



Desarrollo del proceso DELOS-susp para la
encapsulación de fármacos hidrofílicos en
vesículas unilamelares pequeñas

PROYECTO FINAL DE CARRERA

INGENIERÍA DE MATERIALES

Autor: Fco. Javier Muñoz García

Directora: Nora Ventosa Rull

Tutor: Oscar Palacios Bonilla

Bellaterra: Febrero 2011

NORA VENTOSA RULL, Científico Titular del CSIC en el Instituto de Ciencia de Materiales de Barcelona.

Certifica que:

FRANCISCO JAVIER MUÑOZ GARCÍA, ha realizado bajo su dirección el trabajo al cual corresponde esta memoria que lleva como título: "**Desarrollo del proceso DELOS-susp para la encapsulación de fármacos hidrofílicos en vesículas unilamelares pequeñas**". Este trabajo constituye su Proyecto Final de Carrera para la obtención del título de Ingeniero de Materiales.

Y para que conste firma el siguiente certificado.

Dra. Nora Ventosa Rull.

Así mismo, el Dr. Oscar Palacios Bonilla certifica haber sido el tutor del presente Proyecto Final de Carrera.

Dr. Oscar Palacios Bonilla

Bellaterra: Febrero 2011

Agradecimientos

Quisiera mostrar mi agradecimiento a la Dra. Nora Ventosa Rull bajo la dirección de la cual ha sido realizado este proyecto, y que siempre se ha mostrado receptiva y dispuesta a dar todo tipo de facilidades para llevar a cabo este trabajo.

También me gustaría dar las gracias al Dr. Oscar Palacios Bonilla por haber tutelado este proyecto, y del que siempre he recibido un trato amable y cordial.

No me puedo olvidar de la ya Doctora Elisa Elizondo, que me ha servido de grandísima ayuda y con la que ha sido un placer trabajar. Tampoco me puedo olvidar de Alba Córdoba, Ingrid Cabrera y Daniel Villanueva de Supercríticos por haber estado dispuestos a ayudarme en todo momento, así como al resto de miembros del grupo Nanomol con los que me he sentido a gusto trabajando.

A todos: MUCHAS GRACIAS

Contenidos

1. Introducción.....	1
1.1 Sistemas vesiculares	2
1.2 Sistemas vesiculares como sistemas de liberación controlada de fármacos.....	4
1.2.1 Encapsulación de fármacos en vesículas. Aspectos generales.....	5
1.3 Métodos pasivos convencionales de fabricación de vesículas y de encapsulación de fármacos en vesículas.....	7
1.4 Métodos basados en el uso de fluidos comprimidos para la encapsulación pasiva de fármacos en sistemas vesiculares.....	9
1.4.1 Fluidos comprimidos. Aspectos generales	10
1.4.2 Métodos basados en fluidos comprimidos (FCs) para la preparación de sistemas vesiculares	10
1.4.3 Procedimiento DELOS-susp para la fabricación de vesículas	12
2. Objetivos	17
3. Obtención por DELOS-susp de vesículas de colesterol:CTAB utilizando etanol como disolvente orgánico	19
3.1 Determinación de la curva de solubilidad del sistema “colesterol/etanol/CO ₂ ”	19
3.2 Fabricación de vesículas de colesterol:CTAB con etanol como disolvente	22
4. Encapsulación de sulfato de gentamicina (GS) en vesículas de colesterol:CTAB mediante DELOS-susp	27
4.1 Influencia de la relación molar de GS:lípido en las características estructurales de las vesículas unilamelares pequeñas (SUVs).....	30
4.2 Influencia de la relación molar de GS:lípido en la eficiencia de encapsulación y la carga de antibiótico.....	35
5. Estudio de escalabilidad del proceso DELOS-susp para la encapsulación de activos hidrofílicos	41
5.1 Influencia del escalado del proceso DELOS-susp en la estabilidad y las características estructurales de las vesículas de colesterol:CTAB	44
5.2 Influencia del escalado del proceso DELOS-susp en la eficiencia de encapsulación y la carga de GS en las vesículas de colesterol:CTAB.....	47
6. Conclusiones	51

7. Parte experimental	53
7.1 Materiales	53
7.2 Análisis de solubilidad	53
7.2.1 Determinación de la solubilidad del colesterol en etanol	53
7.2.2. Determinación de solubilidades en disolventes orgánicos expandidos con CO ₂ según el método “vanishing point” mediante una celda de volumen variable	54
7.2.2.1 Equipo: Analizador de fases a alta presión	54
7.2.2.2 Procedimiento para la determinación de solubilidades según el método “vanishing point”	55
7.3 Preparación de vesículas de colesterol:CTAB por DELOS-susp: equipos y procedimientos	58
7.3.1 Equipo de 6 ml	58
7.3.1.1 Configuración.....	58
7.3.1.2 Procedimiento experimental	59
7.3.2 Equipo de 300 ml	60
7.3.2.1 Configuración.....	60
7.3.2.2 Procedimiento experimental	61
7.3.3. Encapsulación de sulfato de gentamicina (GS) en vesículas por DELOS-susp	62
7.4 Instrumentos, técnicas y procedimientos utilizados para la caracterización de los sistemas vesiculares.....	62
7.4.1 Dispersión de luz dinámica (“ <i>dynamic light scattering</i> ”, DLS).....	62
7.4.2 Potencial Z	63
7.4.3 Microscopía electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM)	63
7.4.4 Procedimiento experimental para la determinación de la eficiencia de encapsulación, EE(%), y la determinación de la carga de antibiótico en las vesículas de colesterol:CTAB cargadas con sulfato de gentamicina (GS).....	64
7.4.4.1 Cromatografía de exclusión por tamaño (CE).....	64
7.4.4.2 Ruptura de las vesículas y liberación de la GS encapsulada	65
7.4.4.3 Medidas de fluorescencia y reacción de derivatización	65
8. Coste del proyecto	69
9. Referencias	71

1. Introducción y objetivos

En el diseño de un nuevo fármaco sería deseable que aparte de la actividad terapéutica, todas las características farmacológicas de éste tales como solubilidad, estabilidad, permeabilidad a las membranas biológicas y direccionalidad hacia los tejidos, células, y compartimentos intracelulares, se dieran en el propio principio activo. Pero resulta más sencillo obtener estas características desligando la acción terapéutica de las propiedades físico-químicas que determinan las características clave de su farmacología. De acuerdo con esta estrategia, en los últimos años se han obtenido una serie de nanotransportadores de fármacos denominados “*drug nanocarriers*” o “*drug delivery systems*” (DDS) que confieren al principio activo las propiedades farmacológicas para mejorar su eficacia [1-3]. Estos dispositivos pueden ayudar significativamente a desarrollar nuevas rutas de suministro de medicamentos más selectivas y mejores sistemas de diagnóstico, al mismo tiempo que permiten la liberación controlada de fármacos y son capaces de mejorar su focalización hacia determinados tejidos, células, o compartimentos intracelulares.

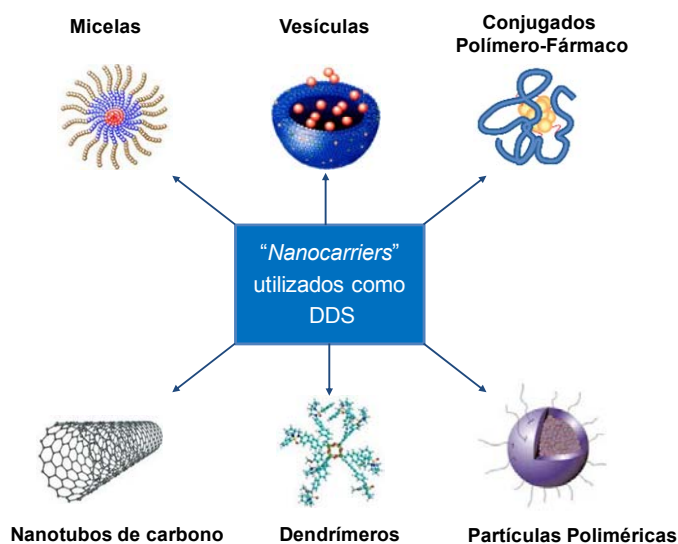


Figura 1.1. Ejemplos de de diferentes DDS utilizados para la liberación controlada de fármacos. Adaptada de [4].

Los primeros “*drug nanocarriers*” investigados fueron los liposomas, por Gregoriadis et al. en 1974 [5]. Desde entonces se han investigado un gran número de nanodispositivos para ser usados como sistemas de liberación de fármacos. En la Figura 1.1 se muestran algunos ejemplos de los “*nanocarriers*” más extensamente investigados el desarrollo de “*drug delivery systems*” (DDS) [4]. Aunque actualmente hay un gran interés en la investigación de sistemas como los dendrímeros [6], los conjugados polímero-fármaco [7], las micelas [8] o incluso los nanotubos de carbono [9], las partículas basadas en polímeros biodegradables y los sistemas vesiculares son los sistemas más utilizados y desarrollados [10].

1.1 Sistemas vesiculares

Los sistemas vesiculares se clasifican como materiales blandos o “*soft materials*”. Estos materiales incluyen las soluciones de polímeros, los coloides, las soluciones de tensoactivos y los cristales líquidos, entre otros. Estos materiales aparentemente distintos entre sí poseen propiedades estructurales y dinámicas similares que se localizan entre las de un sólido cristalino y las de los líquidos y los gases moleculares simples [11].

Un sistema vesicular es una suspensión coloidal de vesículas. Las vesículas son estructuras esféricas formadas por una o más bicapas de moléculas anfifílicas que rodean un espacio de agua. Las moléculas anfifílicas contienen un extremo hidrofílico polar y otro extremo apolar de naturaleza hidrofóbica. Debido a las interacciones hidrofóbicas e hidrofílicas, estas moléculas se orientan y autoensamblan dando lugar a distintas organizaciones supramoleculares entre las que se encuentran las vesículas [12] (Figura 1.2).

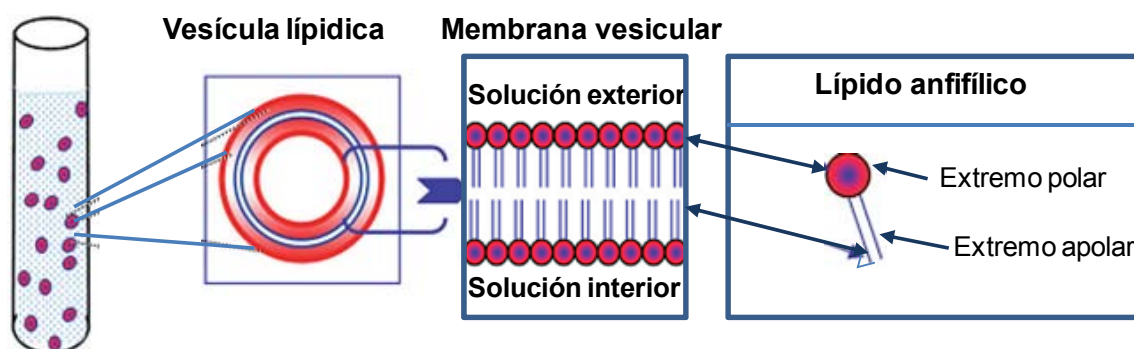


Figura 1.2. Esquema del auto-ensamblaje de moléculas anfifílicas en vesículas cuando se dispersan en un medio acuoso. Adaptada de [13].

Las vesículas se pueden clasificar según su tamaño y número de bicapas de moléculas anfifílicas o lipídicas. Si la membrana está formada por sólo una bicapa de moléculas anfifílicas, la vesícula se denomina “unilamelar”. Si por el contrario, la vesícula está formada por más de una bicapa dispuestas en forma concéntrica y separadas entre sí por amplios espacios acuosos, ésta se denomina vesícula “multilamelar”. Si además de esto se tiene en cuenta el tamaño, las vesículas se clasifican en (ver Figura 1.3) vesículas unilamelares pequeñas o “*small unilamellar vesicles*” (SUVs, $d \leq 200\text{nm}$), vesículas unilamelares grandes o “*large unilamellar vesicles*” (LUVs, $d \geq 200\text{ nm}$), vesículas multilamelares o “*multilamellar vesicles*” (MLVs) y vesículas multivesiculares o “*multivesicular vesicles*” (MVVs). La frontera entre SUVs y LUVs no está clara, mientras algunos autores consideran que se puede hablar de SUVs cuando los diámetros de éstas son inferiores a 50 nm [14], otros autores consideran SUVs a vesículas con diámetros de hasta 200 nm [15], siendo esta última definición la adoptada en este proyecto.

El tamaño de las vesículas puede variar desde los 20 nm hasta unos pocos micrómetros, dependiendo de factores como el tipo de molécula anfifílica, pH, temperatura o fuerza iónica del medio dispersante y, por supuesto, del método utilizado para la preparación del sistema vesicular.

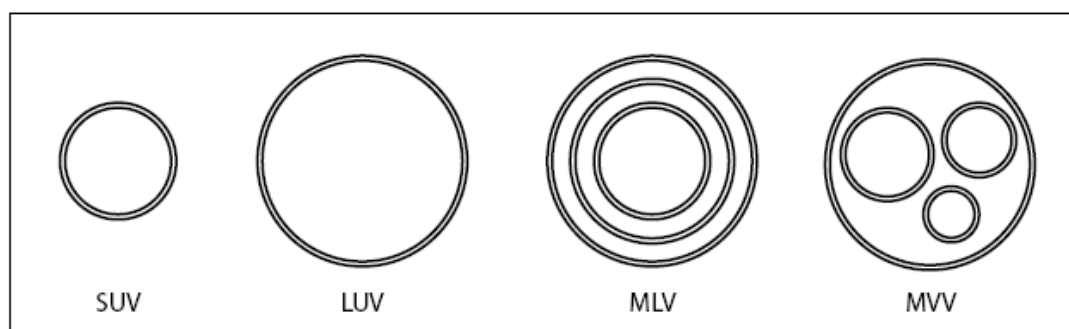


Figura 1.3. Clases de vesículas en función de su tamaño y número de bicapas. SUV: vesícula unilamelar pequeña o “*small unilamellar vesicle*”; LUV: vesícula unilamelar grande o “*large unilamellar vesicle*”; MLV: vesícula multilamelar o “*multilamellar vesicle*”; MVV: vesícula multivesicular o “*multivesicular vesicle*”.

Las vesículas también se pueden clasificar en función de la naturaleza de sus constituyentes en liposomas (formadas por fosfolípidos), niosomas (constituidas por surfactantes no iónicos), vesículas catiónicas (formadas por surfactantes catiónicos) y vesículas catiónicas (formadas por mezclas de surfactantes catiónicos y aniónicos) [16].

Debido a su gran versatilidad, derivada principalmente de la capacidad de modificar la composición y funcionalidad de su membrana lipídica, los sistemas vesiculares presentan diversas e interesantes aplicaciones que abarcan desde su empleo como dispersantes de pigmentos [17], hasta su utilización como mini-reactores [18-19], o modelos de membrana celulares [12]. Sin embargo, el uso de vesículas como vehículos para el suministro controlado de fármacos es probablemente la aplicación más estudiada desde su descubrimiento en los años 60.

1.2 Sistemas vesiculares como sistemas de liberación controlada de fármacos

Las principales características que promueven el uso de los sistemas vesiculares como portadores de fármacos son las siguientes [20]:

- **Dirección.** Las vesículas pueden dirigir el fármaco al lugar deseado del cuerpo, aumentando así la eficacia terapéutica.
- **Duración.** Los sistemas vesiculares pueden actuar como depósitos desde los cuales el fármaco se va liberando de manera controlada con lo que se consigue una acción más duradera y una disminución de la frecuencia de administración.
- **Protección.** Estos sistemas proporcionan protección a las moléculas del fármaco contra la degradación biológica y desnaturalización antes de que éstas logren alcanzar la zona afectada.
- **Internalización.** Las vesículas tienen la capacidad de interactuar con las células diana promoviendo, por ejemplo, la penetración celular de los fármacos que en su forma libre, es decir, no encapsulado no son capaces de penetrar en el interior celular debido a características físico-químicas desfavorables.

La utilización de vesículas en el campo farmacéutico para el transporte de activos terapéuticos viene determinada por tres requisitos básicos. El primero es que la vesícula sea intrínsecamente estable desde el punto de vista físico-químico. El segundo está relacionado con la impermeabilidad de la membrana y su resistencia a la penetración de sustancias, bien sean las propias moléculas encapsuladas intencionadamente o las que se encuentren en el medio externo. El último requisito es la biocompatibilidad de los constituyentes de la vesícula. Bien sean de naturaleza sintética o natural, y la estabilidad de los mismos en disolución frente a procesos de degradación [21].

1.2.1 Encapsulación de fármacos en vesículas. Aspectos generales

Aunque la direccionabilidad o la respuesta a estímulos externos son las características deseadas para el desempeño óptimo de los sistemas de liberación de fármacos o “*drug delivery systems*” (DDS), el principal requisito para el uso exitoso de estos “*nanocarriers*” es que estos se puedan cargar eficientemente con el fármaco deseado. La eficiencia de encapsulación de un determinado fármaco en un sistema vesicular está influenciada por la naturaleza del fármaco, de las vesículas y el procedimiento elegido para la encapsulación [22]. Por lo tanto, la combinación adecuada de éstos es crucial para el logro de un DDS rentable.

A continuación se describe como afectan las características del fármaco y de las vesículas en la eficiencia de encapsulación.

Características del fármaco a encapsular

La naturaleza del fármaco es determinante en el tipo de interacción fármaco-vesícula que pueda establecerse y de las características de las interacciones [23] (ver Figura 1.4):

- (1) *Fármacos hidrofílicos* solubles en agua. Se disuelven en el espacio de agua dentro de las vesículas y no interactúan con la bicapa lipídica
- (2) *Fármacos hidrofóbicos*. Éstos interactúan con la bicapa lipídica y se alojan dentro de ésta.
- (3) *Fármacos con carga eléctrica o iónicos*, que se pueden asociar con la superficie de la vesícula a través de interacciones electrostáticas.
- (4) Fármacos que no son solubles en agua, ni interactúan con la bicapa lipídica ni se asocian con ésta mediante cargas electrostáticas.

Atendiendo a esta clasificación, la encapsulación de fármacos hidrofílicos depende del volumen acuoso atrapado en el seno de las vesículas, y por tanto, de su tamaño y de su lamellaridad (número de bicapas lipídicas).

En el caso de la encapsulación de fármacos hidrofóbicos, la capacidad de encapsulación depende de la concentración lipídica, la longitud de la cadena de los lípidos y de las propiedades (estado de gel o líquido) de las bicapas. En general, estos fármacos tienden a incorporarse de manera más eficiente en las membranas en las que las cadenas hidrofóbicas de los lípidos tienen una considerable libertad de movimiento.

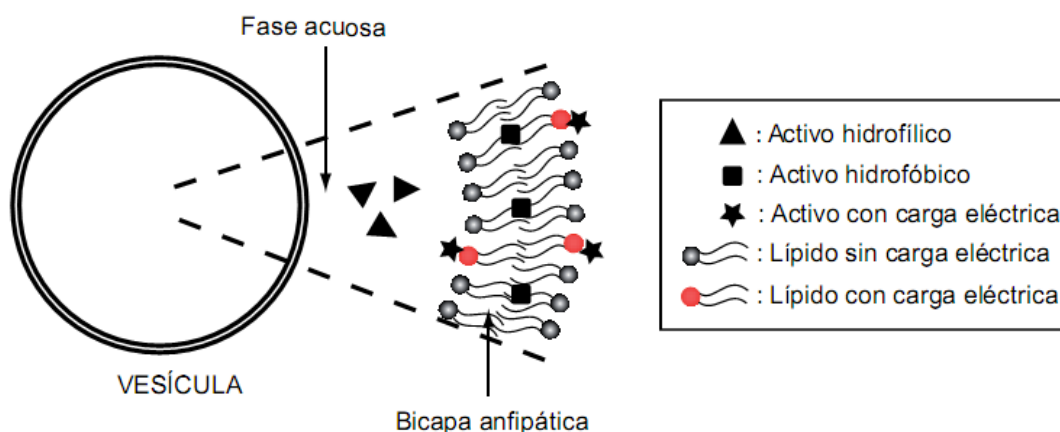


Figura 1.4. Representación esquemática de las diferentes posibilidades de encapsulación en vesículas dependiendo de la naturaleza química del fármaco

En cuanto a los fármacos iónicos, cuya interacción con la membrana se basa en las fuerzas electrostáticas, la encapsulación se ve afectada por la densidad de carga o las cargas que inducen los componentes de la bicapa lipídica y la fuerza iónica del medio acuoso.

Por último, los fármacos clasificados en el grupo 4 presentan una muy baja eficiencia de encapsulación y requieren métodos de encapsulación más sofisticados.

Características del sistema vesicular

Aparte de la naturaleza química de los componentes de la membrana, tanto el tamaño como la lamelaridad (número de bicapas) de las vesículas juegan un papel importante en la encapsulación de ingredientes activos dentro de estas estructuras de autoensamblaje molecular.

En el caso de los fármacos hidrofílicos, que permanecen disueltos en la fase acuosa, son preferibles las vesículas unilamelares a las multilamelares debido a que pueden atrapar un mayor volumen acuoso. Según este criterio, las vesículas unilamelares grandes (LUVs) ($d \geq 200$ nm) son las más adecuadas para encapsular fármacos hidrofílicos, ya que el volumen de agua encapsulada es relativamente alto en comparación con las vesículas pequeñas unilamelares (SUVs) ($d \leq 200$ nm) [24]. Sin embargo, el tamaño de la vesícula es un parámetro crítico en la determinación de la vida media de circulación de éstas en el organismo, siendo éste uno de los factores más importantes que definen su eliminación por el sistema reticuloendotelial (RES) [25]. De hecho, la velocidad de degradación de las vesículas en el sistema reticuloendotelial aumenta con el tamaño. De acuerdo con este criterio las vesículas pequeñas (≤ 100 nm) son las más adecuadas para ser empleadas como DDS ya

que se acumulan más fácilmente que las grandes en los tejidos afectados. Por lo tanto, para obtener un rendimiento óptimo de las vesículas como DDS existe un compromiso entre la capacidad de encapsulación y la vida media de circulación de éstas.

En el caso de los compuestos hidrofóbicos, que se internan en la bicapa lipídica las vesículas más adecuadas para encapsular el activo son MLVs o SUVs debido a su mayor relación superficie/volumen. Pero como se ha comentado anteriormente, para aplicaciones *in vivo* se requieren vesículas con un tamaño del orden de los 100 nm o menor, así que, se prefieren las SUVs a las MLVs para aplicarlas como sistemas de liberación de fármacos.

De lo comentado hasta ahora se desprende que las vesículas más adecuadas para ser empleadas como sistemas de liberación de fármacos tanto para fármacos hidrofóbicos como para fármacos hidrofílicos son las vesículas unilamelares pequeñas, SUVs.

Método de encapsulación

Los métodos de encapsulación se pueden clasificar en dos grupos. Métodos de encapsulación pasiva y en métodos de encapsulación activa [26].

En los métodos de encapsulación pasiva, descritos con más detalle más adelante, la encapsulación del activo se produce durante la formación de las vesículas, de tal manera que la eficacia de encapsulación depende del tipo de la vesícula obtenida (MLV, LUV o SUV).

Por otro lado, las técnicas de encapsulación activas se basan en la capacidad de ciertos compuestos, normalmente ácidos débiles anfipáticos o bases, para redistribuirse a través de la bicapa lipídica en respuesta a un gradiente de iones entre el exterior y el interior de la vesícula. Estos métodos que utilizan vesículas preformadas, proporcionan una mayor eficiencia de encapsulación que las técnicas pasivas [27]. Sin embargo, a pesar de las ventajas de las técnicas activas, éstas son sólo aplicables a ciertos fármacos y requieren protocolos de fabricación más complicados que los métodos pasivos siendo estos últimos los de uso más común para la encapsulación de principios activos en vesículas.

1.3 Métodos convencionales para la encapsulación pasiva de fármacos en vesículas

Los métodos de encapsulación pasiva son métodos en los que el fármaco se añade a la fase acuosa o la fase lipídica y la encapsulación del activo se produce durante el proceso de

fabricación del sistema vesicular. En la Figura 1.5 se muestra un resumen de los métodos convencionales para la producción y post-formación de vesículas.

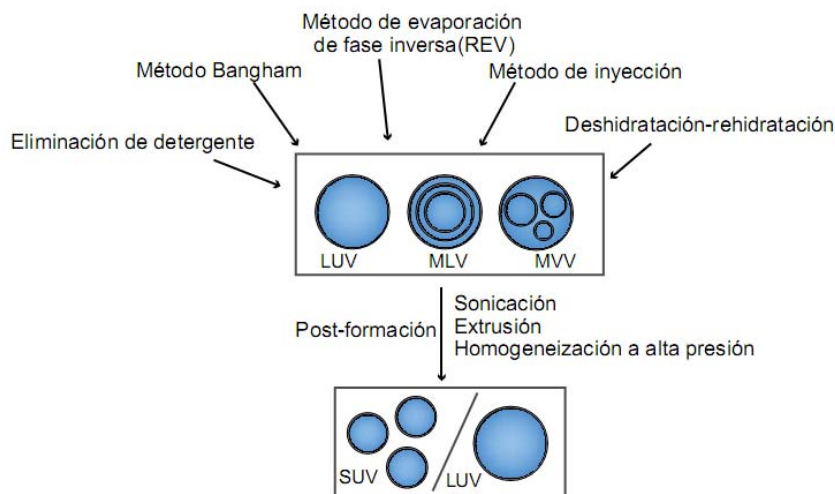


Figura 1.5 Representación esquemática de los métodos convencionales más usados para la producción y post-formación de vesículas.

A continuación se mencionan las técnicas convencionales más utilizadas para la producción de vesículas y encapsulación pasiva de fármacos:

- ◆ **Método Bangham (“thin film hydration or Bangham method”).** Es uno de los métodos más usados para la producción de vesículas. Con este método se obtienen MLVs, es decir, vesículas grandes multilamelares. Éstas son poco homogéneas y se obtienen bajas eficiencias de encapsulación. Después de la formación de las vesículas se emplean ciclos de congelación-descongelación para mejorar la eficiencia de encapsulación [28].
- ◆ **Métodos de fase inversa (“reverse phase methods”).** Dentro de éstos están incluidos el método de evaporación de fase inversa (“reverse phase evaporation”. REV) y el método de inyección (“solvent injection method”). Con el método de evaporación de fase inversa (REV) [29] se obtienen MLVs. En cambio, con el método de inyección [30] se obtienen LUVs.
- ◆ **Método de eliminación de detergente (“detergent depletion method”).** Con este método se obtienen LUVs. Los principales inconvenientes de esta metodología que impiden su escalado industrial son la baja concentración final de vesículas en el medio, la baja eficiencia en la encapsulación de compuestos hidrofóbicos, la larga duración del proceso y los residuos de detergente en el medio [28, 31].

- ◆ **Método de deshidratación y rehidratación (“*dehydration-rehydration procedure*”)**
Descrito por Kirby and Gregoriadis [31]. Con este método se obtienen MLVs y altas eficiencias de encapsulación.

Como se comentó en el Apartado 1.2, las vesículas unilamelares con un tamaño del orden de los 100 nm suelen ser las más adecuadas para aplicaciones *in vivo*. Debido a que con la mayoría de las técnicas explicadas anteriormente generalmente se obtienen vesículas grandes y/o multilamelares, normalmente es necesario un tratamiento posterior para alcanzar las características óptimas de tamaño y rareza. Los métodos más comunes para el procesamiento posterior a la formación son **sonicación** [32], **extrusión** [33-35] y **homogeneización a alta presión** [36-37]. Con estas metodologías se utiliza una fuerza mecánica para dividir las vesículas grandes en vesículas pequeñas unilamelares. La necesidad de utilizar estos métodos mecánicos limita el uso de los métodos convencionales para la encapsulación de moléculas frágiles, ya que éstas se pueden ver alteradas durante estos tratamientos.

Las principales desventajas de los métodos convencionales de preparación de vesículas unilamelares es que en general son complejos, son difíciles de escalar y se obtienen bajas eficiencias de encapsulación. Así pues, hoy en día existe un gran interés en el desarrollo de nuevos métodos para la preparación de vesículas en los que las limitaciones inherentes a las técnicas de producción por metodologías convencionales sean reducidas o eliminadas. En este sentido, desde la década de los 90 los fluidos comprimidos han demostrado ser una buena alternativa a los disolventes líquidos convencionales para la producción eco-eficiente de materiales micro y nanoestructurados con aplicación en el campo de la nanomedicina [38-40].

1.4 Métodos basados en el uso de fluidos comprimidos (FCs) para la encapsulación pasiva de fármacos en sistemas vesiculares

Ya se ha comentado antes el gran potencial de aplicación que tienen los sistemas vesiculares dentro la industria farmacéutica, sin embargo, su utilización industrial depende en gran medida del desarrollo de métodos de preparación baratos, simples y de una sola etapa de procesado y que puedan realizarse bajo protocolos de “*Good Manufacturing Practice*” (GMP) [16].

1.4.1 Fluidos comprimidos. Aspectos generales

Los fluidos comprimidos se definen como sustancias que en condiciones ambientales se encuentran en estado gaseoso, pero que al someterlas a presiones más elevadas que la atmosférica se pueden convertir en líquidos o fluidos supercríticos.

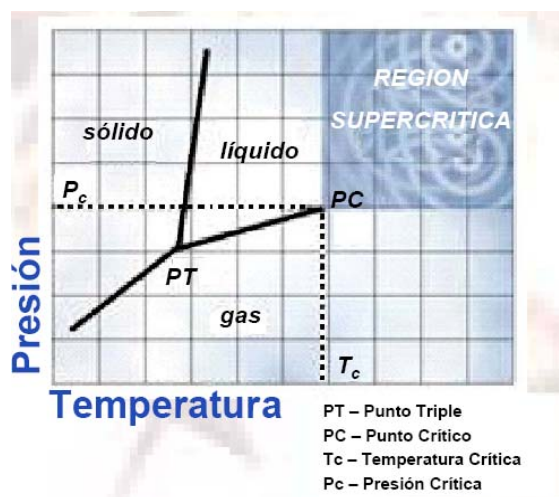


Figura1.6. Diagrama de fases P vs T de un fluido comprimido. Tomada de [41].

El estado supercrítico se alcanza cuando el fluido es sometido a condiciones por encima de su temperatura y presión crítica, T_c y P_c respectivamente [42]. En este estado la línea de separación de fases líquido-gas se interrumpe y se forma una única fase (ver Figura1.6) en la que el fluido tiene propiedades intermedias entre las de un líquido y las de un gas, presentando densidades cercanas a las de los líquidos y difusividades parecidas a las de los gases.

Durante las dos últimas décadas los FCs han despertado un gran interés como disolventes verdes para la síntesis y el procesamiento de materiales estructurados a escala micro, macro y supramolecular [43-45] En este marco, algunos grupos de investigación están explorando la utilización de los FCs, principalmente CO_2 , para la preparación de vesículas unilamelares pequeñas, SUVs.

1.4.2 Métodos basados en fluidos comprimidos para la preparación de sistemas vesiculares

Los procesos basados en fluidos comprimidos son una alternativa prometedora a las metodologías convencionales de preparación de sistemas vesiculares. El fluido comprimido más usado es el CO_2 . Éste tiene una presión crítica, P_c , de 7,4 MPa y una temperatura

crítica, T_C , de 304 K. La baja T_C del CO_2 implica que se requiere poca cantidad de energía para procesar el gas denso (fluido en estado supercrítico) y también que éste sea adecuado para el procesado de materiales termolábiles. Por otro lado, los FCs pueden proporcionar condiciones estériles de fabricación.

La mayoría de los métodos que utilizan CO_2 comprimido para la producción de vesículas comprenden una mezcla entre el gas denso, los componentes de la membrana y un co-solvente. A continuación se citan algunos de los métodos basados en FCs existentes para la fabricación de vesículas:

- ◆ Métodos de inyección con fluidos supercríticos (*“supercritical fluid injection”*) y de descompresión con fluidos supercríticos (*“decompression method”*) [46].
- ◆ *“Superfluids phospholipid nanosome (SFS-CFN) method”* [47].
- ◆ *“Supercritical fluid liposome”* [48].
- ◆ Método de evaporación en fase reversa supercrítica (*“Supercritical reverse phase evaporation”*, scRPE) [49].

Con estas metodologías se obtienen SUVs estériles con una calidad igual o superior a la obtenida con muchos de los métodos convencionales. Además, estas metodologías constan de sólo una o dos etapas de fabricación y también se minimiza el uso de disolventes orgánicos. A pesar de estas claras ventajas, la producción de vesículas con fluidos comprimidos a día de hoy presenta algunas limitaciones, entre ellas, cabe mencionar las elevadas presiones (>20M Pa) y temperaturas (>330 K) requeridas debido a la baja solubilidad de los lípidos en el CO_2 supercrítico [50].

Con el fin de aprovechar las ventajas de los procesos de producción mediante fluidos comprimidos pero evitando el uso de elevadas presiones y elevadas temperaturas de trabajo, el grupo Nanomol (ICMAB-CSIC) desarrolló el método DELOS-susp [51], para la producción de vesículas unilamelares. En este proceso, explicado más detalladamente en el apartado siguiente, las vesículas se obtienen al despresurizar una solución de lípidos expandida con CO_2 sobre una solución acuosa. Con esta metodología se emplean presiones (~10 MPa) y temperaturas (~308 K) más suaves que con las metodologías basadas en fluidos comprimidos mencionadas anteriormente. El empleo de temperaturas suaves de trabajo hace a este método atractivo para procesar compuestos termolábiles, esto junto al hecho de emplear presiones más bajas puede contribuir notablemente a la reducción del coste de una planta de producción.

1.4.3 Procedimiento DELOS-susp para la fabricación de vesículas

La producción de vesículas mediante DELOS-susp se basa en la despresurización de una solución de los lípidos de membrana expandida con CO_2 sobre una fase acuosa [51]. Como se muestra en la Figura 1.7, el proceso DELOS-susp se puede dividir en tres etapas.

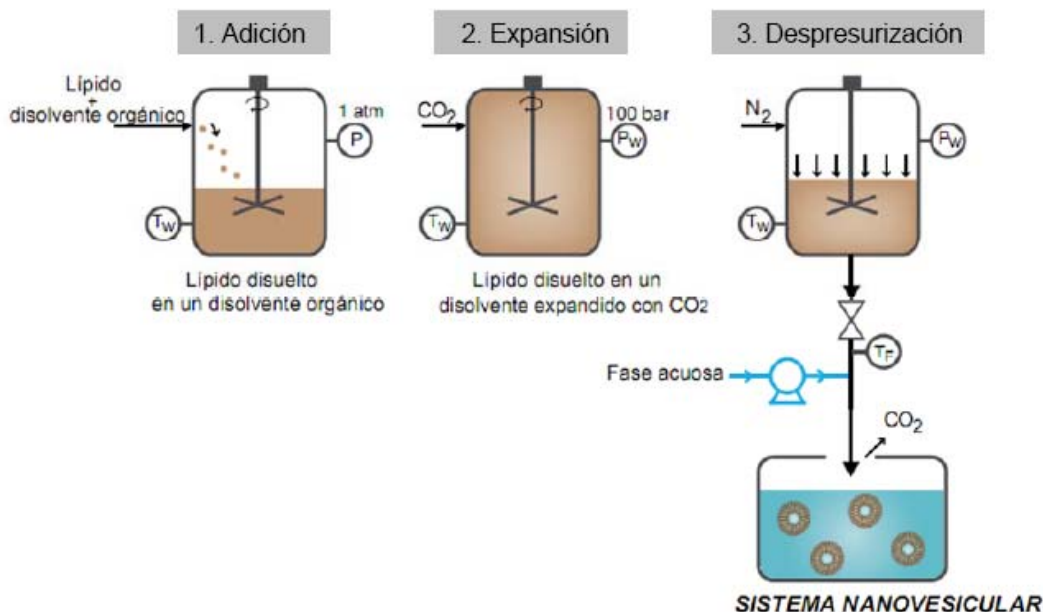


Figura 1.7. Representación esquemática del proceso DELOS-susp para la fabricación de vesículas 1) Carga de un reactor con una solución orgánica del lípido a T_w y presión atmosférica. 2) Expansión de la solución orgánica del lípido añadiendo CO_2 hasta alcanzar X_w y P_w a T_w . 3) Despresurización de la solución expandida con CO_2 sobre una corriente de fase acuosa desde P_w a P_{atm} .

Etapas del proceso:

- (1) En la primera etapa los lípidos de membrana se disuelven en un solvente orgánico convencional a presión atmosférica y a la temperatura de trabajo, T_w .
- (2) En la segunda etapa se añade CO_2 con el fin de obtener una solución expandida de los constituyentes de la membrana vesicular a T_w , a alta presión, P_w , y con una determinada fracción molar de CO_2 , X_w .
- (3) Por último, la solución expandida se despresuriza desde P_w hasta presión atmosférica sobre un flujo continuo de fase acuosa para obtener nanovesículas unilamelares y uniformes. Durante la despresurización la solución de lípido, experimenta una gran disminución de la temperatura de manera abrupta y muy homogénea. Esta brusca y homogénea disminución de la temperatura es probablemente la razón por la cual este

procedimiento proporciona vesículas más homogéneas en términos de tamaño, morfología y organización supramolecular en comparación con los procedimientos convencionales [51].

También es posible preparar vesículas por DELOS-susp disolviendo parte de los lípidos de membrana en la solución expandida con CO_2 y disolviendo el resto en la fase acuosa.

Para poder producir vesículas por DELOS-susp es necesario encontrar una mezcla “lípidos/disolvente orgánico/ CO_2 ” que forme una sola fase a las condiciones de trabajo empleadas (P_w , T_w , X_w). Como se puede observar en la Figura 1.8 a la izquierda, si el CO_2 tiene un fuerte carácter anti-solvente, en esta mezcla existe poco margen para la obtención de una sola fase dándose la precipitación de los lípidos en solución desde fracciones molares de CO_2 (X_{CO_2}) muy bajas. Por el contrario, cuando el CO_2 se comporta como co-solvente para un amplio rango de X_{CO_2} existe más margen para que dicha mezcla se encuentre formando una sola fase en las condiciones de trabajo, pudiéndose así aplicar el método DELOS-susp para la producción de SUVs [51].

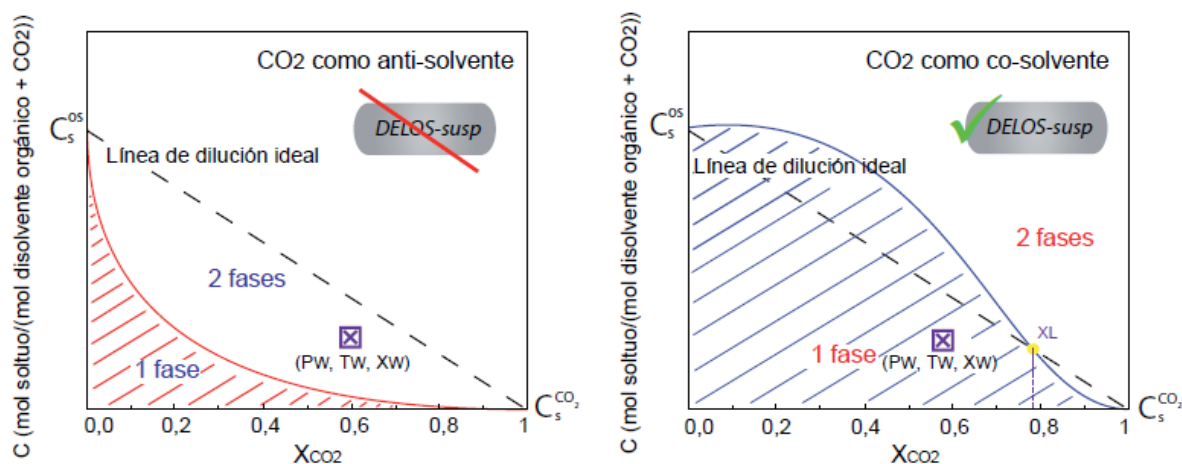


Figura 1.8. Variación de la solubilidad de un soluto (p.ej: un lípido) en una mezcla de solvente orgánico/ CO_2 a T_w , P_w desde $X_{\text{CO}_2} = 0$ a $X_{\text{CO}_2} = 1$. *Línea punteada:* variación de la solubilidad en un proceso de dilución ideal. *Izquierda:* La curva de solubilidad se encuentra por debajo de la línea de dilución ideal, actuando el CO_2 como anti-solvente e impidiendo el uso de DELOS-susp. *Derecha:* El CO_2 actúa como co-solvente hasta X_L favoreciendo el uso de DELOS-susp. X_L : Punto de intersección entre la línea de dilución ideal y la curva de solubilidad real. \square : X_{CO_2} usada normalmente para la producción de vesículas por DELOS-Susp, si el CO_2 se comporta como anti-solvente, ésta se sitúa en la zona de dos fases. Por el contrario, si el CO_2 actúa como co-solvente, ésta se sitúa en la zona de 1 fase.

Durante los últimos años el grupo Nanomol ha utilizado el método DELOS-susp para preparar sistemas vesiculares con diferentes lípidos [52]. Así por ejemplo, mediante DELOS-susp se han obtenido vesículas ricas en colesterol, con una relación molar 1:1 de colesterol y bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), unilamelares, nanoscópicas y con una uniformidad morfológica muy elevada. En la Figura 1.9 se representan las estructuras moleculares de del colesterol y el CTAB.

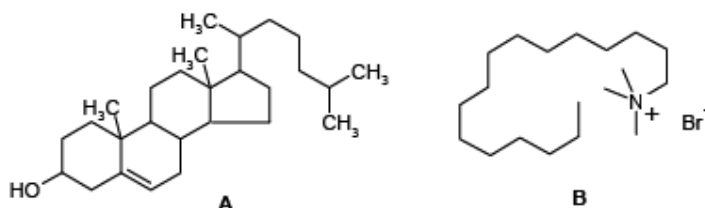


Figura 1.9. Representación de las estructuras moleculares del colesterol (A) y CTAB (B).

Estas vesículas presentan características físico-químicas únicas comparadas con las vesículas preparadas mediante métodos de mezclado convencional utilizando la misma composición de sistema. En las curvas de distribución de tamaño observados por “*dynamic light scattering*” representadas en la Figura 1.10 se puede ver que las vesículas preparadas por DELOS-susp son más pequeñas y presentan una distribución de tamaño de partícula más estrecha que las preparadas por el método convencional, con el que se obtiene una amplia distribución de tamaños.

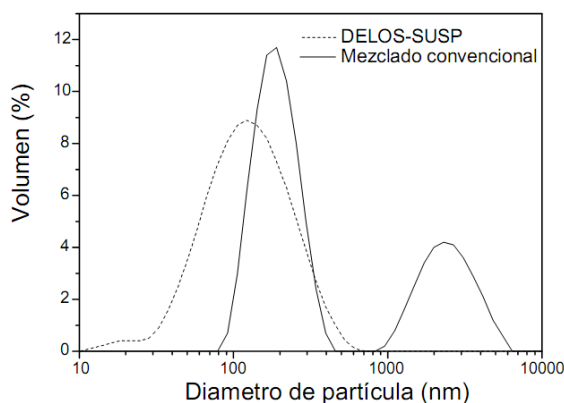


Figura 1.10. Curvas de distribución del tamaño de partícula medidas por “*dynamamic light scattering*” (DLS) de las vesículas ricas en colesterol preparadas por el método DELOS-susp (línea discontinua) y de las vesículas preparadas por un método convencional de mezclado (línea continua). Las curvas se representan en términos de porcentaje en volumen. Figura adaptada de.[13].

Además, en la Figura 1.11 se puede ver que las vesículas preparadas por DELOS-susp son más estables y su morfología, observada por microscopía electrónica de transmisión criogénica (crio-TEM), es más uniforme que la que presentan las vesículas preparadas por el método convencional de mezclado, con el cual se obtiene una mezcla heterogénea de vesículas oligo- y multilamelares [13].



Figura 1.11. Imágenes captadas por cryo-TEM de vesículas ricas en colesterol preparadas por DELOS-susp (imagen A) y por el método convencional de mezclado (imagen B). En la fotografía central se muestran los sistemas vesiculares después de un mes de haber sido preparados por el método convencional de mezclado (las dos imágenes de la izquierda) y por DELOS-susp (imagen de la derecha) Adaptada de [13].

Hasta ahora mediante DELOS-susp, sólo se han fabricado vesículas blancas, es decir, vesículas sin ningún activo encapsulado. Como un paso más en el desarrollo de este método basado en fluidos comprimidos, en este proyecto se ha estudiado la viabilidad de este proceso para la encapsulación de activos hidrofílicos en vesículas unilamelares pequeñas, SUVs.

2. Objetivos

El objetivo del presente trabajo es evaluar la viabilidad de la tecnología DELOS-susp para encapsular activos terapéuticos solubles en agua en vesículas de colesterol:CTAB, y evaluar la escalabilidad de esta nueva metodología de encapsulación.

3. Obtención por DELOS-susp de vesículas de colesterol:CTAB utilizando etanol como disolvente orgánico

Antes de iniciarse el presente trabajo, en todos los experimentos previos de preparación de vesículas de colesterol:CTAB por DELOS-susp se utilizaba acetona como disolvente orgánico. Se obtuvieron así vesículas vacías con una relación molar 1:1 de colesterol:CTAB. Estas vesículas se obtuvieron despresurizando una solución de colesterol en acetona expandida con CO₂ sobre una fase acuosa que contenía CTAB. Con el objeto de extender el uso de DELOS-susp a otros disolventes orgánicos en el presente trabajo se explora la posibilidad de emplear etanol expandido con CO₂ en vez de acetona para la producción de SUVs por DELOS-susp.

3.1 Determinación de la curva de solubilidad del sistema “colesterol/etanol/CO₂”

La viabilidad de preparar por DELOS-susp vesículas de colesterol:CTAB utilizando etanol en lugar de acetona, viene determinada por el comportamiento de solubilidad del colesterol en etanol expandido con CO₂ a las condiciones de trabajo (P_w, T_w, X_w) empleadas. Si la solubilidad del colesterol disminuye rápidamente al incrementar la cantidad de CO₂ en la mezcla con el solvente (ver Figura 1.8, izquierda) no será posible utilizar el etanol para preparar vesículas de colesterol:CTAB por DELOS-susp. Si por el contrario, la solubilidad del colesterol en la mezcla “etanol/CO₂” se mantiene por encima de la línea de dilución ideal en un amplio rango de X_{CO_2} , el proceso DELOS-susp será viable para obtener dicho sistema vesicular (ver Figura 1.8, derecha).

Por esta razón en este trabajo se ha determinado por primera vez la variación de la solubilidad del colesterol en mezclas “etanol/CO₂” a $P_w=10$ MPa y $T_w=308$ K al variar X_{CO_2} . Para determinar esta curva de solubilidad se empleó el método “*vanishing point*” [53-54], descrito detalladamente en la Parte Experimental, Apartado 7.2.2. Este método se basa en la observación de la redisolución progresiva, y finalmente completa, de un sólido *C* que se encuentra en equilibrio con una fase saturada de él mismo en dos fluidos *A* y *B* miscibles entre sí, la cual se da como consecuencia del cambio de composición de la fase binaria *A/B*

para aumentar su poder disolvente. Este método es adecuado para determinar solubilidades tanto a presión atmosférica, donde los dos disolventes A y B son disolventes orgánicos convencionales, como a alta presión, donde A y B pueden ser respectivamente, un disolvente orgánico convencional y un fluido comprimido, como por ejemplo el CO₂.

La determinación de solubilidades por el método “vanishing point” se realizó mediante un analizador de fases a alta presión basado en una celda de volumen variable esquematizada en la Figura 3.1 y descrita con más detalle en el Apartado 7.2.2.1.

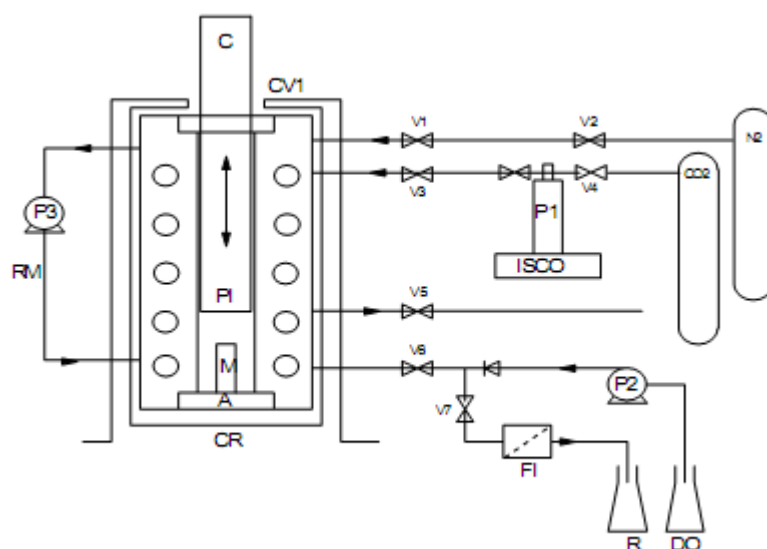


Figura 3.1. Diagrama de flujo del analizador de fases. A: sistema de agitación; C: cilindro neumático; CV1: celda de volumen variable; CR: cámara de calor o frío; DO: disolvente o disolución orgánica; FI: filtro; P: bomba; PI: pistón; R: residuo; RM: sistema de recirculación; V: válvula. M: muestra sólida.

La curva de solubilidad se halló para P=10 MPa y T=308 K, ya que son las condiciones de trabajo a las que se deseaban obtener las vesículas de colesterol:CTAB mediante DELOS-susp. Los resultados de los puntos obtenidos experimentalmente se muestran en la Tabla 3.1. Estos puntos se ajustaron a la Ecuación 3.1,

$$C_S = C_S^A (1 - X_B)^{(\alpha + \beta X_B)} + C_S^B X_B \quad (3.1) \quad [53]$$

Donde:

- C_S es la concentración de saturación del soluto, en este caso colesterol, en la solución expandida (mol soluto/mol disolvente expandido).

- C_S^A es la concentración de saturación del soluto en el disolvente **A**. En este caso el disolvente **A** es etanol y $C_S^A = 4,45E-03$ (mol colesterol/mol etanol).
- C_S^B es la concentración de saturación del soluto en el disolvente **B**. En este caso el disolvente **B** es CO₂ y $C_S^B \sim 0$ (mol colesterol/mol CO₂).
- X_B es la fracción molar del disolvente **B** en la mezcla disolvente. En este caso X_B es igual a la fracción molar de CO₂ (mol CO₂/(mol CO₂ + mol etanol))
- α y β son los coeficientes de la Ecuación 3.1 obtenidos ajustar los datos experimentales (X_B, C_S) a dicha ecuación.

Tabla 3.1. Valores de solubilidad (C_S) del colesterol en mezclas “etanol/CO₂” determinadas a diferentes valores de X_{CO_2} a P=10MPa y T=308K.

X_{CO_2}	C(mol colesterol/(mol etanol+mol CO ₂))
Sistema “colesterol/etanol/CO₂”	
0 ^a	4,5E-03
0,21	5,1E-03
0,49	3,8E-03
0,50	3,4E-03
0,70	1,6E-03
0,72	1,7E-03
0,90	2,6E-04
1	~0

^a La solubilidad del colesterol en etanol a 308 K y presión atmosférica fue hallada tal y como se describe en el Apartado 7.2.1.

El ajuste de los datos de la Tabla 3.1 a la Ecuación 3.1, permite obtener la siguiente expresión (Ecuación 3.2) que describe la variación de la solubilidad del colesterol con la fracción molar de CO₂ en mezclas “etanol/CO₂” a P=10 MPa y T=308 K

$$C_S = 4,45E - 03 \cdot (1 - X_{CO_2})^{(-1,02+2,65X_{CO_2})} \quad (R^2=0,995). \quad (3.2)$$

La curva de solubilidad obtenida de ajustar los resultados experimentales a la Ecuación 3.1 se representa en la Figura 3.2. En ella se puede observar que el CO₂ tiene un fuerte carácter co-solvente en el sistema “colesterol/etanol/CO₂” e incluso llega a tener un comportamiento sinérgico, donde la solubilidad del colesterol en la mezcla “etanol/CO₂” es superior a la que presenta en estos dos compuestos por separado, hasta $X_{CO_2}=0,4$. La concentración de CO₂ límite (X_L) a partir de la cual el CO₂ tiene un efecto anti-solvente se determina a partir del punto de intersección entre la curva de solubilidad del colesterol y la variación lineal ideal de

la solubilidad con la fracción molar de CO_2 , X_{CO_2} . Tal y como se puede observar en la Figura 3.2 el valor de X_L , a partir del cual el CO_2 empieza a manifestarse como anti-solvente, para este sistema es de 0,76. Así pues, el comportamiento de solubilidad del colesterol en mezclas “etanol/ CO_2 ” estudiada en el presente trabajo indica que la preparación de vesículas de colesterol:CTAB mediante DELOS-susp es factible utilizando etanol como disolvente, ya que el CO_2 se comporta como co-solvente para un amplio margen de X_{CO_2} .

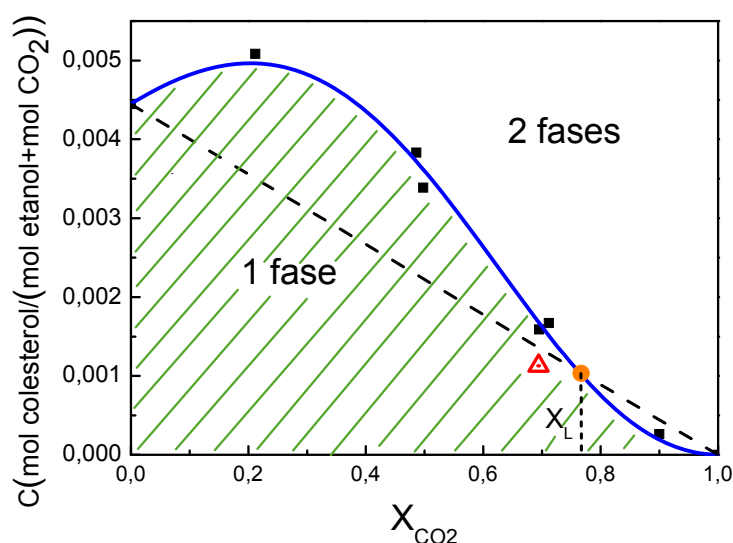


Figura 3.2. (■): Valores de solubilidad del colesterol en mezclas “etanol/ CO_2 ” a $P_w=10\text{MPa}$ y $T_w=308\text{K}$ medidos con un analizador de fases a alta presión a partir del método del punto evanescente. (—): Ajuste realizado para visualizar la evolución de la solubilidad. (---): Variación de la solubilidad según un proceso de dilución ideal. (Δ): Concentración de colesterol y X_{CO_2} en la solución expandida, elegida para realizar los experimentos por DELOS-susp. (X_L): Intersección entre la curva de dilución ideal y la curva de solubilidad

Es interesante mencionar que el comportamiento sinérgico del CO_2 que se da en esta mezcla, no se produce cuando el disolvente orgánico empleado es acetona y que fue utilizada para fabricar vesículas de colesterol:CTAB como disolvente orgánico en un trabajo anterior realizado en el mismo grupo en el que se realizó este proyecto [16].

3.2 Fabricación de vesículas de colesterol:CTAB por DELOS-susp utilizando etanol como disolvente orgánico

En el presente proyecto se estudió si, al igual que ocurre con la acetona, utilizando etanol como disolvente orgánico también se obtienen vesículas de colesterol:CTAB (1mol:1mol) unilamelares pequeñas (SUVs) mediante DELOS-susp. Para ello, de acuerdo con la curva de solubilidad hallada en el apartado anterior y teniendo en cuenta que cuanto mayor sea la

fracción molar de CO₂ utilizada, más grande será el enfriamiento sufrido por la solución y más pequeñas serán vesículas obtenidas[16], se eligió una fracción molar cercana a X_L para la preparación de las vesículas de colesterol:CTAB. La fracción molar de trabajo, X_W, elegida fue igual a 0,7 (en la Figura 3.2 se refleja la X_W y la concentración de colesterol en la solución expandida elegidas para realizar los experimentos por DELOS-susp).

Una vez que las condiciones de trabajo, P_W, T_W y X_W fueron fijadas, se procedió a la obtención de vesículas de colesterol:CTAB mediante el proceso DELOS-Susp empleando etanol como disolvente orgánico.

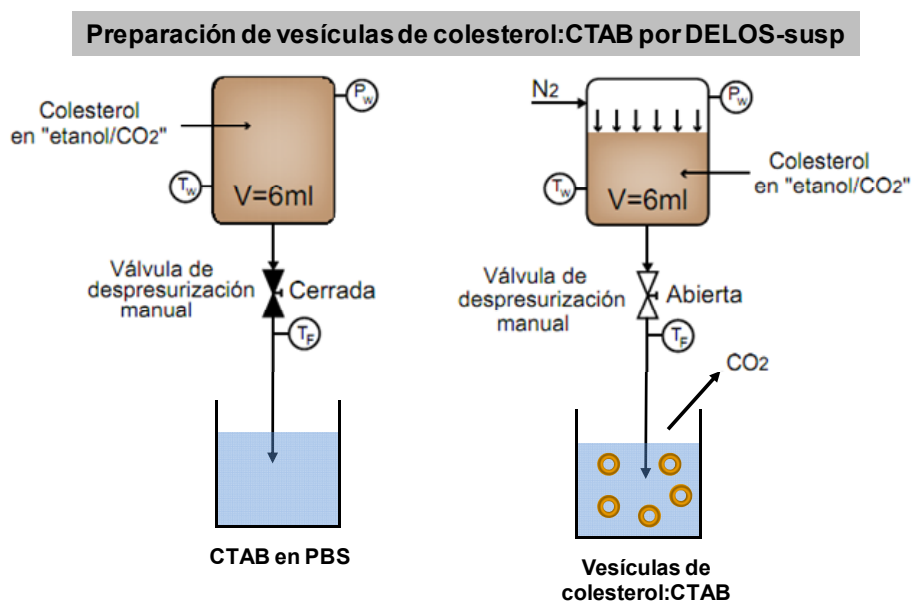


Figura 3.3. Esquema del equipo y el procedimiento utilizado para fabricar vesículas de colesterol:CTAB por DELOS-susp.

Estos experimentos se realizaron utilizando el equipo y el procedimiento esquematizado en la Figura 3.3 siguiendo el procedimiento experimental descrito detalladamente en la parte experimental (Apartado 7.3.1.2). Según este procedimiento, se disolvieron 76 mg de colesterol en 2,9 ml (V) de etanol y se introdujeron en un reactor (V=6 ml) a T_W= 308 K. Después de 20 minutos de estabilización térmica se introdujo CO₂ en el reactor hasta conseguir la presión de trabajo deseada (P_W= 10 MPa), obteniéndose una fracción molar de CO₂ de X_W=0,7. Después de al menos una hora de homogeneización, la solución expandida con CO₂ se despresurizó sobre una solución tampón de fosfato (PBS, 100 mM, pH = 7,4) que contenía 68 mg de CTAB. Se utilizó una corriente de N₂ a P_W =10 MPa como émbolo para empujar la solución en el reactor de 6 ml con el fin de mantener una P_W constante durante la etapa de despresurización. La gran, homogénea y rápida disminución de temperatura producida por la expansión del CO₂ reduce la solubilidad del colesterol cuya precipitación se

evita debido a la presencia del CTAB contenido en la fase acuosa que entra en contacto con la fase orgánica durante la despresurización, produciéndose la formación *in situ* de las vesículas de colesterol:CTAB. Tal y como se muestra en la Tabla 3.2 este experimento se realizó por triplicado para evaluar la reproducibilidad de la metodología.

Se determinó el tamaño medio y la distribución de tamaños de las vesículas producidas en cada experimento mediante la técnica de dispersión dinámica de luz o “*dynamic light scattering*” (DLS) y siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 7.4.1. Como se puede observar en la Tabla 3.2, el tamaño promedio de las vesículas es de alrededor de unos 150 nm. Comprobándose así, que al emplear etanol como disolvente orgánico en el proceso DELOS-susp se obtienen vesículas nanoscópicas.

Tabla 3.2 Tamaño, estabilidad y morfología de las vesículas de colesterol:CTAB obtenidas mediante DELOS-susp empleando etanol como disolvente.

Exp ^a	Tamaño		Estabilidad Potencial Z (mV)	Morfología ^d
	Medio ^b (nm)	Pdl ^c		
1-A	169,2±2,0	0,51±0,02	50,1±1,4	SUVs ^e
1-B	134,3±0,5	0,47±0,00	38,3±0,9	
1-C	124,6±1,7	0,46±0,01	50,0±2,9	
Med ^f	142,7±23,5	0,48±0,29	46,1±6,8	SUVs

Los experimentos de fabricación de vesículas de colesterol:CTAB se realizaron con soluciones expandidas de “EtOH/CO₂” a 10 MPa, 308 K y $X_{CO_2} = 0,7$ con un reactor de 6 ml. ^a A, B y C son diferentes réplicas del mismo experimento. ^b Media ponderada del tamaño de partícula medido por “dynamic light scattering” (DLS). ^c Índice de polidispersidad. ^d Morfología de las vesículas observadas por cryo-TEM. ^e SUVs: Vesículas pequeñas unilamelares. ^f Media: Obtenido de la media de las 3 muestras.

Así mismo, se evaluó la estabilidad de las suspensiones mediante la medida del potencial Z de éstas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 7.4.2. Desde un punto de vista teórico el potencial Z es la diferencia de potencial entre el medio dispersante y la capa estacionaria de líquido que hay alrededor de la superficie de las partículas coloidales, en este caso las vesículas, y es indicativo del grado de repulsión entre las partículas adyacentes de una dispersión. Cuando el potencial Z es bajo (en valor absoluto), la atracción supera la repulsión y las partículas tienden a flocular o precipitar. Así, las suspensiones coloidales con un potencial Z en valor absoluto alto son eléctricamente estables. Por el contrario, las suspensiones coloidales con un potencial Z con un valor absoluto bajo tienden a coagular o flocular con el tiempo (ver Figura 3.4). Desde un punto de vista práctico se considera que una suspensión es estable cuando el potencial Z en valor absoluto es mayor de 30 mV [55]. Como se puede observar en los resultados mostrados en la Tabla 3.2, el potencial Z en cada

experimento es mayor a 30 mV con lo que según este criterio las suspensiones obtenidas son estables.

Potencial Z	Estabilidad de las suspensiones
0 - ± 5	Rápida coagulación o floculación
± 10 - ± 30	Inestabilidad incipiente
± 30 - ± 40	Estabilidad moderada
± 40 - ± 60	Buena estabilidad
$\geq \pm 60$	Estabilidad excelente

Figura 3.4. Valores indicativos de la estabilidad de suspensiones coloidales según el potencial Z de éstas. Adaptada de [55].

También se realizó una caracterización morfológica de los sistemas vesiculares obtenidos. Ésta se realizó mediante microscopía electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM) siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado 7.4.2. En la Figura 3.5 se muestra una imagen de vesículas obtenidas por DELOS-sup empleando etanol como disolvente. Se puede observar que se obtuvieron vesículas unilamelares esféricas o casi esféricas del orden de los 100 nm.

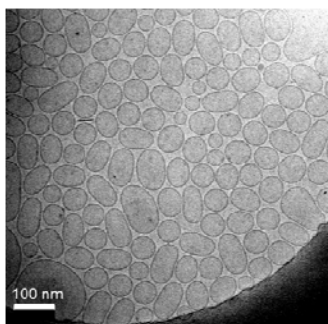


Figura 3.5. Vesículas de colesterol fabricadas mediante DELOS-susp empleando etanol como disolvente, observadas por cryo-TEM. Aumento: 20000 x.

Así pues, los resultados obtenidos muestran que empleando etanol como disolvente se obtienen suspensiones estables de vesículas unilamelares de colesterol:CTAB (1mol:1mol) con un tamaño nanoscópico. Una vez comprobado esto, se procedió a realizar los experimentos de encapsulación del activo hidrofílico sulfato de gentamicina (GS) en vesículas de colesterol:CTAB (1mol:1mol) mediante el proceso DELOS-susp.

4. Encapsulación de sulfato de gentamicina (GS) en vesículas colesterol:CTAB por DELOS-susp

La viabilidad de utilizar el proceso DELOS-susp para la encapsulación directa de activos hidrofílicos en vesículas nanoscópicas unicapa de colesterol:CTAB (relación molar 1:1) se realizó empleando sulfato de gentamicina (GS) como activo modelo.

La gentamicina es un antibiótico aminoglicósido con un amplio espectro de acción. Este antibiótico está formado por una mezcla de varios componentes denominados C₁, C_{1a}, C₂, C_{2a} en proporciones variables (ver Figura 4.1). Todos estos componentes tienen la misma actividad antibacteriana siendo efectivos contra una gran variedad de bacterias Gram positivas y Gram negativas. El sulfato de gentamicina, (GS), es la forma comercial más usada de este antibiótico, pero debido a su naturaleza hidrofílica su eficiencia terapéutica es baja, requiriéndose grandes dosis para alcanzar una concentración suficiente en el centro de la infección que pueden producir efectos adversos en los pacientes. Es por este motivo que existe un gran interés en desarrollar sistemas de liberación de fármacos aplicables a este antibiótico para el tratamiento de diferentes infecciones [56-57].

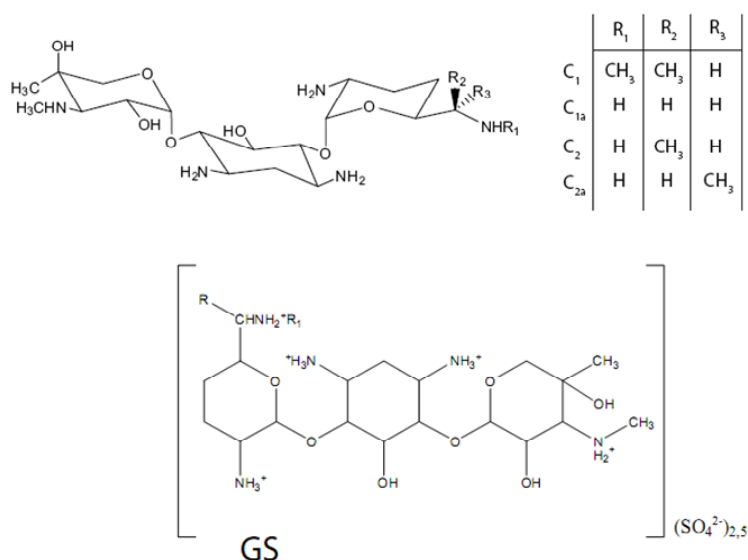


Figura 4.1. Arriba: estructura molecular de los componentes de la gentamicina, fórmula general Abajo: estructura molecular del sulfato de gentamicina (GS).

Anteriores estudios, han demostrado que los sistemas vesiculares poseen una mayor eficiencia terapéutica que la forma libre del antibiótico [58-61]. Sin embargo, con las metodologías empleadas para encapsular GS en vesículas pequeñas unilamelares tan solo se han conseguido eficiencias de encapsulación en el rango del 1% al 5%, dependiendo del

método de preparación [58, 60, 62]. Así pues, en este aspecto se ha explorado la viabilidad de la tecnología DELOS-susp para encapsular GS.

En base a las condiciones de preparación de vesículas vacías o blancas de colesterol:CTAB descritas en el Apartado 3.2, se evaluó la encapsulación de GS en estas vesículas al producirlas por DELOS-susp. Con este objetivo se realizó un experimento de encapsulación de sulfato de gentamicina (GS) en vesículas de colesterol:CTAB utilizando el mismo equipo (equipo de 6 ml) y empleando el mismo procedimiento experimental seguido en la preparación de vesículas no cargadas (Apartado 3.2), pero con la diferencia de que en este caso se disolvieron 120 mg de (GS), en la fase acuosa, teniéndose así una relación molar de GS:lípido* igual a 0,44:1. En la Figura 4.2 se esquematiza el procedimiento DELOS-susp utilizado para encapsular GS en vesículas de colesterol:CTAB.

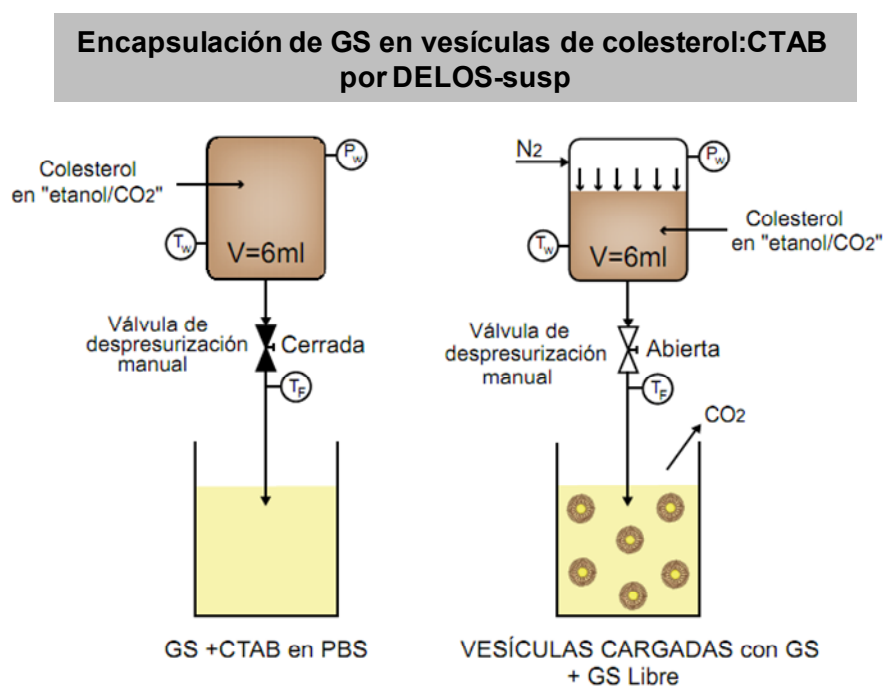


Figura 4.2. Esquema de la preparación por DELOS-susp de vesículas de colesterol:CTAB cargadas con GS.

*Lípido=colesterol + CTAB

Como se muestra en la Figura 4.3 (fotografía insertada en el gráfico de la izquierda) con este experimento se obtuvo una suspensión acuosa con un aspecto macroscópico estable. Aparte de comprobar el aspecto macroscópico de la suspensión, también se determinó el potencial

Z, obteniéndose un valor de 34,3 mV, indicando esto que el sistema es estable ya que el potencial Z es mayor de 30 mV.

Esta suspensión también fue analizada por “dynamic light scattering” (DLS). En la Figura 4.3 (izquierda) se representa la distribución de tamaños de las vesículas obtenidas, con esta técnica. Como se puede observar en dicha figura, las vesículas presentan una distribución de tamaños unimodal y centrada en un tamaño medio de 160 nm.

La suspensión se observó por cryo-TEM para estudiar la morfología de las vesículas. Las imágenes realizadas (Figura 4.3, derecha) muestran que la suspensión acuosa obtenida está constituida por vesículas nanoscópicas y unilamelares (SUVs), lo que indica que se pueden obtener SUVs de colesterol:CTAB en presencia de GS.

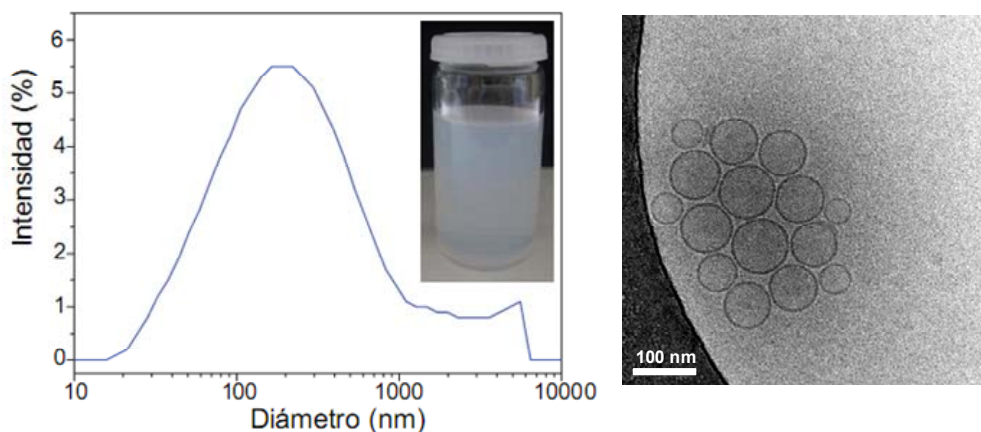


Figura 4.3. Distribución del tamaño de partícula (izquierda) e imagen obtenida por cryo-TEM (derecha) correspondientes a las vesículas de colesterol:CTAB cargadas con GS preparadas a una relación molar de GS:lípido de 0,44:1 preparadas por DELOS-susp. La fotografía insertada en el gráfico de la izquierda muestra el aspecto macroscópico de las vesículas de colesterol:CTAB cargadas con GS y preparadas por DELOS-susp.

En conclusión, estos resultados muestran el potencial del proceso DELOS-susp para la producción en un solo paso de SUVs cargadas con activos hidrosolubles sin la necesidad de emplear ningún procesamiento posterior.

4.1 Influencia de la relación molar GS:lípido en las características estructurales de las SUVs

Con el objeto de optimizar el proceso de encapsulación a la hora de obtener mejores resultados en cuanto al tamaño de vesícula, estabilidad de las suspensiones vesiculares,

4. Encapsulación de GS en vesículas de colesterol:CTAB por DELOS-susp

morfología y eficiencias de encapsulación del activo en las vesículas de colesterol:CTAB, se diseñaron diferentes experimentos a varias relaciones molares de GS:lípido, desde 0,01:1 a 4,40:1.

Tabla 4.1. Tamaño, estabilidad y morfología de las vesículas de Colesterol:CTAB cargadas con GS preparadas mediante DELOS-susp a diferentes relaciones molares de GS:lípido.

Exp ^a	Relación molar GS:lípido	Tamaño		Estabilidad Potencial Z (mV)	Morfología ^d
		Medio ^b (nm)	PdI ^c		
1-A	0:1	169,2±2,0	0,51±0,02	50,1±1,4	SUVs ^e
1-B		134,3±0,5	0,47±0,00	38,3±0,9	
1-C		124,6±1,7	0,46±0,01	50,0±2,9	
Med. ^f	0:1	142,7±23,5	0,48±0,29	46,1±6,8	SUVs
2-A	0,01:1	127,4±1,1	0,43±0,00	42,0±2,1	SUVs
2-B		128,0±0,9	0,47±0,02	53,6±0,1	
2-C		103,0±0,7	0,39±0,02	45,3±1,5	
Med.	0,01:1	119,4±12,4	0,43±0,04	46,9±5,3	SUVs
3-A	0,09:1	121,7±1,5	0,45±0,01	43,3±2,0	SUVs
3-B		155,6±7,2	0,60±0,11	40,8±1,9	
3-C		113,5±0,3	0,39±0,01	45,0±2,3	
Med.	0,09:1	140,4±20,2	0,53±0,13	43,0±2,6	SUVs
4-A	0,44:1	161,6±3,2	0,47±0,02	34,3±1,2	SUVs
4-B		136,2±1,7	0,49±0,01	39,0±0,5	
4-C		125,1±1,8	0,45±0,02	36,5±1,1	
Med.	0,44:1	144,2±15,5	0,48±0,02	37,2±2,2	SUVs
5-A	0,88:1	171,1±3,1	0,47±0,02	34,9±0,7	SUVs
5-B		127,2±1,9	0,45±0,00	32,3±0,8	
5-C		156,7±0,9	0,47±0,01	35,1±1,5	
Med.	0,88:1	156,6±16,7	0,47±0,01	34,3±1,7	SUVs
6	2,64:1	1185±214,4 ^g	1,00±0,00	29,8±2,2	-
7	4,40:1	1075±136,0 ^g	1,00±0,00	20,9±0,3	-

Los experimentos de encapsulación se realizaron con soluciones expandidas de "colesterol/etanol/CO₂" a 10 MPa, 308 K y, X_{CO₂} = 0.7 mediante un reactor de 6 ml. ^a A, B y C son diferentes muestras preparadas a la misma relación molar de GS:lípido. ^b Media ponderada del tamaño de partícula medido por "dynamic light scattering" (DLS). ^c Índice de polidispersidad. ^d Morfología de las vesículas observadas por cryo-TEM. ^eSUVs: Vesículas pequeñas unilamelares. ^f Media: obtenida de la media de las 3 muestras fabricadas a la misma relación molar GS:lípido. ^g La medida del tamaño correspondiente a este dato no cumple con los criterios de calidad de la técnica DLS.

Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo el procedimiento experimental seguido para la encapsulación de GS a una relación molar de GS:lípido de 0,44:1 descrito en el Apartado anterior, salvo que en la fase acuosa se disolvió la cantidad de sulfato de gentamicina correspondiente para obtener la relación molar GS:lípido deseada. Así mismo, se realizaron tres réplicas de cada experimento para evaluar la reproducibilidad del proceso de encapsulación por DELOS-susp.

En la Tabla 4.1 se muestran los resultados de las caracterizaciones realizadas con el fin de evaluar la influencia de la relación molar GS: lípido en las características estructurales de las vesículas obtenidas. Se incluyen el potencial Z, el tamaño medio y el índice de polidispersidad (Pdl) de la distribución de tamaños de partícula de cada muestra, así como, información sobre la morfología de las vesículas. Se muestran también los resultados del experimento de vesículas blancas (no cargadas) descrito en el Apartado 3 con el fin de comprobar si la presencia de diferentes cantidades de GS en estas entidades modifica el tamaño, la estabilidad o las características morfológicas de las vesículas.

Evaluación de la estabilidad de las suspensiones

Como se puede observar en la Figura 4.4 para los experimentos realizados a relaciones molares GS:lípido desde 0,01:1 a 0,88:1 se obtienen suspensiones con un aspecto macroscópico similar al de las vesículas sin cargar en las que aparentemente no se forman ni precipitados ni agregados, indicando esto que las vesículas obtenidas a estas proporciones de GS y lípido son estables. Por otro lado, los valores del potencial Z obtenidos para las vesículas preparadas con estas relaciones molares (ver Tabla 4.1) son mayores de 30 mV lo que confirma la estabilidad de estas suspensiones.

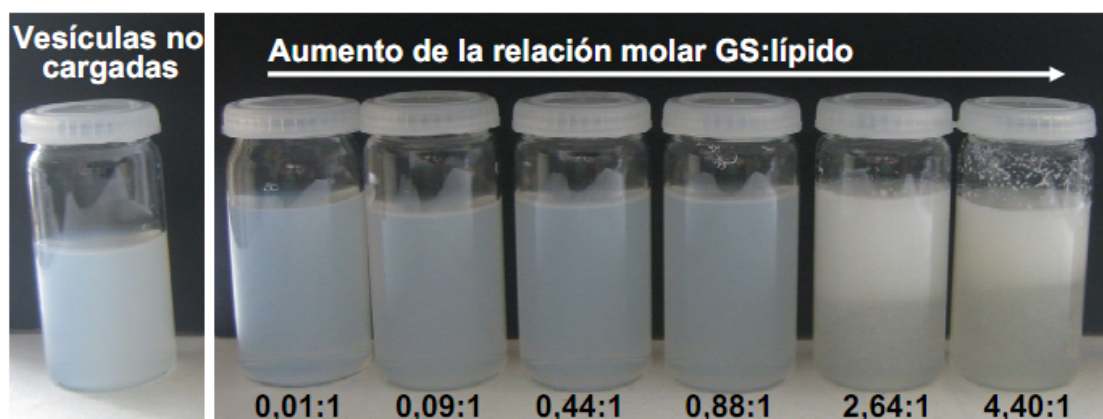


Figura 4.4. Fotografías correspondientes a sistemas vesiculares vesículas con y sin carga de antibiótico (sulfato de gentamicina, GS) preparados a diferentes relaciones molares GS:lípido y fabricados por DELOS-susp (de izquierda a derecha Exp.1-Exp.7).

En cambio, para los experimentos realizados a las relaciones molares de GS:lípido 2,64:1 y 4,40:1, (ver Figura 4.4) se obtienen suspensiones que se separan en dos fases una de las cuales está formada por agregados floculados que flotan en la suspensión. Por otro lado los potenciales Z obtenidos para estas relaciones molares (ver Tabla 4.1) tienen un valor

absoluto inferior a 30 mV lo que también indica que las suspensiones obtenidas con estas relaciones molares son inestables. Esta interferencia de la GS a altas concentraciones en la formación de vesículas también ha sido reportada por otros autores [80].

Así pues, en la Tabla 4.1, se puede observar que el límite de la relación molar GS:lípido a partir de la cual se obtienen potenciales Z con valores inferiores a 30 mV, y por tanto inestables se encuentra entre las relaciones molares de 0,88:1 y 2,64:1 de GS:lípido.

Tamaño de partícula y distribución de tamaños

Las mediciones del tamaño realizadas mediante “*dynamic light scattering*” (DLS), revelaron que para todos los experimentos realizados a relaciones molares de GS:lípido entre 0,01:1 y 0,88:1 se obtienen vesículas nanoscópicas con tamaños promedio en el rango de 100nm a 200 nm. Respecto a las mediciones obtenidas para vesículas preparadas a una misma relación molar se observa una cierta dispersión en el tamaño medio (ver Tabla 4.1). Dicha dispersión también se da en las distribuciones de tamaño de partícula las cuales están representadas en la Figura 4.5. Estas variaciones en el tamaño pueden estar relacionadas con el hecho de utilizar una válvula manual durante la despresurización (Figura 4.2), ya que el grado y la velocidad de apertura puede variar ligeramente entre los diferentes experimentos.

También se puede observar que de acuerdo con los datos descritos en la Tabla 4.1 la relación de GS:lípido no ejerce una gran influencia en el tamaño de las vesículas (siempre que se obtengan suspensiones estables). A pesar de que hay una cierta tendencia a obtener tamaños más grandes a medida que aumenta la relación molar de GS:lípido, las divergencias que se dan entre los experimentos realizados a diferentes relaciones de GS:lípido son similares a las que se dan entre las muestras preparadas con la misma relación molar de GS:lípido. Por lo tanto, a efectos prácticos se puede considerar que la relación molar de antibiótico y lípido no afecta al tamaño de las vesículas.

Por otro lado los resultados de las muestras de los experimentos realizados a relaciones molares GS:lípido de 2,64:1 y 4,40:1 no cumplen los criterios de calidad de la técnica de DLS debido a la presencia de grandes agregados en las formulaciones y la alta polidispersidad de las muestras (esto ocurre cuando Pdl es igual a 1 [63]).

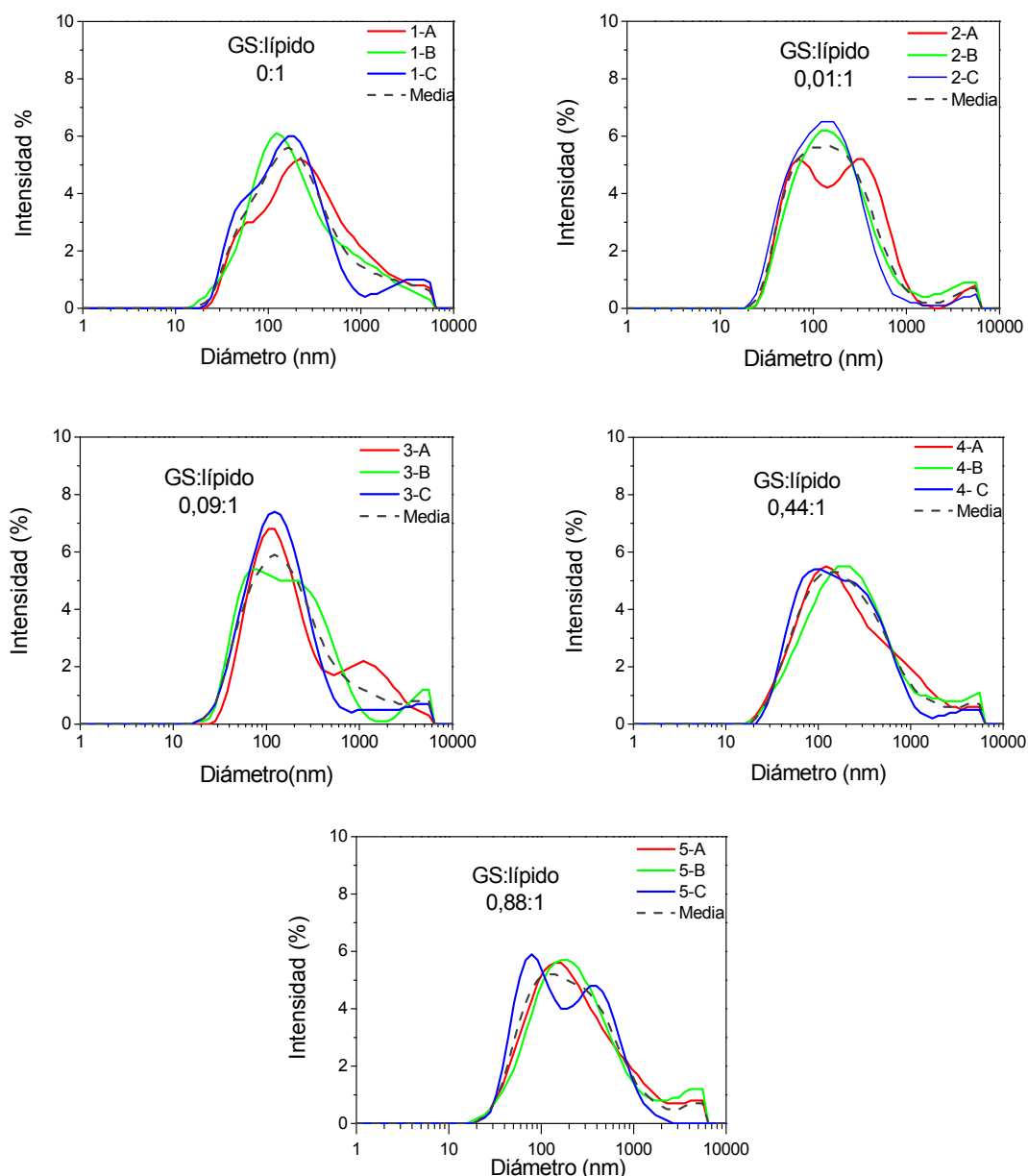


Figura 4.5. Distribución de tamaños medidas por DLS de las vesículas de colesterol:CTAB preparadas por DELOS-susp. Se representan los resultados de cada una de los tres réplicas de los experimentos realizados a cada relación molar GS:lípido y la media de las tres réplicas. (de izquierda a derecha Exp.1-Exp.5).

Como se puede ver en la Figura 4.6 donde se muestran las medias de las distintas réplicas realizadas a cada relación molar de GS:lípido, las muestras preparadas entre 0:1 y 0,88:1 presentan un pico centrado entre 100 nm y 200 nm. En cambio, en los sistemas que se han separado en dos fases se observan dos picos diferenciados, uno centrado alrededor de 100 nm y otro centrado alrededor de 4000 nm. Este último es el más intenso, y se atribuye al sólido floculado, mientras que el pico más pequeño puede ser atribuido a una fracción vesículas estables que podría formarse en el proceso de encapsulación.

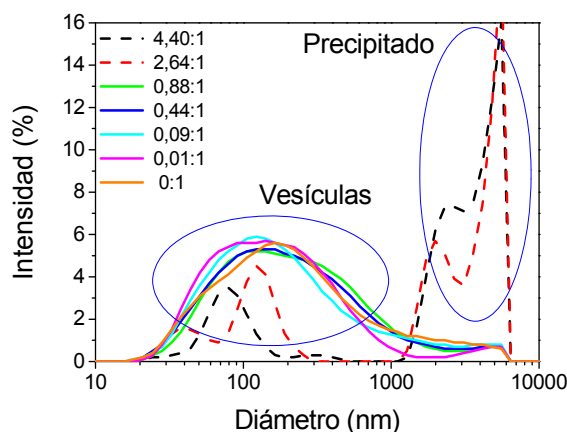


Figura 4.6. Distribución del de tamaño de partícula, medidas por DLS, de las vesículas preparadas por DELOS-Susp a diferentes relaciones molares de GS:lípido. Estas distribuciones de tamaño son el resultado de la media de las tres muestras preparadas en cada experimento realizado a la misma relación molar de GS:lípido.

Morfología

La caracterización morfológica de las vesículas preparadas se realizó por microscopía electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM). En la Figura 4.7 se muestran imágenes correspondientes a las muestras obtenidas en los experimentos realizados con relaciones molares de GS:lípido desde 0:1 a 0,88:1. Se puede observar que para estas relaciones molares se obtuvieron vesículas unilamelares esféricas o casi esféricas. Esto indica, como ocurre con el tamaño, que la morfología de las vesículas es independiente de la relación molar de GS:lípido y que el proceso de encapsulación de GS no altera las características de las vesículas de colesterol:CTAB. Las muestras de las vesículas obtenidas en los experimentos realizados a relaciones molares de 2,64:1 y 4,40:1 también se observaron por cryo-TEM. Pero debido a que por esta técnica es difícil observar partículas mayores a una micra, no se pudo observar las partículas correspondientes al pico centrado alrededor de los 4000 nm que se indica en la Figura 4.6 y sólo se distinguieron algunas vesículas que eran similares en tamaño y a las observadas en los otros experimentos realizados a relaciones molares de GS:lípido más bajas.

En resumen, se comprobó que la presencia de GS afecta a la estabilidad de las vesículas, obteniéndose sistemas vesiculares inestables cuando la relación molar de GS:lípido supera un determinado valor. Por otro lado, mientras este valor no se supera no se observa una influencia de la concentración de GS en las características estructurales de éstas, obteniéndose vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) con una gran uniformidad.

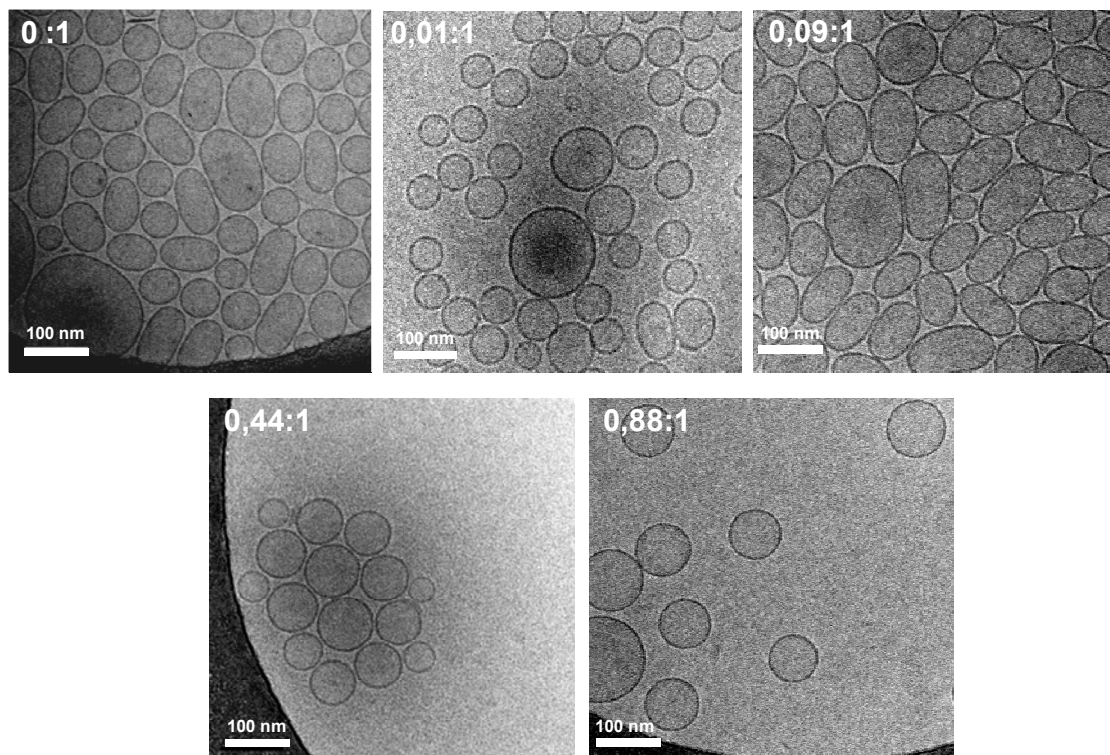


Figura 4.7. Imágenes obtenidas por cryo-TEM de las vesículas de colesterol:CTAB preparadas por DELOS-susp a diferentes relaciones molares de GS:lípido. Aumento: 30000 x.

4.2 Influencia de la relación molar GS:lípido en la eficiencia de encapsulación y la carga de antibiótico

La influencia de la relación molar de GS:lípido en la eficiencia de encapsulación y en la carga de antibiótico en las vesículas preparadas por DELOS-susp se estudió analizando la cantidad de GS encapsulada en cada una de las formulaciones obtenidas en los experimentos mostrados en el apartado anterior. La determinación de la GS contenida en las vesículas se llevó a cabo siguiendo el procedimiento que se explica brevemente a continuación y se esquematiza en la Figura 4.8 (para una descripción más detallada ir a la Parte Experimental Apartado 7.4.4).

Primero se separa la GS no encapsulada de las vesículas por cromatografía de exclusión por tamaño (CE). Después se determina el contenido de GS en las vesículas separadas por CE. Para ello, primero se añade MeOH a la suspensión eluída con el objeto de romper las vesículas por disolución de sus constituyentes de membrana, liberando así el antibiótico atrapado en su interior. Una vez liberada la GS del interior de las vesículas, ésta se transforma en un compuesto fluorescente mediante un proceso de derivatización basado en la reacción de los grupos amino de la GS con el reactivo *o*-ftaldialdehído (OPA) en presencia de β -mercaptoetanol [64]. Después se mide la fluorescencia del compuesto fluorescente

obtenido y mediante una curva de calibración se cuantifica la cantidad de sulfato de gentamicina calculándose la eficiencia de encapsulación, EE (%), y la carga de antibiótico en las vesículas con las Ecuaciones 4.1 y 4.2.

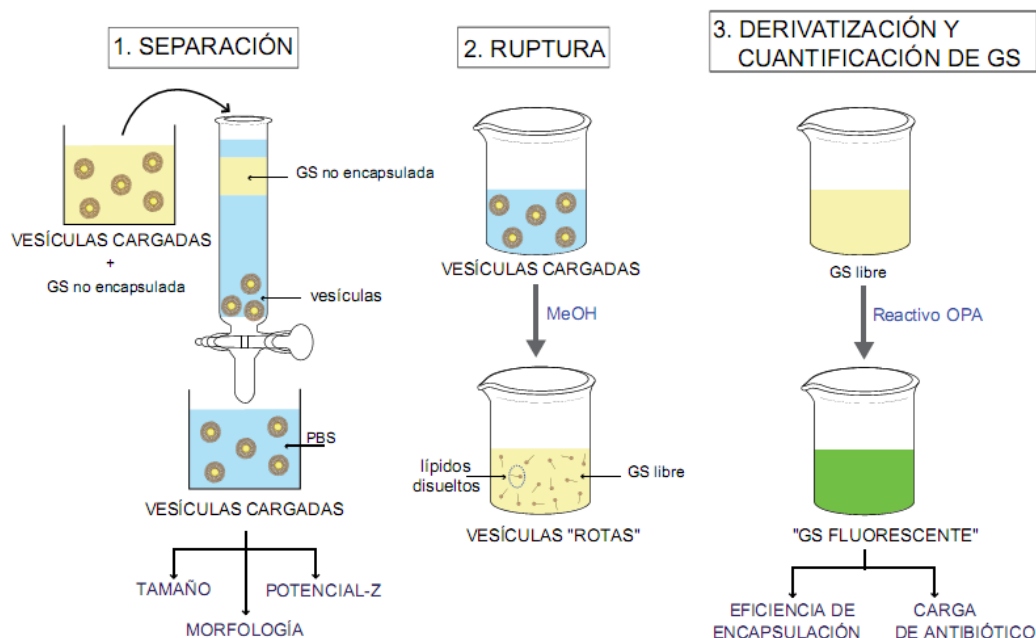


Figura 4.8. Esquema del procedimiento experimental seguido para determinar el contenido de sulfato de gentamicina (GS) de las vesículas preparadas por DELOS-susp.

$$EE(\%) = \frac{\text{Masa de GS encapsulada}}{\text{Masa inicial de GS}} \times 100 \quad (4.1)$$

$$\text{Carga de antibiótico (m/m)} = \frac{\text{Masa de GS encapsulada}}{\text{Masa de lípidos}} \quad (4.2)$$

Antes de determinar *EE* y la carga de antibiótico se consideró conveniente evaluar como afecta el hecho de realizar la cromatografía de exclusión (CE), a las características estructurales de las vesículas.

En la Tabla 4.2 se muestran la eficiencia de encapsulación, la carga de antibiótico, el tamaño promedio de partícula, el índice de polidispersidad (Pdl), el potencial Z e información acerca de la morfología de las vesículas una vez eluidas a través de la columna de cromatografía de exclusión.

Tabla 4.2. Tamaño, estabilidad, morfología, EE y carga de antibiótico en las vesículas de colesterol:CTAB cargadas con GS, preparadas mediante DELOS-susp a diferentes relaciones molares GS:lípido.

Exp ^a	Relación molar GS:lípido	Tamaño		Estabilidad Potencial Z (mV)	Morf ^d	EE(%)	Carga de antibiótico (m/m)
		Medio ^b (nm)	Pdl ^c				
2-A		108,9±1,1	0,43±0,01	60,5±3,0		- ^g	-
2-B	0,01:1	98,9±1,0	0,41±0,01	52,6±2,0	SUVs ^e	-	-
2-C		90,1±0,7	0,39±0,01	59,0±3,3		-	-
Med ^f	0,01:1	99,62±8,2	0,41±0,02	58,6±3,1	SUVs	-	-
3-A		113,0±0,5	0,43±0,00	57,7±1,3		0,73±0,03	1E-03±6E-05
3-B	0,09:1	121,4±1,4	0,47±0,01	55,1±2,4	SUVs	1,23±0,03	2E-03±5E-05
3-C		134,5±2,1	0,47±0,01	52,7±3,2		0,65±0,03	1E-03±5E-05
Med.	0,09:1	122,6±8,1	0,46±0,03	55,2±3,2	SUVs	0,87±0,27	1E-03±5E-04
4-A		116,6±1,3	0,44±0,03	55,0±2,6		0,90±0,01	7E-03±1E-04
4-B	0,44:1	106,2±0,7	0,42±0,02	56,7±2,5	SUVs	0,87±0,01	7E-03±7E-04
4-C		108,8±0,7	0,40±0,02	57,9±3,4		0,66±0,08	6E-03±7E-04
Med.	0,44:1	110,5±4,7	0,42±0,03	56,6±2,8	SUVs	0,81±0,12	7E-03±7E-04
5-A		141,2±4,9	0,56±0,10	53,6±1,6		0,87±0,02	1,5E-02±3E-04
5-B	0,88:1	100,8±0,9	0,36±0,01	55,2±4,0	SUVs	0,69±0,01	1,2E-02±2E-04
5-C		233,3±18,4 ^h	0,49±0,09	57,3±2,4		0,91±0,01	1,5E-02±2E-04
Med.	0,88:1	121,0±22,3 ⁱ	0,46±0,13	55,3±2,9	SUVs	0,82±0,10	1,4E-02±1E-03

Los experimentos de encapsulación se realizaron con soluciones expandidas de "colesterol/etanol/CO₂" a 10 MPa, 308 K y X_{CO₂} = 0,7 mediante un reactor de 6 ml. ^a A, B y C son diferentes muestras preparadas a la misma relación molar de GS:lípido. ^b Media ponderada del tamaño de partícula medido por "dynamic light scattering" (DLS). ^c Índice de polidispersidad. ^d Morfología de las vesículas observadas por cryo-TEM. ^e SUVs: Vesículas pequeñas unilamelares. ^f Media: Obtenido de la media de las 3 muestras fabricadas a la misma relación molar GS:lípido. ^g El valor de fluorescencia es similar al obtenido con vesícula no cargadas. ^h Los resultados correspondientes a este dato no cumplen con los criterios de calidad de DLS. ⁱ Dato resultante de la media de los Exp 5-A y 5-B.

Evaluación de la estabilidad de las suspensiones después de CE

Como se puede observar en la Tabla 4.2, para todas las muestras se obtienen potenciales Z alrededor de 50 mV independientemente de la relación molar de GS:lípido, lo que indica que las muestras eluidas tienen una buena estabilidad. Si se comparan estos resultados con los obtenidos antes de la elución de las muestras, se puede observar que a diferencia de lo que ocurre con las muestras analizadas antes de realizar la cromatografía de exclusión no hay una relación entre el potencial Z y el aumento la proporción GS:lípido. Esto último podría responder al hecho de que el potencial Z depende de la fuerza iónica del medio dispersante y mientras que antes de la CE la presencia de diferentes cantidades de GS libre en el medio acuoso (PBS) provoca diferencias en la fuerza iónica de las muestras, al eliminarse ésta después de la cromatografía todas las muestras tienen el mismo medio dispersante (PBS, 100 mM), provocando que los potenciales Z sean similares. Por lo tanto, con estas

observaciones se puede concluir que la presencia de la GS libre en el medio altera la estabilidad de las vesículas.

Tamaño de partícula y distribución de tamaños después de la CE

Si se comparan los resultados reflejados en la Tabla 4.2 con los de la Tabla 4.1 se puede observar que el tamaño medio de las vesículas disminuye después de realizarse la cromatografía de exclusión (CE). Sin embargo, esta disminución de tamaño no es muy grande, además, es en cierto modo esperable, ya que al pasar por la columna, las vesículas de gran tamaño que podrían estar presentes en la solución sin eluir habrían sido separadas. Por otro lado, como se puede observar en la Figura 4.9, en todos los casos la distribución de tamaños pasa de tener una distribución unimodal antes de la cromatografía a una distribución bimodal después de la CE, en la que el porcentaje de partículas con un diámetro inferior (80-90 nm) aumenta si se compara con los resultados obtenidos antes de la CE.

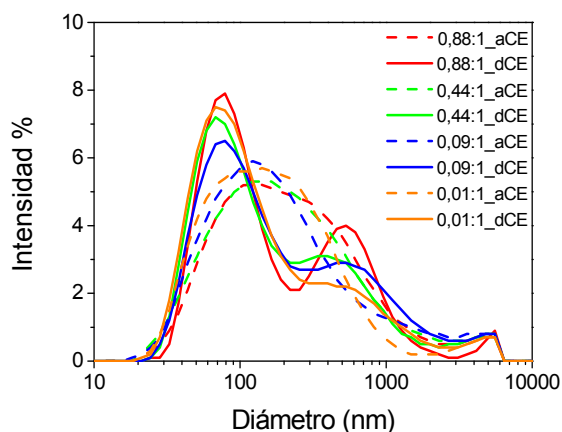


Figura 4.9. Distribución de tamaños de las vesícula antes y después de CE (aCE y dCE) correspondientes a los experimentos de encapsulación mediante DELOS-susp llevados a cabo con relaciones molares de 0.88:1 a 0.01:1 GS:lípido. Se muestran las medias de las 3 muestras fabricadas a la misma relación molar GS:lípido

Morfología de las vesículas después de la CE

Las imágenes obtenidas por cryo-TEM reflejadas en la Figura 4.10 muestran que la mayoría de las vesículas siguen siendo nanoscópicas y unilamelares después de la CE y que ésta no modifica sus características morfológicas.

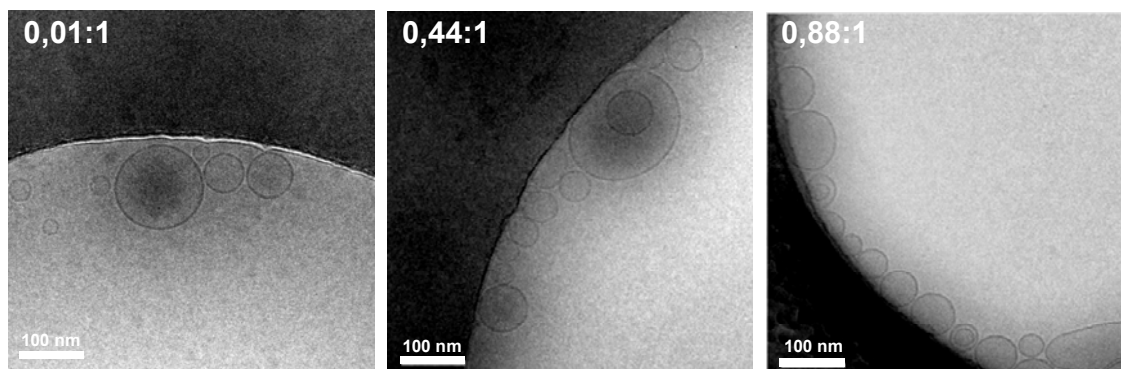


Figura 4.10. Imágenes de cryo-TEM correspondientes a la vesículas de colesterol:CTAB cargadas con GS separadas con la columna de exclusión de tamaño, CE. Aumento 30000 x.

Eficiencia de encapsulación y carga de antibiótico

Una vez se comprobó que la cromatografía de exclusión no afecta significativamente a las características estructurales de las vesículas, se determinó la eficiencia de encapsulación y la carga de antibiótico. La eficiencia de encapsulación obtenida fue, como se muestra en la Tabla 4.2, de alrededor del 1% independientemente de la relación molar de GS:lípido utilizada. Estos resultados podrían explicarse por la existencia de un límite máximo sobre el volumen global de la fase acuosa que puede ser atrapado en el interior de las vesículas. Así mientras que los valores de EE (%) son similares entre las muestras preparadas a diferentes relaciones molares de GS:lípido, la carga de antibióticos es mayor al aumentar la concentración de GS en los experimentos de encapsulación.

A pesar de que las eficiencias de encapsulación alcanzadas con DELOS-susp son bajas, cabe mencionar que las eficiencias de encapsulación de GS en SUVs obtenidas por métodos convencionales están normalmente en el rango del 1-5% [58, 60, 62, 65-66], con la excepción de las eficiencias de encapsulación obtenidas con el método de Deshidratación-Rehidratación, con el que se han obtenido eficiencias de de alrededor del 30%. Sin embargo, esta técnica requiere de más pasos de fabricación que los necesarios con otros procedimientos [59, 67].

Según algunos autores la causa de las bajas eficiencias de encapsulación obtenidas con la mayoría de estos métodos al encapsular GS en vesículas catiónicas pueden ser debidas a la repulsión electrostática entre la carga positiva de las membranas de las vesículas (es este caso debido a la carga positiva de las moléculas de CTAB) y los aniones presentes en la GS [62]. Una alternativa sería encapsular la gentamicina en vesículas con membranas cargadas negativamente. Sin embargo, esta interacción electrostática entre la gentamicina y la membrana cargada negativamente podría verse afectada produciéndose la liberación del antibiótico antes de lo deseado [58, 68]. Otra alternativa sería aumentar el tamaño de las

vesículas para obtener mayores eficiencias de encapsulación [69-70]. Sin embargo, como se comentó en el Apartado 1.2.1, el compromiso entre la eficiencia de encapsulación y los tiempos de circulación en sangre hace que sea preferible el uso de vesículas pequeñas a pesar de que tengan una capacidad de encapsulación inferior.

En resumen el método DELOS-susp permite obtener eficiencias de encapsulación similares a las que se obtienen con otros métodos utilizados para encapsular GS en vesículas, e introduce la ventaja ser un proceso que se lleva a cabo en un solo paso reduciendo la complejidad de los otros métodos, lo que repercutiría reduciendo costes si se llevara a cabo una aplicación industrial de este proceso.

5. Estudio de escalabilidad del proceso DELOS-susp para la encapsulación de activos hidrofílicos.

Una de las limitaciones que presentan los sistemas convencionales de fabricación de sistemas vesiculares es la falta de reproducibilidad y el alto coste relacionado con el escalado de estas técnicas. Las tecnologías basadas en fluidos comprimidos han despertado interés como una alternativa prometedora, debido a presentar una más fácil escalabilidad y a presentar una mayor reproducibilidad que otros métodos de producción de materiales micro y nanoestructurados. Atendiendo a la importancia y necesidad de la producción de liposomas a gran escala, se estudió la escalabilidad del proceso DELOS-susp para la encapsulación de sulfato de gentamicina (GS) en vesículas de colesterol:CTAB escalando el proceso en un factor de 50 obteniéndose más de un litro de producto por lote.

Para realizar el estudio de escalabilidad se repitieron los experimentos de encapsulación de GS en vesículas de colesterol:CTAB (1mol:1mol) llevados a cabo con relaciones molares GS:lípido 0,09:1 y 0,88:1 (Apartado 4.1.), pero fabricándose esta vez en un autoclave de 300 ml con las mismas condiciones de presión ($P_w=10$ MPa), temperatura ($T_w = 308$ K) y fracción molar de CO_2 ($X_w = 0,7$) que con el equipo de 6 ml utilizado anteriormente. Así mismo, se prepararon tres réplicas de los experimentos realizados para observar la variabilidad entre las muestras preparadas con idénticas condiciones. Por otro lado, tal y como se hizo con los experimentos realizados con el equipo de 6 ml, primero se prepararon vesículas sin carga de antibiótico con el fin de comprobar si la presencia de GS afecta al tamaño, a la estabilidad o a las características morfológicas de las vesículas de colesterol:CTAB cuando estas se preparan el equipo de 300 ml.

Hay que mencionar que la diferencia de los equipos no se limita sólo a la diferencia de capacidad de éstos, sino que también hay diferencias en la configuración de ambos equipos. Estas diferencias, que se indican esquemáticamente en la Figura 5.1 son las siguientes:

- ♦ Una de las variaciones que se dan entre ambas configuraciones es el método de mezclado del CO_2 en la disolución de colesterol en etanol. Mientras que con el equipo de 6 ml, debido a su reducido volumen, no era posible instalar un agitador para homogeneizar la muestra, el equipo de 300 ml cuenta con un agitador mecánico para

realizar dicha mezcla de un modo más rápido y poder así alcanzar más rápidamente el equilibrio termodinámico de la solución expandida con CO₂.

- ◆ Otra diferencia a destacar es que en la configuración del equipo de 300 ml se añadió un filtro a la salida del reactor con el fin de separar las posibles partículas de colesterol que pudieran precipitar durante la etapa de presurización.
- ◆ Otra diferencia importante que se introdujo en la configuración del proceso realizado a mayor escala, fue utilizar una válvula de despresurización de apertura automática regulada por un sistema de control en vez de utilizar una válvula de despresurización manual como la utilizada en el equipo de 6 ml.

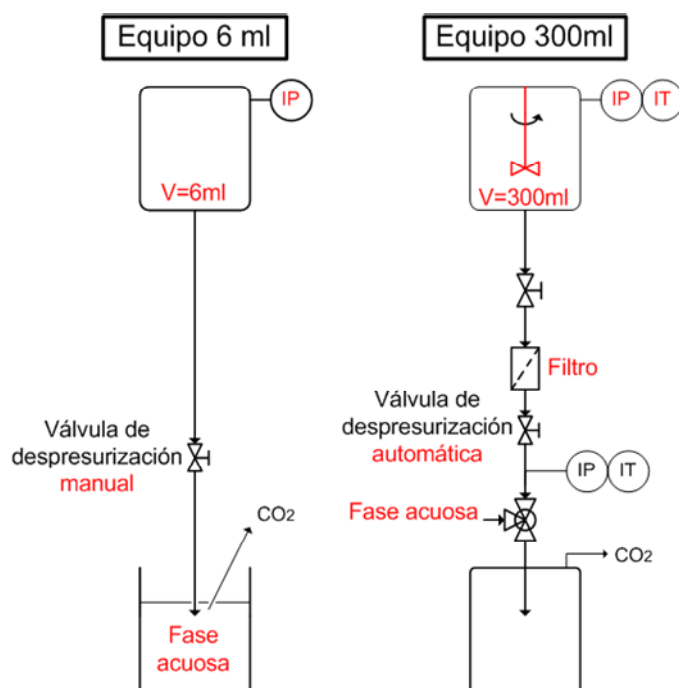


Figura 5.1. Representación esquemática de las diferencias significativas entre la configuración del sistema de 6 ml y el sistema de 300 ml utilizados en los experimentos de encapsulación de GS mediante DELOS-susp.

- ◆ Por último, otra diferencia importante entre ambas configuraciones es la que se da en la forma en que se mezclan la solución orgánica expandida y la fase acuosa durante la etapa de despresurización. Mientras la despresurización de la fase orgánica expandida en el equipo de 6 ml se realiza directamente sobre un recipiente que contiene la fase acuosa (Figura 5.2, izquierda), con la configuración del equipo de 300 ml la fase orgánica se mezcla con la fase acuosa en una unión tipo T (Figura 5.2, derecha). El modo de mezclado con la unión tipo T es el siguiente: mientras se despresuriza la fase orgánica expandida, la fase acuosa se bombea a través de dicha unión. Ambas fases se

mezclan en la unión tipo T con la proporción deseada regulando el caudal con el que ambas pasan a través de ella, consiguiéndose así una mezcla equimolar de colesterol y CTAB. Conviene destacar que un trabajo anterior realizado en el presente grupo [16], con el equipo de 300 ml se comprobó que se conseguían suspensiones más homogéneas usando la configuración tipo T que las que se conseguían despresurizando la solución expandida directamente sobre la solución acuosa, ya que así se conseguía un mejor mezclado entre ambas fases durante la etapa de despresurización. Sin embargo, en principio se podría considerar que con un equipo de dimensiones reducidas, como en el caso del equipo de 6 ml, las diferencias en la homogeneidad del mezclado usando una u otra configuración no son muy importantes.

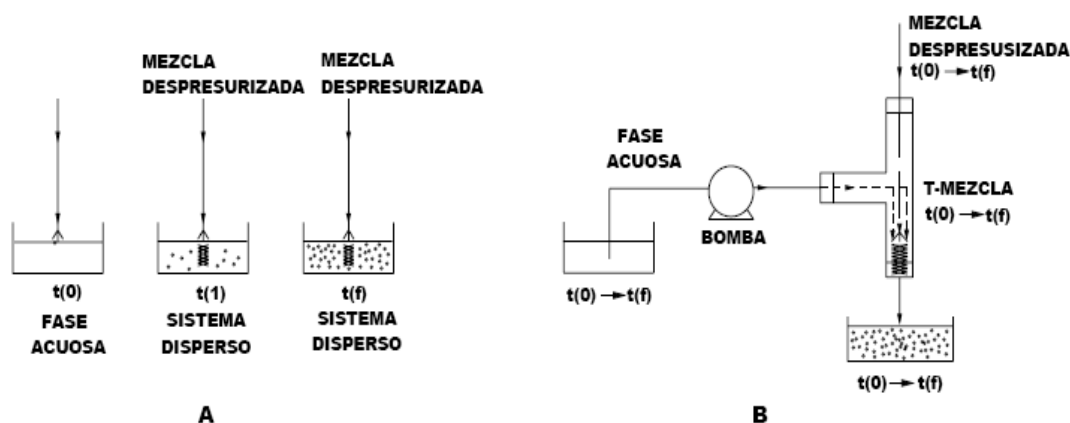


Figura 5.2. Diferencias en el sistema de mezclado de la fase acuosa con la fase orgánica durante la etapa de despresurización. **A** En el equipo de 6 ml se realiza directamente sobre un recipiente que contiene la fase acuosa. **B.** En el equipo de 300 ml la mezcla entre la fase acuosa y la orgánica se realiza mediante una unión tipo T. Tomada de [71].

El procedimiento experimental utilizado para realizar los experimentos de encapsulación en el sistema de 300 ml es muy similar al procedimiento seguido en los experimentos realizados con el equipo de 6 ml. Se disolvieron 3.7 g de colesterol en 142 ml de etanol y la solución se introdujo en un reactor de 300 ml precalentado a 308K. Después de 15 minutos de equilibrio térmico, se añadió CO_2 hasta lograr una presión, P_w , de 10 MPa y una fracción molar de CO_2 , X_w , de 0,7. La solución expandida se agitó durante al menos 30 minutos, procediéndose después a la despresurización de ésta mediante la apertura de la válvula automática. Durante la despresurización la fase orgánica se mezcló a través de la unión tipo T con 1180 ml de solución acuosa (PBS 100 mM, pH=7.4) que contenía 3.3 g de CTAB y la cantidad correspondiente de GS para obtener la relación molar de GS:lípido deseada. Durante la despresurización se produjo una gran, rápida y homogénea disminución de la temperatura de

la solución orgánica de colesterol, obteniéndose las vesículas al entrar en contacto la solución orgánica con la solución acuosa que contenía el surfactante CTAB.

5.1 Influencia del escalado del proceso DELOS-susp en la estabilidad y las características estructurales de las vesículas de colesterol:CTAB

Los sistemas vesiculares obtenidos con en el reactor de 300 ml se caracterizaron del mismo modo que los obtenidos a menor escala. Es decir, se analizaron tanto el tamaño, la estabilidad, la morfología de las vesículas y el contenido de GS encapsulado. Los resultados referentes al tamaño, estabilidad y morfología de las vesículas producidas con el equipo de 300 ml se resumen en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Tamaño, estabilidad y morfología de las vesículas de colesterol:CTAB cargadas con GS preparadas mediante DELOS-Susp a diferentes relaciones molares de GS:lípido.

Exp ^a	Relación molar GS:lípido	Tamaño		Estabilidad Potencial Z(mV)	Morfología ^d
		Medio ^b (nm)	Pdl ^c		
8	0:1	130,6±1,3	0,30±0,01	41,1±0,8	SUVs ^e
9-A	0,09:1	142,0±0,6	0,37±0,00	42,1±2,5	SUVs
9-B		138,8±1,7	0,33±0,03	44,4±0,2	
9-C		144,5±0,5	0,35±0,00	41,9±2,2	
Med. ^f	0,09:1	141,8±2,6	0,35±0,02	42,8±2,1	SUVs
10-A	0,88:1	148,0±2,6	0,32±0,01	29,9±2,2	SUVs
10-B		141,2±0,4	0,25±0,01	32,0±2,1	
10-C		150,0±0,7	0,35±0,01	33,0±1,8	
Med.	0,88:1	146,4±4,8	0,30±0,04	31,6±2,2	SUVs

Los experimentos de encapsulación se realizaron con soluciones expandidas de "colesterol/etanol/CO₂" a 10 MPa, 308 K, XCO₂ = 0,7 con un reactor de 300 ml. ^a A, B y C son diferentes muestras preparadas a la misma relación molar de GS:lípido. ^b Media ponderada del tamaño de partícula medido por "dynamic light scattering" (DLS). ^c Índice de polidispersidad. ^d Morfología de las vesículas observadas por cryo-TEM. ^e SUVs: vesículas pequeñas unilamelares. ^f Media: Obtenida de la media de las 3 muestras fabricadas con la misma relación molar GS:lípido.

Evaluación de la estabilidad de las suspensiones

Los resultados del potencial Z mostrados en la Tabla 5.1 indican que todas las suspensiones obtenidas son estables ya que se obtienen potenciales Z por encima de 30 mV. Tal y como se observó con los experimentos realizados con el equipo de 6 ml, la estabilidad de las vesículas depende de la relación molar de GS:lípido. Para las vesículas fabricadas con relaciones molares de 0:1 y 0,09:1 se obtienen valores de potencial Z de alrededor de 40 mV en y un valor un poco superior a 30 mV en el caso las vesículas preparadas con relaciones molares de GS:lípido de 0,88:1. Estos resultados son similares a los obtenidos con el equipo

de 6 ml con las mismas relaciones molares de GS:lípido, indicando que la estabilidad de las vesículas de colesterol:CTAB cargadas con GS no se ve afectada cuando son producidas a una escala 50 veces superior.

Tamaño y distribución de tamaños

Las vesículas preparadas con el equipo de 300 ml presentan diámetros medios que varían desde 130nm hasta 150 nm en función de la relación molar de GS:lípido (0:1 y 0,88:1, respectivamente). Aunque los tamaños de las vesículas son comparables a los obtenidos para las formulaciones preparadas a menor escala, las vesículas producidas con el equipo de 300 ml presentan una distribución de tamaños más estrecha (ver Figura 5.3), El aumento en la homogeneidad del tamaño también se refleja en el índice de polidispersidad (Pdl), ya que en el caso del sistema de 6 ml se obtienen valores de alrededor de 0,47 (ver Tabla 4.1) y alrededor de 0,3 en el reactor de 300 ml (ver Tabla 5.1). Estas diferencias en la distribución de tamaños podrían ser atribuidas a las divergencias en la configuración de la etapa de despresurización entre ambos equipos. Por un lado, al uso de una válvula automática en vez de una manual como la utilizada en el equipo de 6 ml y por otro, a la diferencia en el sistema de mezclado durante la etapa de despresurización.

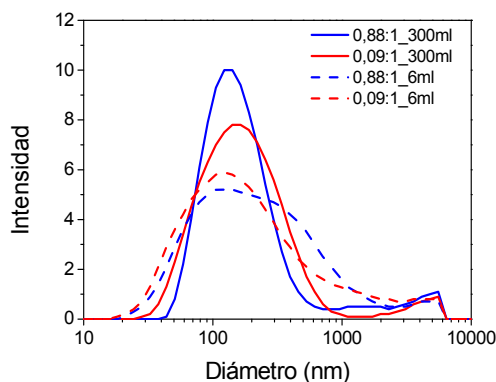


Figura 5.3. Distribución de tamaños correspondientes a vesículas de colesterol:CTAB obtenidas en el equipo de 300 ml y en el equipo de 6 ml a diferentes relaciones molares GS:lípido. Se muestran las medias de las 3 muestras fabricadas a la misma relación molar GS:lípido

Otra diferencia encontrada entre los resultados obtenidos en el equipo de 300 ml y el de 6 ml, es la mejor reproducibilidad tanto en el tamaño medio como en la distribución de tamaños que se da en los experimentos realizados a la misma relación molar de GS:lípido en el reactor de 300 ml. La mejora de la reproducibilidad a mayor escala queda patente en la disminución de la desviación estándar en el tamaño medio de las réplicas realizadas a la misma relación GS:lípido en el equipo de 300 ml, comparado con la obtenida con el equipo de 6 ml.

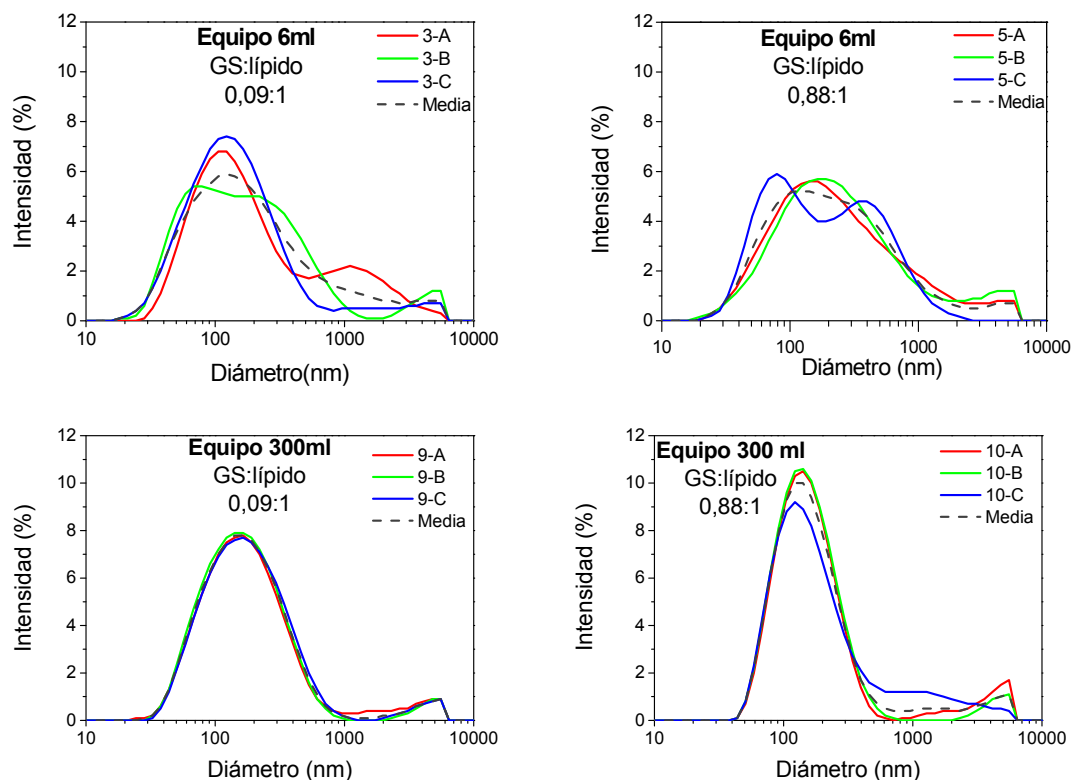


Figura 5.4. Distribución de tamaños medidas por DLS de las vesículas de colesterol:CTAB preparadas por DELOS-susp en el equipo de 6 ml y el de 300 ml. Se representan los resultados de cada una de los tres réplicas de los experimentos realizados a cada relación molar GS:lípido y la media de las tres réplicas.

Dicha mejora de la reproducibilidad también se puede observar en las distribuciones de tamaños de los experimentos realizados a una misma relación molar. En la Figura 5.4 se puede observar que con el equipo de 300 ml se obtiene una mejor reproducibilidad de la distribución de tamaños.

Morfología

La morfología de las vesículas obtenidas con el reactor de 300 ml (ver Figura 5.5) fue similar a la de las vesículas obtenidas con el equipo de 6 ml, obteniéndose en ambos casos vesículas de tamaño nanoscópico, unilamerales y con forma esférica o casi esférica.

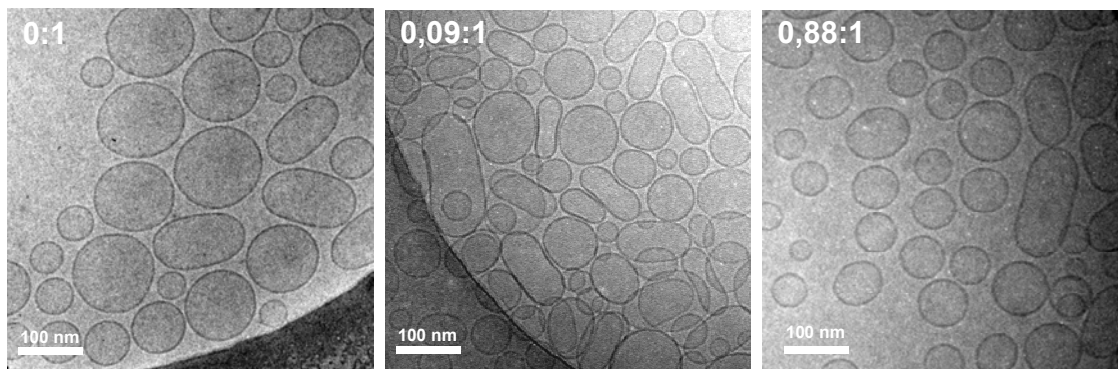


Figura 5.5 Imágenes obtenidas por cryo-TEM de las vesículas de colesterol:CTAB cargadas con GS y obtenidas mediante DELOS-susp en el reactor de 300 ml. Aumento: 30000 x.

Con lo visto hasta ahora se puede concluir que el escalado del proceso DELOS-susp no afecta las características estructurales, ni a la estabilidad de las vesículas, ya que al escalar el proceso se siguen obteniendo vesículas unilamelares de alrededor de 150 nm, se obtienen valores similares de potencial Z en las formulaciones con la misma composición y la morfología de las vesículas también se mantiene. Por otro lado, las pequeñas diferencias entre los resultados obtenidos cuando se emplean los equipos de 6 ml y de 300 ml pueden ser atribuidas a las diferencias de configuración de la etapa de despresurización más que al escalado en sí, siendo los resultados obtenidos en el equipo de 300 ml ligeramente más reproducibles debido a un mejor control de los parámetros de operación.

5.2 Influencia del escalado del proceso DELOS-susp en la eficiencia de encapsulación y la carga de antibiótico en las vesículas de colesterol:CTAB

Como se procedió con las formulaciones obtenidas en el reactor de 6 ml las vesículas cargadas con sulfato de gentamicina (GS) se separaron del antibiótico no encapsulado, o libre, mediante cromatografía de exclusión de tamaño (CE), y tal y como se hizo anteriormente, se evaluó el tamaño, estabilidad y las características morfológicas de las vesículas separadas con el fin de comprobar cómo afecta la CE a las características estructurales de éstas. En la Tabla 5.2 se presentan estos resultados junto con los resultados obtenidos de eficiencia de encapsulación, EE, y carga de antibiótico.

Como se puede observar en la Tabla 5.2, tal y como ocurre con las vesículas preparadas con el reactor de 6 ml, las muestras eluidas presentan un mayor potencial Z que las muestras no eluidas. Al igual que ocurre con los experimentos realizados a más pequeña escala, el potencial Z ronda los 50 mV en todos los casos. Esto es debido a que la separación de la GS libre que desestabiliza a las vesículas, iguala el medio dispersante en el que se encuentran

las mismas produciéndose un aumento y una homogeneización del potencial Z entre las distintas muestras preparadas a diferente relación GS:lípido.

Tabla 5.2. Tamaño, estabilidad, morfología, eficiencia de encapsulación, EE y carga de antibiótico de las muestras de vesículas eluidas de la columna de exclusión de tamaño correspondientes a los experimentos realizados de encapsulación realizados en el equipo de 300 ml.

Exp ^a	Relación molar GS:lípido	Tamaño		Estabilidad Potencial Z (mV)	Morf. ^d	EE(%)	Carga Ant. (m/m)
		Medio ^b (nm)	Pdl ^c				
9-A		102,8±0,7	0,26±0,01	55,6±2,7		1,69±0,10	3E-03±2E-04
9-B	0,09:1	114,4±0,6	0,25±0,00	48,6±1,9	SUVs ^e	1,58±0,05	3E-03±8E-05
9-C		102,6±0,7	0,28±0,02	56,4±3,0		1,69±0,09	3E-03±1E-04
Med. ^f	0,09:1	106,6±5,9	0,26±0,02	53,5±4,3	SUVs	1,65±0,09	3E-03±1E-04
10-A		108,9±0,7	0,26±0,02	52,5±1,0		1,32±0,02	2E-02±3E-04
10-B	0,88:1	109,6±1,1	0,30±0,01	51,8±0,9	SUVs	1,21±0,07	2E-02±1E-03
10-B		109,2±0,7	0,35±0,02	58,4±3,8		1,39±0,04	2E-02±6E-04
Med.	0,88:1	109,3±0,8	0,30±0,03	54,2±3,7	SUVs	1,31±0,09	2E-02±1E-03

Los experimentos de encapsulación se realizaron con soluciones expandidas de "colesterol/etanol/CO₂" a 10 MPa, 308 K, XCO₂ = 0,7 con un reactor de 300 ml. ^a A, B y C son diferentes muestras preparadas a la misma relación molar de GS:lípido. ^b Media ponderada del tamaño de partícula medido por "dynamic light scattering", DLS. ^c Índice de polidispersidad. ^d Morfología de las vesículas observadas por cryo-TEM. ^e SUVs: Vesículas pequeñas unilamelares. ^f Media: Obtenido de la media de las 3 muestras fabricadas a la misma relación molar GS:lípido.

Tal y como ocurre con las vesículas obtenidas en los experimentos realizados a menor escala, el tamaño medio de las vesículas se reduce al separar las vesículas del sulfato de gentamicina (GS) mediante cromatografía de exclusión de tamaño (CE). Así, al pasar las vesículas por la CE el tamaño medio pasa ser de alrededor de 140 nm a unos 100nm. Por otro lado, tras la CE se produce un estrechamiento en la distribución de tamaños (ver Figura 5.6) y al contrario que lo que ocurre con los experimentos realizados a menor escala (ver Figura 4.9) ésta continua siendo unimodal. En la Figura 5.6 también se puede observar que las vesículas eluidas muestran una tendencia un poco más acentuada a la reducción de tamaño después de pasar a través de la CE que las producidas con el equipo de 6 ml. Además presentan un índice de polidispersidad (Pdl) menor, lo que indica que tienen una distribución de tamaños más estrecha. Así mismo, la desviación estándar del tamaño medio entre los experimentos realizados a la misma relación molar GS:lípido con el equipo de 300 ml (Tabla 5.2) también es menor la que se obtiene con el equipo de 6 ml (Tabla 4.2).

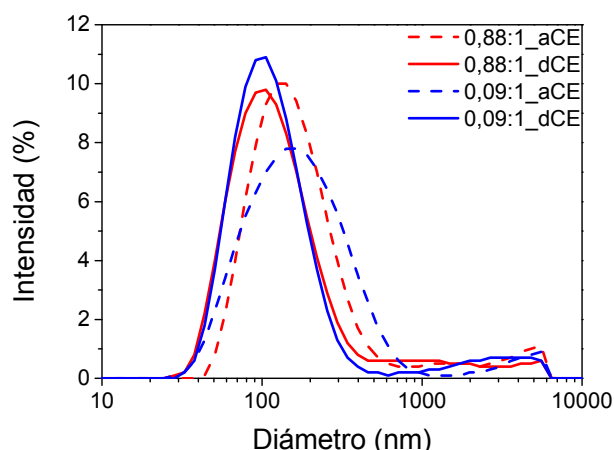


Figura 5.6. Distribución de los tamaños de vesícula antes y después de CE (a CE y d CE) correspondientes a los experimentos de encapsulación mediante DELOS-susp en el reactor de 300 ml llevados a cabo con relaciones molares de 0,88:1 y 0,09:1 GS:lípido. (Se representa la media de las tres réplicas de cada experimento).

Las imágenes obtenidas por cryo-TEM (ver Figura 5.7) muestran que la morfología de las vesículas preparadas con el reactor de 300 ml no cambia después de la CE, ya que las vesículas eluidas siguen siendo unilamelares y nanoscópicas para las relaciones de GS:lípido molares estudiadas.

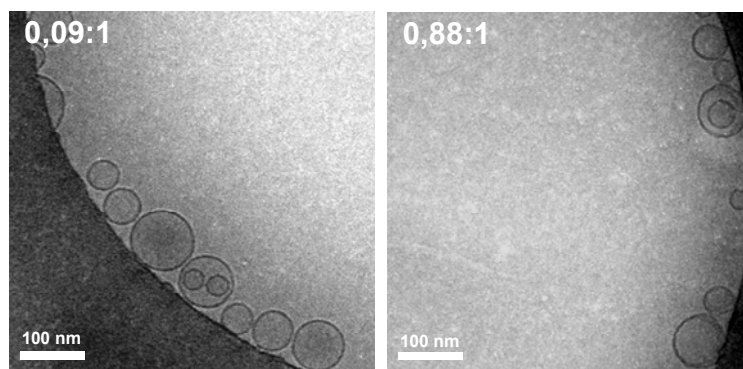


Figura 5.7. Imágenes de cryo-TEM correspondientes a la vesículas de colesterol:CTAB cargadas con GS y preparadas con DELOS-sup mediante el reactor de 300 ml y eluidas a través de la columna de exclusión de tamaño (CE).

Una vez comprobado que la CE no afecta a las características estructurales de las vesículas se halló la eficiencia de encapsulación y la carga de antibiótico. Las eficiencias de encapsulación que se obtuvieron en las formulaciones fabricadas con el reactor de 300 ml fueron de entre el 1 y el 2% (ver Tabla 5.2), siendo éstas algo mejores para los experimentos realizados con relaciones molares de 0,09:1 GS:lípido. También son algo mejores que las obtenidas con el equipo de 6 ml (Tabla 4.2). La desviación estándar de los resultados de los

experimentos realizados a la misma relación molar es también más baja que la de los experimentos realizados a una escala menor lo que indica que también en este aspecto con el equipo de 300 ml se obtiene una reproducibilidad mayor que con el equipo de 6 ml. Esto concuerda con la mayor reproducibilidad observada en el apartado anterior en cuanto al tamaño y la distribución de tamaños de las vesículas.

En resumen, los resultados obtenidos al realizar el escalado demuestran que la encapsulación por DELOS-susp de principios activos hidrosolubles en vesículas de colesterol:CTAB es fácilmente escalable cuando el volumen de producción se incrementa en un factor de 50.

6. Conclusiones

En este proyecto se ha demostrado que el etanol es un disolvente adecuado para preparar vesículas de colesterol:CTAB por el método DELOS-susp, ya que el CO₂ tiene un fuerte carácter co-solvente, llegando incluso a tener un comportamiento sinérgico, en la mezcla “colesterol/etanol/CO₂”, para un amplio margen de fracciones molares de CO₂ a condiciones de trabajo adecuadas.

Así mismo, se ha comprobado que al emplear etanol como disolvente orgánico con el método DELOS-susp se obtienen vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) de colesterol:CTAB de manera reproducible y con una gran uniformidad.

Se han obtenido SUVs por DELOS-susp cargadas con sulfato de gentamicina (GS) con gran uniformidad y de modo reproducible, obteniéndose éstas en un solo paso y con eficiencias de encapsulación comparables a las obtenidas con otros procedimientos más complejos.

Se ha escalado el proceso DELOS-susp de encapsulación de GS en SUVs de colesterol:CTAB por un factor de 50, produciéndose resultados comparables a los obtenidos a menor escala, pero con una mayor reproducibilidad, una distribución de tamaños más estrecha y una ligera mejora en las eficiencias de encapsulación.

7. Parte experimental

7.1 Materiales

En este proyecto se utilizaron los productos químicos que se mencionan a continuación. *Colesten-3 β -ol* (colesterol: pureza 95%) que fue suministrado por Panreac (Barcelona). Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), que fue suministrado por Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Madrid). Sulfato de gentamicina (GS), que fue suministrado por Molekula (Dorset, UK). Todos los disolventes orgánicos de grado HPLC utilizados fueron suministrados por Teknokroma (Sant Cugat del Vallès) el N₂ y el dióxido de carbono (pureza 99,9%) fue suministrado por Carburos Metálicos S.A. (Barcelona). Todos los productos químicos se utilizaron sin realizar ninguna purificación adicional. El agua empleada en los experimentos fue previamente tratada con un equipo de purificación Milli-Q Advantage A10 (Millipore Ibérica, Madrid,). Para la preparación de las vesículas se empleó un buffer de PBS (pH= 7,4) y con una concentración molar 100 mM de sales (0,094 M de NaCl, 0,0031 M de Na₂HPO₄, 0,0009 M de NaH₂PO₄). El β -mercaptoetanol y el *o*-ftaldialdehído utilizados para la determinación de la eficiencia de encapsulación y la carga de antibiótico fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Tres Cantos, Madrid).

7.2 Análisis de solubilidad

7.2.1 Determinación de la solubilidad del colesterol en etanol

La solubilidad del colesterol en etanol a 308 K se determinó del siguiente modo. Una solución sobresaturada de colesterol en etanol se agitó en un baño durante una hora, después la solución se dejó reposar a la misma temperatura también durante una hora. Después de esto, se tomaron dos alícuotas de la solución y se filtraron. Una vez filtradas se pesaron mediante una balanza de precisión ($\pm 0,0001$ g), obteniéndose el valor de la masa del disolvente más la del soluto. Después de obtenerse la masa de la solución (masa de soluto + masa de disolvente) las alícuotas se sometieron a un proceso de evaporación en vacío durante dos horas hasta secarse completamente. Una vez secado, se pesó el contenido restante en las alícuotas obteniéndose la masa de soluto. Conociendo las masas del soluto y de disolvente se calculó la solubilidad del colesterol en etanol puro a 308 K expresándose en moles de soluto/moles de disolvente.

7.2.2. Determinación de solubilidades en disolventes orgánicos expandidos con CO₂ según el método “*vanishing point*” mediante una celda de volumen variable

7.2.2.1 Equipo: Analizador de fases a alta presión

La determinación de solubilidades por el método “*vanishing point*” [53-54] se realizó mediante un analizador de fases a alta presión basado en una celda de volumen variable. Dicho analizador de fases (Figura 7.1) está formado por un reactor a alta presión (CV) de volumen variable, está fabricado con acero inoxidable 316 y está dotado de dos mirillas laterales de zafiro (Jerguson modelo 16-T-40) y un pistón (PI) de acero 316. Mediante el movimiento de éste se consigue una variación del volumen interno de la celda. Dicho pistón se puede introducir dentro de la celda hasta una profundidad máxima de 20 cm consiguiéndose así un volumen mínimo de 50 ml y un volumen máximo de 75 ml cuando el pistón está a su máxima altura. El movimiento del pistón está gobernado por un cilindro neumático (SMC CEB63-200J) con una línea de aire comprimido.

La celda de volumen variable está situada en el interior de una cámara de temperatura Binder MK 53 (F) con un rango de temperaturas de trabajo de 238 K a 453 K. También consta de un transductor de presión (Keller serie 8) y una sonda de temperatura (Pt-100). La homogenización del contenido de la celda se consigue mediante un sistema de recirculación que consta de una bomba externa (RM) (Micro pump serie 180).

El CO₂ se introduce en la celda por medio de una bomba de jeringa termostatzada (P2) (ISCO 260D, CIUO Inc., Lincoln, EE.UU.) a través de la válvula V3. El N₂, que se introduce a través de la válvula V5, llega directamente desde una bombona dotada de un manoreductor que regula la presión de salida del mismo. La alimentación de disolventes o disoluciones orgánicas hacia el interior de la celda se realiza a través de la válvula V4, para ello se utiliza una bomba HPLC JASCO PU-1580 (P1). La celda está mecanizada por la parte inferior para la colocación de un tapón porta-sustancias (M) que permite la introducción de sólidos en su interior. La apertura de las válvulas V1 y V6 permite la evacuación de los fluidos presentes en el interior de la misma.

7.2.2.2 Procedimiento para la determinación de solubilidades según el método de “*vanishing point*”

El método de “*vanishing point*” [53-54] de determinación de solubilidades se basa en la observación de la redisolución progresiva, y finalmente completa, de un sólido *C* que se encuentra en equilibrio con una fase saturada de él mismo en dos fluidos *A* y *B* miscibles entre sí. La redisolución del sólido se da como consecuencia del cambio de composición de la fase binaria *A/B* para aumentar su poder disolvente. Este método es adecuado para determinar solubilidades tanto a presión atmosférica, donde los dos disolventes *A* y *B* son disolventes orgánicos convencionales, como a alta presión, donde *A* y *B* son respectivamente, un disolvente orgánico convencional y un fluido comprimido, como por ejemplo el CO_2 .

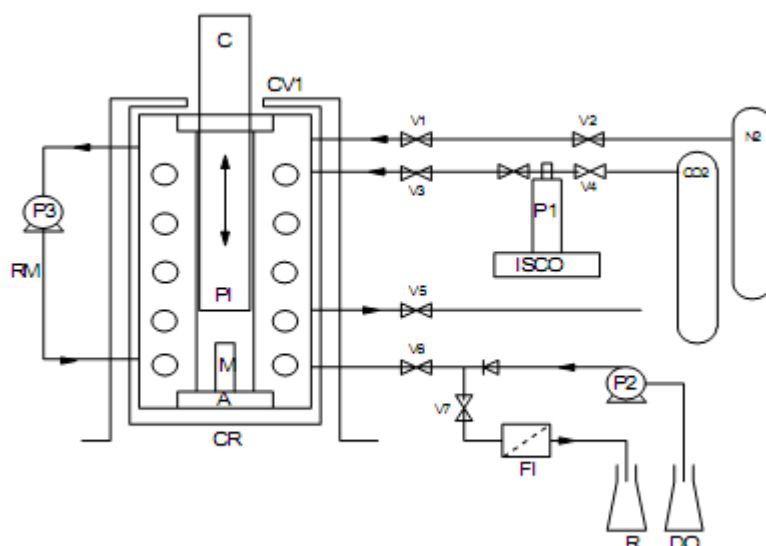


Figura 7.1. Diagrama de flujo del analizador de fases. A: sistema de agitación; C: cilindro neumático; CV1: celda de volumen variable; CR: cámara de calor o frío; DO: disolvente o disolución orgánica; FI: filtro; P: bomba; PI: pistón; R: residuo; RM: sistema de recirculación; V: válvula. M: tapón porta-sustancias.

La celda de volumen variable descrita en la Figura 7.1 obtiene curvas de solubilidad de un soluto en mezclas de “disolvente orgánico/fluido comprimido”, tales como se muestran en la Figura 7.2, donde el fluido comprimido (FC), generalmente CO_2 , puede tener diferentes comportamientos respecto a la disolución del soluto *C* en el disolvente orgánico *A*. El CO_2 puede actuar como anti-solvente (Curva 1), como co-solvente (Curva 2), o puede actuar de manera sinérgica con el disolvente orgánico aumentando así la capacidad solvatadora de la mezcla “disolvente orgánico/ CO_2 ” en relación a cada uno de los componentes por separado (Curva 3) [72].

En la Curva **1** la adición del CO_2 sobre una disolución saturada del compuesto **C** en el disolvente orgánico **A** provoca la precipitación del compuesto **C**, por tanto, el CO_2 se comporta como anti-solvente. En la Curva **2**, existe un rango de X_{CO_2} para el cual el fluido comprimido actúa como co-solvente, por tanto, sin provocar la precipitación del compuesto **C**. Este rango viene determinado por el punto de intersección entre la recta correspondiente a la variación ideal lineal de la solubilidad con la curva real de variación de la solubilidad del compuesto **C** con la composición de la mezcla binaria “disolvente orgánico/ CO_2 ”. Las Curvas **1** y **2** tienen en común que la adición del CO_2 sobre una disolución de **C** en el disolvente **A** provoca una disminución de la solubilidad de **C**. En el caso de la Curva **3**, la adición de CO_2 genera un sistema binario de capacidad solvatadora superior al disolvente orgánico **A**, provocando por tanto, un efecto sinérgico del CO_2 y del disolvente orgánico sobre la solubilidad del compuesto **C** en un rango determinado de X_{CO_2} [73].

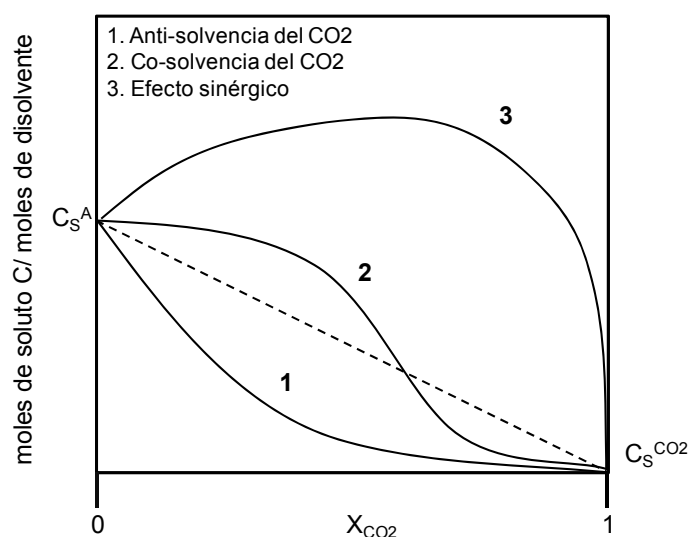


Figura 7.2. Diferentes tipos de curvas de solubilidad en sistemas “soluto/disolvente orgánico/ CO_2 ”: La Curva **1** representa un comportamiento de solubilidad con anti-solvenca del CO_2 . La Curva **2** representa un comportamiento de solubilidad con co-solvenca del CO_2 . La Curva **3** representa un comportamiento sinérgico. La línea a trazos representa para cada sistema la variación ideal lineal de la solubilidad con la composición del disolvente.

Los pasos experimentales para la obtención de la curva de solubilidad de los compuestos utilizados en este trabajo (sistema “colesterol/etanol/ CO_2 ”) se pueden resumir del siguiente modo:

Paso 1

En este paso se coloca el pistón de la celda en su posición más baja (volumen mínimo de la celda). En el caso de que sea necesario, se introduce, por la parte inferior de la celda, un

porta-sustancias con la cantidad de sólido necesaria. A continuación, se fija la temperatura de trabajo en la cámara de temperatura del analizador.

Paso 2

Se añaden cantidades conocidas de soluto, disolvente orgánico y CO_2 hasta conseguir el sistema de dos fases (S+L) deseado a la presión P_W y temperatura T_W a las que se quiere estudiar la variación de la solubilidad con la composición de la mezcla “soluto/disolvente orgánico/ CO_2 ” (puntos marcados con una x en las gráficas modelo de la Figura 7.3).

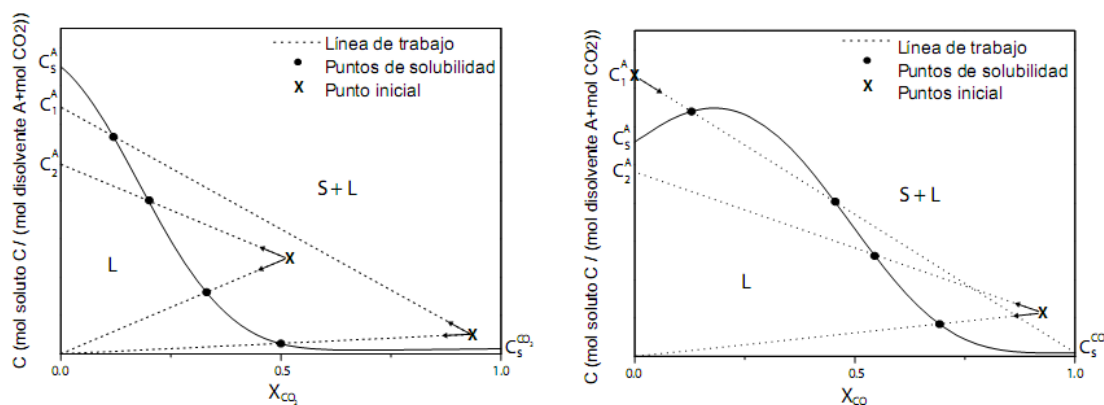


Figura 7.3. *Izquierda:* determinación de los puntos de solubilidad, (•), en un sistema donde el CO_2 actúa como antisolvente. El punto de solubilidad se puede obtener o bien añadiendo el disolvente orgánico puro o bien añadiendo una solución orgánica de C en A con una concentración conocida, (C_1^A o C_2^A), sobre un punto inicial (X) que se encuentre en una zona bifásica (S+L). *Derecha:* Determinación de los puntos de solubilidad cuando el CO_2 actúa como co-solvente. En este caso el procedimiento para obtener los datos de solubilidad puede ser el mismo que el seguido cuando el CO_2 actúa como anti-solvente y también se puede proceder añadiendo CO_2 puro sobre un sistema inicial de dos fases de una solución sobresaturada de C en el disolvente orgánico A.

Paso 3

Sobre el sistema de dos fases (S+L) inicial se añade, según convenga, disolvente orgánico puro, disolución del compuesto C en el disolvente orgánico A o CO_2 puro hasta alcanzar la redisolución total de la fase sólida y obtener una única fase. Durante la adición, la composición del sistema “soluto/disolvente orgánico/ CO_2 ” varía de forma lineal siguiendo la denominada línea de trabajo (líneas discontinuas en los gráficos de la Figura 7.3) hasta alcanzar el punto donde toda la fase sólida desaparece (“*vanishing point*”). En este momento se ha obtenido un punto de la curva de solubilidad del compuesto C en la mezcla “disolvente orgánico A/ CO_2 ” (símbolo • en los gráficos de la Figura 7.3)

La adición ha de ser lo suficientemente lenta para observar con claridad la disolución del soluto C. Esta operación está limitada por el volumen máximo de de la celda, que se alcanza con la máxima altura del pistón, con lo que en los casos que no se alcance la completa disolución del soluto C en dicho punto habría que comenzar un nuevo experimento.

Paso 4

Una vez alcanzado el “vanishing point” y por tanto contar con una única fase en el analizador, se realiza el balance de los componentes del sistema y se calcula la solubilidad del soluto C en la mezcla “disolvente orgánico/CO₂”.

Paso 5

Por último los puntos de solubilidad encontrados experimentalmente mediante el método “*vanishing point*” se ajustan a la Ecuación 7.1 mostrada a continuación obteniéndose la curva de solubilidad “soluto/disolvente orgánico/CO₂” correspondiente.

$$C_S = C_S^A (1 - X_B)^{(\alpha + \beta X_B)} + C_S^B X_B \quad (7.1)^{[53]}$$

Donde:

- C_S es la concentración de saturación del soluto, en la solución expandida (mol soluto/mol disolvente).
- C_S^A es la concentración de saturación del soluto en el disolvente A.
- C_S^B es la concentración de saturación del soluto en el disolvente B
- X_B es la fracción molar del disolvente B.
- α y β son los coeficientes de la Ecuación 6.1 obtenidos ajustar los datos experimentales (X_B, C_S) a dicha ecuación.

7.3 Preparación de vesículas de colesterol:CTAB por DELOS-susp: equipos y procedimientos

7.3.1 Equipo de 6 ml

7.3.1.1 Configuración.

El equipo utilizado para la preparación de las vesículas por DELOS-susp se esquematiza en la Figura 7.4. La configuración consta de un reactor de 6 ml (R), cuya temperatura se

controla mediante una camisa de calefacción externa. También consta de una bomba de jeringa termostatzada (P) (ISCO 260D, CIUO Inc., Lincoln, EE.UU.), con la que se introduce el CO_2 al interior del reactor R a través de la válvula V1. Consta también de una válvula de despresurización (V3), a través de la cual la solución expandida se despresuriza en el interior de un colector (C), donde está contenida la fase acuosa. El N_2 se introduce a través de la válvula V2 que está directamente conectada al depósito a presión que lo contiene. Situadas frente a las válvulas V1 y V2 hay dos válvulas anti-retorno para evitar la contaminación de las líneas de CO_2 y N_2 . El equipo también consta de un indicador de presión (PI) que indica la presión del interior del reactor, y una válvula anti-retorno situada antes el reactor.

7.3.1.2 Procedimiento experimental

La preparación de vesículas ricas en colesterol mediante DELOS-susp se lleva a cabo conforme el siguiente procedimiento:

En el reactor, R, se introduce un volumen (V) de una solución de "colesterol/etanol", que previamente ha sido llevado a la temperatura de trabajo (T_W). Después de 30 minutos, una vez que la solución ha alcanzado T_W , el reactor se presuriza con CO_2 comprimido abriendo la válvula V1, obteniéndose una solución expandida de "colesterol/etanol/ CO_2 " con la fracción molar de CO_2 , X_{CO_2} , deseada a la presión de trabajo (P_W).

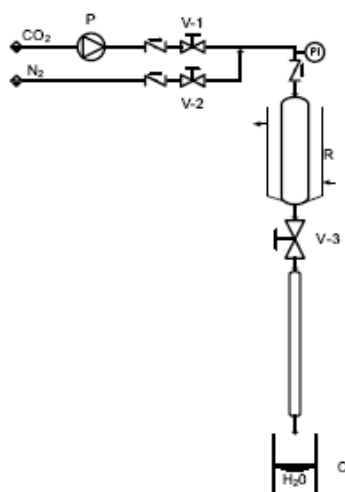


Figura. 7.4. Esquema del equipo de 6 ml utilizado en los experimentos realizados con DELOS-susp.

La solución "colesterol/etanol/ CO_2 " se deja estabilizar al menos durante una hora, manteniendo la bomba de CO_2 en marcha y la válvula V1 abierta con el fin de mantener una P_W constante el interior del reactor. Después la solución expandida con CO_2 se despresuriza, abriendo la válvula V3, desde P_W hasta presión atmosférica, sobre una solución acuosa de CTAB (con o sin antibiótico). Durante la despresurización se utiliza un flujo de N_2 a P_W como

émbolo para empujar la solución expandida con el fin de mantener una presión constante en el reactor. La rápida, homogénea y gran disminución de temperatura, producida debido a la evaporación del CO₂, reduce la solubilidad del colesterol, evitándose la precipitación del mismo debido a que el CTAB presente en el medio se autoensambla con éste produciéndose así la formación *in situ* de vesículas homogéneas unilamelares de tamaño nanoscópico (SUVs). Las vesículas obtenidas se almacenan a 4 °C.

7.3.2 Equipo de 300 ml

7.3.2.1 Configuración

El equipo de 300 ml empleado para la preparación de vesículas mediante DELOS-susp se esquematiza en la Figura 7.5. En esta configuración el CO₂, previamente enfriado mediante un intercambiador de calor (S1), se introduce con una bomba de alta presión, P1, (bomba dosificadora con cabezal refrigerado, Milton Roy) en el reactor (R) a través de la válvula V3. El caudal de CO₂, introducido en el reactor R a través de la válvula V3 se mide empleando un caudalímetro, C, (Bronkhorst). Una vez en el reactor, el CO₂ se calienta hasta la temperatura de trabajo (T_w) empleando un segundo intercambiador de calor (S2). El reactor R posee una camisa de refrigeración conectada a un baño térmico de recirculación para regular la temperatura en su interior. El reactor R también está conectado a través de la válvula V4, a un filtro (F) presurizado a la presión de trabajo (P_w) con el objeto de retener el precipitado que se pudiera formar por acción anti-solvente del CO₂ durante la etapa de presurización. El filtro F está conectado a su vez a una unión tipo T de mezclado (T-mezcla) donde se mezcla la disolución despresurizada y la fase acuosa contenida en el depósito D1 que se bombea a flujo constante mediante la bomba P2 (Watson Marlow sci). Las vesículas se recogen después de la unión tipo T en el colector RC. Como elementos de control del proceso, el reactor R dispone de un indicador de presión, IP, y dos indicadores de temperatura, un termopar, IT1, situado en el interior del reactor R y otro termopar, IT2, situado después de la válvula de despresurización, V5, que está controlada automáticamente. El termopar, IT1 mide continuamente la temperaturas de trabajo, T_w, y el termopar, IT2, mide la temperatura final de la despresurización, T_F.

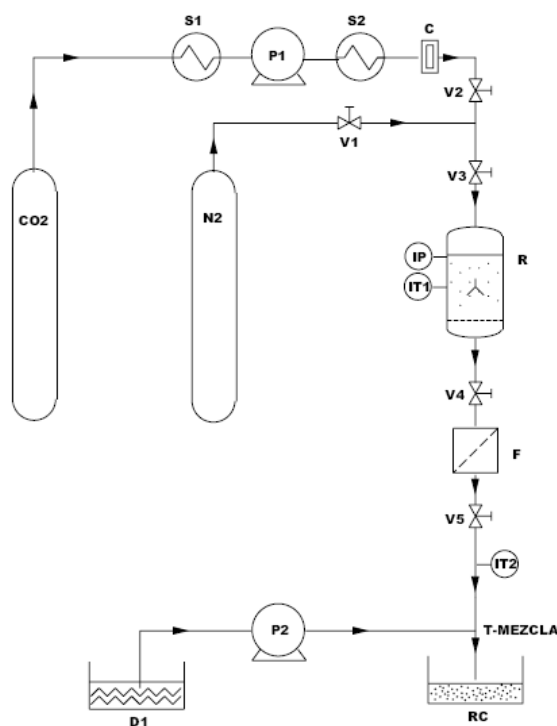


Figura 7.5. Esquema del equipo de 300 ml utilizado en los experimentos realizados con DELOS-susp.

7.3.2.2 Procedimiento experimental

Para la preparación de vesículas de colesterol:CTAB por DELOS-susp con el equipo de 300 ml se sigue el siguiente procedimiento: En el reactor R se introduce una solución preparada con un disolvente orgánico que contiene los componentes de la membrana vesicular excepto el CTAB. La solución se calienta en el reactor hasta la temperatura de trabajo, T_w . A los 30 minutos de haber conseguido esta temperatura, el reactor se presuriza mediante la adición de CO_2 comprimido a través de la válvula V3, produciéndose una solución expandida con CO_2 a la fracción molar, X_{CO_2} , de éste deseada, y a la presión de trabajo fijada P_w . Después la solución expandida de “soluto/disolvente orgánico/ CO_2 ” se agita durante una hora para alcanzar un buena homogenización. Un vez que la solución está homogenizada, se para el agitador y se abre la válvula V4 para conectar el reactor con el filtro F que está presurizado a la presión de trabajo P_w . Después de esto, se abre la válvula V5 para despresurizar la solución expandida con CO_2 en la unión tipo T a la cual se bombea simultáneamente la solución de CTAB. Para empujar la solución expandida con CO_2 se emplea un flujo de N_2 , a la presión P_w , que actúa como émbolo para mantener la presión en el reactor a P_w durante la despresurización.

La rápida, homogénea y gran disminución de temperatura producida por la evaporación del CO₂, reduce la solubilidad del colesterol, evitándose la precipitación del mismo, debido a que el CTAB presente en el medio se autoensambla con éste, produciéndose la formación in situ de vesículas homogéneas unilamelares de tamaño nanoscópico (SUVs). Las vesículas producidas se almacenan a 4 °C.

7.3.3 Encapsulación de sulfato de gentamicina (GS) en vesículas por DELOS-susp

La encapsulación del sulfato de gentamicina (GS) en las vesículas de colesterol:CTAB se llevó a cabo con los mismo procedimientos usados para la fabricación de vesículas de colesterol:CTAB no cargadas en los equipos de 6 ml y 300 ml descritos anteriormente pero con la incorporación de la cantidad de GS deseada en la fase acuosa.

7.4 Instrumentos, técnicas y procedimientos utilizados para la caracterización de los sistemas vesiculares

7.4.1 Dispersión de luz dinámica (“*dynamic light scattering*”, DLS)

El tamaño de las vesículas fue medido mediante “*dynamic light scattering*” (Malvern Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, U.K.). Las muestras (1 ml) fueron analizadas sin realizarse ninguna modificación o dilución. El resultado obtenido es la media de tres medidas consecutivas de la misma muestra. En el presente trabajo los tamaños de partícula y las distribuciones de tamaño se han presentado en porcentaje de intensidad de luz dispersada por las partículas, porque esta es la forma más recomendable de expresar los resultados, ya que son los datos originales proporcionados por el equipo de medida. Aparte del tamaño medio de partícula (Z_D), en los resultados se refleja el índice de polidispersidad (PDI) que se define de la forma siguiente: Si se asumiera un único tamaño de la población que sigue una distribución de Gauss, el índice de polidispersidad estaría relacionado con la desviación estándar (σ) de la hipotética distribución de Gauss de la forma que se expresa en la Ecuación 7.2.

$$PDI = \frac{\sigma^2}{Z_D^2} \quad (7.2)$$

7.4.2 Potencial Z

Mediante la medida del potencial Z se determinó la carga superficial de las vesículas en la fase acuosa y la magnitud de las interacciones electroestáticas entre las partículas que forman el sistema disperso. Las medidas de potencial zeta se realizaron con el equipo Malvern Zetasizer Nanoseries (Malvern Instruments, UK). El volumen de la muestra analizada fue de 1ml, las medidas se realizaron sin ninguna modificación ni dilución. Los resultados mostrados del potencial Z son la media de tres medidas consecutivas.

7.4.3 Microscopia electrónica de transmisión criogénica (cryo-TEM)

La morfología de los sistemas vesiculares fue estudiada mediante microscopia electrónica de transmisión en condiciones criogénicas (cryo-TEM). Las imágenes de cryo-TEM se obtuvieron mediante un microscopio electrónico de transmisión JEOL JEM-2011 (JEOL LTD, Tokio, Japan) operando a 120 kV.

La preparación de las muestras congeladas se llevó a cabo en un sistema de vitrificación con ambiente controlado (CEVS) Leica modelo EM-CPC (Leica Microsystems, Alemania). Se fijó una rejilla estándar de TEM de cobre cubierta con una película fina de carbono agujereada en el CEVS mediante unas pinzas de sujeción. Se añadieron 2µl de la muestra a dicha rejilla, después de 30 segundos, el exceso de muestra se eliminó con un papel de filtro de doble capa para obtener una película fina de 20-400nm. Inmediatamente después se sumergió en un baño de etano justo por encima de su punto de congelación (94 K), provocando la vitrificación de la muestra con una velocidad de enfriamiento extremadamente rápida (100 K/s), evitándose así la formación de cristales, y por tanto, la alteración de la microestructura original.

Después de la preparación de las muestras, éstas se almacenaron en un recipiente con nitrógeno líquido (77 K) y seguidamente la muestra vitrificada fue trasladada al microscopio para su análisis. Para evitar la perturbación de la muestra y la formación de cristales de hielo, las muestras se conservaron en frío (77 K), tanto durante el traslado, como durante la captación de imágenes. Las condiciones de trabajo fueron en vacío, a una temperatura por debajo de 77 K y a un voltaje de 120 kV.

Las imágenes de las vesículas fueron grabadas digitalmente con una cámara digital Gatan 724 Multiscan CCD y procesadas con el programa DigitalMicrographs versión 3.9.2.

7.4.4 Procedimiento experimental para la determinación de la eficiencia de encapsulación, EE y la determinación de la carga de antibiótico en las vesículas de colesterol:CTAB cargadas con sulfato de gentamicina (GS)

El análisis de las EE% y la carga de antibiótico de las vesículas ricas en colesterol se realizó siguiendo el siguiente procedimiento experimental que comprende:

- 1) Separación del antibiótico no encapsulado de las vesículas cargadas.
- 2) Ruptura de las vesículas.
- 3) Transformación del sulfato de gentamicina (GS) en una especie diferente, que se detecta por fluorescencia.
- 4) Cuantificación de la masa de antibiótico encapsulado utilizando una curva patrón.
- 5) Obtención de EE (%) y la carga de antibiótico con las Ecuaciones 7.3 y 7.4 respectivamente.

$$EE(\%) = \frac{\text{Masa de GS encapsulada}}{\text{Masa inicial de GS}} \times 100 \quad (7.3)$$

$$\text{Carga de antibiótico}(m/m) = \frac{\text{Masa de GS encapsulada}}{\text{Masa de lípidos}} \quad (7.4)$$

7.4.4.1 Cromatografía de exclusión por tamaño (CE)

La separación de las vesículas cargadas con GS del antibiótico no encapsulado se realizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño (CE). Se utilizó una columna rellena de gel Sephadex G-100 (GE Healthcare, Barcelona, España). La columna CE (1 cm x 27 cm) se preparó del siguiente modo:

- Se pesó 1,3 g de Sephadex G-100 y se suspendió en 39 ml de PBS (100 mM, pH= 7,4).
- Con el fin de que el gel se hinchara, la suspensión se mantuvo a 363 K durante 5 horas.
- Una vez hinchado el gel, la suspensión se enfrió a temperatura ambiente, el sobrenadante se decantó y se agregó más PBS para obtener una suspensión al 75 % (volumen) de gel en PBS.
- El siguiente paso fue desgasificar la suspensión mediante burbujeo de argón durante 15 minutos.

- Una vez desgasificada la suspensión, el gel se agregó rápidamente a la columna evitándose la formación de burbujas.
- Finalmente se eluyó un volumen de PBS igual a tres veces el volumen de la columna.

Una vez la columna estuvo lista para usar, se eluyó 1 ml de la muestra vesicular por gravedad con PBS. Las fracciones recogidas (1 ml) fueron analizadas por cromatografía de capa fina (TLC) con el fin de detectar la elución de las vesículas y sulfato de gentamicina. Cada fracción fue inyectada en placas de sílica y eluída con acetato de etilo en una cámara de cromatografía y revelada con KMnO_4 . Esto permitió comprobar que se produjo una buena separación entre las vesículas cargadas y el antibiótico no encapsulado pasados por la columna de 1 cm x 27 cm rellena con gel Sephadex G-100.

7.4.4.2 Ruptura de las vesículas y liberación de la GS encapsulada

Una vez separadas las vesículas cargadas con GS del antibiótico no encapsulado, las fracciones que contenían vesículas se juntaron en un "pool" que se utilizó para la cuantificación de GS. El antibiótico encapsulado fue liberado tras la ruptura de la membrana vesicular mediante la adición de metanol a una determinada cantidad de vesículas (100 μl -500 μl) hasta alcanzar un volumen total de 1,6 ml.

7.4.4.3 Medidas de fluorescencia y reacción de derivatización

El porcentaje de encapsulación de la GS fue determinado usando el método fluorométrico descrito por Gubernator et al [64]. Este método se basa en la reacción entre *o*-ftalaldialdehído (OPA) y los grupos amino primarios (Figura 7.6), en presencia de β -mercaptoetanol. Por esta reacción de derivatización la GS se transforma en una especie fluorescente que se puede cuantificar usando un espectrofluorímetro.

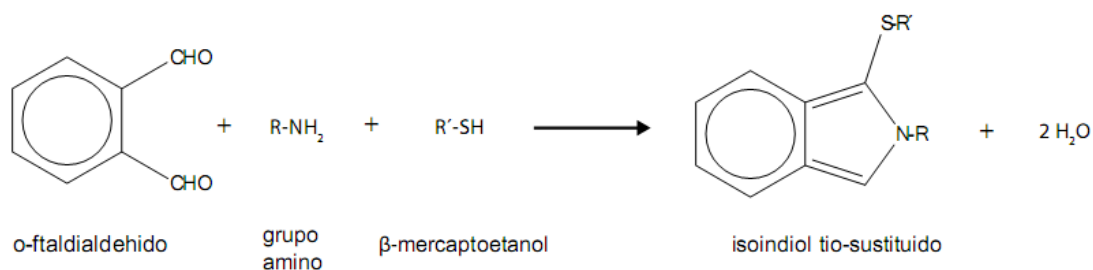


Figura 7.6. Reacción de los grupos amino de la GS con *o*-ftalaldialdehído en presencia de β -mercaptoetanol.

El reactivo OPA se preparó y se utilizó como se detalla en [64]. En base al procedimiento descrito por los autores, se agregaron 0,9 ml de un reactivo diluido OPA (100 µl de reactivo OPA en 800 µl de metanol) a 1,6 ml de vesículas rotas que contenían GS. La mezcla se dejó reaccionar durante 10 minutos antes de medir la fluorescencia de las soluciones. Para medir la fluorescencia se utilizó un espectrómetro de fluorescencia Perkin Elmer LS45 equipado con una lámpara de Hg. Para la determinación de los espectros de emisión producidos por la fluorescencia se usaron cubetas de cuarzo con una longitud de camino óptico de 1 cm y un filtro atenuador de 1%. Los espectros se realizaron excitando las muestras a 340 nm.

Para cuantificar la GS encapsulada se obtuvo una recta de calibración de GS en metanol, construida con las mismas condiciones a las que iban a ser analizadas las muestras de vesículas con GS. Se comprobó que la presencia de lípidos no influyó en la fluorescencia de GS.

Recta de calibración para la cuantificación de GS por fluorescencia

Para determinar la recta de calibración se siguió el siguiente procedimiento: Se introdujeron diferentes cantidades (5, 10, 15, 20, 25 y 30 µl) de una solución acuosa de GS (0,1 mg/ml) en viales de vidrio seco, además se añadió 1,6 ml de metanol. Así se obtuvieron muestras patrón que contenían 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 y 3 µg del antibiótico. A todas estas muestras patrón se les añadió 0,9 ml de OPA diluido (0,1 ml de OPA y 0,8 ml de metanol) Después de 10 minutos de incubación se midió la fluorescencia de las muestras patrón excitando éstas a 340 nm. El valor usado para la obtención de la recta de calibración fue el área de la banda de emisión de fluorescencia (432nm). Cada concentración de GS se realizó por triplicado.

La Figura 7.7 (izquierda) muestra las bandas de emisión a diferentes concentraciones de GS. Mediante el ajuste de los datos experimentales de fluorescencia representados en la Figura 7.7 (derecha) a una ecuación $y = a + bx$ se obtuvo de la recta de calibración siguiente ($R^2 = 0,998$).

$$\text{Área} = 3484,277\mu\text{g} + 167,80 \quad (7.5)$$

Donde *Área* es el área de la banda de emisión de fluorescencia y μg es la masa de GS presente en la muestra.

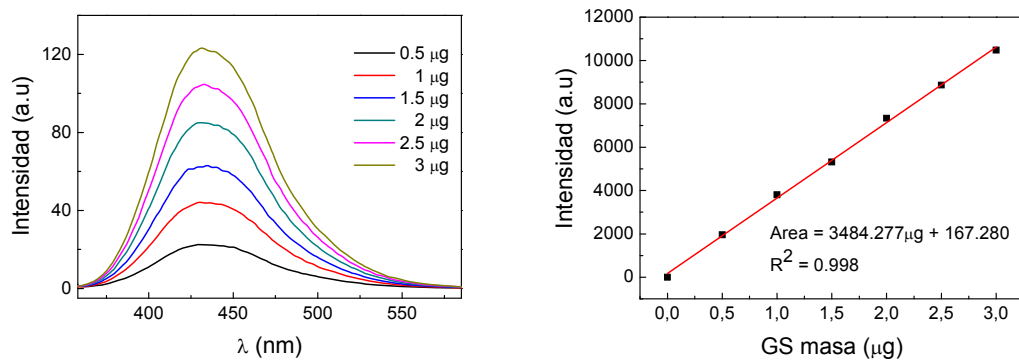


Figura 7.7. *Izquierda:* bandas de emisión de fluorescencia de las muestras patrón que contienen diferentes cantidades de GS. *Derecha:* recta de calibración para la cuantificación de GS por fluorescencia.

8. Coste del proyecto

A continuación se muestra el coste total del proyecto asociado al coste de material (productos químicos más empleados), como a los procesos de fabricación y caracterización de las muestras.

Material			
Concepto	Unidades	Coste unitario (€)	Coste total (€)
Colesterol (100 g)	1	87,1	87,1
CTAB (50 g)	0,5	54,3	27,2
Etanol grado HPLC (2,5 l)	1	73,0	73,0
Sulfato de Gentamicina (100 g)	1	352,5	352,5
CO2 (Kg)	3,5	11,6	40,6
N2 (Kg)	3	14,6	43,8
Sephadex-G100 (50 g)	0,1	299,8	30,0
o-Ftaldialdehido (OPA) (5 g)	2	38,8	77,6
β-Mercaptoetanol (100 ml)	0,5	16,7	8,4

Procesos de fabricación y caracterización			
Concepto	Unidades	Coste unitario (€)	Coste total (€)
Equipo 6 ml	68	5	340
Equipo 300 ml	32	14	448
Analizador de fases	108	12	1296
Zetasizer (DLS y potencial Z)	20	10	200
Fluorímetro	15	6	90
cryo-TEM	10	88	880

Coste total	
Coste total material:	740 €
Coste total procesos y caracterización:	3.254 €
Coste seguimiento y dirección (40 horas):	1.600 €
Coste total del proyecto :	5.594 €

9. Referencias

1. Langer, R., *Drug delivery and targeting*. Nature, 392 (1998) 5-10.
2. Lasch, J.W.; V.; Brandl; M. *Preparation of liposomes*. In Torchilin, V. and Weissig V. (eds.), *Liposomes: A practical approach*, Oxford University Press, New York 2003, 3–29.
3. Soussan, E.; Cassel, S.; Blanzat, M. and Rico-Lattes, I., *Drug delivery by soft matter: Matrix and vesicular carriers*. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48 (2009) 274-288.
4. Peer, D.; Karp, J.M., Hong, S.; Farokhzad, O.C.; Margalit, R. and Langer, R., *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. *Nature Nanotechnology*, 2 (2007) 751-760.
5. Gregoriadis, G.; Wills, E.J.; Swain, C.P. and Tavill, A.S., *Drug carrier potential of liposomes in cancer chemotherapy*. *Lancet*, 1 (1974) 1313-1316.
6. Boas, U. and .H., P.M.H., *Dendrimers in drug research*. *Chemical Society Reviews*, 33 (2004) 43-63.
7. Duncan, R., *The dawning era of polymer therapeutics* *Nature Reviews Drug Discovery*, 2 (2003) 347-360.
8. Torchilin, V.P., *Micellar nanocarriers: Pharmaceutical perspectives*. *Pharmaceutical Research*, 24 (2007) 1-16.
9. Kostarelos, K.; Bianco, A. and Prato, M., *Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics*. *Nature Nanotechnology*, 4 (2009) 627-633.
10. Malam, Y.; Loizidou, M. and Seifalian, A.M., *Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 30 (2009) 592-599.
11. http://enlaceacademico.uson.mx/wb2/DP/DP_matbiomoleculares.
12. Dumitriu, S., *Polymeric Biomaterials*. Second Edition ed. 2001: CRC Press
13. M. Cano; S.Sala.; N. Ventosa and J. Veciana, *Easy to scale-up preparation of uniform unilamellar nanovesicles using CO₂-expanded solvents*. *E-Nanonewsletter*, March 2008: p. 28-30.
14. Gradzielski, M., *Vesicles and vesicle gels- structure and dynamics of formation*. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 15 (2003) R655-R697.
15. Lorin, A., Flore, C., Thomas, A. and Basseur, R., *Les liposomes : description, fabrication et applications*. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 8 (2004) 163-176.
16. Cano, A.M., *Preparación de materiales moleculares nanoparticulados y dispersos –vesículas y microemulsiones empleando fluidos comprimidos*, in *Programa de doctorado de Ciencia de Materiales. Departamento de Química. Facultad de Ciencias*. 2009, U.A.B: Barcelona.
17. Veatch, S.L. and .K., S.L., *Separation of Liquid Phases in Giant Vesicles of Ternary Mixtures of Phospholipids and Cholesterol*. *Biophysical Journal*, 85 (2003) 3074-3083.
18. Kulin, S.; Kishore, R.; Helmerson, K. and Locascio, L., *Optical Manipulation and Fusion of Liposomes as Microreactors*. *Langmuir*, 19 (2003) 8206-8210.
19. Bolinger, P.Y.; Stamou, D. and Vogel, H., *Integrated nanoreactor systems: Triggering the release and mixing of compounds inside single vesicles*. *Journal of the American Chemical Society*, 126 (2004) 8594-8595.
20. Storm, G. and .C., D.J.A., *Liposomes: quo vadis?*, in *Pharmaceutical Science & Technology Today*,. 1 (1998) 19-31.
21. Goni, F.M.; Urbaneja; M.A., Alonso, A., *Liposome Technology*. 1993, London Tokyo: CRC Press.
22. Kulkarni, S.B.; Betageri, G.V. and Singh, M., *Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes*. *Journal of Microencapsulation*, 12 (1995) 229-246.

23. Talsma, H. and .C., D.J.A., *Liposomes as drug delivery systems. Part 1. Preparation*, in *Pharmaceutical Technology*. 16 (1992) 96-106.
24. Gregoriadis, G., *Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems*, in *Trends in Biotechnology*. 13 (1995) 527-537.
25. Hwang, K., *Liposome pharmacokinetics*. Liposomes: from biophysics to therapeutics, ed. M.J.E. Ostro. 1987, New York.: Marcel Dekker.
26. Mayer, L.D.; Bally, M.B.; Hope, M.J. and Cullis, P.R., *Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes*, in *Chemistry and Physics of Lipids*. 40 (1986) 333-345.
27. Barenholz, Y., *Liposome application: problems and prospects*, in *Current Opinion in Colloid & Interface Science*. 6 (2001) 66-77.
28. New, R.C.C., *Preparation of liposomes*. (Ed.) 1990, New York: Oxford University Press.
29. Szoka, F. and .P., D., *Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reversephase evaporation*. . Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 75 (1978) 4194-4198
30. Batzri, S. and .K., E.D., *Single bilayer liposomes prepared without sonication*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 298 (1973) 1015-1019.
31. Kirby, C. and .G., G., *Dehydrationrehydration vesicles A simple method for and N.B. highyield drug entrapment in liposomes*, 2 (1984) 979-984.
32. Woodbury, D.J.; Richardson, E.S.; Grigg, A.W.; Welling, R.D. and Knudson, B.H. *Reducing liposome size with ultrasound: Bimodal size distributions*. *Journal of Liposome Research*, 16 (2006) 57-80.
33. Berger, N., Sachse, A., Bender, J., Schubert, R. and Brandl, M. , *Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics*. *International Journal of Pharmaceutics*, 223 (2001) 55-68.
34. Hope, M.J.; Bally, M.B., Webb; G. and Cullis, P.R., *Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membranepotential*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 812 (1985) 55-65.
35. Macdonald, R.C.; Macdonald, R.I.; Menco, B.P.M.; Takeshita, K.,; Subbarao, N.K. and Hu, L.R. , *Small-volume extrusion apparatus for prepration of large, unilamellar vesicles*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1061 (1991) 297-303.
36. Bachmann, D.; Brandl, M. and Gregoriadis, G. , *Preparation of liposomes using a MiniLab 8.30 H highpressure homogenizer*. *International Journal of Pharmaceutics*, 91 (1993) 69-74
37. Pupo, E.; Padrón, A.; Santana, E.; Sotolongo, J.; Quintana, D.; Dueñas, S.; Duarte, C.; De la Rosa, M.C.;and Hardy, E., *Preparation of plasmid DNAcontaining liposomes using a highpressure homogenization-extrusion technique*. *Journal of Controlled Release*, 104 (2005) 379-396.
38. Davies, O.R.; Lewis, A.L.; Whitaker, M.J.; Tai, H.Y.; Shakesheff, K.M. and Howdle, S.M. , *Applications of supercritical CO₂ in the fabrication of polymer systems for drug delivery and tissue engineering*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (2008) 373-387.
39. Mishima, K., *Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60 (2008) 411-432.
40. Reverchon, E.; Adami, R.; Cardea, S. and Della Porta, G., *Supercritical fluids processing of polymers for pharmaceutical and medical applications*. *Journal of Supercritical Fluids*, 47 (2009) 484-492.
41. www.istas.net/risctox/gestion/estructuras/3079.pdf.
42. P.G. Jessop, B.S., *Chemical Syntheses using Supercritical Fluids*. Wiley-VCH, (1999).

43. Woods, H.M.; Silva, M.; Nouvel, C.; Shakesheff, K.M. and Howdle, S.M., *Materials processing in supercritical carbon dioxide: surfactants, polymers and biomaterials*. Journal of Materials Chemistry, 14 (2004) 1663-1678.
44. Johnston, K.P. and S., P.S., *Materials science- Making nanoscale materials with supercritical fluids*. Science, 303 (2004) 482-483.
45. Wells, S.L.a.D., J., *CO₂ technology platform: An important tool for environmental problem solving*. Angewandte Chemie-International Edition, 40 (2001) 519-527.
46. Castor, T.P.M.a.a.f.l.p., WO9427581, 1994.
47. Castor, T.P., *Phospholipid nanosomes*, Current Drug Delivery, 2 (2005) 329-340.
48. L. Frederiksen, L.A., K.; van Hoogevest, P.; Keller, H. R.; Leuenberger, H. J. *Pharm. Sci.* 86 (1997) 921.
49. Otake, K.I., T.; Sakai, H.; Abe, M. *Langmuir*. 17 (2001) 3898.
50. Meure, L.A.R.; K.; Foster, N.R.; Dehghani, F. , *Langmuir*. 2009. 25: p. 326.
51. Cano-Sarabia, M.; Ventosa, N.; Sala, S.; Patino, C.; Arranz, R. and Veciana, J. and . *Preparation of uniform rich cholesterol unilamellar nanovesicles using CO₂expanded solvents*. Langmuir, (2008). 24: p. 2433-2437.
52. Cabrera, I., *Preparación de nanovesículas, con fluidos comprimidos,*, in *Programa de doctorado de Ciencia de Materiales*. . En progreso, U.A.B: Barcelona: Barcelona.
53. Wubbolts, F.E.; Bruinsma, O.S.L. and van Rosmalen, G.M., *Measurement and modelling of the solubility of solids in mixtures of common solvents and compressed gases*. Journal of Supercritical Fluids, 32 (2004) 79-87.
54. Wubbolts, F.E., *Supercritical crystallisation: volatile components as antisolvents*. 2000, Technical University of Delft: Delft
55. *Zeta Potential of Colloids in Water and Waste Water*, A.S.D.-., American Society for Testing and Materials, 1985
56. Gamazo, C.; Prior, S.; Lecaroz, M.C.; Vitas, A.I., Campanero; M.A., Perez, G.; Gonzalez, D. and Blanco-Prieto, M.J. and . *Biodegradable gentamicin delivery systems for parenteral use for the treatment of intracellular bacterial infections*. Expert Opinion on Drug Delivery, 4 (2007) 677-688. .
57. Virto, M.R.; Elorza, B.; Torrado, S.; Elorza, M.D.A. and Frutos, G., *Improvement of gentamicin poly(D,L-lactidoglycolic acid) microspheres for treatment of osteomyelitis induced by orthopedic procedures*. Biomaterials, 28 (2007) 877-885.
58. Lutwyche, P.; Cordeiro, C.; Wiseman, D.J.; St-Louis, M.; Uh, M.; Hope, M.J.; Webb, M.S. and Finlay, B.B., *Intracellular delivery and antibacterial activity of gentamicin encapsulated in pHsensitive liposomes*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 42 (1998) 2511-2520.
59. Mugabe, C.; Halwani, M.; Azghani, A.O.; Lafrenie, R.M. and Omri, A., *Mechanism of enhanced activity of liposome entrapped aminoglycosides against resistant strains of Pseudomonas aeruginosa*, in *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 50 (2006) 2016-2022.
60. Mugabe, C.; Azghani, A.O. and Omri, A., *Liposome mediated gentamicin delivery: development and activity against resistant strains of Pseudomonas aeruginosa isolated from cystic fibrosis patients*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 55 (2005) 269-271.
61. Klemens, S.P.; Cynamon; M.H., Swenson, C.E.; and Ginsberg, R.S., *Liposome encapsulated gentamicin therapy of Mycobacterium avium complex infection in beige mice*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 34 (1990) 967-970.
62. Gubernator, J.; Druis-Kawa, Z.; Dorotkiewicz-Jach, A.; Doroszkiewicz, W. and Kozubek, A., *In vitro antimicrobial activity of liposomes containing ciprofloxacin, meropenem and gentamicin against gram-negative clinical bacterial strains*. Letters in Drug Design & Discovery, 4 (2007) 297-304.

63. http://www.malvern.com/LabEng/technology/dynamic_light_scattering/dynamic_light_scattering.htm.
64. Gubernator, J.; Drulis-Kawa, Z. and Kozubek, A., *A simply and sensitive fluorometric method for determination of gentamicin in liposomal suspensions*. International Journal of Pharmaceutics, 327 (2006) 104-109.
65. Morgan, J.R. and W., K.E., *Preparation and properties of liposome-associated gentamicin*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 17 (1980) 544-548.
66. Sanderson, N.M. and J., M.N., *Encapsulation of vancomycin and gentamicin within cationic liposomes for inhibition of growth of Staphylococcus epidermidis*. Journal of Drug Targeting, 4 (1996) 181-189
67. Halwani, M.; Mugabe, C.; Azghani, A.O.; Lafrenie, R.M.; Kumar, A. and Omri, A., *Bactericidal efficacy of liposomal aminoglycosides against Burkholderia cenocepacia*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 60 (2007) 760-769.
68. Bakker-Woudenberg, I.A.J.M.; Schiffelers, R.M.; Storm, G.; Becker, M.J. and Guo, L., *Longcirculating sterically stabilized liposomes in the treatment of infections*. Nejat, D. (Ed.) Methods in Enzymology. 2005: Academic Press.
69. Fierer, J.; Hatlen, L.; Lin, J.P.; Estrella, D.; Mihalko, P. and Yau-Young, A., *Successful treatment using gentamicin liposomes of Salmonella dublin infections in mice*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 34 (1990) 343-348.
70. Nightingale, S.D.; Saletan, S.L.; Swenson, C.E.; Lawrence, A.J.; Watson, D.A.; Pilkiewicz, F.G., Silverman; E.G. and Cal, S.X., *Liposome-encapsulated gentamicin treatment of Mycobacterium avium Mycobacterium intracellulare complex bacteremia in AIDS patients*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 37 (1993) 1869-1872.
71. Sarabia, A.M.C., *Preparación de materiales moleculares nanoparticulados y dispersos – vesículas y microemulsiones empleando fluidos comprimidos*, en Programa de doctorado de Ciencia de Materiales. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. 2009, 21-24, U.A.B: Barcelona.
72. (a) Sala, S., *Tesis Doctoral*, Universidad Autónoma de Barcelona 2005; (b) Muntó, and T.d.I. M, Universidad Autónoma de Barcelona 2005.
73. Sala, S., *Desenvolupament del nou mètode DELOS de cristal·lització amb fluids comprimits. Estudi a nivell molecular dels seus fonaments*. 2005, Univeritat Autònoma de Barcelona (U.A.B): Barcelona.

La presente memoria ha sido redactada por:

Firmado: Fco Javier Muñoz García

Bellaterra, x de enero de 2011

Resumen

En los últimos años el crecimiento de la nanotecnología ha revolucionado el mundo de la investigación farmacológica promoviendo la investigación de nuevos vehículos de transporte de fármacos de tamaño nanométrico denominados “drug nanocarriers” entre los cuales las vesículas y las partículas poliméricas biodegradables son los que se han estudiado más ampliamente. Estas entidades son interesantes ya que pueden mejorar la biodisponibilidad del activo y pueden ser empleadas como materiales inteligentes que pueden transportar el activo al sitio específico de acción.

A pesar de haber sido demostrado que con estos dispositivos en muchos casos se consigue administrar el fármaco de un modo más eficiente que administrando éste en su forma libre, el éxito de estos “nanocarriers” está ligado al desarrollo de tecnologías reproducibles, eficientes, respetuosas con el medio ambiente y fácilmente escalables que permitan su producción a escala industrial. A día de hoy las tecnologías basadas en fluidos comprimidos (FCs), que emergieron a principio de los años 90 como una alternativa al uso de disolventes líquidos convencionales en la producción de materiales micro- y nanoparticulados, están siendo investigadas para la producción de diversos “*nanocarriers*”. Algunas de las ventajas de estas tecnologías son: la reducción en el uso de disolventes orgánicos, el empleo de bajas temperaturas de procesado, disminución del número de etapas de producción, ser fácilmente escalables y reproducibles. A su vez, este tipo de procesos permiten obtener productos más uniformes estructuralmente que aquellos obtenidos mediante tecnologías convencionales.

Dentro de este marco el grupo Nanomol (ICMAB-CSIC) ha desarrollado el proceso DELOS-susp, basado en el uso de fluidos comprimidos, para la obtención en un solo paso de producción vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) con elevada uniformidad tanto a nivel de tamaño y morfología como a nivel supramolecular con aplicación en nanomedicina. Como un paso más en el desarrollo del proceso DELOS-susp para la producción de SUVs, en este proyecto se ha estudiado y probado la viabilidad de este proceso para la encapsulación de activos hidrofílicos en vesículas catiónicas de colesterol:CTAB usando sulfato de gentamicina como activo hidrofílico modelo y se ha demostrado la factibilidad de un escalado del proceso por un factor de 50.