

NUEVO PROCEDIMIENTO DE CLORACIÓN DE LA LANA UTILIZANDO LIPOSOMAS UNILAMELARES FORMADOS POR MEZCLAS DE LÍPIDOS

A. de la Maza*, L. Coderch**, A.M. Manich*** y J.L. Parra****

0.1. Resumen

Se investiga la utilización de liposomas formados por fosfatidilcolina (PC) y colesterol (CH) como vehículos de hipoclorito sódico en la cloración de la lana. A tal fin, se ha estudiado la interacción de dichos liposomas a diferentes relaciones molares de ambos componentes (PC:CH desde 10:0 hasta 8:2) con soluciones cloradas a fin de determinar la estabilidad físico-química de los liposomas a la acción de dicho agente oxidante. Su estabilidad física se ha estudiado midiendo tanto los cambios en la absorbancia de dichas suspensiones, directamente relacionados con la agregación o solubilización de los liposomas, como el tamaño medio de sus partículas. El estudio de la estabilidad química de los liposomas se ha basado en la determinación del índice de peroxidación de los lípidos constitutivos de dichos liposomas a diferentes concentraciones de cloro activo a un valor de pH de 6.5. Los efectos oxidativos causados por las soluciones cloradas sobre la lana a pH 1.5 se han estudiado analizando la formación de ácido cisteínico en la lana clorada en función de los tratamientos oxidativos realizados, tanto directamente por el procedimiento convencional como vía liposomas. Cantidades crecientes de colesterol en los liposomas aumentaron la estabilidad físico-química de estos liposomas frente al agente oxidante y disminuyeron la formación de ácido cisteínico en las muestras de lana clorada.

Palabras clave: Lana, cloración, liposomas, fosfatidilcolina, colesterol, estabilidad a la oxidación, índice oxidación, hidrólisis, ácido cisteínico.

0.2. Summary. NEW WOOL CHLORINATION PROCEDURE USING UNILAMELLAR LIPOSOMES FORMED BY MIXTURES OF LIPIDS

The use of unilamellar liposomes of defined size (200 nm) formed by phosphatidylcholine (PC) and containing cholesterol (CH) as vehicles for oxidative reagents in chlorination of wool fibres has been investigated. To this end, the interaction between lipid vesicles formed by different mixtures of both lipid components (PC:CH mole ratios from 10:0 to 8:2) and chlorine was firstly studied to determine the physicochemical stability of these systems in the presence of this oxidative agent. Similarly, the study of the physical stability of liposomes was undertaken both through the changes in the absorbance of the vesicle suspensions, directly related to the aggregation or solubilization of liposomes, and by measuring the mean particle size distribution of these liposome dispersions. The study of chemical stability was based on the lipid peroxidation index of liposomes at different chlorine concentrations at pH value 6.5. As regards the oxidative effects caused by the chlorine treatments of wool applied directly or by means of liposomes at pH 1.5, the extent of the cysteic acid formation groups in wool fibres was investigated. Increasing amounts of cholesterol in liposomes enhance both the physicochemical stability of these systems and the inhibitory ability of cysteic acid formation when samples have been treated with chlorine-liposome systems

Key words: Wool, chlorination, liposomes, phosphatidylcholine, cholesterol stability, peroxidation index, hydrolysis, cysteic acid.

0.3. Résumé. NOUVELLE PROCÉDURE DE CHLORATION DE LA LAINE EN UTILISANT DES LIPOSOMES UNILAMELLAIRES FORMÉS PAR DES MÉLANGES DE LIPIDES

Il s'agit d'étudier l'utilisation de liposomes formés de phosphatidylcholine (PC) et de cholestérol (CH) pour véhiculer l'hypochlorite de sodium dans la chloration de la laine. A cet effet, nous avons étudié l'action entre ces liposomes, avec différents rapports molaires pour les deux composants (PC:CH de 10:0 à 8:2), et les solutions chlorées, afin de déterminer la stabilité physico-chimique des liposomes sous l'action de cet agent oxydant. Leur stabilité physique a été étudiée en mesurant aussi bien les

* Dr. A. de la Maza, Colaborador de Investigación en el Departamento de Tensioactivos del Centro de Investigación y Desarrollo (C.I.D.) de Barcelona, del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

** Dra. L. Coderch, Colaboradora de Investigación en el Departamento de Tensioactivos en el C.I.D. de Barcelona, del C.S.I.C.

*** Dr. A.M. Manich, Colaborador de Investigación en el Departamento de Ecotecnologías del C.I.D. de Barcelona, del C.S.I.C.

**** Dr. J.L. Parra, Investigador del Departamento de Tensioactivos en el C.I.D. de Barcelona, del C.S.I.C.

changements dans l'absorptivité de ces suspensions, directement liées à l'agrégation ou à la solubilisation des liposomes, que la taille moyenne de leurs particules. Pour étudier la stabilité chimique des liposomes, nous avons déterminé l'indice de peroxydation des lipides constitutifs de ces liposomes à différentes concentrations de chlore actif avec une valeur de pH de 6,5. Les effets oxydatifs causés par les solutions chlorées sur la laine à pH 1,5, ont été étudiés en analysant la formation de l'acide cystéinique dans la laine chlorée en fonction des traitements oxydatifs, réalisés soit directement selon la procédure conventionnelle, soit en passant par les liposomes. Des quantités croissantes de cholestérol dans les liposomes ont augmenté leur stabilité physico-chimique face à l'agent oxydant et ont diminué la formation d'acide cystéinique sur les échantillons de laine chlorée.

Mots clés: laine, chloration, liposomes, phosphatidilcholine, cholestérol, stabilité à l'oxydation, indice oxydation, hydrolyse, acide cystéinique.

1. INTRODUCCIÓN

La reacción de fibras queratínicas tales como la lana con soluciones acuosas de hipoclorito sódico han sido extensamente estudiadas, prestando especial atención a las reacciones oxidativas que dan lugar a modificaciones físico-químicas de dichas fibras. La composición de las especies oxidantes de las soluciones acuosas de hipoclorito sódico varía con el pH de las mismas¹. Así, a pH inferior a 2,0 predomina el cloro libre, mientras que a valores de pH entre 3 y 6 predomina el ácido hipocloroso y a valores de pH superiores predomina la especie hipoclorito. En consecuencia, la oxidación promovida por el hipoclorito sódico sobre la lana depende directamente del valor del pH de la disolución a la que se aplique^{2,3}.

Los procesos de cloración en medio ácido oxidan preferentemente los residuos de cistina de la lana convirtiéndolos en residuos de ácido cisteínico a través de la formación de productos intermedios de oxidación. En términos generales, los procesos tecnológicos actuales relacionados con el procesado textil de la lana tienden a sustituir la cloración de la fibra por otros procedimientos de menor efecto degradativo y a la vez de mayor posibilidad de control, o bien a evitar este tratamiento oxidativo^{4,5,6}.

Los liposomes son estructuras vesiculares fosfolipídicas que se han desarrollado rápidamente por sus aplicaciones tanto como modelos de membrana como en aplicaciones de encapsulación y protección de distintas sustancias^{7,8,9}. Estas vesículas se aplican también como transportadores de distintos agentes al interior de células en experimentos "in vitro" tanto para agentes de naturaleza hidrofílica como lipofílica. La inclusión de colesterol en las membranas lipídicas da lugar a un

efecto condensante de dichas estructuras que tiende a retardar la penetración de proteínas en dichas membranas disminuyendo su permeabilidad¹⁰. La presencia de este componente es también un factor muy importante para obtener formulaciones de liposomes más estables en medios biológicos y más adecuados como carriers de distintos productos químicos¹¹.

En trabajos previos, se ha investigado en nuestro laboratorio el uso de liposomes constituidos por fosfatidilcolina como vehículos de soluciones acuosas de hipoclorito sódico en la cloración de la lana¹². Dicha aplicación ha demostrado ser una interesante alternativa al proceso de cloración convencional obteniéndose una mejora en la regularidad y homogeneidad de estos tratamientos y minimizando el deterioro sobre la lana.

En el presente trabajo, dado que el colesterol es uno de los componentes más importantes de los lípidos internos de la lana¹³, se ha estudiado el efecto causado por la inclusión de dicho lípido en liposomes constituidos por fosfatidilcolina a fin de obtener mejoras en el proceso ya estudiado cloración de la lana vía liposomes. A tal fin, se ha estudiado la estabilidad física de dichas suspensiones de liposomes en presencia de soluciones de hipoclorito sódico a distintas concentraciones y para liposomes constituidos por diferentes composiciones lipídicas (relaciones molares PC:CH, entre 10:0 y 8:2). El estudio de la estabilidad química de los liposomes se ha basado en la determinación del índice de peroxidación de los lípidos constitutivos de dichos liposomes a diferentes concentraciones de cloro activo a un valor de pH de 6.5. En relación con los efectos oxidativos causados por las soluciones de hipoclorito sódico sobre la lana se ha estudiado la formación de ácido cisteínico en la lana clorada en función de los tratamientos oxidativos realizados, comparando los resultados obtenidos en cloraciones realizadas por el procedimiento convencional con aquellos obtenidos vía liposomes para un rango de concentraciones lipídicas comprendido entre 0.5 y 25 mM.

2. EXPERIMENTAL

2.1. Materiales

Se utilizó lana Merino Australiana 64,S. Las muestras fueron extraídas con Soxhlet durante 2 horas con cloruro de metileno y lavadas con agua purificada por el método de Milli-Ro (Millipore), a fin de extraer todos sus componentes contaminantes. Las muestras se secaron a temperatura ambiente.

La fosfatidilcolina (PC) se purificó a partir de lecitina de huevo (Merck) según el método descrito por Singleton¹⁴, comprobándose su pureza por TLC. La composición en ácidos grasos de la PC determinada por GLC, fue la siguiente: ácido palmítico (16:0), 37,7 %, ácido esteárico (18:0), 7,08

%, ácido oleico (18:1), 36,4 %, ácido linoleico (18:2), 17,5 %,

El colesterol (CH) fue suministrado por Sigma. La solución de hipoclorito sódico del 8% peso/volumen en cloro activo fue suministrada por Carlo Erba

Las membranas de policarbonato de tamaño de poro de 200, 400 y 800 nm utilizadas para la extrusión de liposomas fueron suministradas por Nucleopore.

2.2. Métodos

2.2.1. Preparación de liposomas unilamelares (LUV)

Suspensiones de liposomas unilamelares (LUV) de un tamaño definido de partícula (200 nm), a diferentes concentraciones de lípido (entre 1.0 y 25.0 mM) y conteniendo diversas concentraciones de hipoclorito sódico, se prepararon esencialmente siguiendo el método descrito por Bangham que se describe a continuación de forma resumida¹⁵.

Se formó un film de lípido en un matraz apropiado por eliminación del disolvente orgánico. Dicha evaporación se realizó bajo atmósfera de nitrógeno y vacío suave (350 mm Hg) por evaporación rotatoria de la solución de cloroformo que contenía los lípidos disueltos fosfatidilcolina/colesterol (relaciones molares 10:0, 9:1 y 8:2). A continuación se añadió una fase acuosa conteniendo KCl (200 mM) y diferentes concentraciones de hipoclorito sódico (0,07%, 0,14 % y 0,28% Cl₂ peso/volumen). Las soluciones se agitaron circularmente utilizando rotavapor. Se obtuvieron así suspensiones lechosas de liposomas que fueron nuevamente agitadas con vórtex durante 5 minutos. Las suspensiones de liposomas fueron entonces extruídas a través de membranas de policarbonato de tamaños de 800, 400 y 200 nm a fin de obtener un tamaño uniforme de vesícula¹⁶. El pH de la suspensión se ajustó a 6.5 con ácido clorhídrico 4 N. Finalmente, se determinó el contenido en cloro de las suspensiones de liposomas obtenidas por el método iodométrico¹⁷.

2.2.2. Cloración de fibras de lana

Se trataron fibras de lana Merino (1 g) con las suspensiones de liposomas unilamelares (70 ml) recientemente preparados a diferentes concentraciones de lípidos (de 1.0 a 25.0 mM) y conteniendo tres diferentes concentraciones de sodio hipoclorito (0,07%, 0,14 % y 0,28% Cl₂ peso/volumen), después de ajustar el pH de las suspensiones de liposomas a 1.5 con ácido clorhídrico (tampón KCl/HCl). Los tratamientos se realizaron durante un período de 15 minutos a una temperatura de 20°C con agitación constante en un matraz cerrado. Después de los tratamientos, las muestras fueron lavadas con agua y tratadas con una solución de metabisulfito sódico al 1%,

manteniendo una relación de baño 1/30 y durante un período de 5 minutos a fin de eliminar el exceso de reactivo oxidante. Las muestras de lana clorada se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente.

2.2.3. Estabilidad de las preparaciones de liposomas y caracterización química

El tamaño medio y la polidispersidad de las preparaciones de liposomas unilamelares se determinó utilizando el Espectrómetro Foton Correlador (Malvern Autosizer II C). Las muestras se ajustaron al rango de concentraciones adecuado utilizando una solución de 200 mM KCl a pH 6.5. Las lecturas se realizaron a 20°C con un ángulo de lectura de 90°.

El estado de agregación de las vesículas se estimó como una medida del grado de estabilidad física de los liposomas. Estas medidas se realizaron midiendo las variaciones en absorbancia de las suspensiones de liposomas (concentración de lípido 5.0 mM) utilizando el espectrofotómetro Shimadzu UV 265 FW (a una longitud de onda de 500 nm, para una cubeta de 0,2 cm de anchura), así como midiendo las variaciones de la distribución media de tamaño de las vesículas de los liposomas a lo largo del tiempo.

La concentración de lípido de las suspensiones de liposomas se determinó por medio del método espectrofotométrico del ácido ascórbico para valoración del fósforo total¹⁸.

Según Kelen¹⁹, la relación entre las adsorbancias a 233 y 215 nm puede tomarse como una medida de la peroxidación de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos constitutivos de liposomas. En el presente trabajo se determinó la presencia de dienos conjugados después de añadir 0,1 ml de una preparación determinada de liposomas (concentración de lípidos 20 mM en una solución acuosa 200 mM de KCl) a 3,0 ml de etanol absoluto, midiendo la adsorbancia en una cubeta de 1.0 cm de anchura a 233 nm y 215 nm, utilizando un espectrofotómetro Shimadzu UV-240.

Los lípidos contenidos en las preparaciones de liposomas se separaron por repetidas extracciones con hexano, separándose por eliminación del disolvente. La composición en ácidos grasos se determinó cuantitativamente como derivados de ésteres metílicos²⁰, en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5840 A G.C. equipado con detector de ionización a la llama utilizando ácido heptadecanoico como patrón interno. Los ésteres metílicos de los ácidos grasos se prepararon por el método de diazometano²¹.

2.2.4. Determinación del grado de oxidación de la lana

El estado de oxidación de las fibras de lana se determinó midiendo el contenido en ácido

cisteínico de las muestras de lana cloradas según el método descrito por la International Wool Textile Organization (IWTO)²².

3. RESULTADOS

3.1. Estabilidad física de las preparaciones de liposomas

Los cambios en el tamaño medio de las vesículas liposómicas unilamelares debidos a fenómenos de agregación o solubilización fueron determinados analizando los cambios producidos en la adsorbancia de las suspensiones indicadas, así como determinando el tamaño medio de distribución de dichas vesículas. Estas determinaciones se realizaron utilizando técnicas espectrofotométricas así como técnicas de determinación de quasi-elastic light scattering^{23,24} respectivamente. La concentración de cloro presente en cada una de las suspensiones de liposomas se indica como la relación molar existente entre los componentes cloro y lipido, que en este trabajo se define por la constante K.

La Figura 1 indica los cambios en la densidad óptica de suspensiones de liposomas

conteniendo cloro a un valor de pH 6.5, para diferentes relaciones molares K en función del tiempo. En dicha Figura puede observarse que los valores de densidad óptica decrecen linealmente con el tiempo, siendo este proceso especialmente acusado para valores de K superiores a 40 (disminución del 20 % de adsorbancia tras 4-6 horas de interacción para valores de K= 40). Para valores de K menores de 5, los cambios de adsorbancia de estos sistemas con respecto al tiempo se redujeron considerablemente. Así, para valores de K= 5,0, solamente se observó el 30% de disminución en los valores de adsorbancia transcurridas 24 horas de la preparación de las mencionadas suspensiones. Además, cantidades crecientes de colesterol en las bicapas lipídicas dieron lugar a un aumento en la estabilidad de estas estructuras independientemente de la relación K (relacion molar cloro/lípido). Así, las suspensiones de liposomas para una K = 5 y conteniendo la mayor proporción relativa de colesterol (relación molar PC:CH 8:2) solamente experimentaron una disminución en los valores de adsorbancia aproximadamente del 20% transcurridas 24 horas después de la preparación de las mencionadas suspensiones.

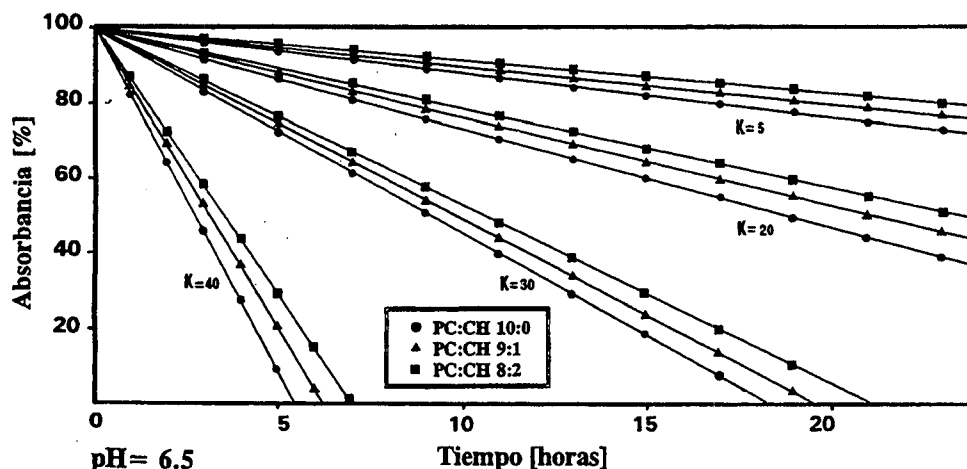


FIGURA 1: Variación de la adsorbancia de LUV liposomas conteniendo cantidades crecientes de colesterol en las bicapas (relaciones molares PC:CH comprendidas entre 10:0 y 8:2) a diferentes relaciones molares cloro/lípido (K), a pH 6.5 con respecto al tiempo.

Asimismo, en la Tabla 1 se indican las variaciones del tamaño medio de las vesículas de liposomas con el tiempo para un valor de K = 5.0. Puede observarse un ligero descenso en el tamaño medio de las partículas con el tiempo, aunque el coeficiente de polidispersidad se mantiene inferior a 0.25 incluso transcurridas 24 horas de la preparación de dichas suspensiones. Es interesante señalar que la presencia de cantidades crecientes de colesterol en los liposomas aumentó la estabilidad de estas

estructuras en relación a su agregación, mejorando tanto el tamaño medio de partículas como sus índices de polidispersidad. Los resultados indicados en dicha Tabla son coherentes con los presentados en la Figura 1.

TABLA 1

Variaciones del tamaño medio y polidispersidad de suspensiones de liposomas conteniendo cantidades crecientes de colesterol (relaciones molares PC:CH 10:0, 9:1 y 8:2) a pH 6.5 para una relación molar K= 5.0 en función del tiempo

COMPOSICION LIPIDICA	TIEMPO (HORAS)															
	1		2		4		8		12		16		20		24	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
PC:CH 10:0	202	0.113	203	0.118	198	0.126	189	0.140	188	0.148	182	0.158	178	0.175	170	0.194
PC:CH 9:1	200	0.112	201	0.115	199	0.117	197	0.124	193	0.138	190	0.146	184	0.156	180	0.185
PC:CH 8:2	201	0.110	200	0.112	200	0.114	199	0.116	196	0.123	194	0.132	187	0.147	185	0.176

A tamaño medio de partícula
 B índice de polidispersidad

3.2. Estabilidad a la oxidación de las preparaciones de liposomas

Las interacciones oxidativas que se producen entre las soluciones de hipoclorito sódico contenidas en los liposomas y las bicapas lipídicas pueden presentar dos formas de degradación en sistemas acuosos en función del valor del pH y de la concentración de cloro existente en el medio de reacción. Así, puede producirse hidrólisis de los enlaces éster con formación de compuestos lisofosfátidos y ácidos grasos libres, o bien puede producirse oxidación de las cadenas hidrocarbonadas de dichos ácidos grasos. En este trabajo se determinaron las concentraciones de ácidos grasos libres resultantes de la mencionada hidrólisis por cromatografía de gases (GLC^{20,21}), y la formación de dienos conjugados en los ácidos grasos insaturados se terminó midiendo el índice de oxidación definido como el cociente de los valores

de adsorción óptica de las suspensiones de liposomas medidos a 233 nm y 215 nm. Estas relaciones de adsorbancia se consideraron como una medida del nivel peroxidación lipídica^{19,25}.

3.2.1. Determinación de dienos conjugados

El incremento de la peroxidación lipídica de las cadenas hidrocarbonadas de los ácidos grasos componentes de los lípidos estudiados implica un incremento de la adsorción a 233 nm, mientras que los valores de adsorción a 215 nm permanecen constantes hasta que la relación de adsorción entre 233 nm y 215 nm alcanza el valor máximo de 0,8. El parámetro "índice de oxidación" solo puede ser utilizado de manera reproducible para valores inferiores a 0,8²⁵) y durante los instantes iniciales de procesos en los que se produce una peroxidación rápida.

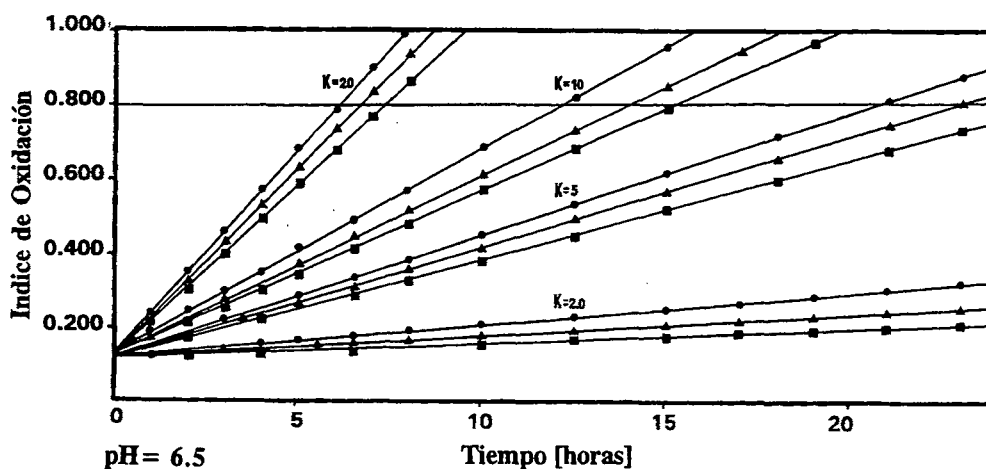


FIGURA 2: Variación del índice de peroxidación de LUV liposomas conteniendo cantidades crecientes de colesterol en las bicapas (relaciones molares PC:CH comprendidas entre 10:0 y 8:2) a diferentes relaciones molares cloro/lípido (K), a pH 6.5 con respecto al tiempo.

En la Figura 2, se indican los "índices de peroxidación" de suspensiones de liposomas unilamelares (LUV) conteniendo diferentes concentraciones de hipoclorito sódico (concentración de lípido 20.0 mM), a pH 6,5 representados frente al tiempo. Puede observarse que los valores del "índice de peroxidación" aumentan linealmente con el tiempo para cada una de las relaciones molares cloro/lípido (K) en las diferentes suspensiones de liposomas estudiadas. Así, para valores de K del orden de 20, la peroxidación lipídica aumenta rápidamente (índice de peroxidación de 0,8 después de 6-7 horas de tratamiento), mientras que para valores de K menores, el incremento del índice de peroxidación no es tan rápido, siendo necesarias aproximadamente 21 horas para detectar valores de dicho índice del orden de 0,8 para una relación de K de aproximadamente 5.0. Además, la presencia de cantidades crecientes de colesterol en las bicapas lipídicas hacen estas vesículas progresivamente más resistentes a la peroxidación lipídica, especialmente para valores de K inferiores a 5.0.

3.2.2. Hidrólisis de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos

Se realizaron análisis secuenciales de la composición de ácidos grasos de los lípidos por cromatografía de gases, a fin de determinar los cambios en las concentraciones de ácidos grasos de las suspensiones de liposomas en función del tiempo, en presencia de soluciones de hipoclorito sódico a pH 6.5 y con relaciones molares de cloro/lípido (K) de 2.5. Los resultados obtenidos nos indican que las suspensiones de liposomas investigadas, durante 24 horas (tomando muestras cada hora) no presentaban reacciones de hidrólisis de los enlaces de éster de las moléculas de lípido,

por lo que solamente se detectaron las moléculas del ácido heptadecanoico utilizado como patrón interno.

En términos generales, la presencia de hipoclorito sódico en el interior de los liposomas puede ser considerado el factor determinante de la estabilidad físico-química de dichas estructuras. En este sentido, considerando que el ácido hipocloroso predomina a pH 6.5 tanto en el interior de las vesículas, como en el medio acuoso que las rodea, podemos concluir de los resultados obtenidos que la estabilidad de estos sistemas respecto al tiempo depende directamente tanto de la relación molar existente entre el agente oxidante y los lípidos. Sólo para valores de K inferiores a 2.0 puede apreciarse a este valor de pH sistemas físico-química estables para un período de 24 horas. La presencia de cantidades crecientes de colesterol en las bicapas da lugar a un aumento de estabilidad de dichos sistemas tanto con respecto a la peroxidación lipídica como a la agregación de vesículas.

3.2.3. Tratamientos de muestras de lana con liposomas conteniendo cloro

Fibras de lana se trataron con suspensiones de liposomas conteniendo cloro a pH 6.5 y posteriormente ajustadas a pH 1,5 según las especificaciones experimentales detalladas anteriormente. La Figura 3 indica el contenido en ácido cisteínico (micro moles/g de lana) de muestras de lana tratadas con liposomas conteniendo cloro a tres concentraciones de dicho componente oxidativo (0,07%, 0,14% y 0,28% peso/volumen), para un intervalo de concentraciones de dicho componente comprendido entre 0 y 25.0 mM para tres diferentes composiciones lipídicas (relaciones molares PC:CH 10:0, 9:1 y 8:2).

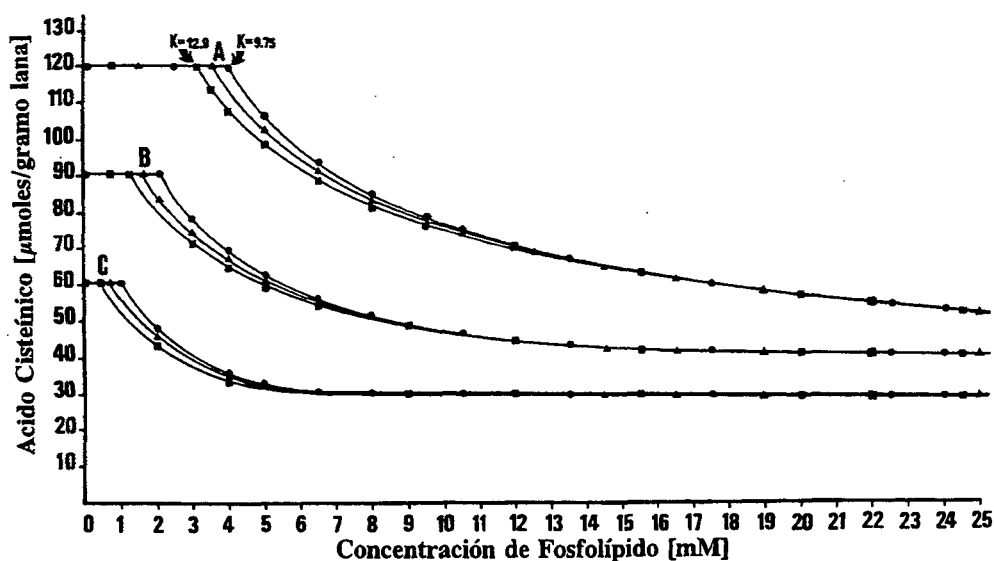


FIGURA 3: Variación en el contenido de ácido cisteínico de las muestras de lana coloradas por medio de LUV liposomas conteniendo cantidades crecientes de colesterol en las bicapas (relaciones molares PC:CH comprendidas entre 10:0 y 8:2) a tres diferentes concentraciones de cloro activo (A=0.28%, B= 0.14% y C=0.07% w/v) con respecto a la concentración lipídica de los liposomas.

Puede observarse una clara inhibición (50% aproximadamente) en la formación del ácido cisteínico para las tres concentraciones de cloro investigadas. Esta inhibición parece estar estrechamente relacionada con la relación molar existente entre el cloro y los lípidos presentes en los liposomas. La presencia de cantidades crecientes de colesterol en las bicapas dio lugar a un aumento en la capacidad de los liposomas de inhibir la oxidación de la lana. Así, en el tratamiento de las lana a una concentración de cloro activo del 0.28% (curvas A), los liposomas que contenían la máxima concentración de colesterol (relación molar PC:CH 8:2) dieron lugar a una inhibición en la formación del ácido cisteínico a partir de un valor de $K=12.9$, mientras que liposomas sin colesterol manifestaron esta capacidad a partir de menores valores de K ($K=9.75$). En consecuencia, en el primer caso menores concentraciones de lípido fueron necesarias para iniciar este efecto inhibitorio. Una tendencia similar se observó para todas las concentraciones de cloro estudiadas (curvas B y C correspondientes a concentraciones de cloro activo del 0.14 y 0.07% respectivamente).

Al representar la relación molar cloro/lípido (K) necesaria para iniciar la capacidad inhibitoria de formación de ácido cisteínico en la lana clorada frente a la concentración de cloro activo en los liposomas, se obtienen las curvas indicadas en la Figura 4. Es interesante observar que los liposomas que contenían la mayor concentración de colesterol en sus bicapas (relación molar PC:CH 8:2) inhibieron en todos los casos la formación de ácido cisteínico para mayores valores de K . Sin embargo, esta capacidad inhibitoria disminuyó a medida que aumentó la concentración en cloro activo en los liposomas con una relación molar PC:CH 10:0 y 9:1.

Respecto a la estabilidad físico-química de los liposomas conteniendo cloro activo a pH 1.5, durante los tratamientos de lana, cuando el valor de K fue aproximadamente 2.0, se produjo tras una hora de tratamiento una total hidrólisis de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos. En este caso los ácidos grasos de C16, C18, C18:1 y C18:2 se detectaron por cromatografía de gases en la misma proporción que en la que existen en la molécula fosfolipídica. Asimismo, el índice de peroxidación se incrementó rápidamente alcanzando valores de 0.8 en el mismo período de tiempo. Asimismo, la distribución del tamaño medio de las vesículas durante dichas aplicaciones mostró una rápida degradación de dichas vesículas. Ambos efectos oxidativos se produjeron como consecuencia de la presencia de la especie química de cloro libre en la suspensión de liposomas a dicho valor de pH.

En nuestra opinión, la mayor contribución de este trabajo es presentar algunos aspectos relacionados con el efecto inhibitorio en la formación de ácido cisteínico en procesos de cloración de la lana por aplicación de sistemas de liposomas

formados por fosfatidilcolina y colesterol a diferentes relaciones molares de ambos componentes y conteniendo distintas concentraciones de dicho agente oxidante. La inclusión de colesterol en las bicapas lipídicas ha demostrado ser un factor muy importante a fin de obtener formulaciones de liposomas mas estables con respecto a las soluciones de hipoclorito sódico a valores de pH neutros, siendo también especialmente adecuados como carriers en procesos de coloración de la lana a pH ácido. Estos factores pueden tener interesantes aplicaciones tecnológicas, tanto en los mencionados procesos de cloración de la lana como en otras etapas del procesado industrial de la misma. En particular, durante los procesos convencionales de cloración, existe una fuerte afinidad entre el cloro activo y las fibras de lana, la cual determina una reacción demasiado rápida e irregular. Esta irregularidad puede afectar a los procesos subsiguientes del acabado de la lana tales como tintura, procesos de antiencogimiento etc. La presencia de colesterol en los liposomas puede inhibir el exceso de oxidación que se produce en la cloración de la lana en ausencia de dichos liposomas o usando liposomas unicamente constituidos por fosfatidilcolina, promoviendo un mas regular ataque oxidativo de la superficie de las fibras y aumentando la eficacia de los tratamientos posteriores ya mencionados.

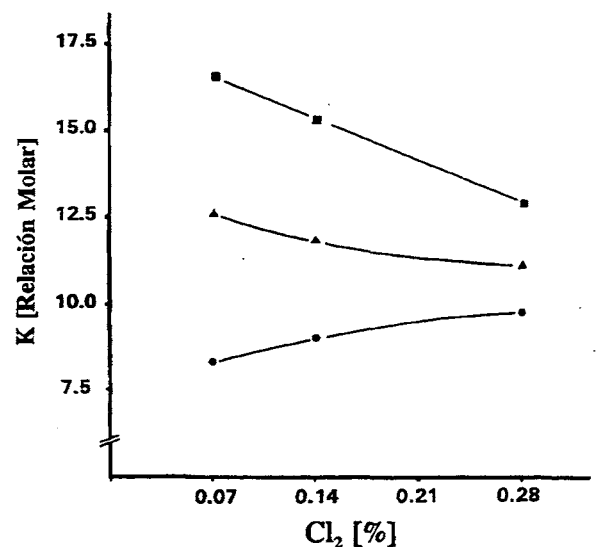


FIGURA 4: Variación de la relación molar cloro/lípido necesaria para promover la capacidad inhibitoria de formación de ácido cisteínico en muestras de lana coloradas por medio de LUV liposomas conteniendo cantidades crecientes de colesterol en las bicapas (relaciones molares PC:CH comprendidas entre 10:0 y 8:2) con respecto a la concentración de cloro en los liposomas (%).

4. CONCLUSIONES

4.1. De los resultados expuestos se puede concluir que un nuevo método de cloración de la lana a pH ácido vía liposomas puede ser considerado adecuado para inhibir o modular la formación de ácido cisteínico en las fibras de lana. La presencia de colesterol en dichas bicapas lipídicas mejora tanto la estabilidad de los liposomas a la agregación como su aplicabilidad en los procesos de cloración de la lana.

4.2. Los resultados sobre la estabilidad físico-química de las suspensiones de liposomas conteniendo cloro a pH 6.5 indican que para relaciones molares cloro/lípido (K), menores de 2.0 las suspensiones de liposomas fueron estables durante un período de 24 horas. Cantidades crecientes de colesterol en las bicapas lipídicas aumentó la estabilidad físico-química de las suspensiones de liposomas haciendo estas estructuras lipídicas más resistentes a la agregación así como a la peroxidación lipídica.

4.3. La cloración de la lana vía liposomas formados por fosfatidilcolina y colesterol (relaciones molares PC:CH desde 10:0 a 8:2) inhibe la formación de ácido cisteínico en la misma. La presencia de cantidades crecientes de colesterol en las bicapas lipídicas aumentó dicha capacidad inhibitoria. Esta mejora fue obtenida en todas las relaciones molares cloro/lípido investigadas, independientemente de la concentración de cloro activo usado en cada caso.

4.4. Este nuevo método de cloración consiste en preparar suspensiones de liposomas formados por mezclas de fosfatidilcolina y colesterol a distintas relaciones molares (relaciones molares PC:CH comprendidas entre 10:0 y 8:2) y conteniendo crecientes concentraciones de hipoclorito sódico a un valor de pH 6.5 y una relación molar cloro/lípido (K) comprendida entre 1.0 y 40.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Sra. María Dolcet su ayuda en el trabajo experimental.

6. BIBLIOGRAFÍA

- McLaren, J.A. and Mulligan, B.: Wool Science: "The Chemical Reactivity of the Wool Fibre". Marrickville, NSW: Science Press (1981).
- Prömper, E., Klee, D., Altenhofen, U. and Zaahn, H.: Methode zur quantitativen Erfassung oxidierender Gruppen in chlorierter und photooxidierter Wolle. *Textilveredlung* 18, n^o 11, 330-334 (1983).
- Zahn, H.: Oxidative Filzfreiausrüstung und oxidative Bleiche von Wolle aus der chemischen Sicht. *Textilveredlung* 17, n^o 10, 421-440 (1982).
- Erra, P., Juliá, M.R., Infante, M.R., Coderch, M.L. and García Domínguez, J.J.: Shrink-resist treatments of wool with a nucleophilic reagent/cationic surfactant/cationic resin mixture. *J. of Soc. Dyers and Col.* Vol. 104, 93-96 (1988).
- García Domínguez, J.J., Erra, P., De la Maza, A., Juliá, M.R. and Shaw, T.: The Use of Surfactants to Improve the Regularity of Deposition of Resin on Wool. "Proc. 5th Int. Wool Text. Res. Conf. Aachen", Vol. III, 337-348 (1975).
- Parra, J.L., García Domínguez, J.J., De la Maza, A. and Sánchez Leal, J.: The Application of Mixed Surfactant Micellar in Wool Textile Finishing. *J. Soc. Dyers Col.* 102, 227-232 (1986).
- Chapman, D.: Physicochemical Properties of Phospholipids and Lipid-Water Systems, in "Liposome Technology", Ed. Gregoriadis, G., CRC Press Inc. Boca Raton, Florida. Vol. I, 1-19 (1986).
- Mayhew, E. and Papahadjopoulos, D.: Therapeutic Applications of Liposomes, in "Liposomes", Ed. Ostro, J.M., Marcel Dekker, Inc. New York. Chap 7 (1983).
- Szoka, F. and Papahadjopoulos, D.: Liposomes: Preparation and Characterization, in "Liposomes: From Physical Structure to Therapeutic Applications. Ed. Knigh, C.G., Elsevier, North-Holland. Amsterdam, Chap. 3 (1981).
- Juliano, R.L.: Interactions of Proteins and Drugs with Liposomes, J.M. Ostro Ed., Marcel Dekker, Inc. New York, (1983).
- Papahadjopoulos, D., Cowden, M. and Kimelberg H.K. Role of Cholesterol in Membranes. *Biochim. Biophys. Acta*, 330, 8 (1973).
- de la Maza, A., Parra, J.L., Bosch, P., Using Liposomes in Wool Chlorination: Stability of Chlorine Liposomes and their Applications on Wool Fibers, *Textile Res J.* 61, 357, (1991).
- Rivett D.E., Structural Lipids of the Wool Fibre, *Wool Science Rev.* 67, 1, (1991).
- Singleton, W.S., Gray, M.S., Brown, M.L. and White, J.L.: Chromatographically Homogeneous Lecithin from Egg Phospholipids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 42, 53 (1965).
- Bangham, A.D., Standish, M.M. and Watkins, J.C.: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol.* 13, 238 (1965).
- Szoka, F., Olson, F., Heath, T., Vail, W., Mayhew, E. and Papahadjopoulos, D.: Preparation of Unilamellar Liposomes of Intermediate size (0.1-0.2 μ m) by a combination of Reverse Phase Evaporation and Extrusion Through Polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 601, 559-571 (1980).

17. Norma UNE 55-528-77 II. Iodometric method to determine the concentration of active chlorine in the sodium hypochlorite solutions.
18. Standard Methods, 14th ed. Amer. Public Health Ass., Washington, 466-484 (1976).
19. Klein, A.R.: The Detection of Oxidation in Liposome Preparations. *Biochim. Biophys. Acta.* 210, 486 (1970).
20. Christie, W.W.: *Gas Chromatography and Lipids.* The Oily Press. AYR, Scotland (1989).
21. De Boer, Th. J., Backer, H.J.: Diazomethane. *Org. Synth. Coll.* 4, 250 (1963).
22. Standard Specifications for Test Methods IWTO 23-70 (F): Methode de Determination de la Teneur en Acide Cysteique ans les Hydrolysates de Laine par Electrophorese sur Paper et Colorimetrie, Adopté C.T. F.L.I. Paris (1969)
23. Chong, C.S. and Colbow, K.: Light scattering and turbidity measurements on lipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta,* 436, 260 (1976).
24. Kerker, M.: Light scattering, in "Chemistry and Physics of interfaces II", Ross, S., Ed. American Chemical Society, Washington D.C. 170 (1971).
25. Konigs, A.W.T.: Lipid Peroxidation in Liposomes, in "Liposome Technology", Ed. Gregoriadis, G. CRC., Press. Boca Raton Florida Vol. I, 139-163 (1986).

Trabajo presentado en: 1997.04.16.

Aceptado en: 1997.06.11