



ESCUELA POLITÉCNICA NACIONAL

FACULTAD DE CIENCIAS

AUTOORGANIZACIÓN EN SISTEMAS BIOMOLECULARES

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN IÓNICA EN LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑOS DE LIPOSOMAS PREPARADOS CON ACEITE DE SOYA

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PRESENTADO COMO
REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE FÍSICO**

VLADIMIR ALEXANDER RODRÍGUEZ ROMERO

vladimir.rodriguez01@epn.edu.ec

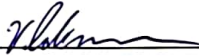
DIRECTOR: MARCO VINICIO BAYAS REA

marco.bayas@epn.edu.ec

DMQ, FEBRERO, 2023

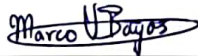
CERTIFICACIONES

Yo, VLADIMIR ALEXANDER RODRÍGUEZ ROMERO, declaro que el trabajo de integración curricular aquí descrito es de mi autoría; que no ha sido previamente presentado para ningún grado o calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.



Vladimir Alexander Rodríguez Romero

Certifico que el presente trabajo de integración curricular fue desarrollado por Vladimir Alexander Rodríguez Romero, bajo mi supervisión.



Marco Vinicio Bayas Rea

DIRECTOR

DECLARACIÓN DE AUTORÍA

A través de la presente declaración, afirmamos que el trabajo de integración curricular aquí descrito, así como el producto resultante del mismo, es público y estará a disposición de la comunidad a través del repositorio institucional de la Escuela Politécnica Nacional; sin embargo, la titularidad de los derechos patrimoniales nos corresponde a los autores que hemos contribuido en el desarrollo del presente trabajo; observando para el efecto las disposiciones establecidas por el órgano competente en propiedad intelectual, la normativa interna y demás normas.

Vladimir Alexander Rodríguez Romero

Marco Vinicio Bayas Rea

RESUMEN

Se prepararon liposomas unilamelares con el componente lipídico del aceite de soya (lecitina de soya grado alimenticio), en soluciones buffer salinas (PBS) de pH 7 y con concentraciones iónicas de *NaCl* de: 0 *mM*, 50 *mM*, 100 *mM*, 150 *mM* y 200 *mM*. Para ello se utilizó el método de hidratación de una película lipídica y su posterior sonicación. La concentración de liposomas se evaluó con la absorbancia para la longitud de onda referencial $\lambda_r = 232 \text{ nm}$. Luego, se caracterizó su distribución de tamaños (diámetros hidrodinámicos) y potencial zeta (ζ) mediante el método del seguimiento de trayectorias (*Nanotracking*) trazadas por la luz dispersada por las partículas. Se observó que estas distribuciones son independientes de la concentración de iones demostrándose así estabilidad en el rango estudiado; en concordancia con resultados de la literatura. Asimismo, se encontró que los diámetros hidrodinámicos de los liposomas tienen valores medios alrededor de los 120 *nm* y potenciales ζ en torno a los -40 mV asociados a cargas positivas de la superficie liposomal. Estos resultados se analizaron dentro del marco de la teoría DLVO y el modelo de la doble capa eléctrica. Con ello se logró explicar que la polaridad de los potenciales ζ obtenidos se debe a que los aniones del medio son adsorbidos por los liposomas.

Palabras clave: Liposomas, potencial ζ , *nanotracking*, lecitina de soya, dispersiones coloidales.

ABSTRACT

Unilamellar liposomes were prepared with the lipid component of soybean oil (food grade soybean lecithin), in saline buffer solutions (PBS) of pH 7 and ionic concentrations of *NaCl* of: 0 *mM*, 50 *mM*, 100 *mM*, 150 *mM* y 200 *mM*. For this, the method of hydration of a lipid film and its subsequent sonification was used. The concentration of liposomes was evaluated with the absorbance at 232 *nm*. Then, their size distribution (hydrodynamic diameters) and zeta potential were characterized with the method of nanoparticle tracking analysis (Nanotracking). It was observed that these distributions are independent of the ion concentration, thus demonstrating stability in the range studied; in agreement with results from the literature. Likewise, it was found that the diameters of the liposomes have mean values around 120 *nm* and potentials around -40 *mV* associated with positive charges of the liposomal surface. These results were analyzed within the framework of the DLVO theory and the model of the electrical double layer. With this, it was possible to explain that the polarity of the zeta potentials obtained is due to the fact that the anions in the medium are adsorbed by the liposomes.

Keywords: Liposomes, zeta potential, nanotracking, soy lecithin, colloidal dispersions.

Índice general

1. Descripción del componente desarrollado	1
1.1. Objetivo general	1
1.2. Objetivos específicos	1
1.3. Alcance	2
1.4. Marco teórico	4
1.4.1. Formación y componentes de los liposomas	4
1.4.2. Caracterización de liposomas	5
2. Metodología	10
2.1. Preparación de Liposomas	10
2.1.1. Soluciones madre	10
2.1.2. Obtención del espectro de absorción:	12
2.1.3. Muestras de Liposomas	13
2.2. Caracterización de los liposomas	13
2.2.1. Calibración del equipo analizador de trayectorias . . .	13
2.2.2. Experimentos	14
2.2.3. Análisis de datos	14
3. Resultados, conclusiones y recomendaciones	17
3.1. Resultados	17

3.1.1. Imagen microscópica de los liposomas	17
3.1.2. Espectros de absorbancia	18
3.1.3. Liposomas en solución PBS 0 [mM]	18
3.1.4. Liposomas en solución PBS 50 [mM]	21
3.1.5. Liposomas en solución PBS 100 [mM]	24
3.1.6. Liposomas en solución PBS 150 [mM]	26
3.1.7. Liposomas en solución PBS 200 [mM]	28
3.1.8. Efecto de la concentración iónica en las distribuciones	30
3.2. Conclusiones y recomendaciones	32

Bibliografía

Índice de figuras

1.1. (a.) Estructura química simplificada de una molécula de fosfatidilcolina cuyas colas son grupos de ácido linoleico y ácido palmítico; (b.) Liposoma unilamelar estructurado con moléculas de fosfatidilcolina.	5
1.2. (a.) Modelo simplificado de la doble capa eléctrica para una partícula cargada negativamente con carga Q . Se muestra el ancho de la doble capa k^{-1} , el radio de la partícula (a) y la frontera del plano de deslizamiento (<i>slip plane</i>); (b.) Boceto del potencial eléctrico originado por la distribución de iones de la doble capa, en función de la distancia medida desde la superficie de la partícula	7
3.1. Liposomas en PBS obtenida por el equipo analizador <i>Zeta View</i> durante uno de los experimentos	17
3.2. Espectros de absorbancia de dos muestras de liposomas en solución PBS con concentraciones iónicas de 0 $[mM]$ y 50 $[mM]$	18
3.3. Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 0 mM : (a.) Distribución de diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico.	19
3.4. Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 0 mM : (a.) Distribución de la movilidad electroforética; (b.) Distribución del potencial ζ	19

3.5. Resultados para la superposición de experimentos con LP en solución PBS 0 <i>mM</i> : (a.) Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución acumulada de diámetros hidrodinámicos	20
3.6. Para los liposomas en solución PBS 0 <i>mM</i> : (a.) Distribución del potencial ζ obtenida del experimento 4; (a.) Distribución del potencial ζ obtenida del experimento 5. Para la combinación de experimentos: (c.) Distribución del potencial ζ ; (d.) Distribución de probabilidad del potencial ζ	21
3.7. Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 50 <i>mM</i> : (a.) Distribución de diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico.	22
3.8. Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 50 <i>mM</i> : (a.) Distribución de la movilidad electroforética; (b.) Distribución del potencial ζ	22
3.9. Resultados para la superposición de experimentos con LP en solución PBS 50 <i>mM</i> : (a.) Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución acumulada de diámetros hidrodinámicos.	23
3.10 Resultados de la superposición de experimentos con LP en PBS 50 <i>mM</i> : (a.) Distribución del potencial ζ ; (b.) Distribución de probabilidad del potencial ζ	23
3.11 Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 100 <i>mM</i> : (a.) Distribución de diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico.	24
3.12 Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 100 <i>mM</i> : (a.) Distribución de la movilidad electroforética; (b.) Distribución del potencial ζ	24

3.13	Considerando la superposición de resultados para los experimentos de tamaños de liposomas en solución PBS 100 <i>mM</i> : (a.) Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución acumulada de los diámetros hidrodinámicos.	25
3.14	Resultados de la superposición de experimentos con LP en PBS 100 <i>mM</i> : (a.) Distribución del potencial ζ ; (b.) Distribución de probabilidad del potencial ζ	25
3.15	Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 150 <i>mM</i> : (a.) Distribución de diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico. .	26
3.16	Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 150 <i>mM</i> : (a.) Distribución de la movilidad electroforética; (b.) Distribución del potencial ζ	26
3.17	Considerando la superposición de resultados para los experimentos de tamaños de liposomas en solución PBS 150 <i>mM</i> : (a.) Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución acumulada de los diámetros hidrodinámicos.	27
3.18	Resultados de la superposición de experimentos con LP en PBS 150 <i>mM</i> : (a.) Distribución del potencial ζ ; (b.) Distribución de probabilidad del potencial ζ	27
3.19	Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 200 <i>mM</i> : (a.) Distribución de diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico. .	28
3.20	Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 200 <i>mM</i> : (a.) Distribución de la movilidad electroforética; (b.) Distribución del potencial ζ	28

3.21	Considerando la superposición de resultados para los experimentos de tamaños de liposomas en solución PBS 200 <i>mM</i> : (a.) Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; (b.) Distribución acumulada de los diámetros hidrodinámicos.	29
3.22	Resultados de la superposición de experimentos con LP en PBS 200 <i>mM</i> : (a.) Distribución del potencial ζ ; (b.) Distribución de probabilidad del potencial ζ	30
3.23	Según la concentración iónica de las disoluciones liposomales: (a.) Valores medios de las distribuciones de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; (b.) Valores medios de las distribuciones de probabilidad del potencial zeta	31

Capítulo 1

Descripción del componente desarrollado

El presente trabajo se enfocó en el estudio de la distribución de tamaños y potencial ζ de liposomas preparados con el componente lipídico del aceite de soya (lecitina de soya), en soluciones buffer salinas (PBS) de pH 7 y con concentraciones iónicas de NaCl de: 0 *mM*, 50 *mM*, 100 *mM*, 150 *mM* y 200 *mM*. La distribución de tamaños se obtuvo con ayuda de un equipo analizador de trayectorias, el cual realiza el seguimiento de la luz dispersada por las partículas mediante microscopía óptica. El equipo permitió además determinar la distribución del potencial ζ de los liposomas analizando su movilidad electroforética.

1.1. Objetivo general

Estudiar la distribución de tamaños y potencial ζ de liposomas preparados con el componente lipídico del aceite de soya en soluciones con diferentes concentraciones iónicas.

1.2. Objetivos específicos

1. Determinar la distribución de tamaños de liposomas preparados con el componente lipídico del aceite de soya en soluciones con concentraciones de NaCl de 0 *mM*, 50 *mM*, 100 *mM*, 150 *mM* y 200 *mM*.

2. Determinar la distribución de potencial ζ de los liposomas preparados con el componente lipídico del aceite de soya en soluciones con concentraciones de NaCl de 0 *mM*, 50 *mM*, 100 *mM*, 150 *mM* y 200 *mM*.

1.3. Alcance

Los liposomas se prepararon con los lípidos que forman parte del aceite de soya. En conjunto, estos lípidos constituyen lo que se conoce comercialmente como lecitina de soya, e incluye fosfolípidos y triglicéridos [1–5]. La lecitina de soya se obtiene como subproducto en el refinamiento del aceite de soya [1, 5, 6]. Su principal fosfolípido es la fosfatidilcolina (FC), con un porcentaje de composición de entre 19 % y 21 % en presentación comercial (grado alimenticio) [5]. Ésta molécula se conforma por una cabeza polar (con un grupo fosfato PO_4^{3-} y un grupo colina $C_5H_{14}NO^+$) y una doble cadena de carbono en su cola, exhibiendo así un carácter dipolar de carga superficial [7]. La interacción hidrofóbica de las colas y la naturaleza hidrofílica de los grupos de cabeza promueven la formación de liposomas (LP). Éstos liposomas son estructuras esféricas de tamaño coloidal (de entre 20 *nm* y 10 μm), conformadas por una doble capa de moléculas lipídicas que aísla un volumen acuoso [8]. Debido a dicha estructura los liposomas poseen muchas propiedades con interés en múltiples aplicaciones en los campos industrial, médico y científico [8–10]. En la actualidad, la aplicabilidad de los LP preparados con lecitina de soya se ha centrado en el encapsulamiento y transporte de fármacos, como aquellos dirigidos al cerebro, vacunología y en quimioterapia contra el cáncer [9].

Gran parte de las aplicaciones de los liposomas precisan conocer y controlar sus características macroscópicas, entre las cuales figuran su distribución de tamaños y potencial zeta ; propiedades que son manipulables por los métodos de preparación [8, 9, 11, 12]. Es por ello por lo que el desarrollo de metodologías para su preparación y caracterización se ha establecido como un campo importante de investigación en los últimos tiempos [9]. De esta forma, el presente proyecto tuvo como finalidad determinar el efecto de la concentración iónica de disoluciones liposomales

en su distribución de tamaños. Asimismo, el procedimiento de caracterización permitió obtener su distribución de potencial ζ .

El proyecto se desarrolló en el laboratorio de biofísica del Departamento de Física de la Escuela Politécnica Nacional. Los liposomas se prepararon a partir de una solución de lecitina de soya de grado alimenticio mediante hidratación de una capa lipídica y su posterior sonificación. Este método es utilizado hasta la actualidad para la preparación de liposomas de lecitina de soya [4, 13, 14]. Posteriormente, la solución base liposomal obtenida se diluyó en soluciones PBS con concentraciones iónicas (Na^+ , Cl^-) de 0 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM y 200 mM. Luego, para evaluar las concentraciones de las disoluciones se determinó su absorbancia para una longitud de onda referencial. De ser el caso que la concentración de partículas en la disolución a emplearse está fuera de cierto rango óptimo de medida, se realizó un ajuste proporcional de disolución. El rango aceptable de concentraciones sobre las cuales opera el equipo analizador de trayectorias utilizado para la caracterización va desde el orden de 10^7 a 10^9 partículas por cm^3 [15].

El equipo analizador permitió obtener la distribución de tamaños mediante el seguimiento de trayectorias (*Nanotracking*) trazadas por la luz dispersada por los liposomas. El *nanotracking* (NTA) es un método reciente destinado a adquirir el tamaño de las partículas con la determinación de su coeficiente de difusión [16]. Igualmente, a través del marco teórico de la electroforesis se obtuvieron las distribuciones de potencial ζ [17, 18].

Los resultados obtenidos se analizaron en el contexto de la teoría *Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek* (DLVO) y el modelo de la doble capa eléctrica. Este marco teórico se ha utilizado en investigaciones previas para explicar la estabilidad de sistemas constituidos por liposomas u otras partículas coloidales en presencia de iones [10, 18, 19].

1.4. Marco teórico

1.4.1. Formación y componentes de los liposomas

La formación de liposomas es inducida principalmente por el denominado efecto hidrófobo que afecta a los fosfolípidos que los componen [7]. Este efecto describe el combinado de fuerzas de London, Van der Waals e interacciones de enlaces de hidrógeno [7, 10]. Dicho fenómeno se debe a la naturaleza de los hidrocarburos que conforman los fosfolípidos. Aquellos hidrocarburos tienden a agregarse al entrar en contacto con el agua, dando como resultado una disminución de la energía libre total del sistema, en comparación al sistema de hidrocarburos separados en el agua [7]. Ahora bien, los fosfolípidos sumergidos en medios acuosos constituyen moléculas anfifílicas [7]. En otras palabras, sus grupos de hidrocarburos (ácidos grasos que constituyen colas hidrófobas) tienden a auto-ensamblarse al interior de membranas, tal que la superficie que entra en contacto con el agua es polar o cargada (grupos de cabeza hidrofílicos) [7]. De esta manera, los liposomas configuran estructuras con una doble membrana de fosfolípidos ensamblados, que encierra una cavidad acuosa (ver figura 1.1 (b.)) [8].

Entre la variedad de grupos de cabeza hidrofílicos se encuentran aquellos con cargas tanto positivas como negativas a pH 7 (*zwitteriónicos*), como es el caso de la cabeza dipolar de las fosfatidilcolinas (FC) (ver figura 1.1 (a.)); que son el componente principal de la lecitina de soya utilizada en diversas formulaciones liposomales [1, 4, 6, 7, 9, 13, 14, 20]. Las fosfatidilcolinas poseen una doble cadena de carbono en su cola, mayormente constituidas por ácido linoleico; para el caso de la lecitina de soya [1, 6, 7, 14]. Su estructura simplificada se esquematiza en la figura 1.1 (a.).

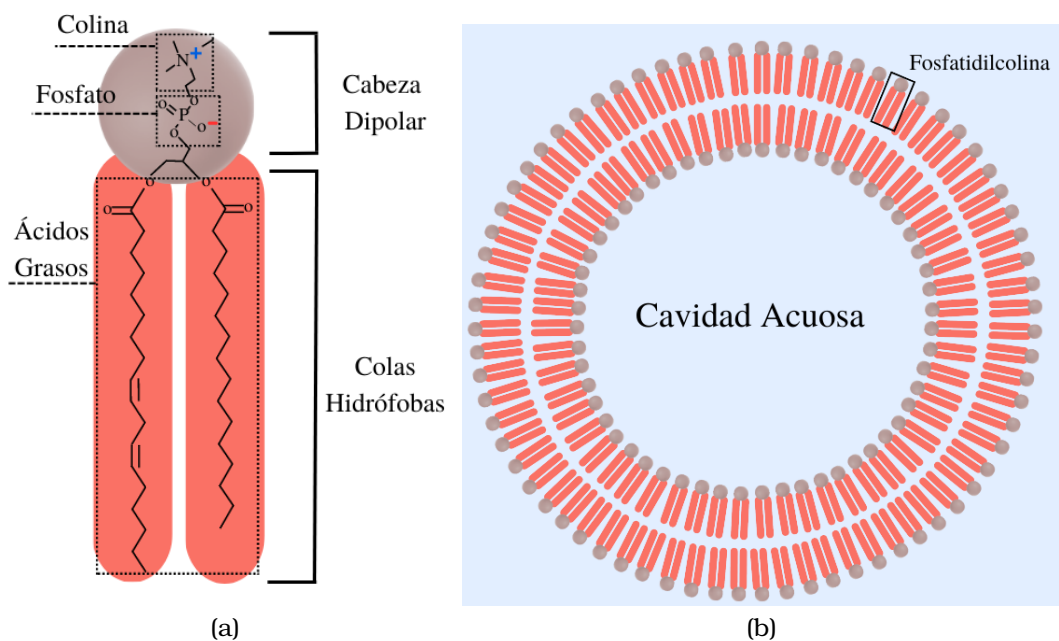


Figura 1.1: **(a.)** Estructura química simplificada de una molécula de fosfatidilcolina cuyas colas son grupos de ácido linoleico y ácido palmítico; **(b.)** Liposoma unilamellar estructurado con moléculas de fosfatidilcolina.

Las figuras 1.1 y 1.2 del presente capítulo se realizaron con la ayuda del programa *Canva* [21].

Las fosfatidilcolinas pueden contener ácidos grasos de alta poli-insaturación (*HPUFAs*) como ácido araquidónico $C_{18} : 4$ (20 carbonos y 4 dobles enlaces), que disminuyen su estabilidad ante la oxidación [22]. Sin embargo, si éstas provienen de lecitina de soya, almacenada en grandes cantidades, conservan dicha estabilidad durante meses debido a su nulo contenido de *HPUFAs* [1, 5]. Esto supone una ventaja en la industria asociada a la preparación de liposomas, a pesar de que los grados de poli-insaturación no afectan en gran medida a la estabilidad de las disoluciones liposomales [22].

1.4.2. Caracterización de liposomas

La caracterización de liposomas mediante la determinación de la distribución de tamaños o carga superficial, significa la base en el estudio de su aplicabilidad [9, 11–13, 23–26]. Para la obtención de dichas distribuciones se considera que los liposomas se encuentran suspendidos en

el medio acuoso conformando dispersiones coloidales.

Distribución de tamaños

La distribución de tamaños se obtiene a partir del coeficiente de difusión D de las partículas. Se ha demostrado que registrando y cuantificando el desplazamiento cuadrático medio $\langle \bar{x}, \bar{y}^2 \rangle$ de las partículas es posible determinar este coeficiente D (ec. 1.1) [16].

$$\langle \bar{x}, \bar{y}^2 \rangle = 4D\Delta t, \quad (1.1)$$

Ahora bien, a través de la ecuación de Stokes-Einstein (ec. 1.2) se puede determinar el radio hidrodinámico a_H de las partículas a una temperatura T y viscosidad η [16]; el concepto de radio hidrodinámico se explica en la siguiente sección.

$$D = \frac{8k_B T}{3\pi\eta a_H}, \quad (1.2)$$

donde k_B es la constante de Boltzmann. Considerando las ecuaciones (1.1) y (1.2) se obtiene que.

$$a_H = \frac{32k_B T \Delta t}{3\pi\eta \langle \bar{x}, \bar{y}^2 \rangle} \quad (1.3)$$

Modelo DLVO y distribución del potencial ζ

En general, el modelo *Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek* (DLVO) describe la estabilidad ante la agregación de partículas cargadas inmersas en dispersiones coloidales; tal es el caso de los liposomas compuestos por fosfatidilcolinas, que en su cabeza tienen una carga dipolar (fig. 1.1 a.) [10]. Para ello, este modelo plantea que la interacción total entre estas partículas tiene una parte repulsiva y otra atractiva. La parte repulsiva es resultado de fuerzas electrostáticas y la parte atractiva proviene de fuerzas de London y van der Waals [10].

Las fuerzas electrostáticas del modelo DLVO son resultado de un po-

tencial eléctrico Ψ que surge por cierta distribución espacial de iones alrededor de las partículas cargadas [17, 18]. Dicha distribución es denominada comúnmente como doble capa eléctrica [17, 18]. El modelo mas sencillo de la doble capa eléctrica se ilustra en la figura 1.2 (a.) y explica que en las inmediaciones de las partículas aparece una primera capa de iones de carga opuesta completamente adsorbidos [18]. Luego, a medida que aumenta la distancia de lejanía, la probabilidad de encontrar iones disminuye siguiendo una distribución de Boltzmann [17]. Aquello genera una segunda capa donde estos iones tienen mayor movilidad y en la que predominan cargas opuestas [18].

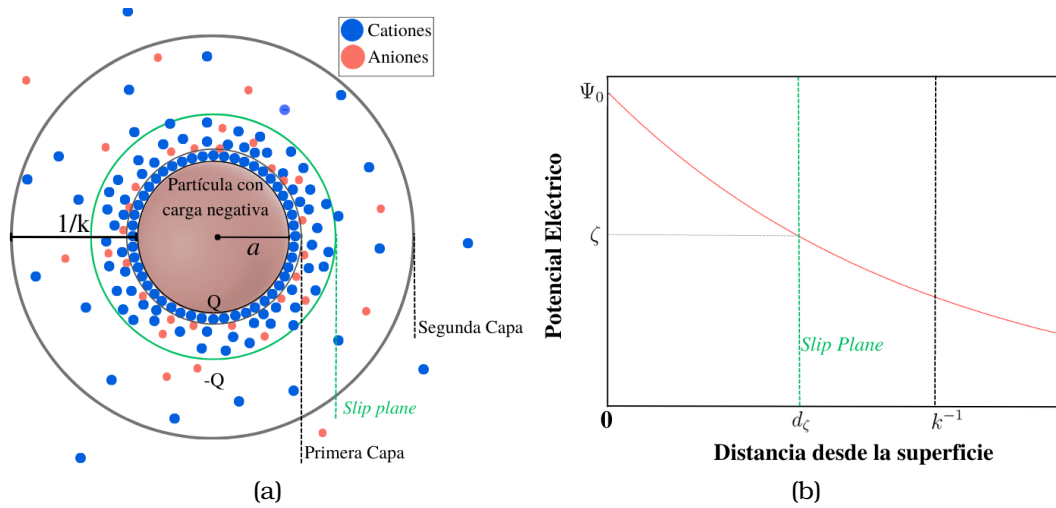


Figura 1.2: **(a.)** Modelo simplificado de la doble capa eléctrica para una partícula cargada negativamente con carga Q . Se muestra el ancho de la doble capa k^{-1} , el radio de la partícula (a) y la frontera del plano de deslizamiento (*slip plane*); **(b.)** Boceto del potencial eléctrico originado por la distribución de iones de la doble capa, en función de la distancia medida desde la superficie de la partícula

Debido a la distribución de iones en la doble capa antes mencionada, el potencial eléctrico Ψ tiene forma exponencial, como se observa en el esbozo de la figura 1.2 (b.). El inverso de su constante de decaimiento k se define como el ancho de esta doble capa [17, 18]. Se estima que Ψ decae aproximadamente 2,72 veces a esta distancia; medida desde la superficie de la partícula. La forma exponencial de Ψ se presenta en la ecuación 1.4:

$$\Psi(x) = \frac{a}{x + a} \Psi_0 \exp(-k(x)), \quad (1.4)$$

donde x es la distancia medida desde la superficie de la partícula, a su

radio, k la constante de decaimiento y Ψ_0 el potencial eléctrico superficial. La ecuación 1.4 es válida bajo la suposición de que el potencial Ψ es pequeño [17].

Hasta ahora se ha analizado el aspecto electrostático del modelo de la doble capa, sin embargo, las partículas tienen flujos tangenciales de líquido sobre su superficie debido a su movimiento [18]. De investigaciones previas se sabe que dicha corriente tangencial genera una capa delgada de iones y partículas de agua que permanecen hidrodinámicamente inmóviles y se mueven como un todo junto al liposoma [18,27]. Esta capa parte de la superficie de la partícula hasta cierta distancia d_ζ que define el denominado plano de deslizamiento o *Slip plane* (fig. 1.2). El potencial Ψ evaluado en este plano es el potencial ζ [18].

En la práctica, la medida del potencial zeta es una de las técnicas más importantes para obtener información de la carga eléctrica superficial Q . Para ello, se supone que la carga Q está anulada con la carga de la doble capa, como se observa en la figura 1.2 (a.) [17]. Luego, considerando que el liposoma es una esfera perfecta, se tiene que:

$$Q = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r k^2 \int_0^\infty (x+a)^2 \Psi(x) dx = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r a(1+ka)\Psi_0 \quad (1.5)$$

Finalmente, se sustituye Ψ_0 por el potencial ζ en la ecuación 1.6 para obtener una carga efectiva Q_e asociada a la capa de iones hidrodinámicamente inmóviles. Esta magnitud nos puede entregar información sobre la polaridad de la carga superficial Q [17]:

$$Q_e = 4\pi\epsilon_0\epsilon_r a_H(1+ka_H)\zeta \quad (1.6)$$

donde, a_H se conoce como radio hidrodinámico, y es el radio de la partícula sumado a la distancia d_ζ desde su superficie al *Slip plane*. Este radio a_H es el radio efectivo de la partícula medido de forma experimental en la obtención de las distribuciones de tamaños (ec. 1.3) y potencial ζ .

En el presente proyecto, la distribución del potencial ζ de las disoluciones liposomales se obtuvo mediante electroforesis, que consiste en provocar el flujo tangencial antes mencionado mediante la aplicación de un campo eléctrico externo E . El equipo de medida empleado es capaz de

generar este campo sobre la muestra y, mediante los videos registrados, medir la velocidad v de las partículas, directamente relacionada con su movilidad electroforética $\mu_e = v/E$ [10, 17, 18]. Luego utiliza la ecuación de Helmholtz-Smoluchowsky (ec. 1.7) para calcular ζ [10, 18].

$$\zeta = \frac{3\eta}{2\epsilon_r\epsilon_0 f(ka_H)} \mu_e = \frac{3\eta v}{2\epsilon_r\epsilon_0 f(ka_H) E}; \quad ka_H \gg 1 \quad (1.7)$$

donde ϵ_r y ϵ_0 son las constantes dieléctricas relativas y del vacío respectivamente, η la viscosidad del agua y $f(ka_H)$ una función que varía suavemente de 1,0 a 1,5; el equipo analizador *ZetaView* toma el valor de 1,5 para obtener la distribución. En cuanto a esta función, se sabe que depende tanto de la temperatura absoluta como la carga y concentración iónica debido a k [10, 17].

Capítulo 2

Metodología

2.1. Preparación de Liposomas

Todos los procedimientos descritos en este trabajo se realizaron dentro de una cabina de flujo laminar *Streamline*; exceptuando la sonicación, la caracterización de muestras, el pesaje de las sustancias y la utilización de la placa calentadora. El pesaje de sustancias se realizó en una balanza *OHAUS Pioneer Plus PA323C* con precisión $320\text{ g} \times 0,001\text{ g}$, a excepción de la lecitina de soya que se pesó en una balanza *OHAUS Adventure-Pro* con precisión $210\text{ g} \times 0,001\text{ g}$. De igual forma, se procuró que todas las sustancias líquidas sean filtradas con una membrana de $45\ \mu\text{m}$ y se encuentren a temperatura ambiente.

2.1.1. Soluciones madre

Solución buffer-Fosfato (PB):

Se preparó 1 L de solución PB 50 mM (pH 7) con fosfato de potasio monobásico y fosfato de sodio dibásico.

Soluciones buffer-fosfato salinas (PBS):

Se prepararon 200 *ml* de soluciones PBS 50 *mM*, 100 *mM*, 150 *mM* y 200 *mM*. Para ello, utilizando la solución PB 50 *mM* se diluyó una solución de *NaCl* 1 *M* en proporciones de 1 : 20, 1 : 10, 3 : 20, 1 : 5.

Solución de lecitina de Soya:

Se preparó 5 *ml* de una solución de lecitina de soya en cloroformo grado analítico (C298 *Fisher Chemical*) con una concentración final de lípidos de ~ 1 *mg/ml*

Soluciones base de liposomas:

Se utilizó el método de hidratación de Bangham detallado a continuación.

1. Se mezcló 0,1 *ml* de metanol de grado analítico (A452 *Fisher Chemical*) con 0,1 *ml* de la solución de lípidos; esto en un balón de 5 *ml* con base redonda y cuello corto. Se permitió la evaporación de los líquidos durante aproximadamente 14 horas. Transcurrido este tiempo se verificó la formación de la película lipídica.
2. Se agregaron 2 *ml* de solución PBS a la película lipídica.
3. Se colocó el balón del paso anterior en baño María a 50 °C, hasta observar que la película lipídica deje de ser visible; esto tarda de entre 1 y 2 horas. El baño María se realizó en un vaso de precipitado de 600 *ml* y se utilizó un agitador magnético para homogeneizar la temperatura entregada por la placa calentadora *MSH-420 Boeco Germany*. Adicionalmente, mientras la capa fue hidratada se agitó la solución en el *vortex V-1 plus (Boeco Germany)*.

El método de Bangham antes descrito permite la obtención de liposomas multilamelares (MLVs) de entre 500 a 10000 *nm* [13]. En investigaciones previas se incluyen procesos de extrusión y/o sonicación tras la hidratación [11, 13, 14]. La sonicación se ha utilizado desde

hace ya muchos años para la fabricación de liposomas artificiales con diámetros promedio del orden de los 100 *nm* (liposomas unilamelares) y se incluyó en la metodología [11, 13].

4. Sonificación: La solución base de liposomas obtenida en el procedimiento anterior se sometió a baño ultrasónico *Fisher Scientific FS20D* durante 10 minutos a 50 °C.

2.1.2. Obtención del espectro de absorción:

Este procedimiento se realizó de forma previa para determinar la longitud de onda λ_r para la cual se obtuvo la absorbancia de las soluciones base de liposomas. La absorbancia permitió verificar que la concentración de las muestras liposomales estén dentro del rango óptimo de medida del equipo analizador de trayectorias *Zeta View (Particle Metrix 110V 3.0)* (mencionada en el capítulo anterior en la sección de alcance) en el cual se realizó la caracterización de los liposomas.

1. Se diluyó 1 *ml* de solución base de liposomas con solución PB hasta los 3 *ml* dentro de un recipiente de cuarzo para espectrofotómetro. De esta forma, se utilizaron 3 *ml* de solución PB como blanco.
2. Se obtuvo el espectro de absorción de la disolución para longitudes de onda de entre 190 *nm* hasta 600 *nm* en pasos de 0,1 *nm*. Esto se realizó en el espectrofotómetro UV-vis *Thermo Scientific Evolution60s*.

Se obtuvieron espectros para dos muestras de liposomas en solución PBS con concentraciones iónicas 0 [*mM*] y 50 [*mM*]. Para la disolución 50 [*mM*] se hidrató la capa lipídica con la solución PBS respectiva. A partir de estos espectros se estableció $\lambda_r = 232 \text{ nm}$ como la longitud de onda referencial para evaluar la concentración de las disoluciones liposomales a inyectarse en el equipo analizador.

2.1.3. Muestras de Liposomas

En experimentos previos se observó que, para $\lambda_r = 232 \text{ nm}$ con absorbancia 0,076, es adecuado diluir 40 μl de la solución base de liposomas hasta 5 ml (disolución de 1 : 125) con la solución PBS respectiva. A continuación, se describe el procedimiento para obtener las disoluciones de liposomas a inyectarse en el equipo analizador.

1. Se determinó la absorbancia de la solución base de liposomas para la longitud de onda λ_r .
2. Se diluyó la solución base hasta los 5 ml con solución PB dentro de un vaso de precipitado de 10 ml , en forma proporcional a la disolución de 1 : 125 obtenida para la absorbancia referencial 0,076. Es así que, si la absorbancia obtenida en el paso anterior es 0,152 es adecuado hacer una disolución 1 : 250.
3. Se sometió la muestra a *vortex* durante 1 minuto.
4. Se almacenó la muestra en una jeringa esterilizada de 5 ml .
5. Se repitió el procedimiento utilizando PBS en el segundo paso para cada concentración iónica antes de realizar los experimentos correspondientes a dichas concentraciones.

2.2. Caracterización de los liposomas

2.2.1. Calibración del equipo analizador de trayectorias

Antes de realizar los experimentos para la caracterización de los liposomas se calibró el equipo analizador de trayectorias *Zeta View*. Para ello se utilizaron nanopartículas de poliestireno de 102 nm suspendidas en una disolución acuosa 1:25000.

El equipo se consideró calibrado si el máximo de la distribución de tamaños coincidía dentro del margen de error con el tamaño nominal de las nanopartículas de poliestireno.

2.2.2. Experimentos

Una vez preparada la muestra se procedió en el equipo analizador de trayectorias de la siguiente forma:

1. Se inyectaron 5 *ml* de solución PB utilizando el filtro de 45 μm .
2. Se inyectó la muestra de liposomas y se obtuvo del equipo el número de partículas según la sensibilidad del sensor de la cámara del equipo. Esto con la finalidad de comprobar que el número de partículas esté en el rango óptimo de medida para una sensibilidad de 70.
3. Se realizaron dos experimentos para obtener la distribución de tamaños (Rango de medida [15, 5000] nm).
4. Se realizaron cinco experimentos para obtener la distribución de potencial ζ .
5. Se realizaron dos experimentos adicionales para distribución de tamaños (Rango de medida [15, 5000] nm).

Para los experimentos el equipo analizador estableció los valores de viscosidad ν del agua como medio y la constante dieléctrica relativa ϵ_r a $25^\circ C$.

2.2.3. Análisis de datos

Los experimentos de tamaños entregaron archivos *.txt* con 4 columnas; la primera columna pertenece a los valores de los diámetros hidrodinámicos ($2a_H$), la segunda al número de partículas en un orden de 10^6 , la tercera a la concentración de partículas y la cuarta al volumen ocupado por el total de partículas con el tamaño correspondiente a su fila. Por otro lado, los experimentos de potencial ζ entregaron archivos *.txt* con 3 columnas; la primera columna pertenece a los valores de movilidad electroforética, la segunda al potencial zeta obtenido por el equipo analizador a partir de los datos de movilidad, y la tercer columna corresponde a las frecuencias correspondientes.

Las columnas de interés se separaron según las frecuencias, con ayuda de un programa escrito en $C++$. El código cuenta el número de veces que se repite un valor y almacena en un archivo distinto dicho valor, las veces que éste se repita. De esta forma el archivo final posee una sola columna; llamemos a éste grupo de archivos como archivos A . Luego, con ayuda de otro código escrito en el mismo lenguaje, se combinaron los archivos A de interés para una misma concentración de iones de las muestras liposomales.

El análisis estadístico de los archivos de interés se realizó mediante un nuevo programa en $C++$. El código lee los archivos correspondientes y calcula la moda, media y desviación estándar de los datos. Por otra parte, las gráficas se realizaron con el programa *gnuplot* a través de *scripts* [28]. En un primer grupo de figuras se ilustraron los histogramas de distribución entregados por el equipo sin ningún tratamiento. Para construir los histogramas de distribución de tamaños se utilizaron los valores del ancho de clase $a = 30$ [nm] y número de clases $n = 199$ entregados por el equipo. En el caso del potencial ζ , dichos parámetros se determinaron según el criterio de Herbert A. Sturges (ec. 2.1) [29].

$$a = \frac{R}{1 + 3,322 \ln N_T}. \quad (2.1)$$

donde R es el rango de datos, dado como la diferencia entre el valor máximo y mínimo, y N_T es el número total de medidas.

Dado que se obtuvieron valores distintos de a , con diferencia absoluta la unidad, se escogió el valor con mayor recurrencia como parámetro común de todos los histogramas ($a = 6$ [mV] para potencial ζ y $a = 4$ [$\frac{\mu m^2}{mV \cdot s}$] para movilidad electroforética).

Datos de tamaños

Las distribuciones de probabilidad de los experimentos de tamaños se graficaron a partir de los histogramas de datos brutos. Para ello, en el *script* correspondiente, la densidad de probabilidad $P(x)$ normalizada es

determinada a partir de las frecuencias $N(x)$ (número de partículas con diámetro hidrodinámico x) y el ancho de clase a .

$$P(x) = \frac{N(x)}{a N_T}, \quad (2.2)$$

donde N_T es el número total de partículas analizadas.

A partir de las distribuciones de probabilidad se construyeron distribuciones acumuladas P_a . Para ello se generó un archivo adicional mediante un código escrito en C++. La primera columna corresponde a x y la segunda columna almacena $P_a(x)$ dado por

$$P_a(x_j) = a \sum_{i=0}^j P(x_i), \quad (2.3)$$

donde $j = 1, 2, \dots, n$, con n el número de clases.

De manera adicional se estudió el volumen $V(x)$ que ocupan los conjuntos de liposomas según su diámetro x . Para determinar $V(x)$ el dispositivo analizador supone que cada liposoma es perfectamente esférico. Es así que:

$$V(x) = N(x) \left(\frac{\pi x^3}{6} \right) \quad (2.4)$$

Datos de potencial Zeta

Las distribuciones de probabilidad de potencial ζ se generaron a través de los histogramas de datos brutos correspondientes, de manera análoga a como se procedió para las distribuciones de tamaños.

Capítulo 3

Resultados, conclusiones y recomendaciones

3.1. Resultados

3.1.1. Imagen microscópica de los liposomas

En la figura 3.1 se presenta una de las sucesivas imágenes de video analizadas en el equipo Zeta View.

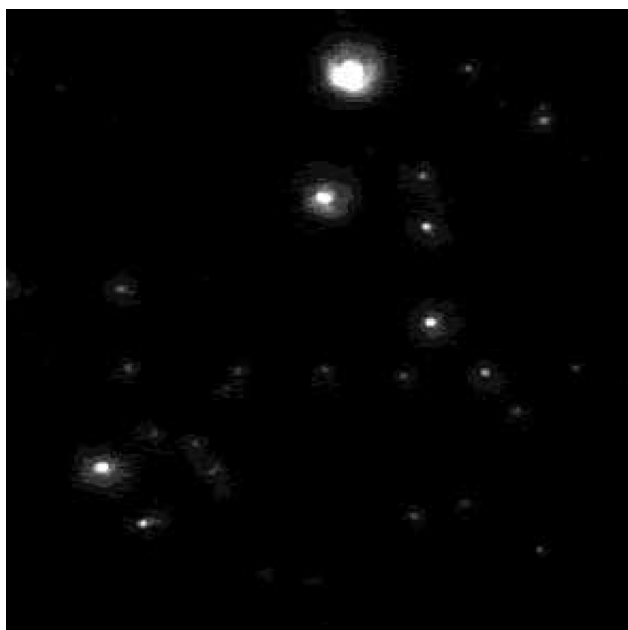


Figura 3.1: Liposomas en PBS obtenida por el equipo analizador *Zeta View* durante uno de los experimentos

3.1.2. Espectros de absorbancia

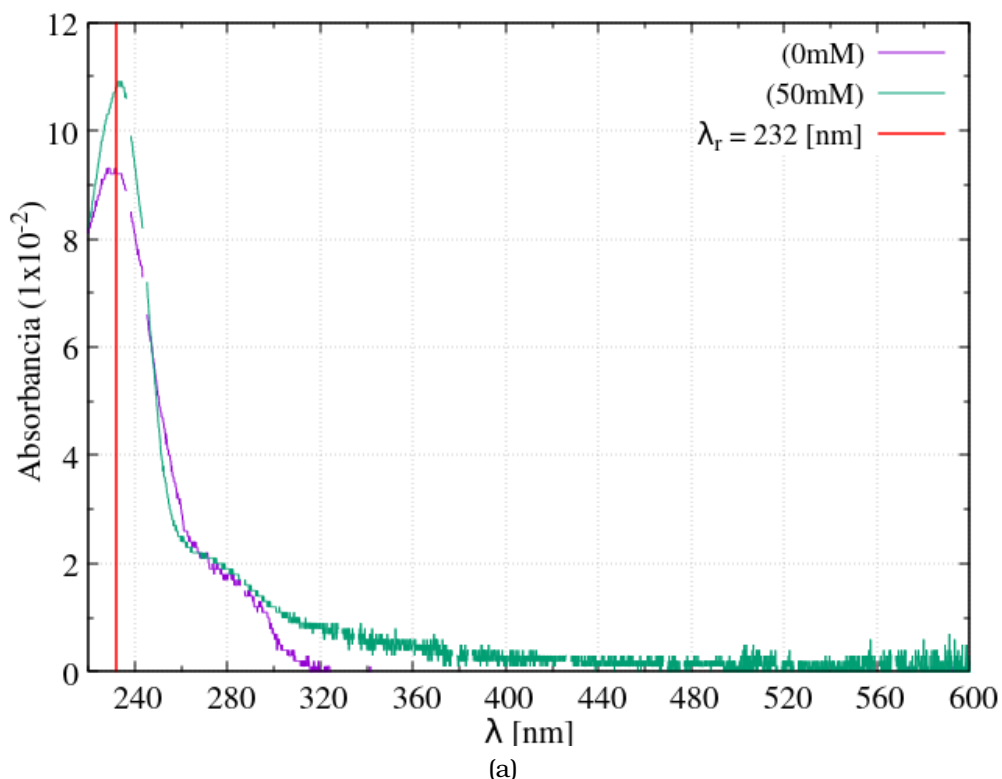


Figura 3.2: Espectros de absorbancia de dos muestras de liposomas en solución PBS con concentraciones iónicas de 0 [mM] y 50 [mM]

La figura 3.2 muestra que el espectro de absorbancia a longitudes de onda menores a ~ 280 nm son comparables. De esta forma, se estableció que la absorbancia en $\lambda_r = 232$ nm es una referencia adecuada para todos los experimentos al momento de evaluar la concentración de liposomas óptima para las medidas en el equipo analizador.

Todos los experimentos se realizaron con una disolución 1 : 125 pues la absorbancia obtenida para una de las muestras representativas fue cercana a 0,076.

3.1.3. Liposomas en solución PBS 0 [mM]

En los experimentos de tamaños y potencial ζ de liposomas en solución PBS 0 [mM] se obtuvieron concentraciones medias de $(23,2 \pm 1,5) \frac{10^6 \text{partículas}}{\text{ml}}$

y $(22,39 \pm 0,83) \frac{10^6 \text{partículas}}{\text{ml}}$ respectivamente. Para experimentos representativos se obtuvieron las siguientes distribuciones:

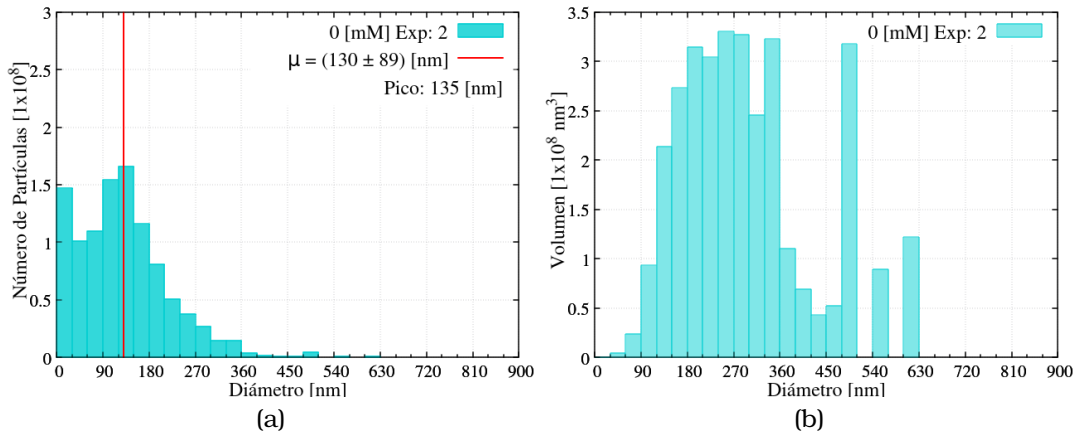


Figura 3.3: Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 0 mM: **(a.)** Distribución de diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico.

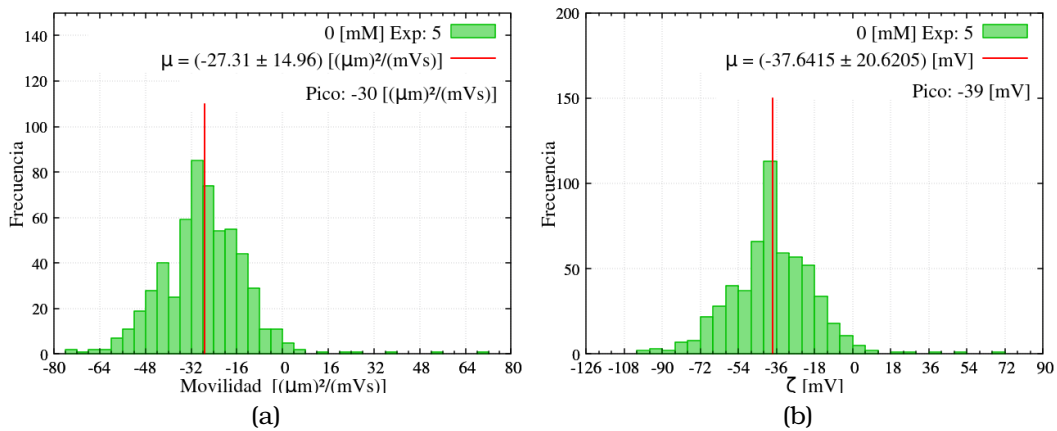


Figura 3.4: Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 0 mM: **(a.)** Distribución de la movilidad electroforética; **(b.)** Distribución del potencial ζ .

Los experimentos de tamaños entregaron histogramas similares al experimento representativo de la figura 3.3, por lo que se consideró adecuada la superposición de los datos; según como se describió en el capítulo de metodología. Esto se observó y realizó en todos los experimentos para las distintas concentraciones iónicas.

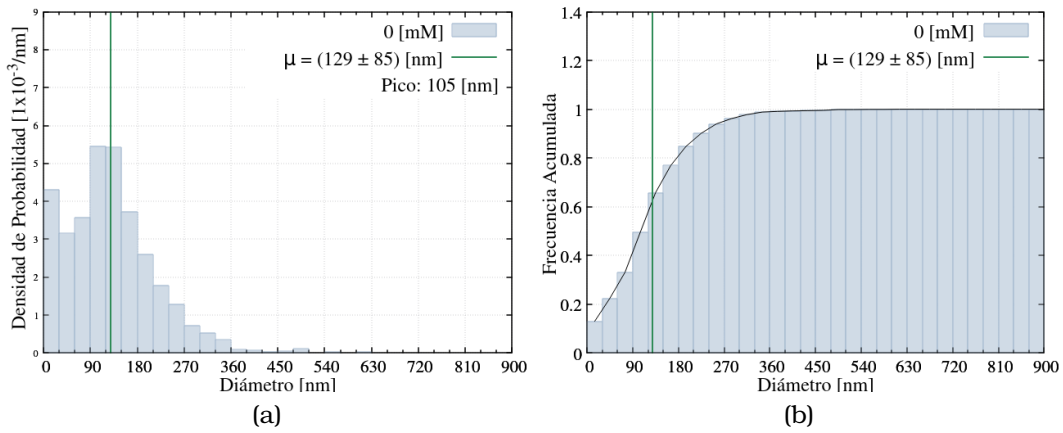


Figura 3.5: Resultados para la superposición de experimentos con LP en solución PBS 0 mM: **(a.)** Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución acumulada de diámetros hidrodinámicos

En la figura 3.5 se tiene que en el intervalo $[44, 214] \text{ (nm)}$, dado por $\mu \pm \sigma$, la densidad de probabilidad acumulada es de aproximadamente 0,6.

Las distribuciones de potencial ζ presentaron diferencias en su forma, sin embargo, éstas no son relevantes; como se observa en la figura 3.6 para dos experimentos representativos. Es por ello que la superposición de los resultados fue adecuada para los experimentos de potencial ζ . De igual forma esto fue aplicable a todas las concentraciones iónicas.

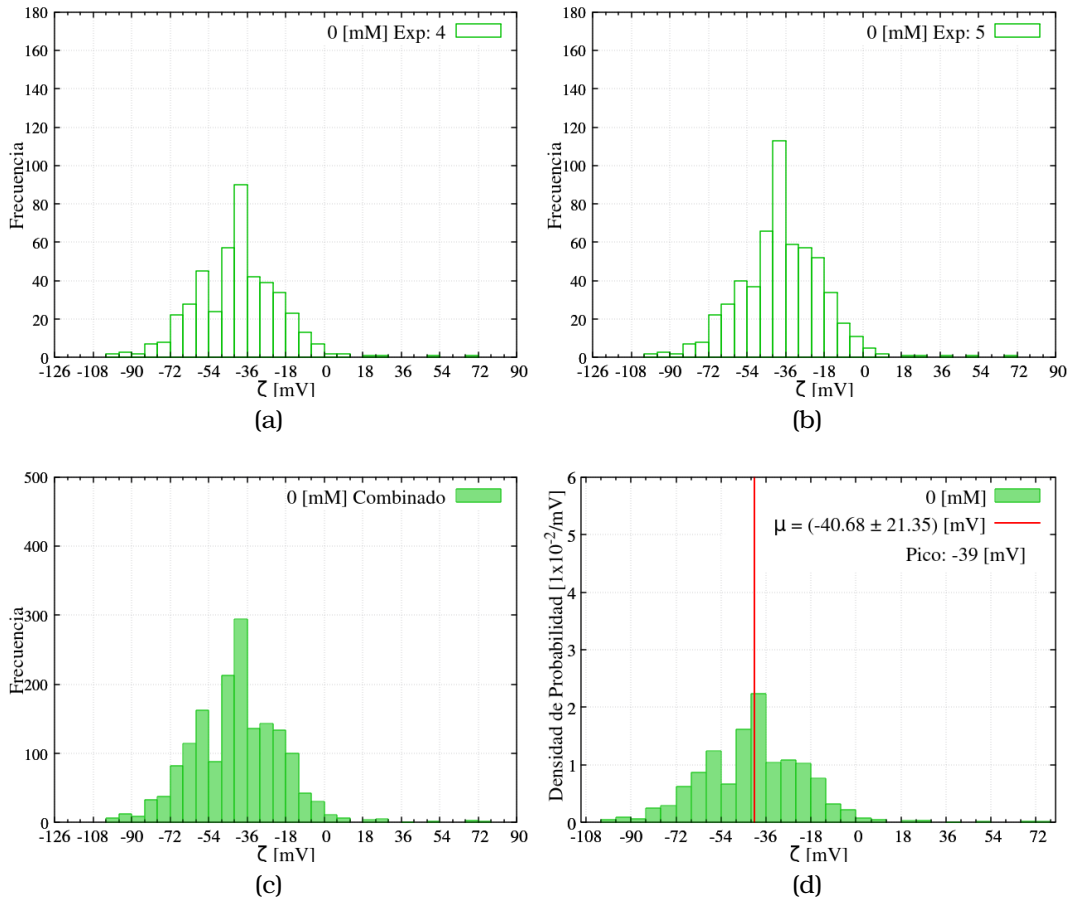


Figura 3.6: Para los liposomas en solución PBS 0 mM : **(a.)** Distribución del potencial ζ obtenida del experimento 4; **(b.)** Distribución del potencial ζ obtenida del experimento 5. Para la combinación de experimentos: **(c.)** Distribución del potencial ζ ; **(d.)** Distribución de probabilidad del potencial ζ .

En la figura 3.6 se tiene que la mayoría de liposomas poseen potenciales ζ en el intervalo $[-62, -19]$ (mV), dado por $\mu \pm \sigma$.

3.1.4. Liposomas en solución PBS 50 [mM]

En los experimentos de tamaños y potencial ζ de liposomas en solución PBS 50 [mM] se obtuvieron concentraciones medias de $(23,7 \pm 3,2) \frac{10^6 \text{partículas}}{ml}$ y $(19,53 \pm 0,31) \frac{10^6 \text{partículas}}{ml}$ respectivamente. Para experimentos representativos se obtuvieron las siguientes distribuciones:

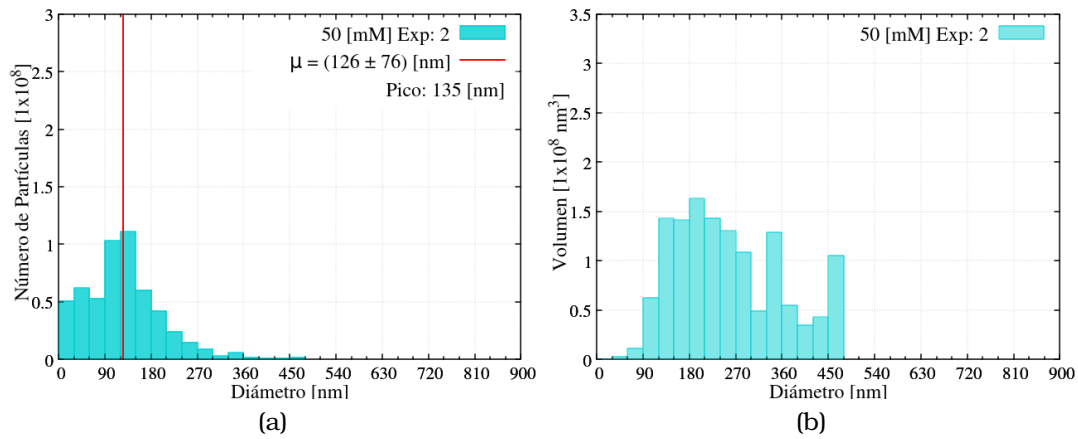


Figura 3.7: Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 50 *mM*: **(a.)** Distribución de diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico.

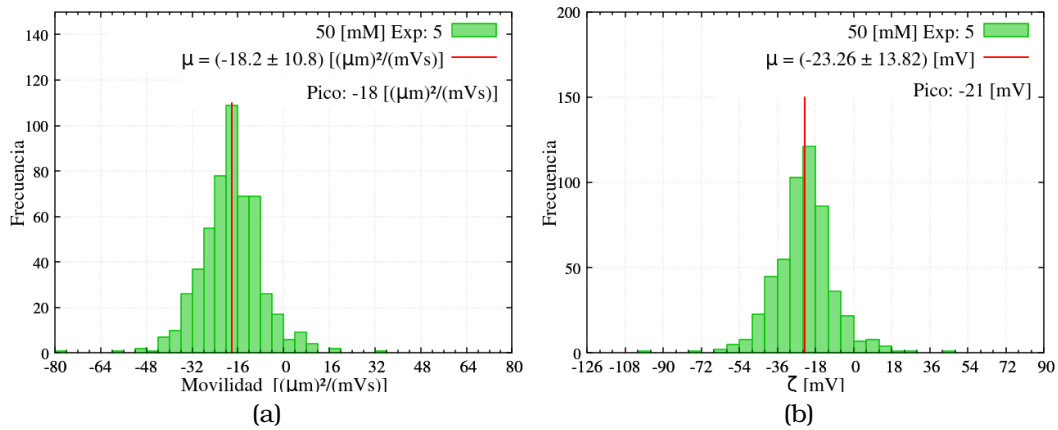


Figura 3.8: Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 50 *mM*: **(a.)** Distribución de la movilidad electroforética; **(b.)** Distribución del potencial ζ .

La superposición de los experimentos de tamaños entregó las siguientes distribuciones.

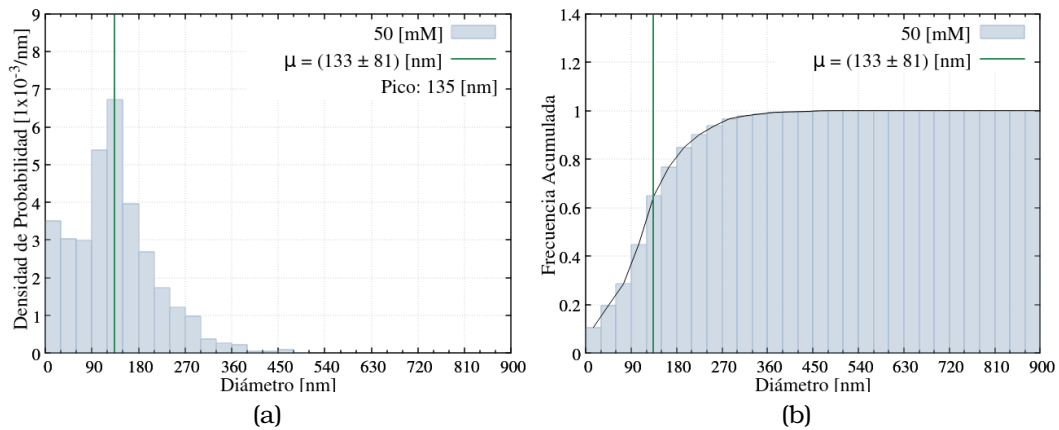


Figura 3.9: Resultados para la superposición de experimentos con LP en solución PBS 50 *mM*: **(a.)** Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución acumulada de diámetros hidrodinámicos.

En la figura 3.9 se tiene que en el intervalo [52, 214] (*nm*), dado por $\mu \pm \sigma$, la densidad de probabilidad acumulada es de aproximadamente 0,6.

La superposición de los experimentos de potencial ζ entregó los siguientes resultados:

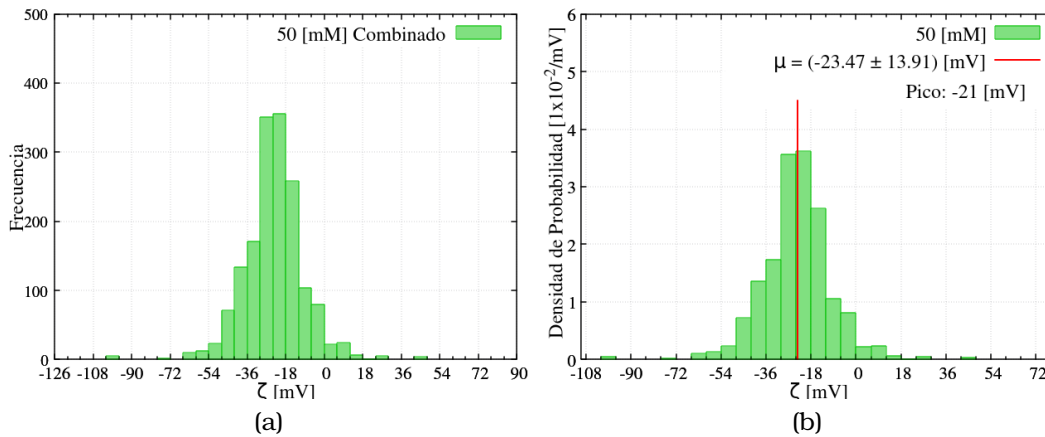


Figura 3.10: Resultados de la superposición de experimentos con LP en PBS 50 *mM*: **(a.)** Distribución del potencial ζ ; **(b.)** Distribución de probabilidad del potencial ζ .

En la figura 3.10 se tiene que la mayoría de liposomas poseen potenciales ζ en el intervalo [-37, -10] (*mV*), dado por $\mu \pm \sigma$.

3.1.5. Liposomas en solución PBS 100 [mM]

En los experimentos de tamaños y potencial ζ de liposomas en solución PBS 100 [mM] se obtuvieron concentraciones medias de $(29,1 \pm 2,6) \frac{10^6 \text{partículas}}{\text{ml}}$ y $(25,9 \pm 3,5) \frac{10^6 \text{partículas}}{\text{ml}}$ respectivamente. Para experimentos representativos se obtuvieron las siguientes distribuciones:

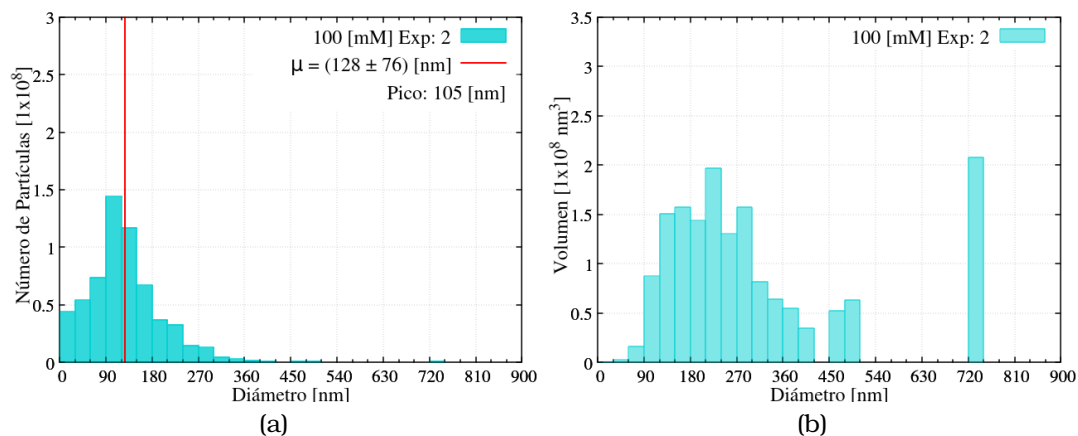


Figura 3.11: Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 100 mM: **(a.)** Distribución de diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico..

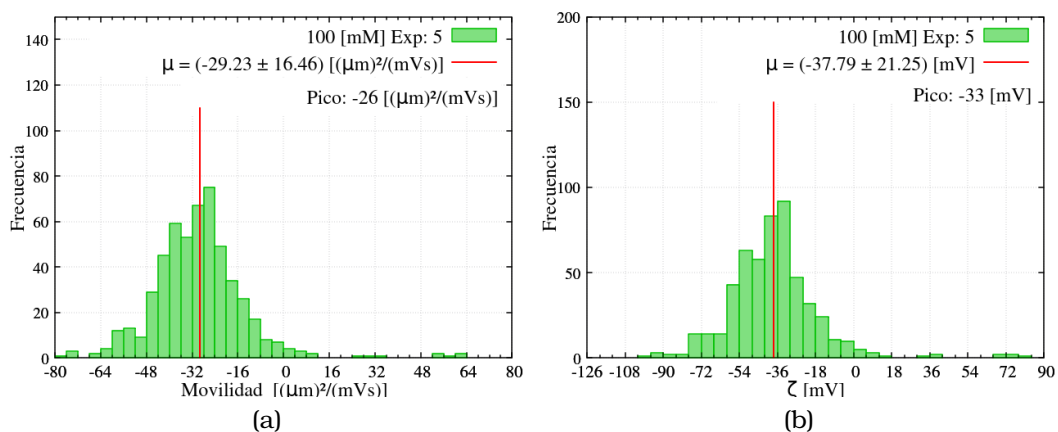


Figura 3.12: Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 100 mM: **(a.)** Distribución de la movilidad electroforética; **(b.)** Distribución del potencial ζ .

La superposición de los 4 experimentos de tamaños entregó los siguientes resultados:

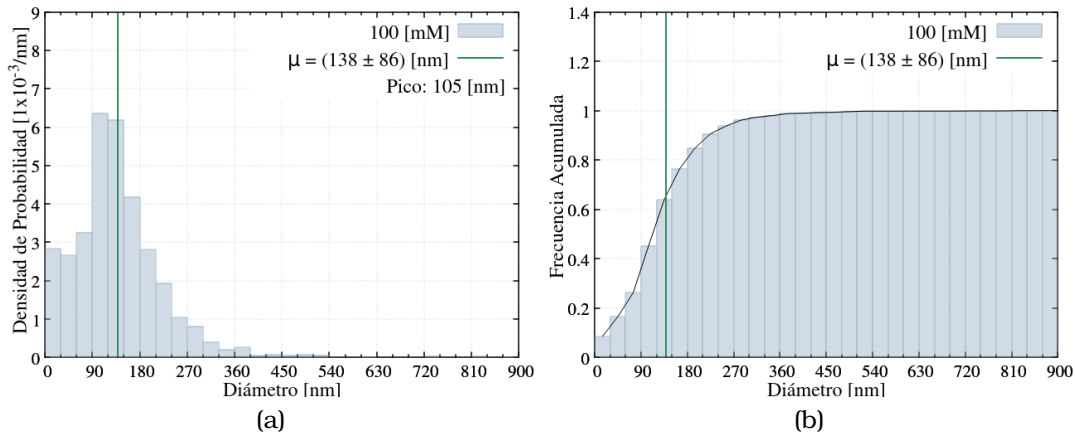


Figura 3.13: Considerando la superposición de resultados para los experimentos de tamaños de liposomas en solución PBS 100 *mM*: **(a.)** Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución acumulada de los diámetros hidrodinámicos.

En la figura 3.13 se tiene que en el intervalo $[52, 224] \text{ (nm)}$, dado por $\mu \pm \sigma$, la densidad de probabilidad acumulada es de aproximadamente 0,6.

Para obtener la distribución de potencial ζ a partir de la superposición de experimentos se descartaron los valores mayores a 80 $[mV]$. Estos datos corresponden a impurezas, ya que no se observan en los resultados análogos para las demás concentraciones.

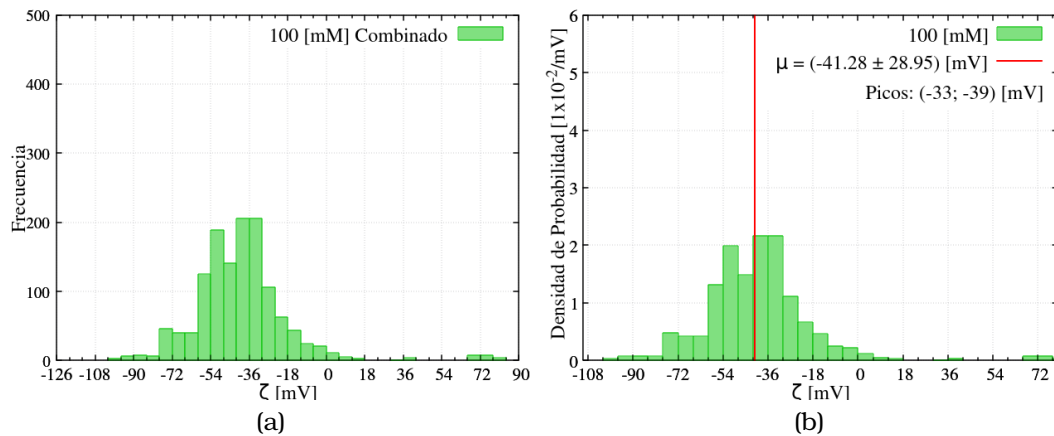


Figura 3.14: Resultados de la superposición de experimentos con LP en PBS 100 *mM*: **(a.)** Distribución del potencial ζ ; **(b.)** Distribución de probabilidad del potencial ζ .

En la figura 3.14 se tiene que la mayoría de liposomas poseen poten-

ciales ζ en el intervalo $[-70, -12]$ (mV), dado por $\mu \pm \sigma$.

3.1.6. Liposomas en solución PBS 150 [mM]

En los experimentos de tamaños y potencial ζ de liposomas en solución PBS 150 [mM] se obtuvieron concentraciones medias de $(33,2 \pm 1,2) \frac{10^6 \text{partículas}}{\text{ml}}$ y $(28,35 \pm 0,44) \frac{10^6 \text{partículas}}{\text{ml}}$ respectivamente. Para experimentos representativos se obtuvieron las siguientes distribuciones:

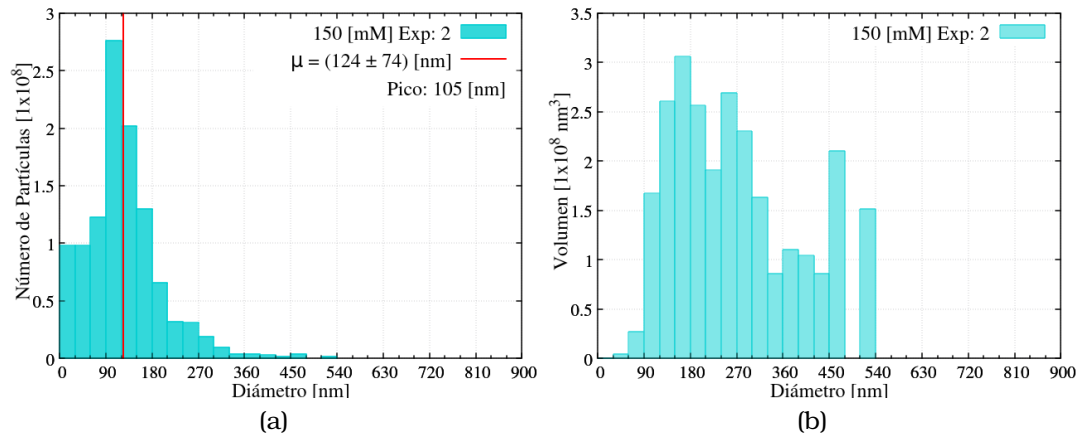


Figura 3.15: Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 150 mM: **(a.)** Distribución de diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico.

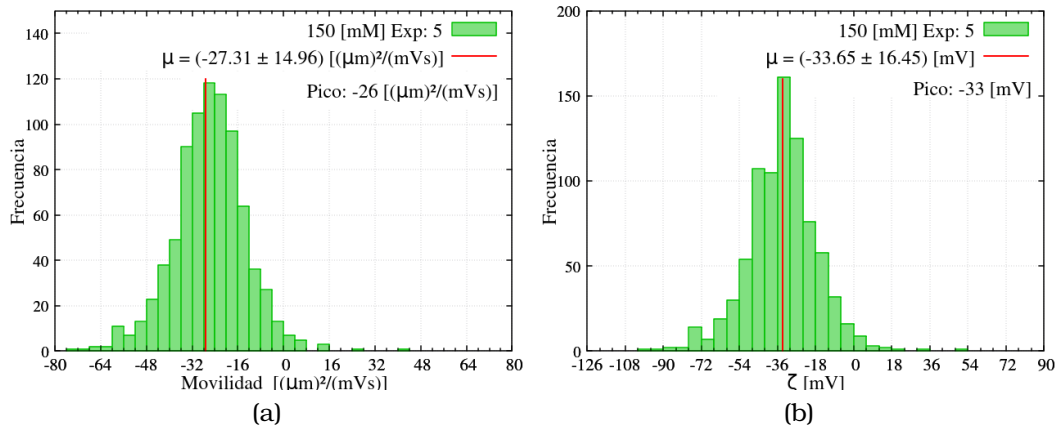


Figura 3.16: Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 150 mM: **(a.)** Distribución de la movilidad electrofórica; **(b.)** Distribución del potencial ζ .

La superposición de los 4 experimentos de tamaños entregó los siguientes resultados:

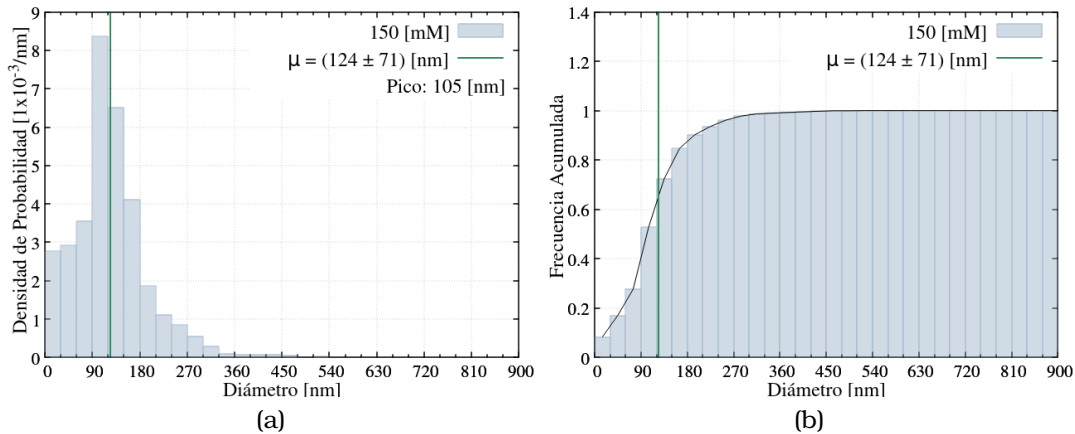


Figura 3.17: Considerando la superposición de resultados para los experimentos de tamaños de liposomas en solución PBS 150 *mM*: **(a.)** Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución acumulada de los diámetros hidrodinámicos.

En la figura 3.17 se tiene que en el intervalo $[53, 195]$ (*nm*), dado por $\mu \pm \sigma$, la densidad de probabilidad acumulada es de aproximadamente 0,6.

La superposición de los experimentos de potencial ζ entregó los siguientes resultados:

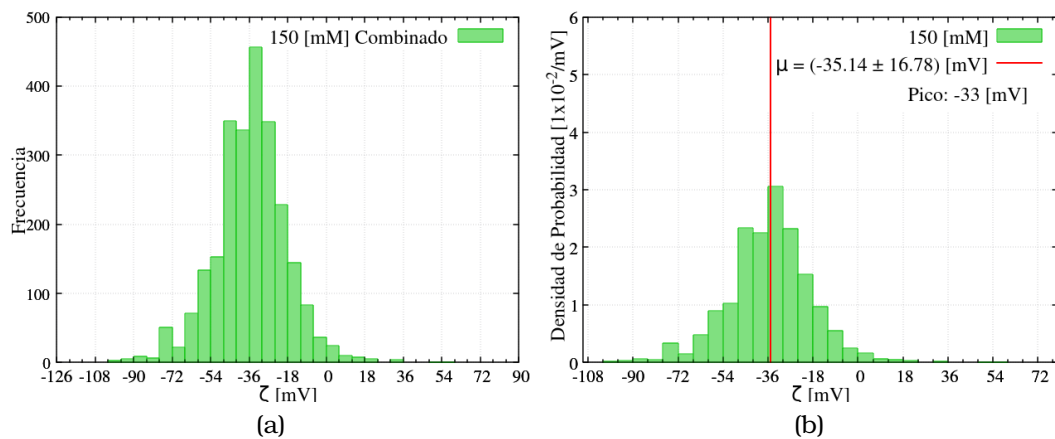


Figura 3.18: Resultados de la superposición de experimentos con LP en PBS 150 *mM*: **(a.)** Distribución del potencial ζ ; **(b.)** Distribución de probabilidad del potencial ζ .

En la figura 3.18 se tiene que la mayoría de liposomas poseen poten-

ciales ζ en el intervalo $[-52, -18]$ (mV), dado por $\mu \pm \sigma$.

3.1.7. Liposomas en solución PBS 200 [mM]

En los experimentos de tamaños y potencial ζ de liposomas en solución PBS 200 [mM] se obtuvieron concentraciones medias de $(26,4 \pm 1,0) \frac{10^6 \text{partículas}}{\text{ml}}$ y $(25,3 \pm 1,9) \frac{10^6 \text{partículas}}{\text{ml}}$ respectivamente. Para experimentos representativos se obtuvieron las siguientes distribuciones:

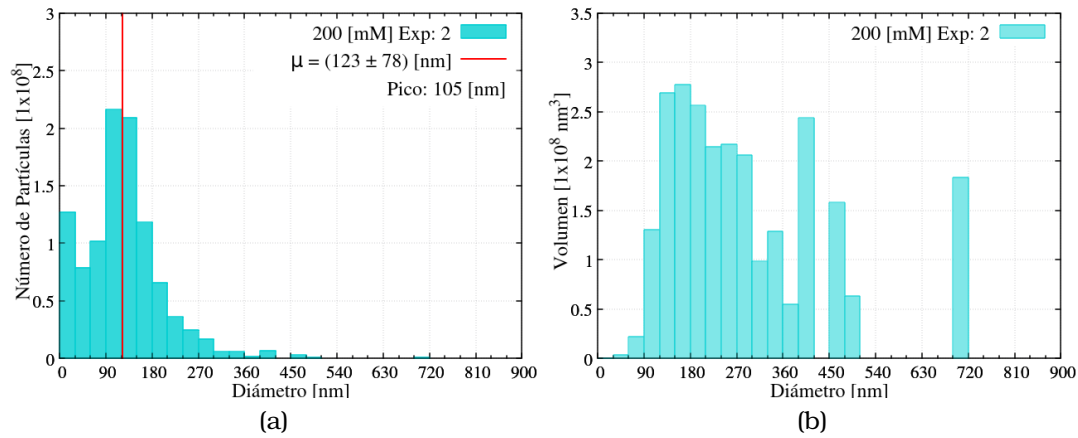


Figura 3.19: Para el segundo experimento de tamaños de liposomas en solución PBS 200 mM: **(a.)** Distribución de diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución del volumen ocupado por los conjuntos de liposomas según su diámetro hidrodinámico.

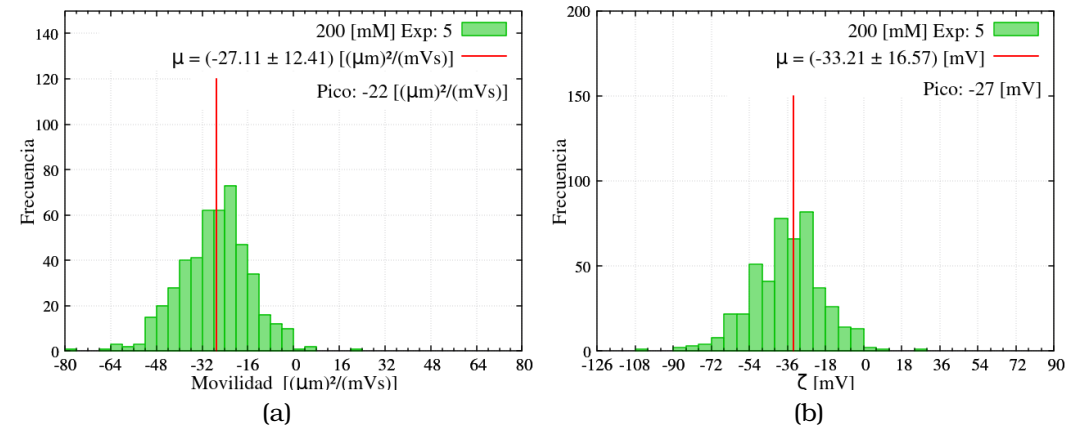


Figura 3.20: Para el quinto experimento de potencial ζ de liposomas en solución PBS 200 mM: **(a.)** Distribución de la movilidad electrofórica; **(b.)** Distribución del potencial ζ .

Para obtener la distribución de tamaños a partir de la superposición de resultados se descartaron los experimentos 3 y 4. Esto debido a que dichos experimentos no mostraron suficientes datos en los rangos donde se obtuvo información en los experimentos para el resto de concentraciones iónicas.

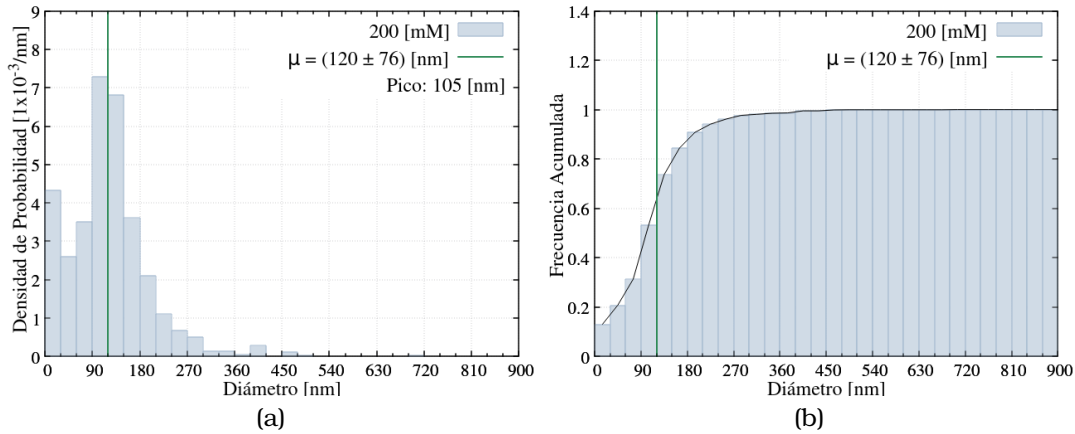


Figura 3.21: Considerando la superposición de resultados para los experimentos de tamaños de liposomas en solución PBS 200 *mM*: **(a.)** Distribución de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Distribución acumulada de los diámetros hidrodinámicos.

En la figura 3.21 se tiene que en el intervalo $[44, 196]$ (*nm*), dado por $\mu \pm \sigma$, la densidad de probabilidad acumulada es de aproximadamente 0,6.

La superposición de los experimentos de potencial ζ entregó los siguientes resultados:

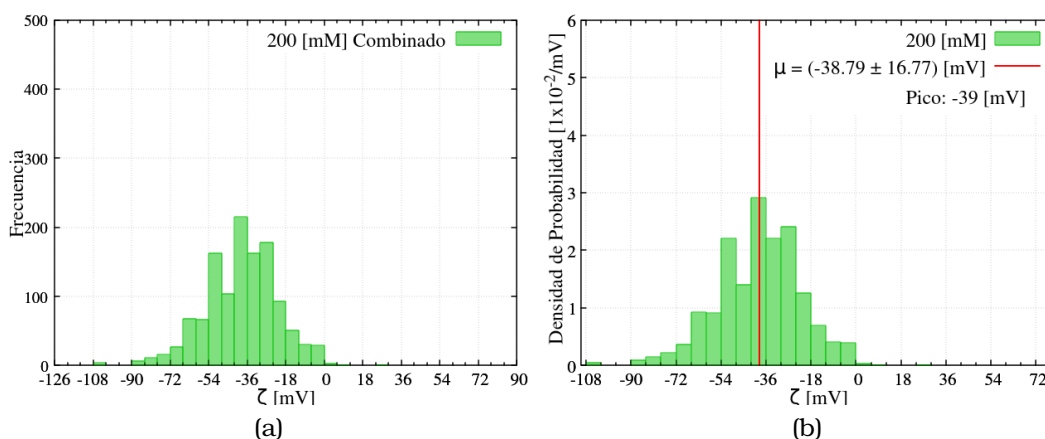


Figura 3.22: Resultados de la superposición de experimentos con LP en PBS 200 *mM*: **(a.)** Distribución del potencial ζ ; **(b.)** Distribución de probabilidad del potencial ζ .

En la figura 3.22 se tiene que la mayoría de liposomas poseen potenciales ζ en el intervalo $[-56, -22]$ (*mV*), dado por $\mu \pm \sigma$.

3.1.8. Efecto de la concentración iónica en las distribuciones

En las figuras (3.5. **b**, 3.9. **b**, 3.13. **b**, 3.17. **b**, 3.21. **b**) se observa que los liposomas analizados se encuentran en un rango general de entre 15 [*nm*] y 540 [*nm*]. De esta forma podemos afirmar que el método utilizado para la preparación de liposomas entrega estructuras unilamelares, como es de esperarse. Adicionalmente, en las figuras (3.3, 3.7, 3.11, 3.15, 3.19) se observa que, a pesar de que existan muy pocas partículas ($< 5\%$ del total de partículas analizadas) con diámetros mayores a 540 *nm*, éstos ocupan volúmenes considerables del total volumétrico debido a su tamaño. Se presume que dichas partículas corresponden tanto a liposomas multilamelares como impurezas. Estas impurezas comprenden en su mayoría a aglomerados lipídicos propios de la lecitina de soya de grado alimenticio, ya que, como se detalló en el primer capítulo, ésta no es pura. Esta falta de pureza también se ve reflejada en la existencia de partículas con diámetros menores a 15 *nm*. Estas partículas podrían ser micelas que surgen de la formación de lípidos de distintas características a las de la fosfatidilcolina [30].

Los valores medios de las distribuciones de diámetros hidrodinámicos ($2a_H$) y potencial ζ para las distintas concentraciones iónicas de las disoluciones liposomales se ilustran a continuación:

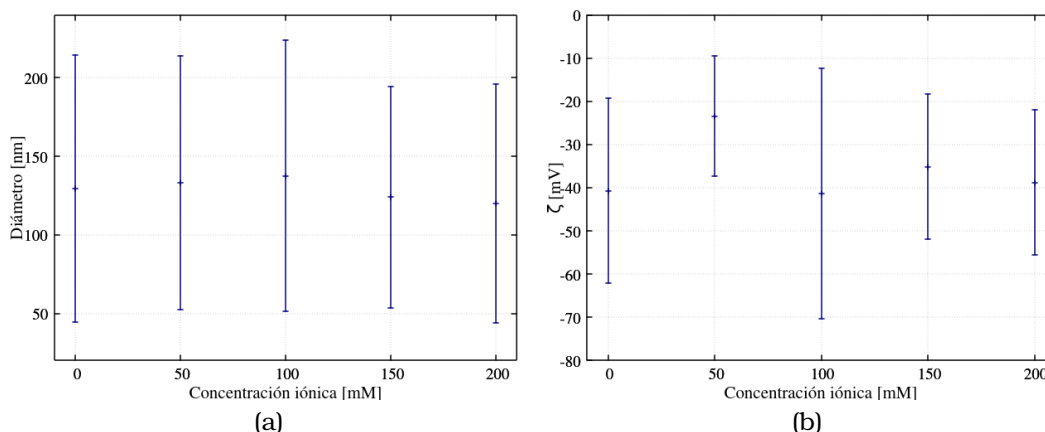


Figura 3.23: Según la concentración iónica de las disoluciones liposomales: **(a.)** Valores medios de las distribuciones de probabilidad de los diámetros hidrodinámicos; **(b.)** Valores medios de las distribuciones de probabilidad del potencial zeta

En la figura 3.23 es notable que los rangos de los valores medios de los tamaños se superponen, así como los rangos de las potenciales ζ . Asimismo, en las figuras (3.5. **a**, 3.9. **a**, 3.13. **a**, 3.17. **a**, 3.21. **a**) y (3.6. **d**, 3.10. **b**, 3.14. **b**, 3.18. **b**, 3.22. **b**) se observa que los picos de las distribuciones de tamaños y potenciales ζ son comparables respectivamente. Es así que tenemos suficiente evidencia estadística para afirmar que ambas distribuciones son independientes de la concentración salina de la solución, en el rango de 0 *mM* a 200 *mM*. En otras palabras, tanto el radio hidrodinámico a_H de las partículas como su carga efectiva Q_e no se ven afectadas por la agregación y el aumento de la cantidad de iones de Na^+ y Cl^- en dicho rango. Resultados similares fueron observados en investigaciones realizadas sobre disoluciones liposomales preparadas ya sea con lecitina de yema de huevo (*EYPC*) o 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio propano (*DOTAP*) [10, 19].

El hecho de que a_H y Q_e para disoluciones liposomales en solución PBS 0 *mM* sea comparable con los resultados para disoluciones que si incluyen iones Na^+ y Cl^- se debe a la existencia de iones de fosfato PO_4^{3-} y potasio K^+ provenientes de la solución buffer utilizada para la regulación de pH. Los iones PO_4^{3-} se ven adsorbidos en la capa hidrodinámicamente

inmóvil dando origen a los valores de a_H y Q_e medidos para esta concentración de PBS.

Con respecto al resultado de que los valores medios del potencial ζ observados en la figura 3.23 son negativos, se puede afirmar que la carga efectiva Q_e es también negativa, según la relación de la ecuación (1.6). Esto se debe a que los iones PO_4^{3-} y Cl^- se ven mayormente adsorbidos por la parte positiva de la cabeza dipolar de las fosfatidilcolinas presentes en la superficie de los liposomas; conforme con el modelo de la doble capa. Dicha parte positiva pertenece a la molécula de colina (fig. 1.1 **(a)**).

3.2. Conclusiones y recomendaciones

El análisis estadístico de las distribuciones tamaños liposomales y potencial ζ indicó que tanto los radios hidrodinámicos como las cargas efectivas de los liposomas preparados con lecitina de soya (grado alimenticio), mediante hidratación y sonificación, son independientes de las concentraciones de iones de sodio y cloro utilizadas ([50 : 200] mM). Esto se evidencia en la figura 3.23 donde se observó que los rangos de valores medios de ambas distribuciones se superponen entre todas las concentraciones iónicas. De igual forma, se visualizó que los picos de las distribuciones de probabilidad no presentan ninguna tendencia respecto a la concentración de iones de las disoluciones (figuras 3.5. **a**, 3.9. **a**, 3.13. **a**, 3.17. **a**, 3.21. **a** y 3.6. **d**, 3.10. **b**, 3.14.**b**, 3.18. **b**, 3.22. **b**). Con todo, la independencia encontrada significa que las disoluciones liposomales obtenidas son estables ante las variaciones en la concentración de iones del medio, dentro del rango estudiado; esto en concordancia con resultados obtenidos en la literatura [10, 19].

Si bien los resultados mencionados anteriormente son comparables a otras dos investigaciones, sería conveniente ampliar el modelo de la doble capa para realizar cálculos alternativos y contrastar la información. Además se debería encontrar una curva de ajuste experimental óptima para las distribuciones de tamaños y potencial zeta que permitan comprobar los resultados con un análisis estadístico más exhaustivo. Asimismo para obtener una visión mas completa, sería adecuado ampliar el rango de concentraciones salinas para estudiar su influencia en las distribuciones.

Con respecto a las características físicas de los liposomas, se obtuvo que en su mayoría éstos tienen tamaños medios alrededor de los 120 nm (liposomas unilamelares) y potenciales ζ en torno a los -40 mV ; (figura 3.23). Debido a la polaridad de ζ se tiene que la carga efectiva Q_e es negativa, y por ende la carga liposomal superficial es positiva. Esta polaridad positiva se atribuye a las moléculas de colina ubicadas en la parte mas externa de los liposomas, que adsorben aniones del medio; conforme las predicciones del modelo de la doble capa. Además, se observó la existencia de liposomas e impurezas con tamaños mayores a 540 nm y que por ende ocupaban volúmenes considerables a pesar de ser escasos; $< 5\%$ de la población total (figuras 3.3, 3.7, 3.11, 3.15, 3.19). Ante ello sería óptimo implementar la extrusión de las muestras en la metodología o mejorar el proceso de filtrado.

Referencias bibliográficas

- [1] I. Hanin and Pepeu G. *Phospholipids: Biochemical, pharmaceutical, and analytical considerations*. Springer Science & Business Media, NY, US, 1990.
- [2] Q. Xu, M. Nakajima, Z. Liu, and T. Shii. Soybean - applications and technology. In Tzi-Bun Ng, editor, *Soybean-based Surfactants and Their Applications*, chapter 20. IntechOpen, Rijeka, Croacia, 1st edition, 2011.
- [3] E. Dickinson. Towards more natural emulsifiers. *Trends in Food Science Technology*, 4(10):330–334, 1993.
- [4] AFA. Aisha, AMSA. Majid, and Z. Ismail. Preparation and characterization of nano liposomes of orthosiphon stamineus ethanolic extract in soybean phospholipids. *BMC Biotechnology*, 14(23), 2014.
- [5] CR. Scholfield. Composition of soybean lecithin. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 58(10):889–892, 1981.
- [6] P. van Hoogevest and A. Wendel. The use of natural and synthetic phospholipids as pharmaceutical excipients. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(9):1088–1107, 2014.
- [7] I. Tinoco, K. Sauer, JC. Wang, JD. Puglisi, G. Harbison, and D. Rovnyak. *Physical chemistry: Principles and applications in biological sciences*. Pearson Education, Upper Saddle River, NJ, US, 5th edition, 2014.

- [8] Lasic DD. Applications of liposomes. In R. Lipowsky and E. Sackmann, editors, *Handbook of Biological Physics*, volume 1, chapter 10, pages 491–519. Elsevier Science B.V, 1995.
- [9] NTT. Le, VD. Cao, TNQ. Nguyen, TTH. Le, TT. Tran, and TT. Hoang Thi. Soy lecithin-derived liposomal delivery systems: Surface modification and current applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 2019.
- [10] J. Sabín, G. Prieto, JM. Ruso, R. Hidalgo-Alvarez, and F. Sarmiento. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. *The European Physical Journal E*, 20:401–408, 2006.
- [11] David Brito. *Determinación de tamaños de liposomas en solución mediante el análisis de las funciones de autocorrelación asociadas a la dispersión de luz*. Tesis, Escuela Politécnica Nacional, Quito, Ecuador, 2013.
- [12] M. Winterhalter and D. D. Lasic. Liposome stability and formation: Experimental parameters and theories on the size distribution. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64(1-3):35–43, 1993.
- [13] TA. Nguyen, QD. Tang, DCT. Doan, and MC. Dang. Micro and nano liposome vesicles containing curcumin for a drug delivery system. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, 7(3), 2016.
- [14] L. Budai, N. Kaszás, P. Gróf, K. Lenti, K. Maghami, I. Antal, et al. Liposomes for topical use: A physico-chemical comparison of vesicles prepared from egg or soy lecithin. *Sci. Pharm*, 81(4):1151–1166, 2013.
- [15] V. Filipe, A. Hawe, and W. Jiskoot. Critical evaluation of nanoparticle tracking analysis (nta) by nanosight for the measurement of nanoparticles and protein aggregates. *Pharmaceutical Research*, 27:796–810, 2010.
- [16] A. Kim, WB. Ng, W. Bernt, and N-J. Cho. Validation of size estimation of nanoparticle tracking analysis on polydisperse macromolecule assembly. *Scientific Reports*, 9(2639), 2019.

- [17] Robert J. Hunter. *Zeta Potential in Colloid Science: Principles and Applications*. Elsevier Ltd, San diego, CA, US, 1st edition, 1981.
- [18] A. V. Delgado, F. González-Caballero, R. J. Hunter, L. K. Koopal, and J. Lyklema. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. *Journal of colloid and interface science*, 309(2):194–224, 2007.
- [19] F. Bordi, C. Cametti, M Diociaiuti, D. Gaudino, T. Gili, and S. Sennato. Complexation of anionic polyelectrolytes with cationic liposomes: evidence of reentrant condensation and lipoplex formation. *Langmuir*, 20(213):5214–5222, 2004.
- [20] F. Persano, G. Gigli, and S. Leporatti. Lipid-polymer hybrid nanoparticles in cancer therapy: current overview and future directions. *Nano Express*, 2(1), 2021.
- [21] Word Inc. Canva (versión 1.60.0). <https://www.canva.com>. Accedido: 15/02/2023.
- [22] M. Araseki, K. Yamamoto, and K. Miyashita. Oxidative stability of polyunsaturated fatty acid in phosphatidylcholine liposomes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(12):2573–2577, 2002.
- [23] R. Nisini, N. Poerio, S. Mariotti, F. De Santis, and M. y Fraziano. The multirole of liposomes in therapy and prevention of infectious diseases. *Frontiers in Immunology*, 9(155), 2018.
- [24] V. Rajendran, S. Rohra, M. Raza, G. M. Hasan, S. Dutt, and P. C. Ghosh. Stearylamine liposomal delivery of monensin in combination with free artemisinin eliminates blood stages of plasmodium falciparum in culture and p. berghei infection in murine malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(3):1304–1318, 2016.
- [25] A. Singh, P. Vengurlekar, and S. Rathod. Design, development and characterization of liposomal neem gel. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 5(4):140–148, 2014.
- [26] F. Sakurai, R. Inoue, Y. Nishino, A. Okuda, O. Matsumoto, T. Taga, F. Yamashita, Y. Takakura, and M. E Hashida. Effect of

dna/liposome mixing ratio on the physicochemical characteristics, cellular uptake and intracellular trafficking of plasmid dna/cationic liposome complexes and subsequent gene expression. *Journal of Controlled Release*, 66(2-3):255–269, 2000.

- [27] J. Lyklema, S. Rovillard, and J. E. De Coninck. Electrokinetics: the properties of the stagnant layer unraveled. *Langmuir*, 14(20):5659–5663, 1998.
- [28] Thomas. Williams, Colin. Kelley, et al. Gnuplot (versión 5.2). <http://www.gnuplot.info/>. Accedido: 21/12/2022.
- [29] HA. Sturges. The choice of a class interval. *Journal of the American Statistical Association*, 21(153):65–66, 2012.
- [30] G. Pabst, N. Kucerka, M. Nieh, and J. Katsaras. *Liposomes, Lipid Bilayers and Model Membranes From Basic research to Application*. CRC Press, Boca Raton, FL, US, 1st edition, 2014.