámetro es muy importante, como ya se ha mencionado, y la sonicación debe realizarse por encima [2] o en la temperatura crítica,  $T_c$ .

Una cualidad observable que permite identificar si la sonicación se ha producido de manera efectiva es la turbidez de la muestra. La turbidez es un fenómeno producido por la dispersión de la luz inducida por las partículas en suspensión cuando estas tienen tamaños del orden o superior a la longitud de la onda de la luz. Así, si la turbidez de la muestra disminuye, es decir, si se hace menos blanquecina tras la sonicación, cualitativamente ésto

---

<sup>2</sup>Los parámetros que pueden elegirse dependen del modelo del sonicador en punta elegido.

indicará que se ha producido una disminución en los tamaños de los liposomas [9], esto en los espectros de absorción de muestras con liposomas en suspensión se traduce en la presencia de un fondo de *scattering*. En este trabajo se ha intentado comprobar si el fondo de dispersión se puede emplear como herramienta para determinar la concentración de lípidos.

#### 1.4. Carga de agentes en liposomas

La encapsulación se puede llevar a cabo de dos maneras: pasiva o activa. Si la encapsulación se desarrolla durante la síntesis o formación de los liposomas, la captación se dice que es pasiva, y si la carga del agente se produce empleando los liposomas ya formados, la encapsulación es activa [1].

En la encapsulación pasiva, si el agente a encapsular es hidrófilo la eficiencia de encapsulación será proporcional al volumen de la fase acuosa del liposoma en formación. Sin embargo, en general la encapsulación dependerá de otros muchos factores como la carga de los liposomas, la composición de los fosfolípidos empleados en la síntesis, entre otros [1, 10]. Una forma sencilla de encapsular moléculas de este tipo es empleando el método de *hidratación del film*, anteriormente descrito.

En el caso de agentes lipófilos, éstos interaccionan con los fosfolípidos de las bicapas de las vesículas. Así, la eficiencia de encapsulación depende de la composición de los fosfolípidos empleados en la formulación liposomal y de la concentración de éstos.

En función de la naturaleza hidrófila o lipófila del agente, siguiendo el método de encapsulación pasivo, los agentes hidrosolubles quedan atrapados en la fase acuosa y los liposolubles en el interior de las bicapas lipídicas. Así, si el agente a encapsular es antipático, la porción hidrosoluble quedará expuesta en la fase acuosa y la parte liposoluble quedará atrapada en la fase lipídica [1, 3, 10].

En algunos casos el agente a encapsular puede llegar a interaccionar con los grupos polares de los fosfolípidos consiguiendo de este modo ser adsorbidos por los liposomas. Esto puede producirse por interacciones electrostáticas, si el agente a encapsular y los liposomas se encuentran cargados; o por interacciones de otro tipo entre grupos funcionales del agente y los liposomas por puentes de hidrógeno, enlaces de van der Waals o covalentes [10].

Por otra parte, en cuanto al método de encapsulación activo, el proceso de carga se produce al añadir a la muestra de liposomas "vacíos" ya formados una solución concentrada del agente a encapsular. Gracias a la permeabilidad de las bicapas de las vesículas, el agente puede penetrar a la fase acuosa o lipídica del liposoma por difusión. El grado de penetración del agente en caso de ser lipófilo dependerá de factores como el grado de empaquetamiento de la membrana, el cual depende de la formulación liposomal empleada. El inconveniente de este método es que requiere entre otras cosas que el agente se comporte como una base o ácido débil y que no se encuentre cargado para poder atravesar la membrana [2, 4].

De los dos métodos de encapsulación posibles, se ha elegido el de encapsulación pasiva.

#### 1.5. Eficiencia de encapsulación y carga útil

La eficiencia de encapsulación,  $EE(\%)$ , proporciona la cantidad del agente encapsulado y/o adsorbido a los liposomas en relación con el agente total empleado. Puede medirse de dos maneras: el método indirecto y el directo.

Generalmente se emplea el primer método dado que no requiere de un protocolo para romper los liposomas. Este método consiste en determinar la cantidad del agente inicial empleado y el no encapsulado (fármaco libre), la eficiencia siguiendo este método se puede calcular empleando,

$$EE_{\text{Ind}} (\%) = \frac{m_{\text{AT}} - m_{\text{NE}}}{m_{\text{AT}}} \cdot 100 \% \quad (1)$$

donde la cantidad del agente empleado es  $m_{\text{AT}}$  y la cantidad del agente no encapsulado es  $m_{\text{NE}}$ . La diferencia en la ecuación anterior da cuenta de la cantidad de agente que si ha sido encapsulado. Para calcular  $m_{\text{NE}}$  hace falta realizar una separación previa del agente libre de los liposomas.

Por otro lado, el método directo conlleva romper los liposomas para que se libere el colorante que contienen, de manera que se pueda medir esta cantidad de forma directa. La eficiencia de encapsulación siguiendo este método se puede estimar mediante,

$$EE_{\text{Dir}} (\%) = \frac{m_{\text{L}}}{m_{\text{AT}}} \cdot 100 \% \quad (2)$$

donde la cantidad del agente liberado es  $m_{\text{L}}$ . Este es el método que se ha empleado en este trabajo y para realizar la rotura de los liposomas se ha seguido el protocolo descrito en la Sec.2.7.

Por otro lado, la EE(%) puede ser un parámetro un poco engañoso dado que depende de la cantidad de fármaco empleado, ignorando por completo la cantidad de lípido inicial, por ello otro parámetro que suele emplearse es el de la carga útil, CU(%), el cual se puede estimar mediante,

$$CU(\%) = \frac{m_{\text{AE}}}{m_{\text{Lip}}} \cdot 100 \% \quad (3)$$

Este parámetro expresa la relación entre el fármaco o agente encapsulado,  $m_{\text{AE}}$ , y la cantidad de lípido empleado  $m_{\text{Lip}}$ . [2].

## 1.6. Moléculas encapsuladas

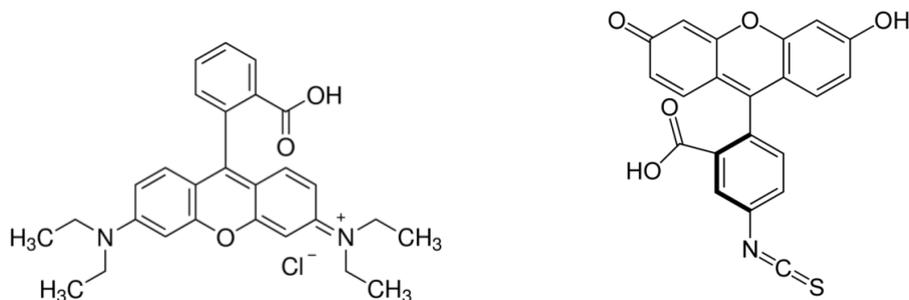
A modo de concepto y para evaluar su eficiencia se han encapsulado los colorantes: Rodamina B (Rho.B) y el 5-Isotiocianato de fluoresceína (FITC)<sup>3</sup>. Su elección ha venido condicionada por su fuerte emisión dentro del rango visible, su carácter lipófilo/hidrófilo y sus cargas.

Por un lado, se tiene la Rodamina B (Fig.6), es un compuesto que se suele emplear como colorante o trazador en fluidos para detectar direcciones en el flujo. Es de color verde muy oscuro con un máximo de absorción entre  $\lambda_{\text{Abs}} = 542 - 554$  nm. Tiene carácter hidrófilo, por lo que se esperaría encontrarlo en el interior del núcleo acuoso de los liposomas. Además, la Rodamina B por ser catiónico se podría esperar una mayor afinidad a adsorberse a los liposomas aniónicos, LN, que en los catiónicos, LC<sup>4</sup>, esto podría traducirse en una posible mayor eficiencia de encapsulación de la Rho.B en los LN que en los LC. Esta hipótesis se estudiará más adelante.

Por otra parte, el 5-Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Fig.6) es un colorante de color amarillo-naranja que presenta un máximo de absorción en  $\lambda_{\text{abs}} = 494$  nm y tras la excitación tiene una longitud de onda de emisión con máximo  $\lambda_{\text{Ems}} = 520$  nm, es decir emite con un color amarillo verdoso [11].

<sup>3</sup>A lo largo del trabajo se hará referencia a esos colorantes como Rho.B y FITC.

<sup>4</sup>A lo largo de este trabajo se denomina a los liposomas catiónicos por LC y a los aniónicos por LN.



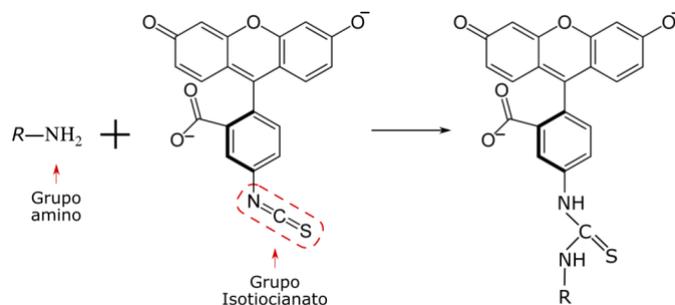
**Figura 6.** Molécula de Rodamina B, Rho.B(izq), y de 5-Isotiocianato de fluoresceína, FITC(der.).

El FITC es poco soluble en agua, con una solubilidad de  $S_{DW} = 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ ; por ello, los LC y LN que encapsulen FITC se hidratarán con una mezcla de agua y dimetilsulfóxido (DMSO) <sup>5</sup>, que aumenta su solubilidad.

Luego, debido a que el FITC se encontrará disuelto en una mezcla de agua y DMSO, es posible encontrarlo en el núcleo acuoso de los liposomas. Además, por su carácter lipófilo podría localizarse en el interior de las membranas de los liposomas; y por su carácter aniónico podría esperarse una mayor afinidad a la superficie de los LC.

Además, se sabe que el FITC es ampliamente utilizado para el marcaje de proteínas, donde se producen enlaces estables de isotiourea entre su grupo isotiocianato, con los grupos amino primarios de las proteínas. De acuerdo a la literatura éste es el único enlace estable posible de este marcador [11]. Esta reacción se muestra en la Fig.7.

En base a esto, la presencia de etanolamina en los liposomas catiónicos que se han empleado, podría reforzar la afinidad del FITC a adsorberse en especial en los LC.



**Figura 7.** Reacción entre un grupo amino con una molécula de 5-Isotiocianato de fluoresceína donde se forma un enlace de isotiourea.

## 1.7. Mecanismo de adsorción

Los fluoróforos además de poder ser encapsulados entre membrana y/o en el núcleo acuoso, pueden ser adsorbidos por los liposomas, fijándose en la interfaz bicapa lipídica-medio.

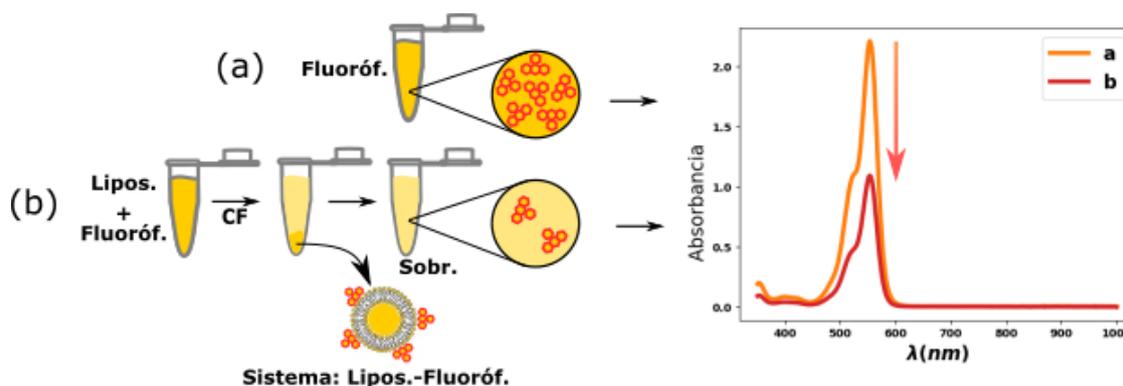
La adsorción llevaría a la formación de sistemas Liposoma-Fluoróforo, y así, bajo una concentración inicial de colorante conocido si estos sistemas se separasen del medio, estos

<sup>5</sup>El dimetilsulfóxido es una molécula antipática y uno de los disolventes que se suelen emplear cuando se trabaja con sustancias poco solubles en agua [12] como el FITC. La solubilidad del FITC en DMSO es:  $S_{DMSO} = 5 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

arrastrarían porciones de colorante, y en consecuencia se produciría una disminución en la concentración de colorante inicial, y con ello una disminución en la absorbancia del colorante sobrenadante. Así, en base a esto, empleando una muestra de liposomas con una concentración de colorante inicial conocida se podría estimar la cantidad de colorante adsorbido en los liposomas.

A través del esquema de la Fig.8 se presenta como se puede determinar si se ha producido adsorción. Se comenzó con dos muestras:

- (a) Disolución con una concentración de colorante conocida,  $[C_{\text{Fluoróf.}}]$ .
- (b) Muestra de liposomas con una concentración teórica igual del colorante (a).



**Figura 8.** Esquema experimental para estimar la cantidad de Rho.B/FITC adsorbido por los liposomas cargados.

Se mide la absorbancia de la muestra (a), obteniéndose por ejemplo el espectro **a**, de la Fig.8. La muestra (b) que contiene liposomas se centrifuga (CF) y se separa la parte sobrenadante del precipitado. Con esto se separa una porción de los posibles sistemas Liposoma-Fluoróforo. Se mide la absorbancia de la parte sobrenadante, obteniéndose por ejemplo el espectro **b**. La disminución en la concentración del colorante, presentada en la Fig.8(der.) como una disminución en la absorbancia, refleja un mecanismo de adsorción del colorante en la superficie externa de los liposomas.

## 2 Técnicas y desarrollo experimental

La caracterización de los liposomas sintetizados se realizó empleando técnicas de microscopía y de espectroscopía.

### 2.1. Técnicas de microscopía

Para realizar una caracterización de los liposomas, su distribución de tamaños, forma y grado de agregación se empleó la técnica de microscopía electrónica. Además, para comprobar la localización de los agentes encapsulados y el estado de los liposomas de gran tamaño tras la adición de colorante se utilizó la técnica de microscopía óptica.

La microscopía electrónica dado que emplea un haz de electrones presenta una resolución limitada por difracción, la cual es mucho menor que en el caso óptico. Por ende, puede proporcionar información significativa de liposomas de pequeño tamaño como son las pequeñas vesículas unilamelares (SUV) [13]. En este caso se requiere la preparación

de la muestra antes de su observación y para ello se utilizó la técnica de tinción negativa, descrita en la Sec.2.4.

El microscopio electrónico utilizado es de transmisión (TEM), el cual consiste en la aceleración de un haz de electrones que se enfocan, con una lente electromagnética sobre la muestra. Una parte mayoritaria del haz atraviesa la muestra y otra es dispersada, el haz que atraviesa la muestra es recogida por un sistema de detección para la formación de las imágenes [14].

El TEM empleado, modelo JEM1011 TEM-JOEL, que se muestra en la Fig.9 se encuentra optimizado para muestras biológicas y está equipado con una cámara digital Gatan de alta resolución. Los liposomas, teñidos negativamente con acetato de uranilo, se observaron con un voltaje acelerador de 75 kV.



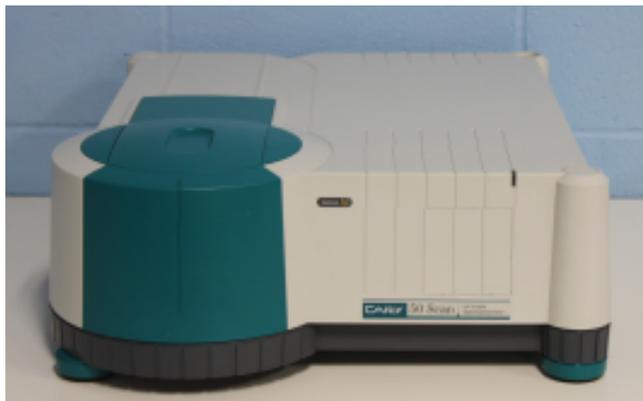
**Figura 9.** Microscopio electrónico de transmisión (TEM) JEOL del instituto de investigación Marqués de Valdecilla (IDIVAL).

Por otro lado, en este trabajo se utilizó un microscopio confocal, NIKON A1R espectral. Este microscopio elimina la luz fuera del plano focal, permitiendo obtener imágenes de los liposomas en diferentes planos con alta claridad y contraste. Obteniendo varias imágenes en diferentes planos se puede realizar una reconstrucción 3D de los liposomas. Además, en caso de disponer de liposomas multilamelares de gran tamaño permite obtener información sobre su estructura interna [14]. El principal inconveniente de este microscopio se encuentra en su resolución óptica de  $\approx 200$  nm definida por el límite de Abbe. En este caso, la observación de las muestras de liposomas no requirió ningún proceso de fijación como ocurre al emplear el TEM, y se han empleado  $200 \mu\text{L}$  de muestra.

## 2.2. Técnicas espectroscópicas

### 2.2.1. Espectroscopía de absorción UV-Vis

El espectrofotómetro que se ha utilizado es un Cary-50 Varian Inc. UV-Vis, mostrado en la Fig.10, que posee por fuente de luz una lámpara pulsada de Xenón. Es un instrumento de haz simple, por lo que antes de medir la muestra con liposomas se debe realizar una medida de la línea base donde se emplea la sustancia blanco, el solvente, para al final solo tener la contribución de los liposomas y/o el colorante. En las medidas realizadas las sustancias blanco han sido: agua destilada, una mezcla de agua destilada con DMSO (al 10 %) y metanol.



**Figura 10.** Espectrofotómetro Cary-50 Varian Inc. empleado durante el proceso de lavado de los liposomas.

Todas las muestras se han medido empleando una cubeta de cuarzo, transparente en el rango ultravioleta (UV), visible (V), y el infrarrojo cercano; de longitud  $l = 1$  cm y paso de 3 mm. El espectrofotómetro mide la intensidad de la luz transmitida a través de la sustancia de referencia (blanco),  $I_0$ , y la intensidad que atraviesa la muestra,  $I$ , en función de la longitud de onda, y con ello proporciona los espectros de absorción de las muestras. La absorbancia,  $A(\lambda)$ , se define como:

$$A(\lambda) = \log_{10} \left[ \frac{I_0(\lambda)}{I(\lambda)} \right]$$

La luz que penetra en la muestra puede sufrir absorción, transmisión y *scattering*. Y cuando la muestra contiene partículas pequeñas, de tamaño inferior a la longitud de onda de la luz empleada, la luz entrante sufre *scattering* Rayleigh e influye en los espectros de absorción obtenidos, dado que la luz desviada no alcanza el detector del espectrofotómetro y se interpreta como luz absorbida. El fenómeno de dispersión en los espectros de absorción fue utilizado en este trabajo como indicador de la presencia de liposomas en las muestras.

## 2.3. Liposomas y protocolo de síntesis

Los liposomas que se han sintetizado han sido adquiridos a la compañía NANOVEX Biotechnologies. Esta empresa proporciona los constituyentes lipídicos liofilizados, a falta únicamente de realizar la última parte del método de preparación descrito en la Sec.1.3.

Así, se ha trabajado con dos tipos de formulaciones que NANOVEX denomina Lipo-N y Lipo-Cat, haciendo con ello referencia a la carga superficial, aniónica y catiónica

respectivamente, que poseen los liposomas tras ser sintetizados. Aunque, no se dispone de una información completa de la proporción y la composición lipídica de las formulaciones empleadas, se sabe que estas contienen: colesterol y fosfatidilcolina, diferenciándose en que los Lipo-Cat poseen además etanolamina, que como se mencionó anteriormente, se encuentra unida a los grupos fosfato de los fosfolípidos mediante un enlace fosfodiéster, esta amina será la principal encargada de dotar la carga positiva a los Lipo-Cat. Por otro lado, la carga negativa de los liposomas aniónicos se encuentra en la cabeza polar de los fosfolípidos, y a pesar de que la fosfatidilcolina de los Lipo-N sea catiónica, su concentración es tal que la carga superficial de los LN será ligeramente aniónica. A lo largo de este trabajo se denota a los liposomas catiónicos como LC y a los aniónicos como LN<sup>6</sup>.

Para la formación de los liposomas, sean LC o LN, se ha empleado el mismo proceso de síntesis:

Se tomó una cantidad de los lípidos liofilizados, correspondientes al tipo de liposoma que se deseó sintetizar, y se introdujo en un vial<sup>7</sup>, como los que se observan en la Fig.11(izq.). A continuación, estos preparados se hidrataron con agua destilada o una mezcla de agua destilada más DMSO (al 10%), la elección se indicará en la Sec.3. La razón de por qué emplear un líquido u otro se describirá en la Sec.2.5.

El proveedor recomienda que por cada 50 mg de lípidos liofilizados se utilicen como máximo 1 mL de líquido. Esta proporción 50/1 es la que ha sido elegida en este trabajo y se ha mantenido en todas las síntesis realizadas. Toda la caracterización se ha hecho en base a esta proporción.



**Figura 11.** (izq.) Viales empleados en la síntesis de liposomas. (Der.) Horno de hibridación donde se colocaron los viales (flecha negra) para que estos giren con las aspas del horno (flechas rojas) y así se agiten los preparados y se sintetizen los liposomas.

Los viales, con la mezcla lípido-medio, se introducen en un horno de hibridación (Hybaid), mostrado en la Fig.11, a 50 °C durante un tiempo de  $t = 20$  mín. Estos dos parámetros: temperatura y tiempo, son indicados por el proveedor. Esta temperatura es necesaria para que los componentes liofilizados hidratados se desestabilicen, y este efecto sumado a la rotación que experimentan las muestras, permiten que se vayan formando las capas de los liposomas y a su vez el agua destilada se introduzca en ellas. La velocidad de rotación de las muestras se ha estimado en 3,3 rpm.

<sup>6</sup>Información proporcionada por el fabricante.

<sup>7</sup>Se ha creído conveniente emplear estos viales para evitar posibles contaminaciones por microorganismos.

Posteriormente, se suministra energía a los preparados empleando un vortex o agitador; más, en unos casos, sonicación en baño, y en otros, sonicación en punta.

El vortex empleado es de marca Heidolph Reax 2000 con un regulador de velocidades de 0 a 9. No hay disponible información sobre estas velocidades expresadas en rpm. El sonicador en baño utilizado es de la compañía Grant Instruments<sup>TM</sup> XUBA1 Analog Ultrasonic Bath, que mantiene una frecuencia de trabajo constante de  $\nu_{SB} = 44$  kHz. Y el sonicador en punta es de la compañía Sonics & Materials de modelo Vibra-Cell VCX 130 PB, con una potencia de salida de 130 W y frecuencia de trabajo de 20 kHz. Este instrumento permite seleccionar el periodo y el tiempo de sonicación, así como la amplitud en tanto por ciento de la potencia de salida.

Por último, las muestras deben ser guardadas durante 12 h mínimo, a una temperatura de 4 °C para que terminen de formarse los liposomas. Estos parámetros también han sido proporcionados por NANOEX.

## 2.4. Tinción de los liposomas

Las estructuras biológicas, como los liposomas, presentan bajo poder de dispersión de electrones. Por ello, para mejorar su contraste, al ser observados empleando un microscopio electrónico, se tiñen negativamente [15].

La tinción negativa consiste en recubrir la muestra con una capa de sales de metales pesados, los cuales pueden ser catiónicos o aniónicos. Dentro del grupo de los catiónicos se encuentra el acetato de uranilo, ampliamente usado para la tinción de muestras biológicas [15], y es la que se empleó para la tinción de los liposomas.

Previo al inicio de la tinción negativa, sobre los liposomas sintetizados que se observarán al TEM, se aplica unos segundos de vortex para dispersarlos y se diluyen 100  $\mu$ L de liposomas en 900  $\mu$ L de agua destilada, seguido de vortex para homogeneizar, se obtiene así la solución de liposomas que se teñirán.

El protocolo de tinción negativa empleado se desarrolla en tres etapas: Fijación de la muestra, adición de la sal y lavado. Así, en la primera etapa se colocó sobre la rejilla 3  $\mu$ L la solución de liposomas anterior, se esperó 1 mín para que estos se fijen a la rejilla. A continuación, se sujetó la rejilla con una pinza y empleando un papel de filtro, desde el borde de la gota, se retiraron los excesos con gran cuidado de solo retirar una fracción muy pequeña de la muestra con liposomas. En la segunda etapa, se colocó sobre la muestra 3  $\mu$ L de acetato de uranilo (al 2% de agua), y 1 mín después se retiró nuevamente los excesos. Por último, en la tercera etapa, sujetando con una pinza la rejilla, esta se puso sobre una gota de agua desionizada de manera que la superficie de la rejilla que contiene la muestra y uranilo entre en contacto con el agua desionizada, 1 mín después se retiraron los excesos, y este proceso de lavado se realizó dos veces más.

## 2.5. Adsorción y encapsulación en los liposomas

Para realizar las pruebas de encapsulación y adsorción se emplearon dos colorantes fluorescentes, el 5-Isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la Rodamina B (Rho.B). Ambos marcadores fluorescentes han sido adquiridos a la empresa Sigma-Aldrich. La elección de éstos ha venido condicionada por su fluorescencia dentro del rango visible y por su carácter aniónico y catiónico. En base a estas propiedades son múltiples las posibilidades de encapsulación y/o adsorción de estos a los liposomas.

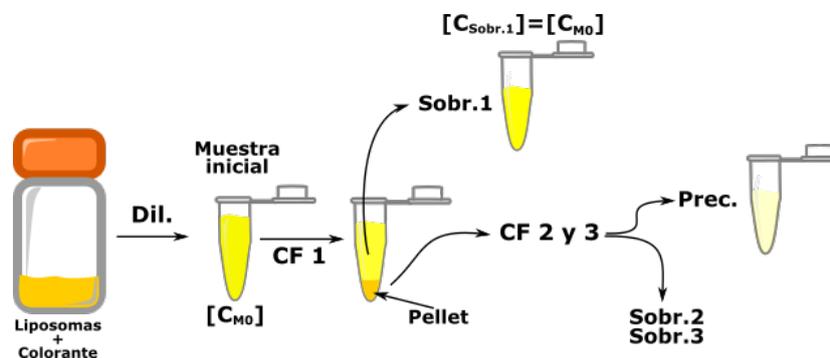
El protocolo de encapsulación/adsorción de liposomas fue el mismo que el de síntesis descrito en la Sec.2.3. La diferencia se encuentra en la mezcla usada para la hidratación

de los lípidos. Así, en la síntesis de liposomas con Rodamina B (Rho.B) se empleó una disolución de  $m = 1$  mg de Rho.B disuelto en  $V = 1$  mL de agua destilada. En cambio, para sintetizar liposomas con 5-Isotiocianato de fluoresceína (FITC) antes se preparó una disolución de  $m = 5$  mg de FITC en  $V = 1$  mL de DMSO puro, de la cual se extrajo  $V = 100 \mu\text{L}$ . Este volumen se mezcló con  $V = 900 \mu\text{L}$  de agua destilada para formar la disolución que finalmente se empleó en el proceso de síntesis. Y en cuanto a la cantidad de lípido empleado para realizar las pruebas de encapsulación es siempre de  $m = 50$  mg, respetando en todo momento la proporción lípido/medio de 50/1.

Estas concentraciones de Rho.B y FITC se han elegido tras realizar ensayos previos donde se emplearon concentraciones de colorante mayores. Con ello se pudo estimar que cantidad de colorante era suficiente para: i) garantizar que no se produjeran saturaciones en los espectros de absorción, y ii) permitir que el proceso de lavado sea lo más efectivo posible, es decir, que no quedasen altos excedentes de colorante en el exterior de los liposomas y fuese necesario hacer varios centrifugados adicionales que conlleven pérdidas de lípidos.

## 2.6. Lavado de liposomas

Dependiendo de la efectividad de la encapsulación se dispondrá de una cantidad mayor o menor de excedente de colorante, aquel que no se ha logrado encapsular. Así, para separar este colorante sobrante del encapsulado o adsorbido se realiza un lavado de los liposomas. Este proceso, que se encuentra esquematizado en la Fig.12, es necesario para poder determinar cuan eficiente es la encapsulación de los liposomas.



**Figura 12.** Esquema del proceso de lavado de los liposomas con colorante. La muestra de liposomas con colorante se diluye (*Dil.*) para tener la muestra inicial. Esta se centrifuga (*CF*) 3 veces en el eppendorf obteniendo un pellet o precipitado (*Prec.*) y 3 partes sobrenadantes: *Sobr.1*, *Sobr.2* y *Sobr.3*.

Así pues, en este trabajo una vez realizada la síntesis de liposomas con Rho.B o FITC siguiendo el protocolo de la Sec.2.5, se obtuvo en primer lugar la disolución inicial que se empleó en el proceso de lavado, que se utilizó para estimar la eficiencia de encapsulación y la carga útil. Esta disolución inicial se denota por:  $M_0:LC$  o  $M_0:LN$  según corresponda a liposomas catiónicos o aniónicos, respectivamente.

Para esto, se diluyó (*Dil.*)  $V_{\text{Lípid.-Color.}} = 200 \mu\text{L}$  de síntesis en  $V_{\text{medio}} = 900 \mu\text{L}$  de agua desionizada o una mezcla de agua desionizada con DMSO (al 10%), en función del tipo de muestra, liposomas con Rho.B o FITC, respectivamente.

Esta muestra inicial, se centrifugó durante  $t_{CF} = 15$  mín a una velocidad angular de  $\omega = 14\,800$  rpm. Luego, se observó un precipitado o pellet en el eppendorf, como el que se presenta en la Fig.12. Se debe intentar retirar el máximo volumen posible de la parte

sobrenadante evitando arrastrar el pellet, este volumen es del orden de  $\approx 900 \mu\text{L}$ . Esta primera parte sobrenadante, que se ha denotado por *Sobr.1*, se guardó en otro eppendorf. De esto, en teoría la parte *Sobr.1* tendría que tener la misma concentración que en  $M_0:LC$  o  $M_0:LN$  según sea el caso.

El precipitado o pellet se dispersó para homogeneizar en agua destilada si el colorante utilizado es Rho.B; y en caso de ser FITC se empleó una mezcla de agua y DMSO al 5%. La muestra resultante se centrifugó dos veces más manteniendo  $\omega$  y  $t_{CF}$ . Se obtuvieron de este modo dos partes sobrenadantes adicionales *Sobr.2* y *Sobr.3*, y los sucesivos precipitados se homogeneizaron en agua destilada, tanto si se tiene Rho.B o FITC.

El tiempo y velocidad de centrifugado se eligieron después de realizar algunas pruebas previas con síntesis de liposomas con colorante.

## 2.7. Rotura de liposomas y medida de la eficiencia de encapsulación directa

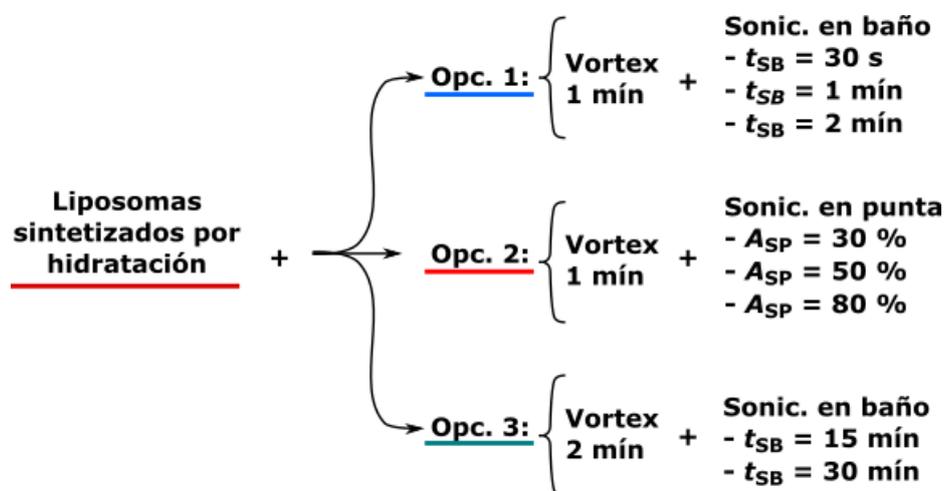
Para medir la eficiencia de encapsulación de manera directa, el precipitado resultante del proceso de lavado, *Prec.*, se centrifugó una vez más y al pellet resultante que contiene liposomas con colorante encapsulado y/o adsorbido, se le añadió  $V = 1 \text{ mL}$  de metanol para romper los liposomas. Se tuvo que aplicar sonicación en baño durante unos segundos para que finalmente no se observen restos de lípidos en la muestra final.

La cantidad de colorante encapsulado y liberado al romper los liposomas se ha medido a partir del espectro de absorción de la muestra con metanol y la curva de calibración correspondiente. Estas curvas de calibrado se presentan en el Apéndice.5.3.

## 3 Resultados

### 3.1. Microscopía electrónica

Se ha realizado un estudio de la forma, tamaño y agregación en función de la técnica de dispersión empleada bajo diferentes parámetros. Con esto se ha buscado encontrar el camino de síntesis de liposomas más adecuado, el cual permitiera controlar la distribución de tamaños.



**Figura 13.** Esquema donde se detallan los parámetros de tiempo ( $t$ ) y amplitud de sonicación ( $A$ ) elegidas para cada opción (*Opc.*) o ruta de síntesis.

Inicialmente se realizó unas síntesis de prueba suministrando energía únicamente con vortex para diferentes tiempos:  $t = 30$  s,  $t = 2$  mín y  $t = 5$  mín. En base a los resultados que se han obtenido, y que se describirán más adelante, se decidió aplicar vortex seguido de sonicación.

Así, se ha decidido explorar tres opciones o rutas de síntesis para regular el tamaño de los liposomas formados por hidratación, que en general son liposomas de gran tamaño: GUV o MLV. Así, en cada opción de síntesis se ha aplicado vortex seguido de sonicación en baño o en punta variando algún parámetro.

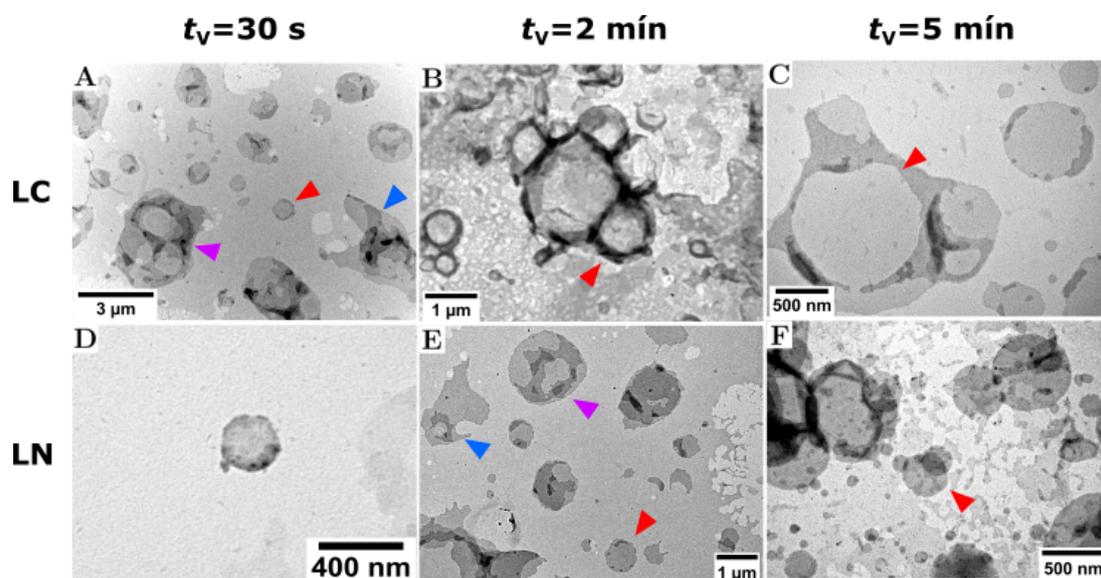
En la Fig.13 se presenta a modo de esquema estas 3 opciones de síntesis con los parámetros que se han elegido de tiempo o de amplitud de sonicación, la cual está expresada en tanto por ciento respecto de la potencia de salida del sonicador, 130 W.

En todas las síntesis la frecuencia de trabajo de la sonicación en baño es constante con un valor de 20 kHz. Asimismo, la velocidad de agitación fijada al aplicar vortex es de 7 en todos los casos<sup>8</sup>.

A continuación, se muestran y analizan los resultados obtenidos en la síntesis de prueba y en cada una de las tres vías de síntesis elegidas.

### 3.1.1. Síntesis de prueba

Se sintetizaron 3 muestras de liposomas aniónicos, *LN*, y otras 3 de liposomas catiónicos, *LC*, siguiendo el protocolo de síntesis, descrito en la Sec.2.3. Después de la hidratación, se aplicaron tiempos de vortex de:  $t_V = 30$  s, 2 mín y 5 mín, a cada tipo de liposoma.



**Figura 14.** Imágenes TEM de liposomas catiónicos (LC) y aniónicos (LN), bajo tinción negativa, para tres tiempos de vortex ( $t_V$ ). Algunos liposomas se señalan con flechas rojas y las formaciones de grasa se indican con una flecha azul. La barra horizontal se corresponde con la escala de cada imagen.

En la Fig.14 se muestran algunas imágenes TEM obtenidas en esta síntesis de prueba. Se ha encontrado tanto para los LC como los LN, independientemente del tiempo de vortex aplicado, un rango muy amplio de tamaños, aunque en general se observaron

<sup>8</sup>Como se ha mencionado en la Sec.2.3 no hay información disponible de la equivalencia del factor 7 en rpm.

liposomas grandes, de tamaños entre 300 nm – 1,0  $\mu\text{m}$ ; incluso se observaron liposomas gigantes, de 1,3  $\mu\text{m}$  de diámetro.

En la Fig.14.A se señala a modo de ejemplo, en rojo, un liposoma grande de 860 nm de diámetro medio; y en la Fig.14.C un liposoma gigante de 1,2  $\mu\text{m}$  de diámetro. La presencia de estos liposomas de gran tamaño sugiere que los tiempos de vortex empleados no han sido efectivos para reducir el tamaño de los liposomas.

Además, se encontraron lo que parecen agregaciones liposomales en algunos casos, como se señalan en la Fig.14.A y E con flecha purpura. Los agregados sugieren que los liposomas no se han terminado de formar como entidades independientes empleando únicamente vortex.

Todo lo anterior indica que, aunque se logren observar liposomas formados, los tiempos de vortex empleados no son suficientes como para generar poblaciones controladas con bajas dispersiones de tamaños. Por esta razón, se decidió emplear sonicación además de vortex, que es lo que comúnmente se emplea.

### 3.1.2. Opc. 1: Sonicación en baño (Tiempos cortos de sonicación)

Para explorar la primera ruta u opción de síntesis se han preparado 2 series de 4 muestras siguiendo el protocolo descrito en la Sec.2.3 empleando exclusivamente agua desionizada para hidratar los lípidos. Una serie de LC y otra de LN a las que se les aplicó  $t_V = 1$  mín de vortex a todas las muestras, seguido de diferentes tiempos de sonicación en baño a cada muestra de cada serie. Los tiempos de sonicación, son:  $t_{SB} = 30$  s, 1 mín, 2 mín y 5 mín.

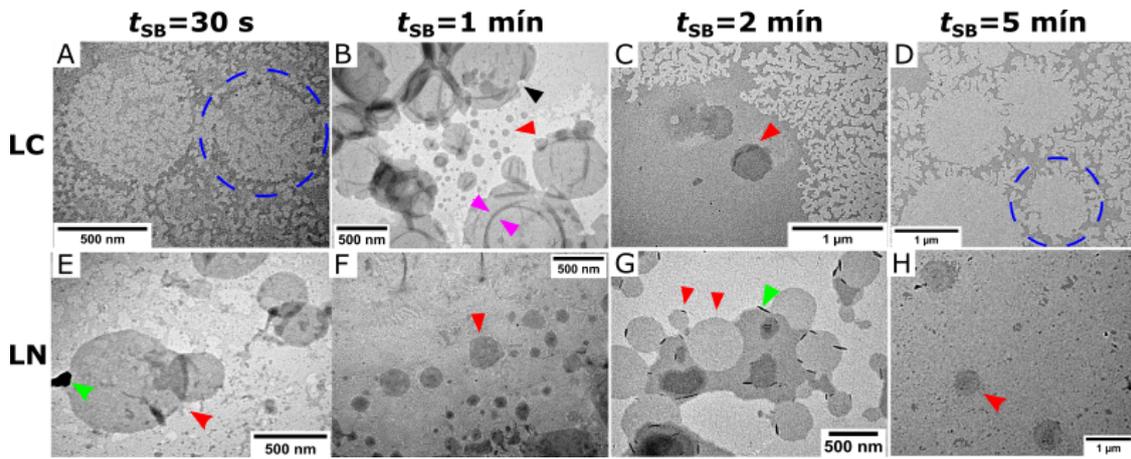
Algunas imágenes TEM obtenidas para estas síntesis se presentan en la Fig.15. En algunos casos, como se señala en azul, se observaron estructuras circulares que resultaría muy aventurado afirmar que son liposomas. Estas estructuras se observaron en los LC de  $t_{SB} = 30$  s y 5 mín. Esto puede sugerir que se encuentren mal teñidos o tal vez el proceso de formación empleado no da lugar a un correcto desarrollo de los liposomas.

Otro caso en el que se observaron estas estructuras fue en los LC con  $t_{SB} = 2$  mín. Sin embargo, a diferencia de los casos anteriores, si se llegó a observar algún liposoma, como el mostrado en la Fig.15C.

Finalmente, Para descartar algún posible error puntual en la observación de los LC con tiempos de sonicación de  $t_{SB} = 30$  s y 2 mín, se repitieron las observaciones al TEM, pero se continuaron observando las mismas estructuras y ningún liposoma.

En los LC con  $t_{SB} = 1$  mín de sonicación en baño, como se muestra en la Fig.15B, se encontraron franjas sobre algunos liposomas. Estas franjas, señaladas con flechas rosas, aunque sean similares a estructuras lamelares de los liposomas, en realidad no lo son porque el microscopio electrónico empleado no tiene la resolución suficiente como para resolverlas. Estas estructuras, como indican algunos autores [13], podrían generarse en el proceso de tinción negativa, el cual puede causar algunos cambios estructurales en los liposomas y generar las franjas observadas. También, se observaron que algunos liposomas presentaban posibles roturas como las que se indica con una flecha negra, posiblemente también por el proceso de tinción. Estos rasgos se presentan solo en algunos casos ya que en general en esta muestra de LC se lograron observar un gran número de liposomas bien definidas formando agregados y aislados.

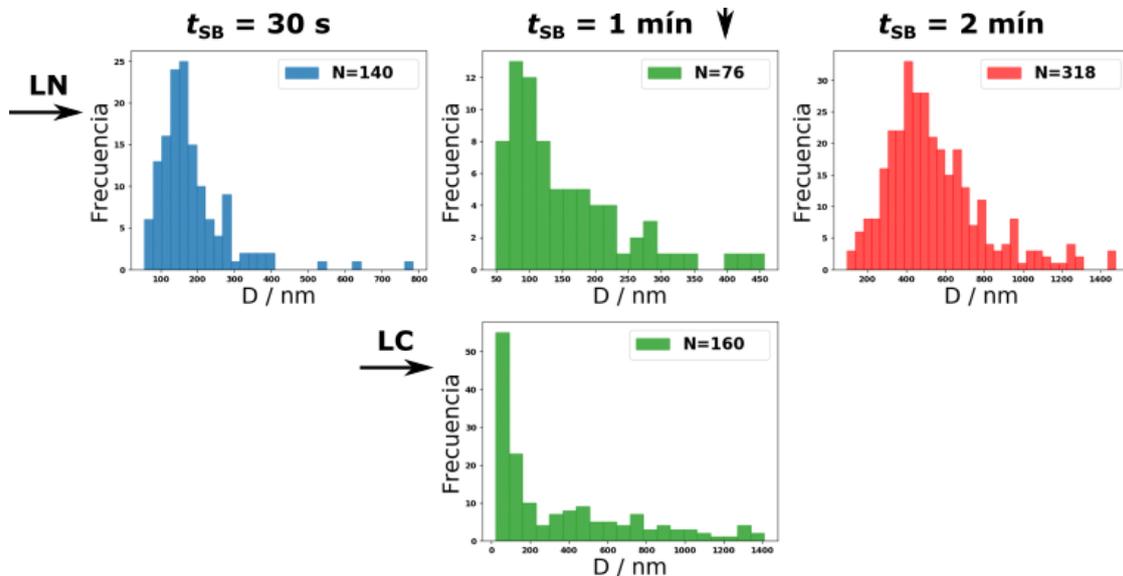
Por otra parte, en los LN con tiempos de sonicación en baño de  $t_{SB} = 30$  s, 1 mín y 2 mín sí se encontraron liposomas, aunque es en esta última muestra donde se llegaron a observar un gran número de liposomas bien definidos y en algunos casos rodeados de restos de grasa como puede observarse en la Fig.15G.



**Figura 15.** Imágenes TEM de liposomas catiónicos (LC) y aniónicos, (LN), bajo tinción negativa, para los tiempos de sonicación en baño ( $t_{SB}$ ) que se indican en la parte superior de las imágenes. Algunos liposomas se señalan en rojo, los restos de uranilo en verde y algunas alteraciones estructurales en negro y rosa. Se han encerrado en azul algunas estructuras similares a liposomas.

En algunas imágenes logran observarse restos del acetato de uranilo empleados en la tinción negativa. Estas se presentan como manchas negras muy intensas debido a su alta densidad de electrones.

A partir de todas las imágenes TEM tomadas, se han obtenido las distribuciones de tamaño de aquellas muestras en las que se encontraron un número significativo de liposomas. Para esto se empleó el programa ImageJ con el que se realizó un ajuste de los liposomas a elipses, a partir del promedio de los ejes mayor y menor se obtuvieron los diámetros de los liposomas. Todo el proceso realizado se encuentra descrito en el Apéndice.5.1.



**Figura 16.** Distribución de diámetros de los LC y LN sintetizados siguiendo la opción 1 de síntesis, donde se emplean tiempos pequeños de sonicación en baño. La población de liposomas utilizado para obtener el histograma es N. La barra horizontal se corresponde con la escala de cada imagen.

Los histogramas de tamaño se muestran en la Fig.16 y se representan en términos del

diámetro de los liposomas. Los diámetros promedios de cada población de liposomas se han registrado en la Tabla.1.

En los LN, como se muestra en la Fig.16, conforme aumenta  $t_{SB}$ , se produce un aumento en la dispersión de tamaños, contrario a lo que en principio podría esperarse. Además, el diámetro promedio, observado en la Tabla.1 disminuye y luego aumenta, no indicando ninguna posible tendencia que sugiera que la distribución de tamaños en los LN se podría controlar empleando tiempos más altos de sonicación<sup>9</sup>.

**Tabla 1:** Diámetros medios,  $\bar{D}$ , de las poblaciones de LC y LN que fueron sintetizados siguiendo la opción de síntesis 1 (Opc. 1), donde se aplican tiempos de sonicación en baño ( $t_{SB}$ ) pequeños.

Opc. 1	$t_{SB}$	$\bar{D}/nm$
	30 s	$183 \pm 100$
LN	1 mín	$152 \pm 91$
	2 mín	$542 \pm 248$
LC	1 mín	$360 \pm 370$

En el caso de la única muestra de LC en la que se encontraron un gran número de liposomas, la dispersión de tamaños es muy amplia, como se aprecia en la Fig.16, esto causa que el error en su diametro promedio sea mayor que la media como se registra en la Tabla.1. Sin embargo, cerca del 51 % de los liposomas tienen tamaños inferiores a los  $D = 200$  nm, el resto se encuentran distribuidos entre  $D = 200$  nm y  $1,4 \mu m$ . Como se verá, en la tercera opción de síntesis, Sec.3.1.4, es necesario un tiempo de sonicación en baño mayor para controlar la distribución de tamaños de los LC.

Se seleccionaron las síntesis en las que se encontraron un número alto de liposomas, como son: los LN y LC con  $t_{SB} = 2$  y 1 mín, respectivamente; con el fin de reducir sus dispersiones de tamaño. Para esto se emplearon filtros con tamaño de poro de diámetro  $d = 200$  nm. Sin embargo, no fue posible por la obstrucción de los poros.

A diferencia de la síntesis de prueba donde solo se aplicó únicamente vortex, Sec.3.1.1; en este caso, donde se empleó vortex y sonicación en baño, se encontraron en algunas muestras liposomas mejor definidos, menor cantidad de restos de grasa y un mayor número de ellos. Sin embargo, aún bajo esta vía las distribuciones de tamaño continúan siendo amplias.

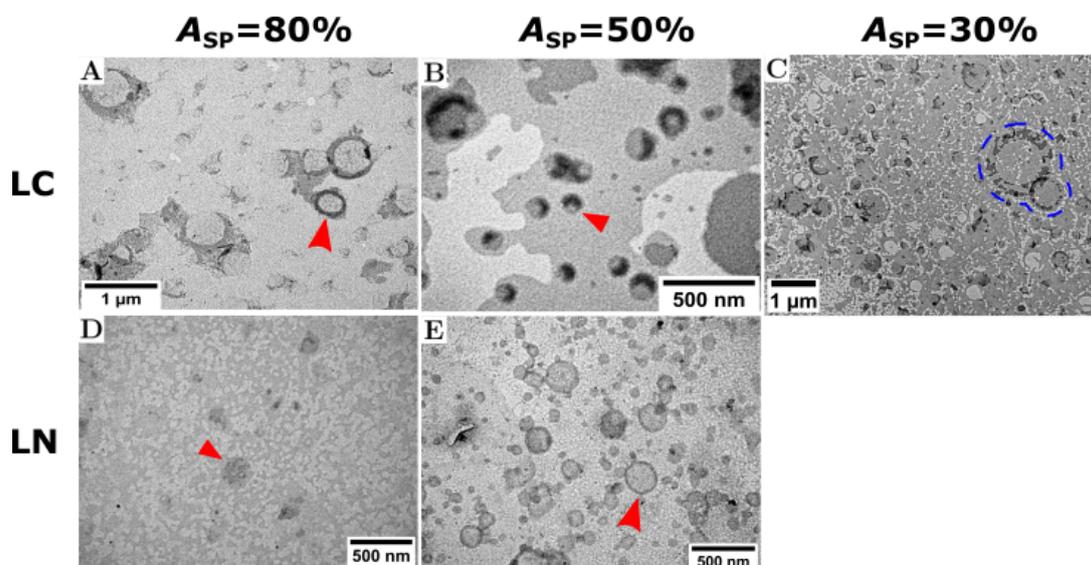
### 3.1.3. Opc. 2: Sonicación en punta

La segunda ruta de síntesis que se ha desarrollado consistió en suministrar vortex, durante  $t_V = 1$  mín, y luego sonicación en punta con diferentes amplitudes manteniendo el tiempo de cada pulso y el periodo de sonicación en  $T_{SP} = 3$  s. Para esto, empleando exclusivamente agua desionizada en la hidratación de lípidos, se sintetizaran 3 muestras de LC y otras 3 de LN, a los cuales se aplicaron diferentes amplitudes de sonicación en punta:  $A_{SP} = 30 \%$ ,  $50 \%$  y  $80 \%$ .

En la Fig.17 se muestran algunas imágenes TEM de las síntesis realizadas.

En cuanto a los LC, se encontraron pocos liposomas, algunos con tamaños comprendidos entre  $D = 40$  y  $700$  nm cuando se emplearon las amplitudes  $A_{SP} = 50 \%$  y  $80 \%$ ; encontrándose los liposomas más pequeños cuando  $A_{SP} = 30 \%$ .

<sup>9</sup>Las incertidumbres en los diámetros de la Tabla.1 tienen más de una cifra significativa porque se ha tenido en cuenta el error en su desviación estándar.



**Figura 17.** Imágenes TEM de liposomas catiónicos (LC) y aniónicos (LN), bajo tinción negativa, para tres amplitudes diferentes de sonicación en punta. Las flechas rojas señalan algunos liposomas y se ha encerrado en azul un par de estructuras similares a liposomas.

Además, en los LC para una  $A_{SP} = 30\%$ , se observaron también pocos liposomas y formaciones como las que se indica en azul en la Fig.17C que podrían ser liposomas ocultados por grasa.

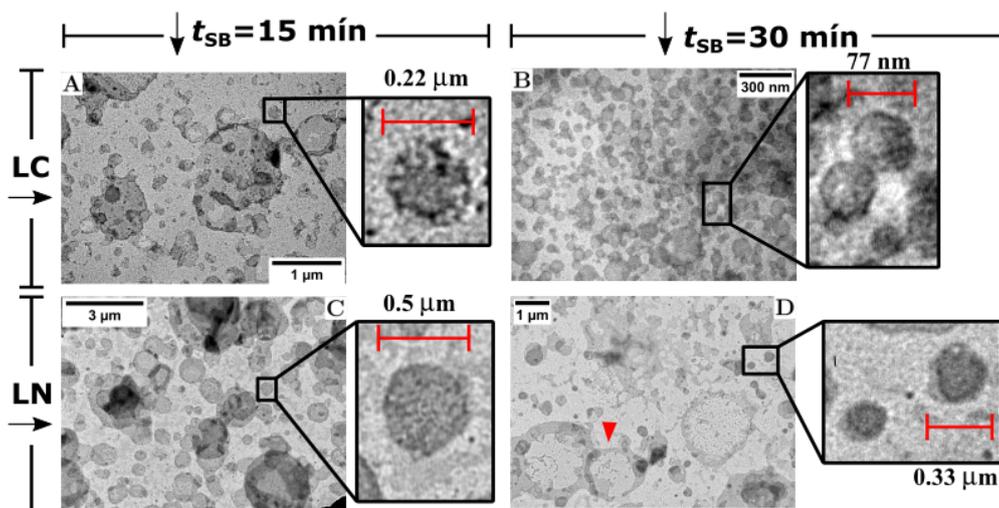
Por otra parte, en cuanto a los LN, para una amplitud  $A_{SP} = 80\%$  al igual que ocurre en los LC el número de liposomas encontrados es muy pequeño. Sin embargo, se encontró un número algo mayor de LN, alrededor de 76, bajo una amplitud de sonicación  $A_{SP} = 50\%$  de tamaños muy pequeños, como se muestra en la Fig.17E, en general por debajo de 90 nm.

Por último, no se encontraron LN sintetizados bajo una amplitud  $A_{SP} = 30\%$ , se encontraron solo porciones amplias de grasa como ocurre con los LC a la misma amplitud.

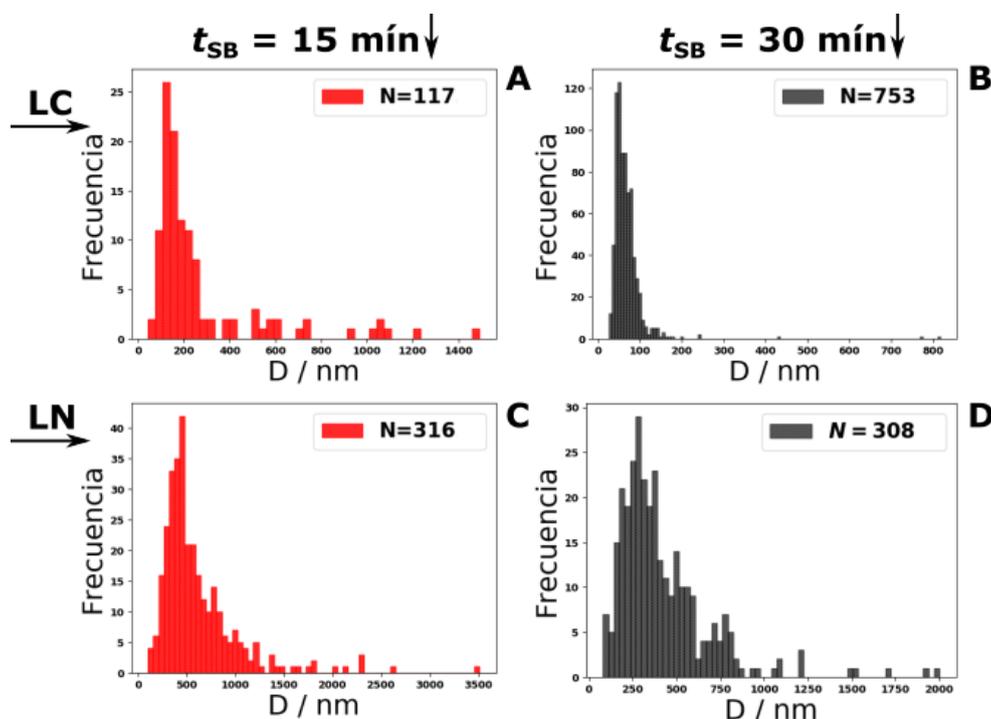
### 3.1.4. Opc. 3: Sonicación en baño (Tiempos largos de sonicación)

Para explorar la tercera ruta u opción de síntesis que se ha seguido se sintetizaron 2 muestras de LN y otras 2 de LC. A todas se aplicó vortex durante  $t_V = 2$  mín. Luego, sonicación en baño durante  $t_{SB} = 15$  mín a un par LN y LC; y a las otras dos muestras restantes se aplicó  $t_{SB} = 30$  mín. Nuevamente, en este caso se ha empleado agua desionizada en la hidratación de los lípidos.

Las imágenes TEM obtenidas se muestran en la Fig.18. En todos los casos se observaron un gran número de liposomas con su característica forma esférica. Además, se observaron agregados y se encontraron menores cantidades de grasa que en las opciones de síntesis anteriores.



**Figura 18.** Imágenes TEM de los liposomas catiónicos (LC) y aniónicos (LN) teñidos negativamente. Estos fueron sintetizados siguiendo la opción de síntesis 3 donde se emplearon los tiempos de sonicación en baño ( $t_{SB}$ ) que se indican en la parte superior de las imágenes.



**Figura 19.** Histogramas de la distribución de tamaños para las poblaciones de liposomas catiónicos (LC) y aniónicos (LN) encontrados siguiendo la opción de síntesis 3. N es la población de liposomas utilizado para obtener el histograma.

En cuanto a la distribución de tamaños, estas se presentan en la Fig.19, y los tamaños promedio de estas poblaciones se han registrado en la Tabla.2.

Como se observa, en el caso de los LC la distribución de tamaños se hace marcadamente más estrecha y el tamaño promedio disminuye a medida que aumenta el tiempo de sonicación en baño. Es notable el efecto que produce la sonicación en baño prolongada en la distribución de tamaños, claramente los LC grandes disminuyen de tamaño de forma significativa al pasar de  $t_{SB}=15$  a 30 min. Además, en especial con  $t_{SB} = 30$  min el

número de LC encontrados es muy superior al obtenido en las otras opciones de síntesis realizadas.

Al comparar estos resultados con los obtenidos en la opción de síntesis 1, Sec.3.1.2 para los LC, los tiempos de sonicación más prolongados eran necesarios para poder reducir las distribuciones de tamaños y producir una gran número de liposomas.

Por otro lado, en los LN el rango de tamaños también disminuye de  $D \approx 100 - 1,3 \mu\text{m}$  hasta  $D \approx 80 - 890 \text{ nm}$  al aumentar de  $t_{\text{SB}} = 15$  a  $30 \text{ mín.}$  De igual manera, el tamaño promedio también disminuye, como se observa en la Tabla.2. Sin embargo, de esto no se puede deducir que utilizando  $t_{\text{SB}}$  mayores se lograría reducir aún más el tamaño promedio en los LN, dado que, como se observó en la Sec.3.1.2, el tamaño promedio disminuía y aumentaba.

Está claro que siguiendo un idéntico proceso de síntesis el comportamiento de los LC y los LN es notablemente diferente.

**Tabla 2:** Diámetros medios,  $D$ , de las poblaciones de liposomas catiónicos (LC) y aniónicos (LN) que se han obtenido siguiendo la opción de síntesis 3 (Opc. 3), donde se aplican los tiempos de sonicación en baño ( $t_{\text{SB}}$ ) indicados.

Opc. 3	$t_{\text{SB}}/\text{mín}$	$D/\text{nm}$
LC	15	$270 \pm 263$
	30	$67,4 \pm 47,0$
LN	15	$609 \pm 415$
	30	$419 \pm 272$

### 3.1.5. Opciones de síntesis elegidas para la encapsulación

Se ha descartado completamente la opción 2 de síntesis, donde se empleaba el sonicador en punta, dado que en todos los casos bajo los diferentes parámetros de amplitud fijados no se ha conseguido obtener un número significativo de liposomas a partir del cual poder inferir el efecto de la sonicación en el tamaño. Además, los grandes restos de grasa que se han encontrado, especialmente en esta opción de síntesis, podrían sugerir que los liposomas son dañados por el sonicador.

Por otro lado, se ha decidido elegir la opción de síntesis 3 para realizar la encapsulación, de esta opción concretamente los LC y LN con  $t_{\text{SB}} = 30 \text{ mín.}$ , ya que en ambos casos se encontró un alto número de liposomas y una baja dispersión de tamaños.

Además, con el fin de realizar una comparación entre las eficiencias de encapsulación se ha decidido elegir la opción de síntesis 1. Concretamente de esta ruta se han elegido los LN y LC con  $t_{\text{SB}} = 2$  y  $1 \text{ mín.}$ , respectivamente, porque en estos casos se encontraron un número alto de liposomas y porque ambas presentan altas distribuciones de tamaños.

Estas elecciones realizadas permitirán observar que opción de síntesis presenta una mayor eficiencia de encapsulación, aquella en la que hay una mayor o menor dispersión de tamaños. Además, se estimó la capacidad de carga a través de la relación lípido empleado/colorante encapsulado, con el fin de saber que colorante es más eficiente, uno lipófilo o hidrófilo, y sobre qué tipo de liposoma presenta una mayor afinidad.

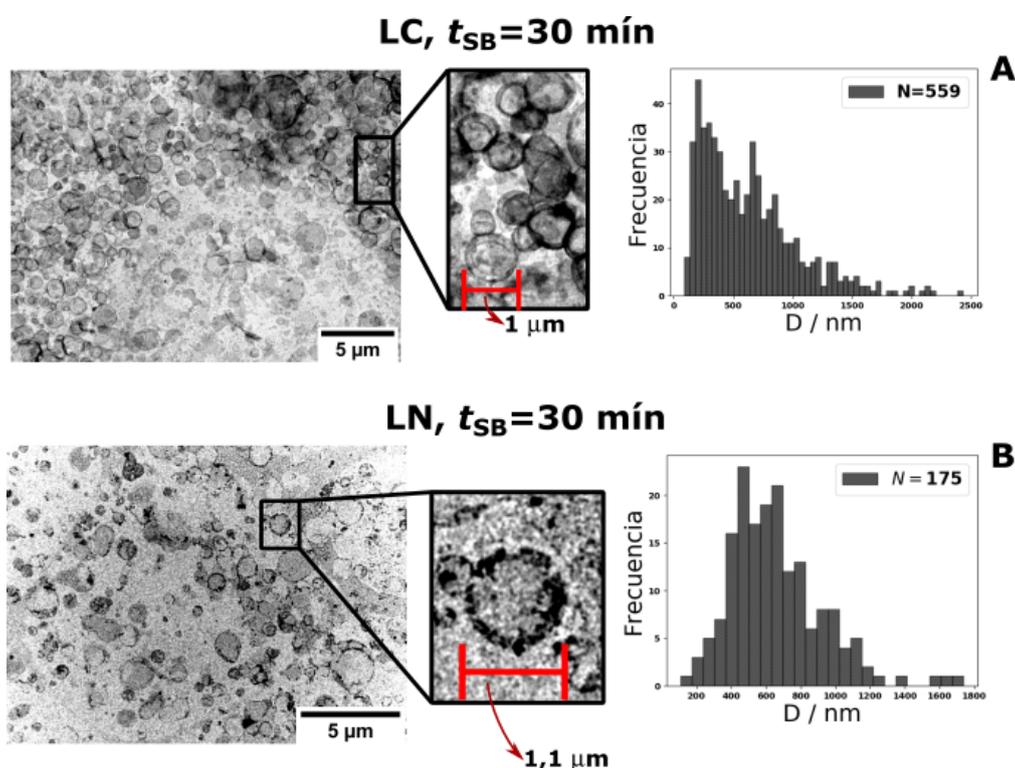
Los colorantes empleados, cuyas propiedades ya han sido descritas en la Sec.1.6, son: Rodamina B (Rho.B) y 5-Isotiocianato de fluoresceína (FITC).

### 3.1.6. Efectos del DMSO en la síntesis de liposomas

De los dos colorantes fluorescentes que se han empleado, el 5-isotiocianato de fluoresceína (FITC) presenta una baja solubilidad en agua desionizada, por ello se ha necesitado emplear una mezcla de agua desionizada y dimetilsulfóxido (DMSO) durante la síntesis de liposomas con FITC.

Ya que el cambio de medio de hidratación puede afectar a la distribución de tamaños, se ha decidido comprobar los posibles efectos que pueda generar la presencia de DMSO en los liposomas que encapsularán FITC. Esto solo se ha estudiado con los liposomas elegidos de la opción 3 de síntesis (Opc.3), dado que en caso de que se produzcan alteraciones en las poblaciones de tamaño, estas serían más significativas en esta opción.

Para esto, se sintetizó una muestra de LN y otra de LC empleando en la etapa de hidratación de lípidos una mezcla de agua y DMSO (al 10%), como se indica en la Sec.2.5.



**Figura 20.** Imágenes TEM e histogramas de tamaños de liposomas catiónicos (LC) y aniónicos (LN) elegidos de la opción 3 de síntesis, donde se aplicaron los tiempos de sonicación indicados en la imagen. N es la población de liposomas utilizado para obtener el histograma.

En la Fig.20 se presentan las imágenes TEM, correspondientes al par de síntesis realizadas, acompañadas de sus histogramas de tamaños.

En los LC, la homogeneidad de tamaños que se había conseguido con tiempos de sonicación en baño de  $t = 30$  mín, siguiendo la opción de síntesis 3, se pierde al emplear agua y DMSO. Al cambiar a un medio con DMSO la dispersión de tamaños aumenta y el tamaño medio también lo hace drásticamente. Comparando los histogramas y diámetros promedios de las Fig.19.B, donde se empleó solo agua (W), con la Fig.20.A, donde se utilizó agua y DMSO, se tiene:

$$D_{LC,W} = 67,4 \pm 47,0 \text{ nm} \rightarrow D_{LC,W+DMSO} = 623 \pm 411 \text{ nm}$$

$$R_{LC,W} \approx 30 - 100 \text{ nm} \rightarrow R_{LC,W+DMSO} \approx 120 - 1,7 \mu\text{m}$$

donde  $D_{LC,W}$  y  $D_{LC,W+DMSO}$  son los diámetros de los LC en agua y en una mezcla de agua y DMSO, respectivamente.  $D_{LC,W}$  ha sido extraído de la Tabla.2.  $R_{LC,W}$  y  $R_{LC,W+DMSO}$  son los rangos de las distribuciones de tamaños cuando se empleó solo agua y en una mezcla de agua y DMSO, respectivamente.

Por otro lado, en el caso de los LN también se ha producido un aumento tanto en el rango y el tamaño medio de la distribución. Nuevamente, comparando los histogramas y diámetros promedios de las Fig.19.D con la Fig.20.B, se observa:

$$D_{LN,W} = 419 \pm 272 \text{ nm} \rightarrow D_{LN,W+DMSO} = 658 \pm 266 \text{ nm}$$

$$R_{LN,W} \approx 80 - 890 \text{ nm} \rightarrow R_{LN,W+DMSO} \approx 100 - 1,3 \mu\text{m}$$

donde el diámetro medio en lo LN  $D_{LN,W}$  ha sido extraído de la Tabla.2.

En base a todos estos resultados, se puede concluir que el DMSO produce un aumento en la dispersión y en el tamaño promedio tanto en los LC como en los LN, estos efectos son más significativos en los LC. Por lo que puede pensarse que los liposomas sintetizados con FITC serán de mayores tamaños que los liposomas sintetizados con Rho.B aun siguiendo los mismos procedimientos de síntesis.

## 3.2. Espectroscopía UV-Vis

Como ya se ha mencionado se han elegido las síntesis:

**Opc.1** : LC,  $t_{SB} = 1 \text{ min}$

LN,  $t_{SB} = 2 \text{ min}$

**Opc.3** : LC,  $t_{SB} = 30 \text{ min}$

LN,  $t_{SB} = 30 \text{ min}$

para determinar la eficiencia de encapsulación y la capacidad de carga.

De aquí en adelante se distingue cada par de liposomas indicando la opción de síntesis a la que corresponden (Opc.), sin indicar el tiempo de sonicación en baño ( $t_{SB}$ ) que se ha empleado.

Mediante la técnica de espectroscopía UV-Vis se ha buscado determinar, si es posible, las concentraciones de colorante en las diferentes síntesis elegidas y a partir de ello la eficiencia de encapsulación de los liposomas por el método directo e indirecto. De igual manera, se ha intentado determinar la concentración de lípidos en todas las síntesis.

Por último, se comprueba si es posible determinar si se produce adsorción de los fluoróforos en la superficie de los liposomas empleando nuevamente la técnica de espectroscopía UV-Vis.

### 3.2.1. Disoluciones iniciales, antes del proceso de lavado

Empleando las rutas de síntesis elegidas se han realizado 4 preparados de liposomas con colorante explorando todas las combinaciones posibles: LC+RhoB, LN+RhoB, LC+FITC y LN+FITC. La concentración de lípido, FITC o Rho.B y el medio empleado en cada caso vienen descritos en la Sec.2.5.

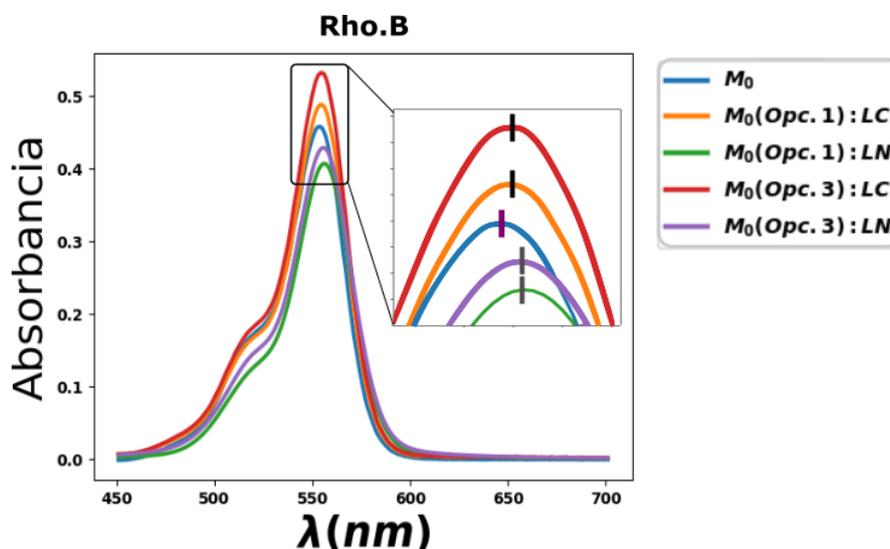
Para determinar la eficiencia de encapsulación, como se ha mencionado anteriormente, se ha requerido realizar un proceso de lavado previo de las muestras sintetizadas.

Para ello, los preparados liposomales con Rho.B y FITC se han diluido, respetando las cantidades indicadas en la Sec.2.6: 200  $\mu\text{L}$  de preparado liposoma-colorante, en 900  $\mu\text{L}$  de medio.

Las concentraciones de colorante<sup>10</sup> y lípido en estas disoluciones iniciales,  $M_0$ , que se han empleado en el proceso de lavado se han registrado en la Tabla.3.

**Tabla 3:** Concentración de colorante y de lípidos de las disoluciones iniciales,  $M_0$ , empleadas en el proceso de lavado.

i	$[C_i](M_0)$
Rho. B	$(11,4 \pm 0,5) \mu\text{g.mL}^{-1}$
FITC	$(45,5 \pm 0,5) \mu\text{g.mL}^{-1}$
Lípidos	$(9,090 \pm 0,018) \text{mg.mL}^{-1}$



**Figura 21.** Espectros de absorción de disoluciones con la misma concentración de Rho.B registrada en la Tabla.3. El espectro de la disolución sin liposomas es  $M_0$ . Los otros espectros contienen liposomas catiónicos (LC) o liposomas aniónicos (LN) sintetizados siguiendo las opciones de síntesis 1 (Opc. 1) y 3 (Opc. 3).

Los espectros de absorción de estas disoluciones iniciales de LC y LN con Rho.B, siguiendo las dos opciones de síntesis elegidas: la opción 1(Opc.1) y 3(Opc.3); y una disolución de Rho.B sin liposomas, se muestran en la Fig.21. Se puede observar la banda de absorción característica de la Rho.B de una muestra sin liposomas,  $M_0$ , cuyo máximo es  $\lambda_{\text{Max.RhoB}} = 554,0 \text{ nm}$ . Además, se puede observar un pequeño desplazamiento de esta banda de absorción cuando en la disolución se tienen liposomas. Este ligero desplazamiento tiene que ser exclusivamente debido a los liposomas, dado que todos los espectros tienen la misma concentración de Rho.B y el mismo solvente: agua. Este desplazamiento es mayor en el caso de los LN, con  $\lambda_{\text{Max.LN+Rho.B}}$ , que en los LC, con  $\lambda_{\text{Max.LN+Rho.B}}$ , como se puede ver:

<sup>10</sup>Se ha decidido trabajar con las unidades de  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  en lugar de emplear la Molaridad ( $M$ ) por motivos de cálculo.

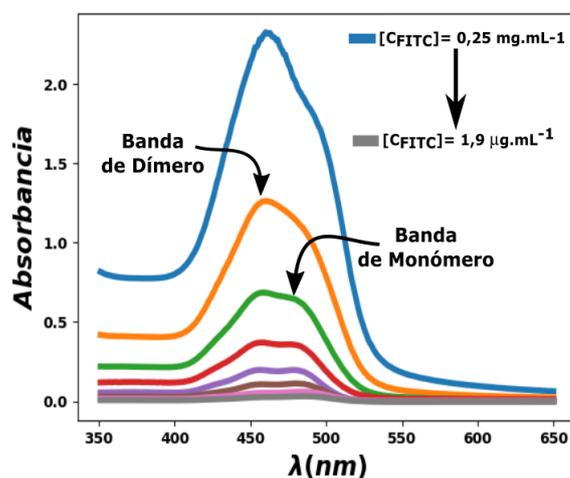
$$\lambda_{\text{Max.RhoB}} = 554,0 \text{ nm} \rightarrow \lambda_{\text{Max.LC+Rho.B}} = 554,9 \text{ nm}$$

$$\lambda_{\text{Max.RhoB}} = 554,0 \text{ nm} \rightarrow \lambda_{\text{Max.LN+Rho.B}} = 556,0 \text{ nm}$$

Nuevamente tomando como referencia el espectro de la disolución de Rho.B sin liposomas,  $M_0$ , otro fenómeno observado es el aumento y disminución de la banda de Rho.B debido a los liposomas. Este aumento se produce en los LC, y es mayor en la Opc.3. La disminución del pico se da en los LN, y esta disminución es mayor en la Opc.1.

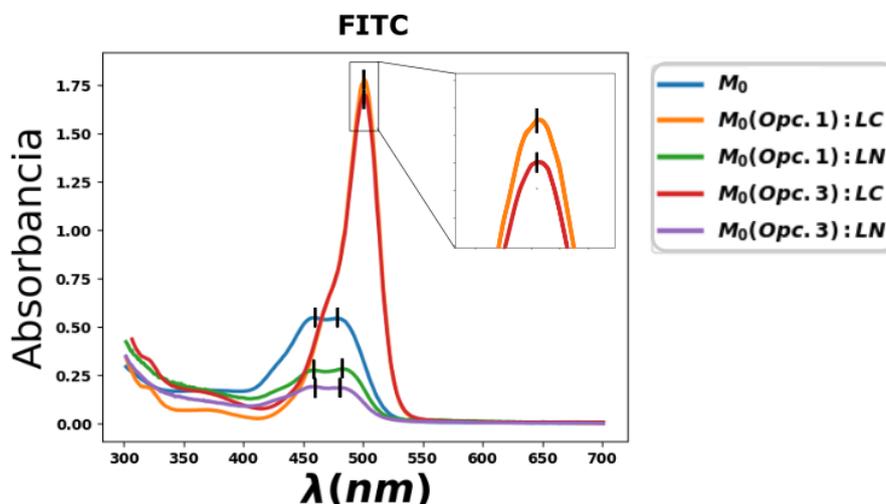
Por otra parte, antes de comenzar a analizar los resultados de las muestras iniciales de liposomas con FITC, se ha encontrado que altas concentraciones de FITC, en una disolución de agua y DMSO (al 10%), se observa una tendencia a formar dímeros. Esto se puede observar en la Fig.22 donde se han representado espectros de FITC a diferentes concentraciones en agua+DMSO(al 10%). Se observa a altas concentraciones la banda del FITC con un hombro no muy pronunciado. La banda con una longitud de onda:  $\lambda_{\text{Dim,FITC}} \approx 455,0 \text{ nm}$  se asocia a la presencia de un gran número dímeros (Agregados H), por ello se la denomina banda de dímero. Este fenómeno se encuentra documentado en la ref.[16].

Además, se puede observar cómo conforme disminuye la concentración de FITC, la presencia de dímeros disminuye y el hombro va definiéndose como una banda independiente. Esta última banda, con  $\lambda_{\text{Mon,FITC}} \approx 480,0 \text{ nm}$ , se asocia a la presencia de monómeros de FITC, por ello es conocida como banda de monómero; y a muy bajas concentraciones de FITC es la banda que predomina por encima de la otra.



**Figura 22.** Espectros de absorción de diferentes concentraciones de FITC en una disolución de agua y DMSO (al 10%). Las concentraciones decaen a la mitad de un espectro al sucesivo inferior.

Así, en el caso de las muestras iniciales de liposomas con FITC, se tienen los espectros de la Fig.23. También se ha decidido representar el espectro de absorción de una disolución de FITC sin liposomas,  $M_0$ , bajo la misma concentración de FITC que las muestras iniciales. Empleando este último espectro como referencia, se observa claramente como los liposomas influyen considerablemente en la forma de las bandas del FITC. Así, los LC aparentemente favorecen la presencia de monómeros de FITC debido al gran pico de monómero que puede observarse en  $\lambda_{\text{max,mon}} = 501,0 \text{ nm}$ . Por otra parte, los LN generan un descenso por igual en las bandas de dímero y monómero del FITC.



**Figura 23.** Espectros de absorción de disoluciones con la misma concentración de FITC, registrada en la Tabla.3. El espectro de la disolución sin liposomas es  $M_0$ , y las otras contienen liposomas catiónicos (LC) o liposomas aniónicos (LN); sintetizadas siguiendo las opciones de síntesis 1 y 3 elegidas.

Por lo tanto, la presencia de liposomas altera la forma de las bandas de absorción de la Rho.B y del FITC. Los LN disminuyen y los LC aumentan la intensidad de las bandas de absorción, este resultado se aplica tanto para la Rho.B como para el FITC. Pero ¿este resultado, para una concentración de colorante fija, es dependiente de la concentración de liposomas? En la siguiente sección se intenta responder a esta pregunta.

Estas alteraciones descartan la posibilidad de emplear curvas de calibrado obtenidas con muestras de Rho.B o FITC en disolución sin liposomas. En la Sec.3.2.2 se comprobará.

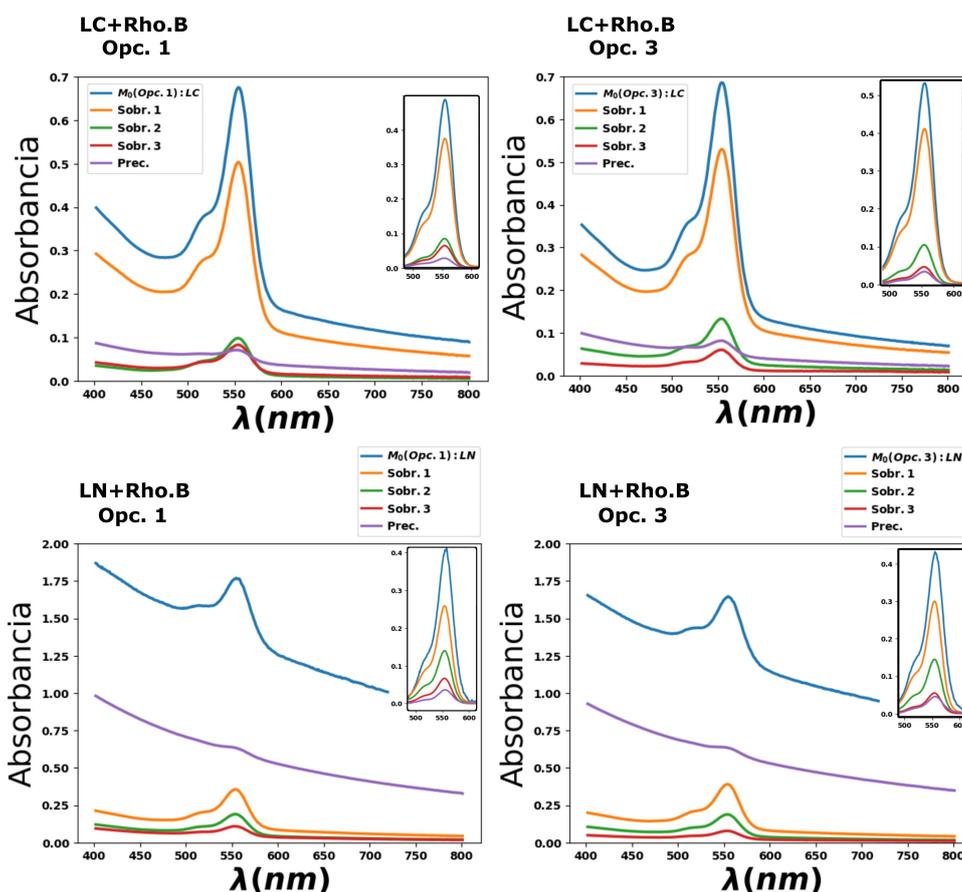
Cabe señalar, que los espectros de las muestras iniciales de liposomas con Rho.B y FITC presentan un fondo de dispersión debido a la presencia de liposomas que ha sido eliminado para realizar las comparaciones anteriores, tal como se indica en Apéndice.5.2. Sin embargo, estos espectros con este fondo se presentarán a continuación.

### 3.2.2. Proceso de lavado

Empleando las disoluciones iniciales con liposomas se inicia el proceso de lavado siguiendo el protocolo descrito en la Sec.2.6. A lo largo de esta sección se presentan los espectros de absorción de las diferentes partes resultantes del proceso de lavado (Sobrenadantes y precipitado o pellet) y nuevamente los espectros de las disoluciones iniciales incluyendo su fondo de dispersión.

Para el caso de los liposomas con Rho.B, los resultados obtenidos se presentan en la Fig.24. Como se puede observar los espectros siguiendo la opción de síntesis 1 y 3 son muy similares. Empleando el fondo de dispersión como indicador de la presencia de liposomas (o lípidos) se puede inferir que durante el lavado, una gran cantidad de liposomas catiónicos (LC) de la muestra inicial,  $M_0:LC$ , han sido arrastrados a la parte del primer sobrenadante, *Sobr.1*; de modo que, los liposomas restantes en su mayoría parecen ser retenidos en la parte del precipitado final, debido al menor fondo de dispersión de las partes sobrenadantes 2 y 3.

Por otro lado, al igual que en el caso anterior, los espectros son muy similares para las dos opciones de síntesis en el caso de los liposomas aniónicos (LN) con Rho.B. Sin embargo, en este caso la concentración de liposomas retenido en el precipitado es mayor.



**Figura 24.** Espectros de absorción de las diferentes partes obtenidas del proceso de lavado para liposomas catiónicos (LC) y aniónicos (LN) con Rho.B. Las disoluciones iniciales son:  $M_0:LC$  y  $M_0:LN$ , para las dos opciones de síntesis: *Opc.1* y *Opc.2*. Los "insets" contienen los mismos espectros sin la componente de dispersión. Las partes sobrenadantes son: *Sobr.1*, *Sobr.2* y *Sobr.3*; y el precipitado resultante es: *Prec.*.

Esta diferencia posiblemente tenga su origen en el tamaño de los liposomas, los LN son de mayor tamaño que los LC, de ahí que la precipitación sea más efectiva en los LN.

Para obtener una idea cuantitativa, se ha intentado determinar la concentración de lípidos en las primeras partes del proceso de lavado empleando curvas de calibración, las cuales se encuentran en el Apéndice.5.3. Dado que la concentración de lípidos en las muestra iniciales ( $M_0:LC$  y  $M_0:LN$ ) que se emplearon en el proceso de lavado son conocidos, se ha comprobado si la concentración de lípidos se puede estimar a partir de las curvas de calibración antes mencionadas. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla.4. En todos los casos se encuentran únicamente discrepancias significativas entre la concentración de lípido esperada y la obtenida a través de la curva de calibración tanto en los LN como en los LC.

Así, dado que para obtener la curva de calibrado de lípidos se emplearon nuevas síntesis, estos resultados sugieren que la dispersión cambia de una síntesis a otra, y en consecuencia no se puede emplear el fondo de *scattering* como indicador de la concentración de lípidos. Se ha comprobado más adelante si estas discrepancias en las concentraciones de lípidos se producen en las muestras que contienen FITC.

En cuanto a la concentración de Rho.B que se mantiene en el precipitado final de la muestra de LC y LN, como se puede observar en la Fig.24, ésta disminuye de forma considerable, basta comparar las bandas de absorción de las muestras iniciales con las

**Tabla 4:** Concentraciones de lípidos en la disolución inicial,  $M_0$ , de LC y LN con Rho.B. La concentración esperada es  $[C_{\text{Lípid}}](Esp.)$ , y las concentraciones obtenidas a partir de curvas de calibración siguiendo la opción de síntesis 1 y 3 son respectivamente:  $[C_{\text{Lípid},1}](Obt.)$  y  $[C_{\text{Lípid},3}](Obt.)$ . Las discrepancias relativas entre la concentración esperada y la obtenida son  $\delta_{\text{Rel}}$ . Todas las concentraciones de lípidos se expresan en  $\text{mg.mL}^{-1}$

	$[C_{\text{Lípid}}](Esp.)$	Opc.1		Opc.3	
		$[C_{\text{Lípid},1}](Obt.)$	$\delta_{\text{Rel},1}$	$[C_{\text{Lípid},3}](Obt.)$	$\delta_{\text{Rel},2}$
<b>LC+Rho.B</b>	$9,091 \pm 0,003$	9.97	10 %	7.45	18 %
<b>LN+Rho.B</b>		12.10	30 %	10.97	20 %

pequeñas bandas de los precipitados, *Prec.*. Una gran parte de Rho.B se pierde en el proceso de lavado. Se descarta la posibilidad de que los liposomas liberen la Rho.B por efecto del centrifugado, porque de ser así los espectros del sobrenadante se encontrarían por encima de alguna parte sobrenadante anterior.

Posiblemente, la baja retención de colorante en el precipitado se deba sencillamente al hecho de que los LN y los LC no logren encapsular eficazmente la Rho.B.

Además, como se ha descrito en la Sec.2.6, para cada caso, la concentración de colorante en cada muestra inicial y su respectiva parte sobrenadante 1 (*Sobr.1*) teóricamente tendrían que ser iguales. Sin embargo, comparando sus espectros de absorción sin el fondo de dispersión, en la Fig.24, se observa que presentan máximos diferentes y en consecuencia se obtendrían concentraciones de Rho.B diferentes. Esto indica que se está produciendo adsorción de la Rho.B en los LC y los LN, por el mecanismo descrito en la Sec.1.7; y en consecuencia las bandas de absorción dependerán de la concentración de liposomas.

**Tabla 5:** Datos de las concentraciones de Rodamina B para las diferentes partes del proceso de lavado. La concentraciones esperadas son  $[C_{\text{Rho.B}}](Esp.)$  y las concentraciones de Rho.B obtenidas con la curva de calibración del Apéndice.5.3 para los liposomas catiónicos siguiendo la opción 1 y 3 de síntesis son respectivamente  $[C_{\text{Rho.B}}]^{(Opc,1)}$  y  $[C_{\text{Rho.B}}]^{(Opc,3)}$ . Todas las concentraciones se dan en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

LC+Rho.B	$[C_{\text{Rho.B}}]$	$[C_{\text{Rho.B}}]^{(Opc,1)}$	$[C_{\text{Rho.B}}]^{(Opc,3)}$
	(Esp.)	(Obt.)	(Obt.)
<b><math>M_0</math>:LC</b>	$11,4 \pm 0,5$	$12,8 \pm 0,4$	$14,0 \pm 0,4$
<b>Sobr. 1</b>	$11,4 \pm 0,5$	$9,88 \pm 0,3$	$10,8 \pm 0,3$
<b>Sobr. 2</b>	$2,07 \pm 0,09$	$2,44 \pm 0,07$	$2,76 \pm 0,08$
<b>Sobr. 3</b>	$0,376 \pm 0,016$	$1,07 \pm 0,05$	$1,23 \pm 0,04$
<b>Prec.</b>	$0,068 \pm 0,003$	$0,75 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,03$

Aún con esto, se ha decidido obtener a partir de la curva de calibración, que se encuentra en Apéndice.5.3, las concentraciones de Rho.B en todas las partes del proceso de lavado para los LC y los LN. Los resultados se recogen en las Tabla.5 y 6. Además, se han registrado las concentraciones esperadas que se han podido estimar dado que se conoce la concentración de Rho.B de la disolución inicial si no hubiese adsorción y los volúmenes de todas las partes del lavado.

A partir de los valores de las Tabla.5 y 6, las concentraciones de Rho.B esperadas con las obtenidas discrepan más en los precipitados. Las discrepancias relativas son menores

en los LC, del orden del  $\approx 90\%$ , que en los LN, donde es del  $\approx 95\%$ . Este resultado es indicador que los LC y los LN, que han permanecido en el precipitado, han transportado Rho.B evitando que se pierda en las otras partes del lavado, generando con ello una mayor lectura en la concentración que la esperada en el precipitado, lo cual apoya la idea de la adsorción de la Rho.B.

Sin embargo, las discrepancias anteriores no indican necesariamente que la Rho.B tenga mayor afinidad por los LN que por los LC, dado que hay que tener en cuenta que ha precipitado mayor cantidad de LN que LC.

**Tabla 6:** Datos de las concentraciones de la Rodamina B para las diferentes partes del proceso de lavado. La concentraciones esperadas son  $[C_{\text{Rho.B}}](\text{Esp.})$  y las concentraciones de Rho.B obtenidas con la curva de calibración del Apéndice.5.3 para los liposomas aniónicos siguiendo la opción 1 y 3 de síntesis son respectivamente  $[C_{\text{Rho.B}}]^{(\text{Opc.1})}$  y  $[C_{\text{Rho.B}}]^{(\text{Opc.3})}$ . Todas las concentraciones se dan en  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

LN+Rho.B	$[C_{\text{Rho.B}}]$	$[C_{\text{Rho.B}}]^{(\text{Opc.1})}$	$[C_{\text{Rho.B}}]^{(\text{Opc.3})}$
	(Esp.)	(Obt.)	(Obt.)
<b>M<sub>0</sub>:LN</b>	$11,4 \pm 0,5$	$10,5 \pm 0,3$	$11,2 \pm 0,3$
<b>Sobr. 1</b>	$11,4 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,2$	$7,9 \pm 0,2$
<b>Sobr. 2</b>	$2,07 \pm 0,09$	$3,68 \pm 0,11$	$3,82 \pm 0,11$
<b>Sobr. 3</b>	$0,358 \pm 0,016$	$1,75 \pm 0,05$	$1,45 \pm 0,04$
<b>Prec.</b>	$0,049 \pm 0,002$	$0,94 \pm 0,03$	$1,19 \pm 0,03$

Salvo algún caso particular, en general, tanto en los LN como en los LC, las concentraciones de Rho.B obtenidas y esperadas discrepan. El origen de esto fundamentalmente se encuentra, como ya se ha mencionado, en la adsorción de la Rho.B.

Así, en base al mecanismo de adsorción, descrito en la Sec.1.7, empleando las concentraciones de Rho.B iniciales esperadas y sus respectivos *Sobr.1* obtenidas, recogidas en la Tabla.5 y 6, se ha podido estimar la concentración de Rho.B adsorbida en los LC y LN para cada opción de síntesis:

$$(\text{Opc.1}) : \text{LC} \quad [C_{\text{Rho.B}}]_{\text{Ads}} \approx (1,5 \pm 0,8) \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$(\text{Opc.3}) : \text{LC} \quad [C_{\text{Rho.B}}]_{\text{Ads}} \approx (0,6 \pm 0,8) \mu\text{g.mL}^{-1}$$

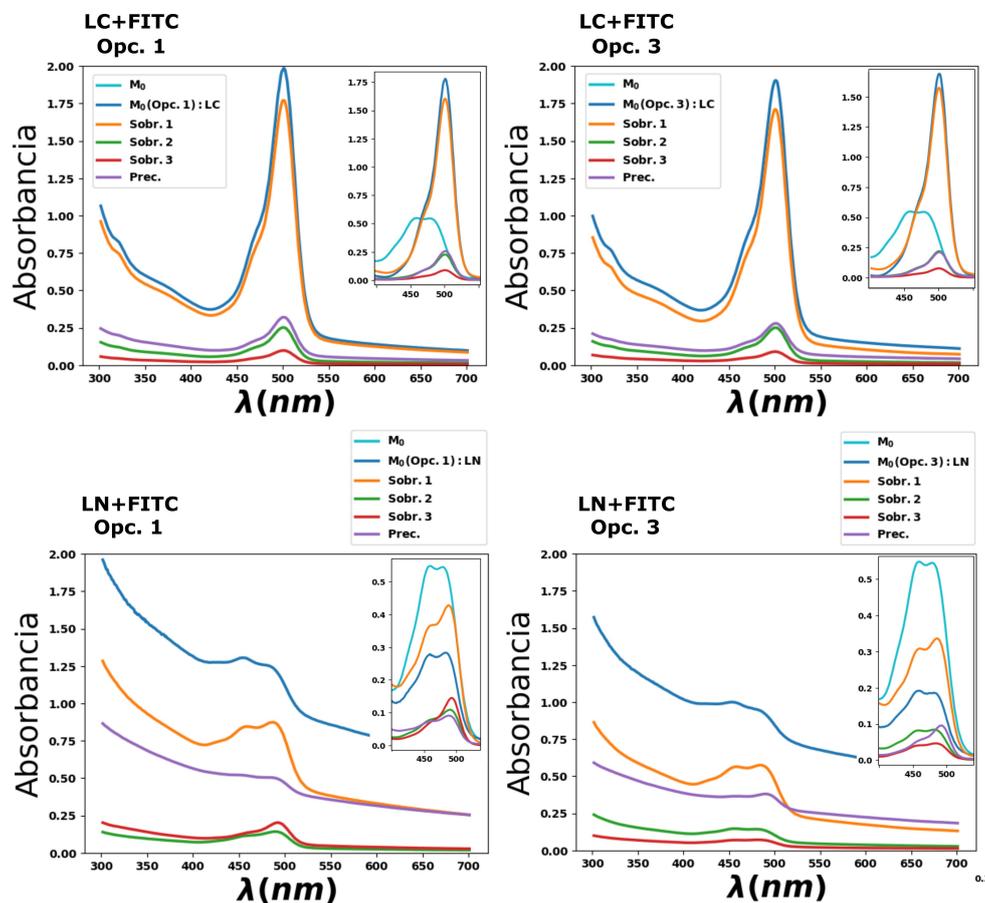
$$(\text{Opc.1}) : \text{LN} \quad [C_{\text{Rho.B}}]_{\text{Ads}} \approx (4,6 \pm 0,7) \mu\text{g.mL}^{-1}$$

$$(\text{Opc.3}) : \text{LN} \quad [C_{\text{Rho.B}}]_{\text{Ads}} \approx (3,5 \pm 0,7) \mu\text{g.mL}^{-1}$$

Comparando estas concentraciones, la adsorción de la Rho.B es mayor en los LN que en los LC. Sin embargo, estas cantidades son engañosas, ya que sugieren ideas contrarias:

- La Rho.B tiene una mayor afinidad a ser adsorbida por los LN que por los LC.
- No hay una afinidad de la Rho.B hacia un tipo de liposomas concreto y las concentraciones anteriores son resultado exclusivo de la diferente precipitación de los liposomas. Es decir, en la Fig.24 se observa, que el precipitado de los LN es mayor que los LC en el *Sobr.1*, luego la cantidad de Rho.B que arrastran los LN es mayor, y en consecuencia se genera una mayor lectura en la concentración de Rho.B en los LN que en los LC.

Los concentraciones obtenidas con la curva de calibración para la Rho.B deben ser tomadas con prudencia, dado que además de la adsorción, posiblemente se produce algún otro fenómeno causado por los liposomas que altere ligeramente las bandas de absorción como ya se ha indicado en la Sec.3.2.1.



**Figura 25.** Espectros de absorción de las partes obtenidas en el proceso de lavado para las muestras de liposomas catiónicos con FITC. Las disoluciones iniciales son:  $M_0$ :LC y  $M_0$ :LN para las dos opciones de síntesis: *Opc.1* y *Opc.2*. Los insets contienen los mismos espectros sin la componente de dispersión. Las partes sobrenadantes son: *Sobr.1*, *Sobr.2* y *Sobr.3*; y el precipitado resultante es: *Prec.*. El espectro de una muestra sin liposomas con la misma concentración de FITC que la disolución inicial y el *Sobr.1*, es  $M_0$ .

Los espectros obtenidos de los LC y LN con FITC, se muestran en la Fig.25. También se ha representado el espectro de una disolución de FITC sin liposomas ( $M_0$ ).

Para los LC con FITC en la Fig.25 se muestran bandas de monómero de FITC muy pronunciadas en todas las partes del proceso de lavado como era de esperarse a bajas concentraciones de FITC. Sin embargo, la concentración en el *Sobr.1* no es lo suficientemente pequeña como para presentar esa intensa banda de monómero. En principio, su espectro debería de corresponder al de la muestra sin liposomas ( $M_0$ ) donde hay un equilibrio en las bandas de dímero y monómero. Este fenómeno como se mencionó en la Sec.3.2.1, se debe a la presencia de liposomas catiónicos, estos inducen un aumento en el número de monómeros de FITC.

También en los LC, las concentraciones de FITC en las muestras iniciales y los *Sobr.1*

en teoría son iguales, pero hay una ligera diferencia entre los máximos de absorción. Esto posiblemente tiene su origen en la adsorción del FITC en los LC.

Por otro lado, en los LN sintetizados con FITC no se observa un pico de monómero pronunciado. En realidad, se observa que en la muestra inicial ( $M_0 : LN$ ) hay un equilibrio entre la banda de dímero y monómero; equilibrio que se pierde en las siguientes partes del proceso de lavado, y termina predominando la banda de monómero como es de esperar debido a las bajas concentraciones de FITC.

Un fenómeno particular ocurre en este caso, en los LN con FITC. Observando los espectros sin *scattering*, el primer sobrenadante, *Sobr.1*, se encuentran por encima de las bandas que corresponden a la muestra inicial ( $M_0:LN$ ). Sin embargo, este aumento no sobrepasa la banda de la disolución sin liposomas como es de esperar. Una posible explicación se encuentra en que se produce desorción del FITC a causa del centrifugado.

Este fenómeno también se produce en la opción de síntesis 1, entre el *Sobr.2* y el *Sobr.3*. Sin embargo, en este caso, la concentración de FITC en el *Sobr.3* es menor que en el *Sobr.2*. Esto sugiere fundamentalmente una posible liberación del FITC por rotura de liposomas consecuencia del centrifugado.

**Tabla 7:** Concentraciones de lípidos en la disolución inicial,  $M_0$ , de LC y LN con FITC. La concentración esperada es  $[C_{Lipid}](Esp.)$ , y las concentraciones obtenidas a partir de curvas de calibración siguiendo la opción de síntesis 1 y 3 son respectivamente:  $[C_{Lipid,1}](Obt.)$  y  $[C_{Lipid,3}](Obt.)$ . Las discrepancias relativas entre la concentración esperada y la obtenida son  $\delta_{Rel}$ . Todas las concentraciones de lípidos se expresan en  $mg.mL^{-1}$

	$[C_{Lipid}](Esp.)$	Opc.1		Opc.3	
		$[C_{Lipid,1}](Obt.)$	$\delta_{Rel,1}$	$[C_{Lipid,3}](Obt.)$	$\delta_{Rel,2}$
<b>LC+FITC</b>	$9,091 \pm 0,003$	9.81	8 %	10.55	16 %
<b>LN+FITC</b>		9.74	7 %	6.20	31 %

Debido a las alteraciones considerables en las bandas de absorción del FITC, no se ha creído conveniente estimar la concentración de adsorción como se hizo con la Rho.B.

En cuanto a la concentración de liposomas aniónicos (LN) en las muestras con FITC, se observa en la Fig.25 como una gran cantidad de liposomas y FITC son desplazados fundamentalmente al primer sobrenadante, *Sobr.1*. Los liposomas restantes en su mayoría permanecen en el precipitado.

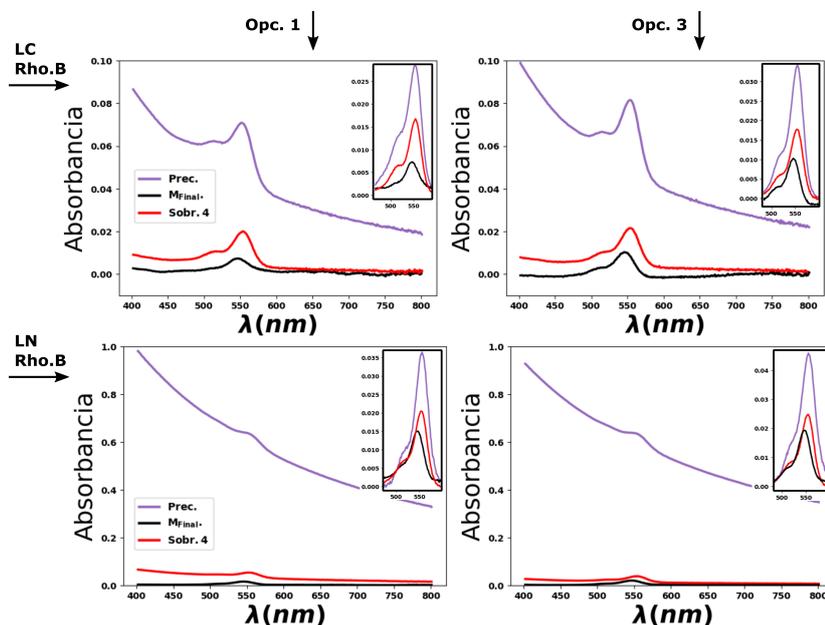
Se ha querido comprobar si se puede estimar la concentración de lípidos en las muestras iniciales de LC ( $M_0:LC$ ) y LN ( $M_0:LN$ ) con FITC en base al fondo de dispersión de sus espectros medida a 700 nm donde no hay absorción de colorante. Los resultados se presentan en la Tabla.7. Nuevamente los resultados discrepan significativamente. Así, las discrepancias relativas entre la concentración de lípidos esperada con la obtenida con las curvas de calibración son menores en la Opc.1 que en la Opc.3.

### 3.2.3. Rotura de liposomas y eficiencia de encapsulación

Se ha comprobado si en el precipitado del proceso de lavado aún hay colorante fuera de los liposomas, para ello se ha realizado un centrifugado adicional a los precipitados, *Prec*, del proceso de lavado para todas las muestras ya analizadas.

Como resultado se obtiene por cada muestra un nuevo sobrenadante y un nuevo precipitado, a los que se han denominado *Sobr.4* y  $M_{Final}$ , respectivamente. Esta última

muestra contiene un pellet de liposomas con colorante que finalmente se han roto empleando metanol, siguiendo el proceso descrito en la Sec.2.7. De esta forma se elimina la influencia de los liposomas en las concentraciones de Rho.B y FITC en las muestras finales.



**Figura 26.** Espectros de absorción pertenecientes al centrifugado adicional realizado al precipitado del proceso de lavado (*Prec.*) para los liposomas catiónicos (*LC*) y aniónicos (*LN*) con Rho.B. La nueva parte Sobrenadante es *Sobr.4* y la muestra con los liposomas rotos en metanol es  $M_{Final}$ .

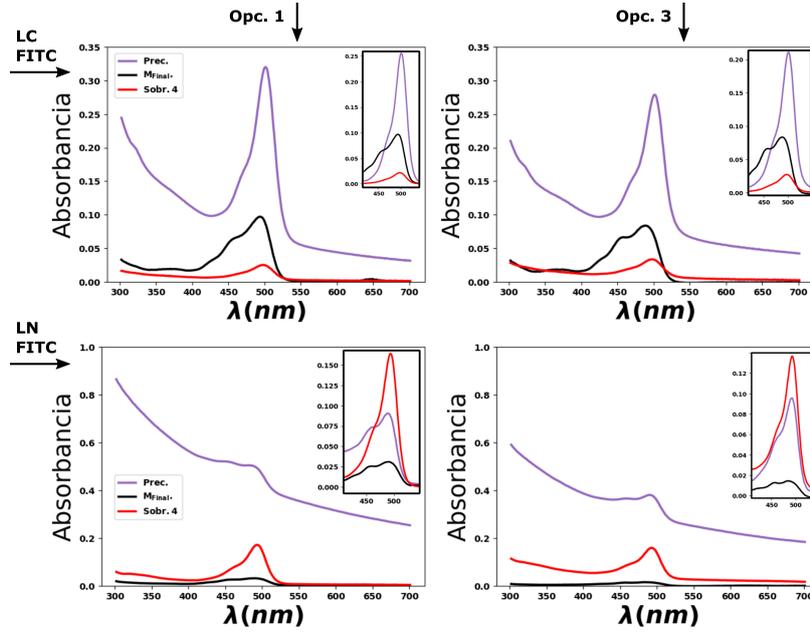
En cuanto a los LC y LN con Rho.B, en la Fig.26 se presentan los espectros de las partes resultantes del centrifugado adicional:  $M_{Final}$  y *Sobr.4*. Para realizar las comparaciones pertinentes se representan también los precipitados del proceso de lavado que ya se mostraron en la sección anterior. Así, se puede observar que tras el centrifugado adicional al *Prec.*, la nueva parte sobrenadante apenas presenta un pequeño fondo de dispersión. Esto indica que casi la totalidad de liposomas que se encontraban en el precipitado del proceso de lavado, han vuelto a precipitar.

En cuanto a la Rho.B presente en los *Prec.*, observando los espectros sin el fondo de *scattering*, una parte considerable fue arrastrada al nuevo sobrenadante, lo cual sugiere que aún se tenía Rho.B fuera de los liposomas en todos los casos y/o que una parte pudo ser liberada en el proceso de centrifugado, quizá por la ruptura de alguno de ellos.

Respecto a las muestras con FITC, los resultados del centrifugado adicional se muestran en la Fig.27. Se observa que, al igual que en las muestras con Rho.B, casi la totalidad de liposomas se mantienen en el nuevo precipitado.

Observando los espectros sin dispersión en los LN con FITC, se tiene una banda de monómero en el *Sobr.4*) por encima que en la muestra de partida, (*Prec.*). Este resultado, obtenido también en el proceso de lavado, puede explicarse a través de la liberación del FITC por la ruptura de liposomas.

A partir de los espectros de absorción de las muestras finales ( $M_{Final}$ ) y las curvas de calibración de la Rho.B y el FITC en metanol, se han determinado finalmente las concentraciones de los colorantes encapsulados+adsorbidos. Estos resultados se han registrado en la Tabla.8 para las muestras con Rho.B y FITC. Empleando estos resultados y la Ec.2 se ha podido determinar la eficiencia de encapsulación para todas las muestras



**Figura 27.** Espectros de absorción pertenecientes al centrifugado adicional realizado al precipitado del proceso de lavado (*Prec.*) para los liposomas catiónicos (*LC*) y aniónicos (*LN*) con FITC. La nueva parte Sobrenadante es *Sobr.4* y la muestra con los liposomas rotos en metanol es  $M_{Final}$ .

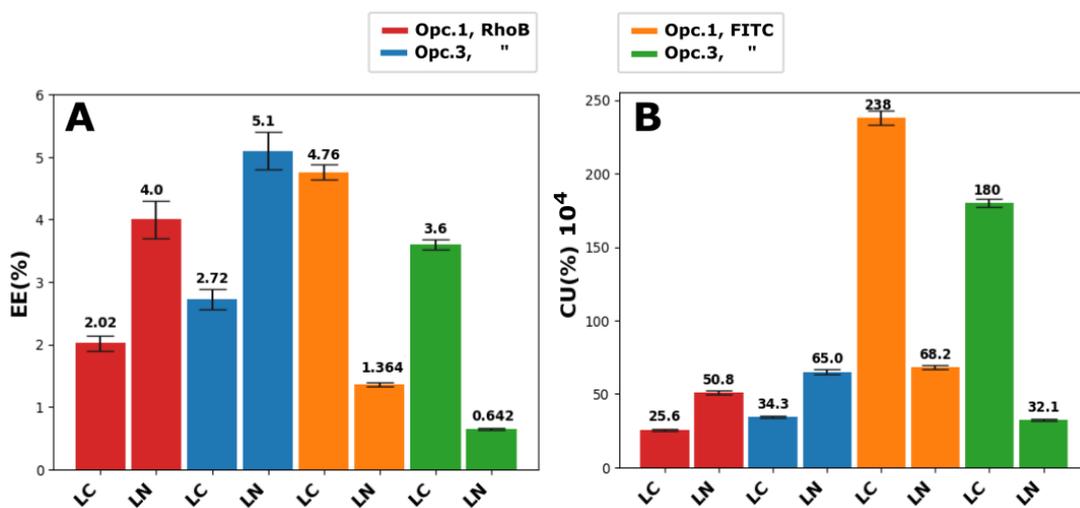
de liposomas, siguiendo las dos opciones de síntesis que se han elegido. Estas eficiencias de encapsulación ( $EE(\%)$ ) se presentan en la Fig.28.A.

Hay que tener presente que la eficiencia de encapsulación determinada tiene dos contribuciones: el colorante encapsulado y el adsorbido. Además, se ha supuesto que el colorante que quedaba en la muestra final ( $M_{Final}$ ) no se encontraba libre. Esta  $EE(\%)$  se ha estimado empleando la Ec.2 y corresponde al método directo.

Se observa en la Fig.28A que los liposomas de la opción de síntesis 1 (*Opc.1*) encapsulan menos Rho.B que los liposomas de la opción de síntesis 3 (*Opc.3*). Contrario a lo que se esperaría en base al volumen de encapsulación porque los liposomas de la *Opc.1* son de mayor tamaño y en consecuencia encierran un mayor volumen que los de la *Opc.3*. Sin embargo, este resultado puede explicarse si hay adsorción, ya que aunque los liposomas de la *Opc.3* son más pequeños, en conjunto presentan una mayor superficie

**Tabla 8:** Datos de las muestras finales  $M_{Final}$ . Se indican las concentraciones de Rho.B y sus volúmenes correspondientes en la 3ra y 4ta columna. Se indican las concentraciones de FITC y sus volúmenes correspondientes en la 5ta y 6ta columna. Todo lo anterior para las dos opciones de síntesis: (*Opc.1*) y (*Opc.3*); y cada tipo de liposomas: catiónicos (*LC*) y aniónicos (*LN*). Las concentraciones van acompañadas con su error y la incertidumbre en los volúmenes es de  $\Delta V(M_{Final}) \approx 1 \mu\text{L}$ .

	Lipos.	$[C_{Rho.B}]/\mu\text{g.mL}^{-1}$	$V(M_{Final})/\mu\text{L}$	$[C_{FITC}]/\mu\text{g.mL}^{-1}$	$V(M_{Final})/\mu\text{L}$
<b>Opc.1</b>	LC	$0,197 \pm 0,003$	1300	$1,78 \pm 0,02$	1337
	LN	$0,404 \pm 0,007$	1258	$0,568 \pm 0,007$	1200
<b>Opc.3</b>	LC	$0,277 \pm 0,004$	1240	$1,54 \pm 0,02$	1170
	LN	$0,512 \pm 0,008$	1260	$0,270 \pm 0,003$	1190



**Figura 28.** Eficiencia de encapsulación (EE%) , en A, y medida de la carga útil (CU%), en B, de la Rho.B y el FITC en los liposomas catiónicos (LC) y aniónicos (LN) para las dos opciones de síntesis: Opc.1 y Opc.3. La leyenda es común a ambas figuras.

que los de la *Opc.1*. De ser esto cierto la adsorción de la Rho.B tiene mayor importancia que la encapsulación. Aunque, nuevamente este resultado podría ser consecuencia de la diferente precipitación de los liposomas.

Además, se observa que la Rho.B se encapsula mejor en los LN que en los LC. Este resultado puede indicar que la Rho.B se adsorbe mejor en los LN a través de interacciones electrostáticas que en los LC, dado que los LC tienen una mayor superficie que los LN. Esto además del hecho que los LN tienen un volumen mayor, explicaría la alta EE(%) en los LN. Sin embargo, nuevamente este resultado podría ser consecuencia de la diferente precipitación de los liposomas.

Por otra parte, el FITC se encapsula mejor en los LC que en los LN. Este resultado se puede explicar en base al tamaño de los liposomas, los LC aunque de menor tamaño que los LN presentan mayor una superficie, luego esto explicaría las diferentes eficiencias de encapsulación observadas. De ser esta idea correcta nuevamente la adsorción tiene un mayor peso que la encapsulación. Además, teniendo en cuenta que precipitan aparentemente más LN que LC, se refuerza la idea de que el FITC tiene alta afinidad hacia los LC.

Por otro lado, no se descarta que la baja eficiencia de encapsulación de los LN podría ser por la posible liberación del FITC durante el proceso de lavado y el centrifugado adicional.

Se observa que en ese caso la eficiencia de encapsulación es mayor siguiendo la opción de síntesis 1, que en la opción de síntesis 3.

Pero ¿Qué colorante se encapsula mejor? ¿El FITC o la Rho.B?. Para responder a esta pregunta se ha decidido obtener la carga útil (CU%) a partir de la Ec.3. Los resultados se representan en la Fig.28B.

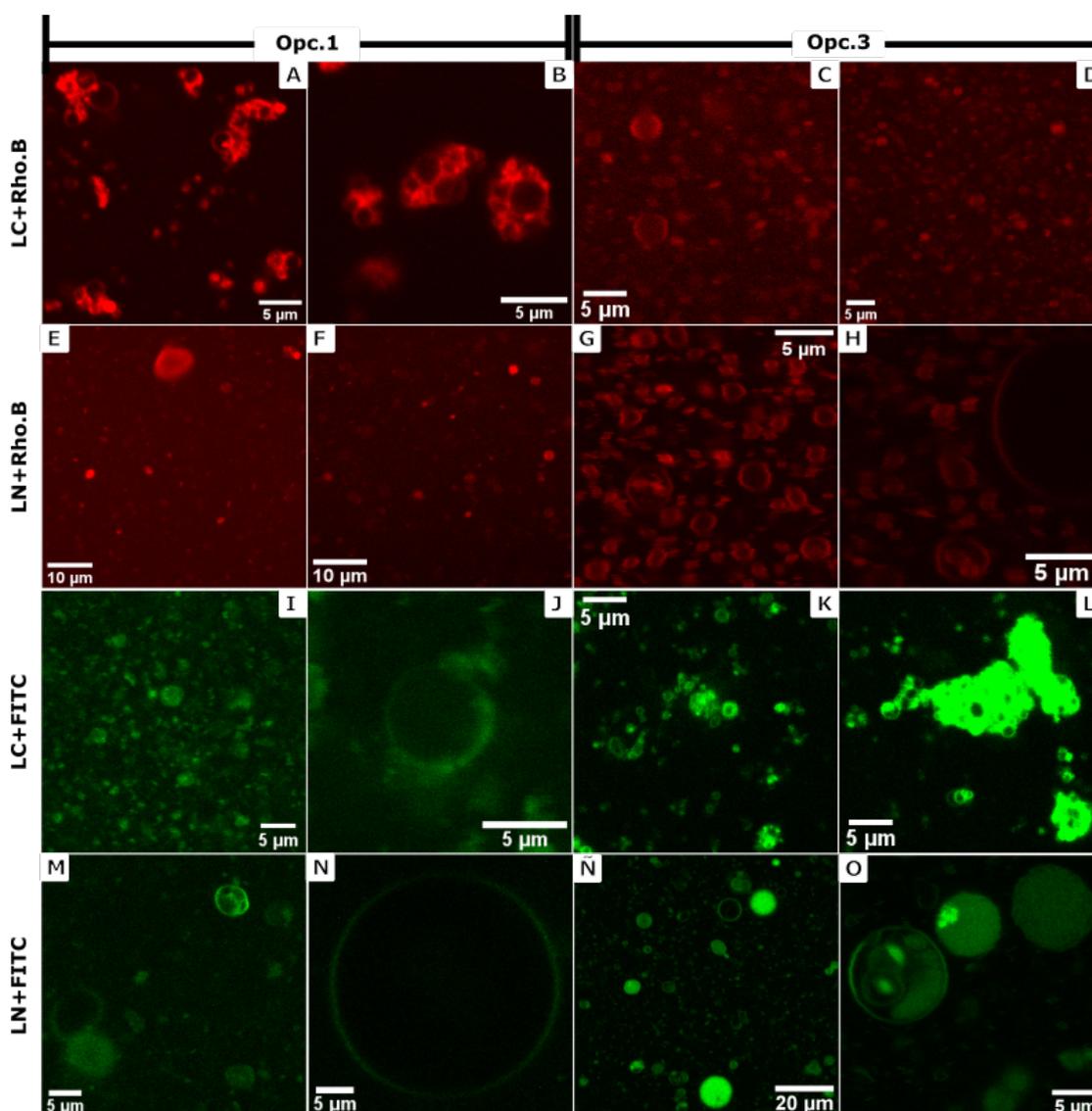
Este parámetro, a diferencia de la  $EE(\%)$ , es menos engañoso dado que no depende de la cantidad de colorante empleado inicialmente en el proceso de lavado, sino de la cantidad de lípido inicial. Así, como puede observarse en la Fig.28.B, el FITC se encapsula mucho mejor que la Rho.B para una misma cantidad inicial de lípido empleado.

### 3.3. Microscopía confocal

Las muestras finales,  $M_{\text{Final}}$ , aquellas que se obtienen después del lavado y el centrifugado adicional, han sido las observadas a través del microscopio confocal.

En la Fig.29 se observan los liposomas con Rho.B y FITC, para las dos opciones de síntesis 1 y 3. La razón de que se observe una señal de fondo, fuera de los liposomas, se encuentra en que se emplearon disoluciones iniciales con concentraciones mayores de Rho.B y de FITC de las que finalmente se han empleado en el proceso de lavado. Fue, en parte, debido a estas observaciones la razón por la cual se terminó empleando una cantidad menor de Rho.B y FITC para el desarrollo del lavado.

Además, los liposomas antes de su observación al microscopio confocal se encontraban almacenados en medio acuoso durante 3 meses aquellas que corresponden a la opción de síntesis 1 y 1 mes los de la opción de síntesis 3.



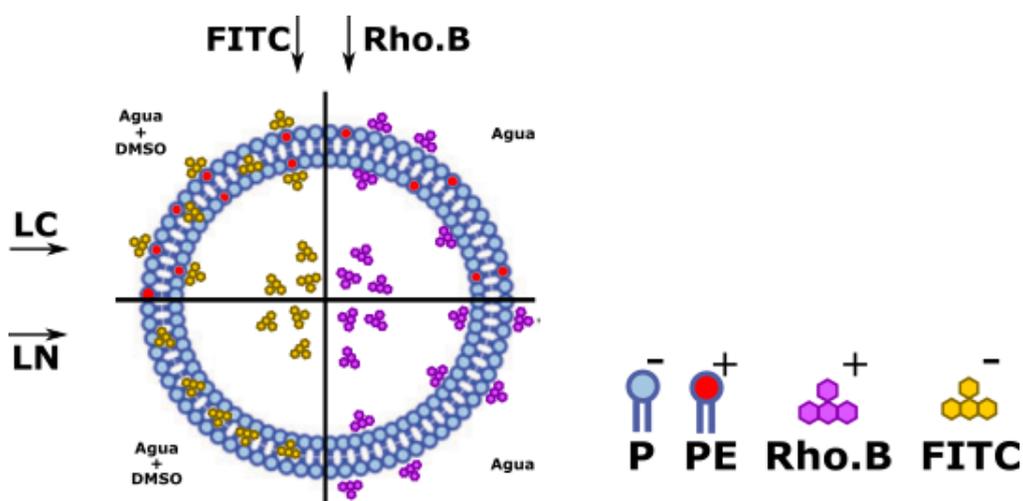
**Figura 29.** LC y LN sintetizados con Rho.B o FITC vistos a través de un microscopio confocal. Se distinguen en la parte superior de la imagen las dos opciones de síntesis empleadas: 1(*Opc.1*) y 3(*Opc.2*).

Algunos liposomas parecen ligeramente deformados, como los observados en la Fig.29C,G, o E; esto se debe a que los liposomas se encontraban en movimiento durante la observación

(movimiento browniano).

En algunos casos se observan múltiples agregados de liposomas, como en la Fig.29A,B,J y L. Esto se da especialmente en los LC sintetizados siguiendo la opción 1 y 3. Se sabe que los liposomas cuando se encuentran almacenados en medio acuoso con el tiempo tienden a la agregación. Sin embargo, en los LN no se observan múltiples agregados y se encontraron almacenados el mismo tiempo que los LC, todo esto puede sugerir que los LC son menos estables que los LN. Aunque se tendrían que realizar más estudios para comprobar esta hipótesis.

En todos los casos se puede observar que la Rho.B y el FITC se localizan en superficie, en general las regiones acuosas parecen no contener colorante. Una posible explicación se puede proporcionar a través del esquema de la Fig.30, es posible que el colorante encapsulado se haya terminado por adherir a la superficie de los liposomas, aquella que se encuentra en contacto con el núcleo acuoso, o incluso en el caso concreto del FITC haya logrado penetrar las bicapas para localizarse en la región intermembrana. Todo esto sería posible por el comportamiento hidrófilo/catiónico de la Rho.B y lipófilo/aniónico del FITC; y por de la carga superficial de los LC y los LN. Asimismo, todas las posibles localizaciones de los colorantes en base a todos los resultados anteriores se presentan en el esquema Fig.30. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que la adsorción es más importante que la encapsulación.

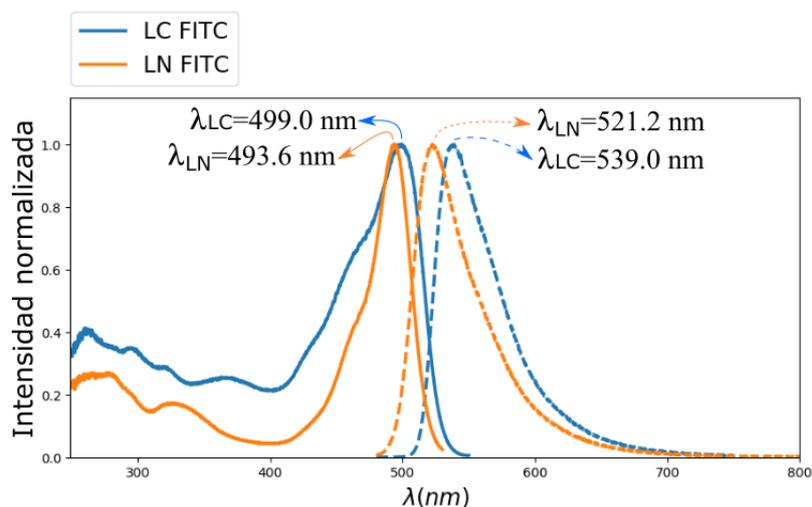


**Figura 30.** Esquema de un liposoma dividido en cuadrantes. Cada uno corresponde a un tipo de liposoma: liposoma catiónico (LC) o aniónico (LN), con Rho.B o FITC, presentes en los medios acuosos: Agua o Agua+DMSO(10%). Los LC tiene fosfatidiletanolamina, (PE), y los LN tienen fosfolípidos con el grupo fosfato libre (P). Los fosfolípidos y los colorantes se han representado con su carga: catiónicos(+) o aniónicos(-).

Además, no se descarta que puedan producirse algún otro tipo de enlace entre los grupos funcionales de los colorantes y los fosfolípidos. Por ejemplo, podría darse el enlace covalente entre el grupo funcional del FITC, el grupo isotiocianato, y la etanolamina en los LC.

### 3.4. Fluorescencia

En la Fig.31 se presentan los espectros de emisión y excitación de muestras con liposomas catiónicos y aniónicos sintetizados con FITC. Estas muestras han sido las que se observaron al microscopio confocal.

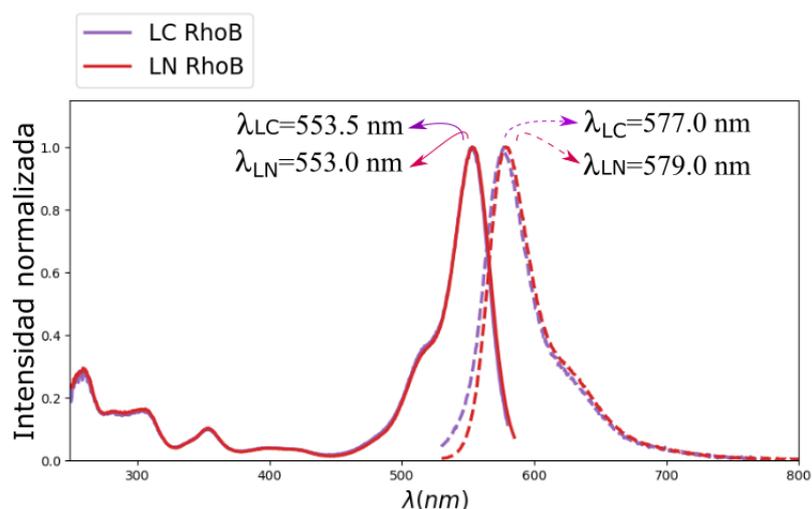


**Figura 31.** Espectro de emisión (línea discontinua) y excitación (línea continua) de liposomas sintetizados empleando FITC bajo la opción de síntesis 1.

Los espectros de emisión y excitación, presentados en la Fig.31, de la muestra de LC con FITC se encuentran desplazados a mayores longitudes de onda y más anchos que los correspondientes a los LN con FITC. El desplazamiento de Stokes en ambas muestras también es diferente:  $\Delta_{LN} = 27,6$  nm y  $\Delta_{LC} = 40$  nm. Ambas muestras de liposomas tienen el mismo solvente, una mezcla de agua con DMSO al 10%. La única diferencia se encuentra en la etanolamina presente en los LC. Esto sugiere que se produce alguna reacción, se plantea como hipótesis la formación de un enlace entre el grupo amino de la etanolamina y el grupo isotiocianato del FITC.

En los LC con FITC hay una pequeña diferencia entre el máximo del espectro de excitación, observado en la Fig.31 y el de absorción,  $\lambda = 501,0$  nm.

Por otra parte, en los LN con FITC, en el espectro de excitación no se distingue la banda de dímero y monómero observada en los espectros de absorción.



**Figura 32.** Espectro de emisión (línea discontinua) y excitación (línea continua) de liposomas sintetizados empleando Rho.B.

Por otro lado, los espectros de emisión y excitación de muestras con liposomas catiónicos y aniónicos sintetizados con Rho.B se muestran en la Fig.32. En este caso, los

espectros de excitación y emisión de los LC y los LN son ligeramente diferentes. Los desplazamientos de Stokes en cada caso son:  $\Delta_{LN} = 26,0$  nm y  $\Delta_{LC} = 23,5$  nm.

## 4 Conclusiones

Empleando la técnica de microscopía electrónica se ha podido realizar una caracterización en la morfología para diferentes rutas de síntesis.

En primer lugar, se ha observado como las diferentes técnicas de dispersión mecánica afectan claramente tanto a la formación como al tamaño de los liposomas. Por un lado, la sonicación en punta en general no proporcionaba muestras con un número significativo de liposomas, sin embargo la sonicación en baño sí, es especial cuando el tiempo de sonicación era alto, de  $t_{SB} = 30$  mín.

Se ha podido observar cómo aun empleando una misma técnica de dispersión y variando algunos parámetros se pueden conseguir poblaciones de liposomas con tamaños totalmente diferentes, un claro ejemplo se tiene al comparar los histogramas los LC cuando  $t_{SB} = 15$  mín con los LC con  $t_{SB} = 30$  mín, en la Fig.19.

También, se ha observado que la distribución de tamaño en los liposomas catiónicos, LC, puede ser controlada de forma efectiva empleando un baño de ultrasonido, logrando reducir el diámetro promedio de los LC hasta  $D = (67,4 \pm 365)$  nm, cuando se aplica sonicación en baño durante  $t_{SB} = 30$  mín. De este modo se consigue una población elevada de liposomas unilamelares pequeños (SUVs). Sin embargo, el mismo efecto no se produce en los liposomas aniónicos, LN, como máximo se ha logrado reducir la dispersión de tamaños en el rango  $R_{LN,W} \approx 80 - 890$  nm cuando el tiempo de sonicación es de  $t = 30$  mín.

También, se ha podido comprobar el efecto que produce el cambio de medio en la distribución de tamaños. Así, al emplear como solvente una mezcla de agua y dimetilsulfóxido (DMSO al 10%), en lugar de solo agua, se produce un aumento en el diámetro promedio y en el rango de la población de liposomas, especialmente este aumento es más significativo en los LC.

En base a la técnica de espectroscopía de absorción se ha comprobado que, aun siguiendo los mismos procesos de síntesis elegidos, bajo las mismas condiciones, el fondo de *scattering* cambia de una síntesis a otra. Por tanto, es un error emplear el fondo de dispersión para determinar la concentración de lípidos presentes en una muestra.

Además, se ha observado que el proceso de lavado resulta más efectivo en los LN que en los LC, posiblemente esto tenga su origen en el tamaño de los liposomas, el cual es mayor en los LN que en los LC.

Se ha podido determinar en base al mecanismo de adsorción, explicado en la Sec.1.7, que se produce adsorción de la Rho.B en los LC y los LN. Además, se ha podido estimar la concentración de Rho.B que ha sido adsorbida. Esta adsorción resulta ser mayor en los LN que en los LC. Esto puede ser por una mayor afinidad de la Rho.B a los LN o puede ser resultado únicamente de una diferente precipitación de los LN y los LC.

Independientemente de esto, la adsorción de la Rho.B ha quedado probada empleando un microscopio confocal.

Tras romper los liposomas mediante metanol, se ha podido determinar que la eficiencia de encapsulación de la Rho.B es mayor en los liposomas aniónicos que en los catiónicos. Nuevamente esto se explicaría por una mayor afinidad de la Rho.B a los LN. Sin embargo, este resultado podría ser consecuencia únicamente de la diferente precipitación de los LN y los LC.

La *Opc.1* presenta una menor EE(%) de la Rho.B que la *Opc.3*. A pesar de que los liposomas de la *Opc.1* puedan encapsular un mayor volumen de Rho.B. Una explicación se encuentra en la mayor superficie y por tanto mayor adsorción de la Rho.B a los liposomas pequeños de la *Opc.3*. Esto indicaría que la adsorción de la Rho.B predomina ante su encapsulación. Aunque, nuevamente estas diferencias en la EE(%) pueden solo ser resultado de diferentes precipitaciones.

Por otro lado, en las muestras con FITC, se ha encontrado que las bandas del FITC son afectadas considerablemente por la presencia de los LN y los LC. Encontrándose grandes bandas de monómero en los LC cuando se esperaría encontrar bandas de monómero y dímero a una misma intensidad. Esto sugiere que la presencia de los LC favorece la formación de monómeros.

Además, por la comparación de espectros con las mismas concentraciones de FITC se ha podido nuevamente observar que hay adsorción del FITC en los LC.

Un fenómeno particular se ha observado los LN con FITC, las bandas del *Sobr.1* son más intensas que las bandas de la disolución inicial a pesar de tener en principio la misma concentración de FITC, ello puede ser resultado de la desorción del FITC como consecuencia del centrifugado. El mismo fenómeno se observa entre los *Sobr.2* y *Sobr.3*, que a diferencia del caso anterior estas muestras tienen diferente concentración de FITC. Ello solo puede ser explicado fundamentalmente por la rotura de los liposomas.

Ante todas las alteraciones observadas en las bandas de absorción del FITC no se ha considerado oportuno estimar las concentraciones de adsorción.

Además, nuevamente para los liposomas con FITC se ha comprobado que las concentraciones de lípidos no pueden estimarse a partir de la dispersión de los liposomas y empleando curvas de calibración.

La eficiencia de encapsulación del FITC es mayor en los LC que en los aniónicos. Esto se explica a través de la mayor superficie que presentan los LC frente a los LN de mayor tamaño y con mayor volumen. Luego, nuevamente la adsorción parece jugar un papel importante en la EE(%). Además, en el esquema de la Fig.30, se observa que el FITC tiene mayores opciones en cuanto a ser adsorbido en los LC que en los LN.

Una explicación que no se descarta es la posible liberación de FITC por los LN, esto justificaría las bajas EE(%) en éstos.

Ante la pregunta ¿qué colorante se encapsula mejor? se ha recurrido a la carga útil, la cual indica que es con creces el FITC.

Por otro lado, ha sido posible observar a través de un microscopio confocal las localizaciones de los colorantes en los liposomas, y en base a esto se plantea como hipótesis que la adsorción del FITC y de la Rho.B es el mecanismo responsable de que los LC y los LN se visualicen en general sin colorantes en la región acuosa. Además, estas observaciones apoyan la hipótesis de que la adsorción es más importante que la encapsulación.

Por último, los diferentes espectros de excitación y emisión en los LC y LN con FITC sugieren que se produce alguna reacción entre el grupo amino de los LC y el FITC, dado que la etanolamina es lo único que distingue a los LC de los LN.

## Referencias

- [1] Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, et al. *Liposome: classification, preparation, and applications*. *Nanoscale Res Lett*. 8(1):102. 2013
- [2] Monteiro N, Martins A, Reis RL, Neves NM. *Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine*. *J R Soc Interface*. 11(101):20140459. 2014

- [3] Bozzuto G, Molinari A. *Liposomes as nanomedical devices*. Int J Nanomedicine. 10:975–999. 2015.
- [4] Greg T. *Chapter 21: Liposome Conjugates and Derivatives. Bioconjugate Techniques*. Academic Press. Third Edition. 2013.
- [5] Emeline R, Rumiana D, Petra S, Frederik R. Wurm L, Katharina L *Liposomes and polymersomes: a comparative review towards cell mimicking*. Chem. Soc. Rev. 47, 8572. 2018
- [6] Marta R. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Químicas. *Tesis doctoral: Fabricación de liposomas y de capsulas poliméricas*. Madrid 2013.
- [7] Tuan A, Quan D, Duc C and Mau C. *Micro and nano liposome vesicles containing curcumin for a drug delivery system*. Vietnam Academy of Science & Technology. 7:(035003). 2016.
- [8] Muhammad R., Muhammad I and Shafi U. *Chapter 8: Liposomes for targeted drug delivery in cancer therapy. Lipid-based Nanocarriers for Drug Delivery and Diagnosis*. Matthew Deans. First Edition. 2007.
- [9] Stephen B, Chief Scientific Officer at Avant(R) Polar Lipids. *Liposomes Preparation*. 1998.
- [10] Weilin L, Aiquian Y, Feifei H and Jianzhong H. *Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling*. Advances in Colloid and Interface Science 263, 52-57. 2019.
- [11] Greg T. *Chapter 9: Fluorescent Probes. Bioconjugate Techniques*. Academic Press. Second Edition. 2008
- [12] Rajarshi P, Murali K, Anjan K and Ramesh B. *Diverse effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on the differentiation potential of human embryonic stem cells*. Archives of Toxicology. 86(4):651-661. 2011.
- [13] Robson AL, Dastoor PC, Flynn J, et al. *Advantages and Limitations of Current Imaging Techniques for Characterizing Liposome Morphology*. Frontiers in Pharmacology. 9:80. 2018.
- [14] Ruozi B, Belletti D, Tombesi A, et al. *AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study*. Int J Nanomedicine. 6:577-563. 2011.
- [15] Zhang L, Tong H, Garewal M, Ren G. *Optimized negative-staining electron microscopy for lipoprotein studies*. Biochim Biophys Acta. 1830(1):2150–2159. 2013
- [16] Farzana K, Panpan L, Shuguang Y, Ying M and Yiping Q. *Concentration-dependent dye aggregation in the LbL-assembly of fluorescein isothiocyanate labeled poly(allylamine hydrochloride) and poly(acrylic acid) on cotton fabrics*. Dyes and Pigments. 142:358-364. 2017.

## 5 Apéndice

### 5.1. Apéndice A: Distribución de tamaños de los liposomas.

Para obtener los tamaños de los liposomas observados al TEM, se empleó el programa ImageJ. Primero se define la escala. Las imágenes TEM poseen una barra de escala TEM con una longitud en  $nm$  o  $\mu m$ . Sobre esta barra se ajustó una recta y luego, en *Analyze/Set Scale* se fijó la distancia conocida de la barra TEM y las unidades de esta longitud.

Entre las diferentes funcionalidades del programa, se encuentra el comando "Analyze particles", el cual permite contar y medir objetos en imágenes binarias. Así, para utilizar esta opción se ajustó inicialmente el *brillo/contraste* de la imagen, y el umbral o *Threshold* de tal manera que los liposomas se marcaran en negro sobre un fondo blanco.

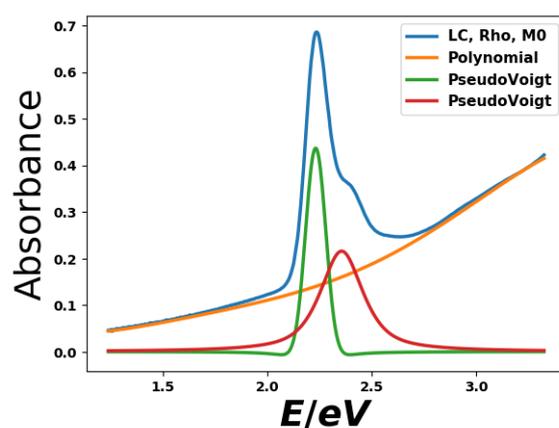
Luego, en *Analyze/Set Measurements* se seleccionó la opción *Fit ellipse*, de este modo a los objetos detectados por *Analyze particles*, se les ajustará una elipse y se obtendrá información como la longitud de los ejes primario y secundario de la mejor elipse de ajuste sobre los liposomas.

A continuación, en *Analyze/Analyze particles* se fijó un tamaño estimado máximo posible de los liposomas en *Size* y se marcó la opción *Add to Manager*, esta última herramienta es muy útil ya que permite seleccionar liposomas que no hayan sido registrados por el comando *Analyze*, eliminar objetos que no sean liposomas y hayan sido seleccionados, además de que proporciona la opción de etiquetar los objetos encontrados, máscaras de selección y la información de los objetos encontrados como las longitudes de los ejes mayor y menor de las elipses de ajuste a los liposomas.

Se creó un programa Python que tratase estos datos y retornase los histogramas de los liposomas.

### 5.2. Apéndice B: Eliminación de la contribución por dispersión

Para determinar los máximos de las bandas de absorción del colorante, ya sea RhoB o FITC, se han realizado ajustes de funciones a todos los espectros UV-Vis para poder eliminar el fondo de dispersión de los liposomas más adecuadamente. Se han utilizado en



**Figura 33.** Espectros de absorción UV-Vis de una muestra de liposomas catiónicos con RhoB en azul. Curvas de ajuste: polinomio de orden 4, en naranja; y dos funciones PseudoVoigt, en rojo y verde.

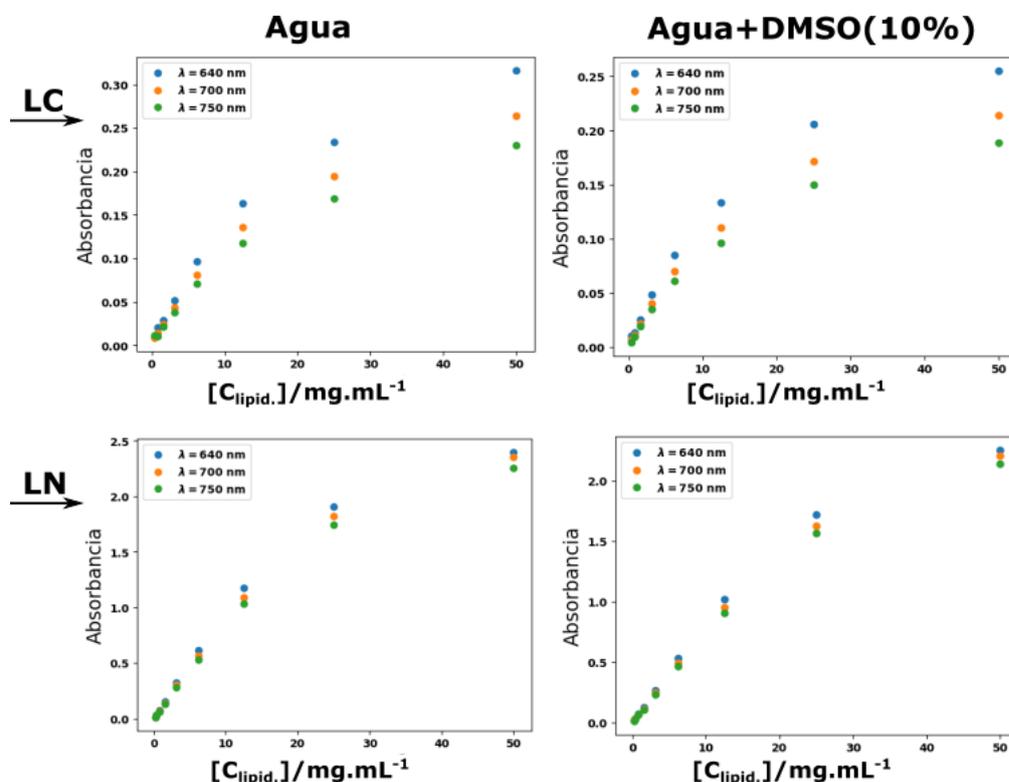
todos los casos funciones PseudoVoigt y un polinomio de 4to grado como se observa en la Fig.33.

El espectro que se presenta corresponde a una muestra de liposomas catiónicos con Rho.B antes de realizar el proceso de lavado (en azul). Para eliminar su fondo de dispersión basta restar únicamente el polinomio de 4to grado a los datos del espectro de la muestra. Las funciones PseudoVoigt se han incluido solo para obtener un mejor ajuste del polinomio de 4to grado.

### 5.3. Apéndice C: Curvas de calibrado obtenidas.

Aquí se presentan las curvas de calibración que se obtuvieron con el objetivo de poder determinar la concentración de lípidos, de Rodamina B y del Isotiocianato de Fluoresceína en las diferentes partes del proceso de lavado y de rotura de liposomas.

Las curvas de calibración para estimar la concentración de lípidos se muestran en la Fig.34. Se muestran a modo de ejemplo únicamente las que corresponden a la opción de síntesis 1. Para obtenerlas se sintetizaron liposomas aniónicos y catiónicos sin emplear colorante. Los medios de hidratación empleados han sido: Agua y una mezcla de agua y DMSO (al 10%). Las longitudes de onda empleadas corresponden a regiones lejos de las bandas características de la Rho.B y el FITC.

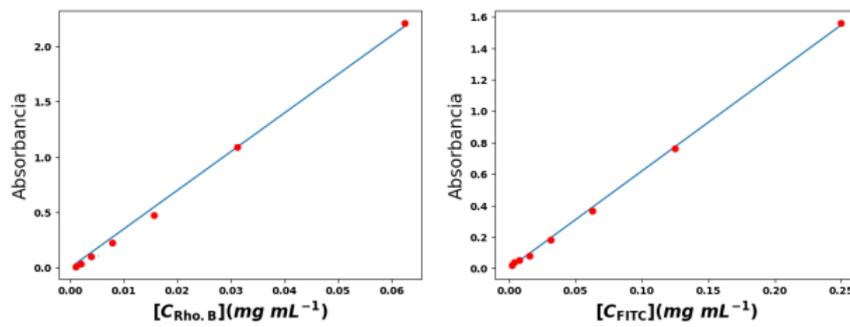


**Figura 34.** Curvas de calibración para determinar la concentración de lípidos. Se indican en las leyendas las longitudes de onda elegidas.

La concentración de Rodamina B (Rho.B) en el proceso de lavado ha sido estimada a partir de la curva de calibración mostrada en la Fig.35. El solvente empleado para la Rho.B fue agua desionizada. Aunque no se ha empleado se muestra la curva de calibración del FITC para una mezcla de agua y DMSO (al 10%). Las ecuaciones de la recta de ajuste de estas curvas de calibración son:

$$\text{Rho.B : } (\lambda = 554,0 \text{ nm}) \quad \text{Absorb} = (37,9 \pm 1,1) [C_{\text{Rho.B}}]$$

$$\text{FITC} : (\lambda = 501,0 \text{ nm}) \quad \text{Absorb} = (6,19 \pm 0,08) [C_{\text{FITC}}]$$

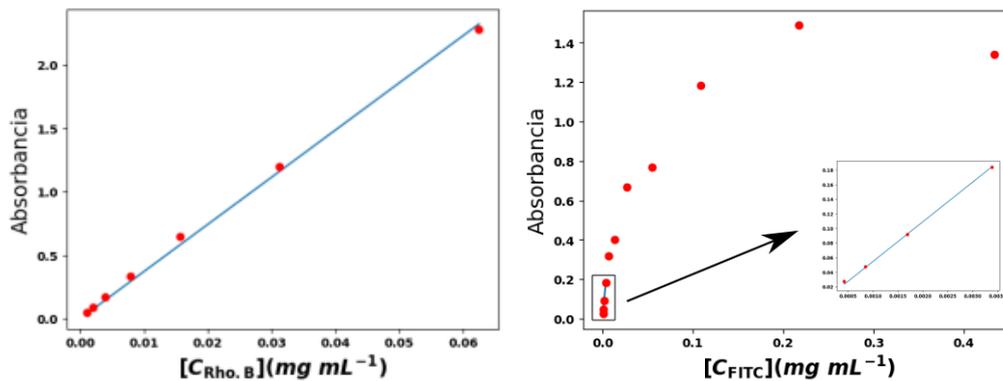


**Figura 35.** Curvas de calibración de la Rho.B (izq) y del FITC(der).

Las curvas de calibración para la Rho.B y el FITC empleando como solvente metanol se presentan en la Fig.36. Estas fueron empleadas para determinar la concentración de colorante después de romper los liposomas. Las rectas de ajuste obtenidas de las curvas de calibración son:

$$\text{Rho.B} : (\lambda = 554,0 \text{ nm}) \quad \text{Absorb} = (37,1 \pm 0,6) [C_{\text{Rho.B}}]$$

$$\text{FITC} : (\lambda = 499,0 \text{ nm}) \quad \text{Absorb} = (54,7 \pm 0,7) [C_{\text{FITC}}]$$



**Figura 36.** Curvas de calibración de la Rho.B (izq) y del FITC(der).

Observase que en el caso del FITC en metanol presenta un comportamiento que no se ajusta a la ley de Lambert-beer a altas concentraciones de FITC. Sin embargo, esto se ha tenido en cuenta. Las concentraciones de FITC en las muestras finales con los liposomas rotos son lo suficientemente pequeñas para ajustarse a la zona donde si se cumple la ley.