



**UNIVERSIDAD DE GRANADA**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA**

**Lípidos polares de arqueas halófilas: elaboración y estudio de  
arqueosomas como sistema de vehiculización de antioxidantes  
naturales obtenidos de alpeorujó**

Memoria que presenta la Licenciada Ana González Paredes para optar al grado de Doctor  
por la Universidad de Granada

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: Ana González Paredes  
D.L.: GR 2987-2010  
ISBN: 978-84-693-2568-1

Vº Bº LOS DIRECTORES DEL TRABAJO

**Dr. Alberto Ramos Cormenzana**

Catedrático Emérito del Dpto. de Microbiología  
Universidad de Granada

**Dra. Mercedes Monteoliva Sánchez**

Catedrática del Dpto. Microbiología  
Universidad de Granada

**Dra. Adolfin Ruíz Martínez**

Catedrática del Dpto. Farmacia y Tecnología Farmacéutica  
Universidad de Granada

La presente tesis Doctoral se llevó a cabo gracias al disfrute de una beca del plan de Formación de Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia (FPU) y se desarrolló dentro del marco del proyecto de investigación “Obtención de compuestos fenólicos a partir de residuos de la industria oleícola. Caracterización y estudio de sus propiedades antioxidantes. Aplicación en liposomas para uso farmacéutico/cosmético” (Plan Nacional I+D, MCYT CTM2004-05302 2004-2007).

Parte de los resultados presentes en ésta memoria se han incluido en el artículo “Archaeosomes as carriers for topical delivery of betamethasone dipropionate: *in vitro* skin permeation study”, *Journal of Liposome Research* (en prensa), así como en dos comunicaciones para congresos internacionales:

- “Archaeosomes as carriers for antioxidants: a preliminary study of characteristics and stability”, póster en el 4th International Workshop “Nanomedicines: Nanoparticulates in drug delivery”, Patras (Grecia), del 11 al 22 de septiembre de 2008.
- “Archaeosomes as carriers for antioxidants: characterization and stability studies” comunicación oral en “Skin barrier function: cutaneous absorption and environmental factors”, Lyon (Francia), del 27 de septiembre al 10 de octubre de 2009.

# INDICE

## I.INTRODUCCIÓN

<b>1. CONCEPTO DE AMBIENTE EXTREMO</b> .....	1
<b>1.2. Ambientes hipersalinos</b> .....	4
<b>1.3. Halofilismo</b> .....	6
1.3.1. Adaptación osmótica de los microorganismos halófilos.....	6
<b>2. ARQUEAS</b> .....	8
<b>2.1. Características del dominio <i>Archaea</i> y diferencias con los dominios <i>Bacteria</i> y <i>Eukarya</i></b> .....	10
<b>2.2. Arqueas halófilas extremas</b> .....	11
2.2.1. Estado actual de la taxonomía de arqueas halófilas extremas.....	13
<b>2.3. Estructuras celulares</b> .....	14
2.3.1. Lípidos de membrana.....	15
2.3.1.1. Lípidos polares.....	18
2.3.1.2. Lípidos neutros: quinonas.....	20
2.3.1.3. Organización de los lípidos en las membranas.....	21
2.3.1.4. Significado biológico de los lípidos de arqueas.....	23
2.3.2. Pigmentos retinales de haloarqueas.....	24
2.3.3. Envoltura celular.....	25
<b>2.4. Aplicaciones biotecnológicas de las arqueas</b> .....	26
<b>3. SISTEMAS DE VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS: LIPOSOMAS</b> .....	33
<b>3.1. Generalidades sobre liposomas</b> .....	34
<b>3.2. Clasificación de los liposomas</b> .....	36
<b>3.3. Métodos de elaboración de liposomas</b> .....	40
<b>3.4. Estabilidad de los liposomas</b> .....	42
<b>3.5. Usos terapéuticos y vías de administración</b> .....	45
<b>3.6. Sistemas vesiculares de aplicación tópica</b> .....	48
3.6.1. Estructura de la piel.....	50
3.6.2. Liposomas para administración tópica y transdérmica.....	51
3.6.3. Vías de entrada y mecanismo de acción de los liposomas.....	52
3.6.4. Uso cosmético de los liposomas.....	54
<b>3.7. Arqueosomas</b> .....	55
3.7.1. Arqueosomas como adyuvantes y vehículo de vacunas.....	58
3.7.2. Otras aplicaciones de los arqueosomas.....	62
<b>4. ANTIOXIDANTES: LOS RESIDUOS DEL ACEITE DE OLIVA COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES DE ORIGEN NATURAL</b> .....	65
<b>4.1. Antioxidantes, radicales libres y estrés oxidativo</b> .....	65
4.1.1. Estrés oxidativo y piel: envejecimiento.....	69

4.1.2. Liposomas antioxidantes.....	72
<b>4.2. Fuentes naturales de antioxidantes.....</b>	<b>73</b>
4.2.1. Compuestos fenólicos de plantas superiores.....	74
4.2.1.1. Compuestos fenólicos del olivo.....	77
<b>4.3. Obtención del aceite de oliva.....</b>	<b>78</b>
4.3.1. Caracterización de los residuos del aceite de oliva.....	82
4.3.2. Compuestos fenólicos del alpeorujó.....	84
4.3.3. Impacto de los residuos en el medio ambiente: soluciones.....	86
<b>II. OBJETIVOS.....</b>	<b>90</b>
<b>III. PARTE EXPERIMENTAL</b>	
<b>1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ALPEORUJO.....</b>	<b>92</b>
1.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	92
1.1.1. Obtención de extractos fenólicos de alpeorujó.....	92
1.1.2. Cuantificación de fenoles totales en los extractos obtenidos.....	93
1.1.3. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos fenólicos obtenidos...94	
1.1.4. Análisis estadístico.....	97
1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	98
1.2.1. Cuantificación de fenoles totales en los extractos obtenidos.....	98
1.2.2. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos fenólicos obtenidos...99	
<b>2. ELABORACIÓN DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS CONVENCIONALES CON COMPUESTOS FENÓLICOS.....</b>	<b>105</b>
2.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	105
2.1.1. Componentes de la fase lipídica de las vesículas.....	105
A) Arqueosomas: lípidos polares de arqueas. Obtención.....	105
A-1. Microorganismos.....	105
A-2. Técnicas de cultivo.....	105
A-3. Extracción de lípidos polares totales.....	107
A-4. Identificación y caracterización de los lípidos polares.....	108
B) Liposomas convencionales: fosfatidilcolina.....	109
C) Colesterol.....	109
D) Disolventes de la fase lipídica.....	110
2.1.2. Componentes de la fase acuosa de las vesículas.....	110
2.1.3. Composición de las formulaciones objeto de estudio.....	111
2.1.4. Elaboración de las vesículas.....	111
A) Vesículas multilaminares.....	111

B) Vesículas unilaminares.....	113
2.1.5. Caracterización de las vesículas .....	113
A) Diámetro medio, índice de polidispersión y potencial zeta.....	113
B) Morfología de las vesículas.....	116
C) Eficiencia de encapsulación (E%).....	117
D) Actividad antioxidante.....	119
2.1.6. Estudio de estabilidad a lo largo del tiempo.....	120
2.1.7. Análisis estadístico.....	121
<b>2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>122</b>
2.2.1. Identificación y caracterización de los lípidos polares.....	123
2.2.2. Caracterización de las vesículas elaboradas.....	123
2.2.2.1. Arqueosomas.....	123
A) Diámetro medio, índice de polidispersión y potencial zeta.....	123
B) Morfología de las vesículas: observación mediante microscopía electrónica de transmisión.....	124
C) Eficiencia de encapsulación (E%).....	124
D) Actividad antioxidante (%inhibición DPPH).....	126
2.2.2.2. Estudio comparativo entre arqueosomas y liposomas convencionales.....	127
A) Diámetro medio, índice de polidispersión y potencial zeta.....	127
B) Morfología de las vesículas: observación mediante microscopía electrónica de transmisión.....	129
C) Eficiencia de encapsulación (E%).....	130
D) Actividad antioxidante (%inhibición DPPH).....	131
2.2.3. Estudio de estabilidad a lo largo del tiempo.....	132
2.2.3.1. Arqueosomas.....	132
A) Diámetro medio, índice de polidispersión y potencial zeta.....	132
B) Morfología de las vesículas: observación mediante microscopía electrónica de transmisión.....	135
C) Eficiencia de encapsulación (E%).....	139
D) Actividad antioxidante (%inhibición DPPH).....	141
2.2.3.2. Estudio comparativo entre arqueosomas y liposomas convencionales.....	143
A) Diámetro medio, índice de polidispersión y potencial zeta.....	143
B) Morfología de las vesículas: observación mediante microscopía electrónica de transmisión.....	148
C) Eficiencia de encapsulación (E%).....	152
D) Actividad antioxidante (%inhibición DPPH).....	154
<b>3. ESTUDIOS DE TOXICIDAD IN VITRO.....</b>	<b>158</b>
3.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	158

3.1.1. Procedimientos para el cultivo celular.....	158
3.1.1.1. Líneas celulares.....	158
3.1.1.2. Medio de cultivo.....	158
3.1.1.3. Procedimiento de cultivo.....	159
3.1.1.4. Procedimiento de subcultivo: tripsinización.....	159
3.1.1.5. Recuento de células viables.....	160
3.1.1.6. Conservación de las líneas celulares.....	160
3.1.1.7. Cultivo en microplaca.....	161
3.1.2. Estudio de la viabilidad celular.....	161
3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	165
3.2.1. Citotoxicidad del extracto fenólico.....	165
3.2.2. Citotoxicidad de las vesículas elaboradas.....	166
<b>4. ELABORACIÓN DE FÓRMULAS FARMACEÚTICAS DE APLICACIÓN TÓPICA.....</b>	<b>169</b>
4.1. MATERIAL Y MÉTODOS.....	169
4.1.1. Fórmulas farmaceuticas objeto de estudio.....	169
4.1.2. Ensayo de cesión de las fórmulas farmacéuticas elaboradas.....	171
4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	174
4.2.1. Características organolépticas de las formulaciones preparadas.....	174
4.2.2. Selección de membrana para el ensayo de cesión.....	176
4.2.3. Estudio de la cesión desde las formulaciones farmaceuticas elaboradas.....	177
4.2.3.1. Formuciones con extracto libre.....	177
4.2.3.2. Gel de carbopol 940.....	178
4.2.3.3. Gel de pluronic 720.....	180
4.2.3. Estudio comparativo entre las fórmulas farmaceuticas estudiadas.....	181
<b>IV. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>184</b>
<b>V. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>191</b>

## RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se han utilizado lípidos polares de la arquea halofila *Halobacterium salinarum* para la elaboración de liposomas (arqueosomas), con el fin de encapsular en ellos un extracto fenólico con probada actividad antioxidante. Ha de destacarse que la técnica utilizada para la obtención de estos lípidos se ha puesto a punto para la realización del trabajo que se recoge en esta memoria.

Uno de los rasgos bioquímicos más característico de las arqueas es la estructura de los lípidos de membrana, compuestos por cadenas hidrocarbonadas de naturaleza isoprenoide de longitud variable, normalmente saturadas, que se unen mediante enlace éter a una molécula de glicerol. Esta estructura química confiere a estos lípidos una mayor resistencia frente a la oxidación, hidrólisis química y ataque de esterasas en comparación con los lípidos presentes en las membranas de los organismos que no pertenecen a este Dominio, lo que hace de los primeros una excelente materia prima para su utilización en la elaboración de estos particulares liposomas denominados arqueosomas. Los liposomas, como sistema para la vectorización o vehiculización de sustancias activas, son ampliamente utilizados en la actualidad para la aplicación tópica tanto de fármacos como de activos cosméticos.

La tendencia en los últimos años ha sido la de buscar fuentes de antioxidantes de origen natural para su aplicación en la industria cosmética y alimentaria, cobrando gran importancia los compuestos fenólicos procedentes de plantas, los cuales poseen gran actividad antioxidante. Entre ellos destacan los fenoles presentes en el fruto del olivo los cuales, durante el proceso de elaboración del aceite de oliva, pasan al aceite resultante y fundamentalmente a los residuos finales, como el alpechín y el alpeorujo. Así, en el presente trabajo de investigación se ha estudiado el contenido fenólico y la actividad antioxidante de extractos preparados con diferentes disolventes de tres muestras de alpeorujo, procedentes de tres variedades de aceituna (picudo, picual y hojiblanca). De ellas, la que presentó en todos los extractos mayor contenido en fenoles, así como mayor actividad antioxidante, fue la muestra de alpeorujo procedente de la variedad picual, por lo que se seleccionó éste como sustrato para la obtención de los compuestos fenólicos a encapsular en liposomas.

Se elaboraron diferentes formulaciones de arqueosomas en función de la concentración de lípido y proporción molar de colesterol utilizada y, con fines comparativos, se elaboraron formulaciones de liposomas convencionales de fosfatidilcolina análogas a las primeras. Se prepararon vesículas multilaminares mediante el método de hidratación del film lipídico, y mediante tratamiento con ultrasonidos de éstas se obtuvieron vesículas unilaminares. La caracterización de las vesículas se realizó determinando el diámetro medio de partícula, índice de polidispersión, potencial zeta, eficiencia de encapsulación y actividad antioxidante. Además la formación y morfología de las vesículas se comprobó mediante observación al microscopio electrónico de transmisión. La estabilidad de las formulaciones fue evaluada durante tres meses mediante la determinación de éstos parámetros.

Las formulaciones con proporción molar lípido/colesterol 1:0,5 mostraron el menor diámetro medio de partícula y, en general, los arqueosomas presentaron diámetros e índices de polidispersión ligeramente superiores a los de liposomas convencionales. Además estos parámetros se mantuvieron constantes, prácticamente en todas las formulaciones, durante el tiempo que duró el estudio de estabilidad.

El potencial zeta fue negativo en todas las formulaciones, siendo significativamente mayor en los arqueosomas.

La eficiencia de encapsulación de los arqueosomas fue mayor que la de los liposomas convencionales, y las formulaciones que fueron más estables en el tiempo con respecto a este parámetro fueron las que contenían una proporción molar lípido/colesterol 1:1. La actividad antioxidante de todas las formulaciones fue muy elevada, manteniéndose constante hasta la finalización del estudio de estabilidad.

Una vez que las formulaciones fueron caracterizadas y evaluadas respecto a la estabilidad, se llevaron a cabo estudios de toxicidad *in vitro*, tanto del extracto fenólico como de algunas de las formulaciones liposomiales. El extracto fenólico mostró propiedades antiproliferativas en la línea celular ensayada, disminuyendo el porcentaje de viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración del extracto.

Se investigó la influencia de los componentes de las vesículas en la supervivencia celular utilizando vesículas vacías, siendo la toxicidad de los arqueosomas significativamente inferior

a la de los liposomas convencionales. La viabilidad celular se vio enormemente disminuida cuando el extracto fenólico se incorporaba dentro de las vesículas, tanto en arqueosomas como en liposomas convencionales.

Por último y, con el fin de proporcionar a las vesículas elaboradas una forma farmacéutica para la aplicación tópica, se evaluaron diferentes excipientes (carbopol 940, pluronic 720 y excipiente cetílico) para la incorporación de las mismas y se investigó la liberación *in vitro* de la sustancia activa desde dichas formas farmacéuticas. Los arqueosomas, tanto en gel de carbopol como de pluronic, cedieron la sustancia activa de forma gradual durante 8 h. En el caso de los liposomas convencionales sólo el gel de carbopol fue efectivo para la incorporación de los mismos, ya que la utilización de pluronic provocó una gran retención de la sustancia activa con porcentajes de liberación muy bajos al final del ensayo.

## RIASSUNTO

In questo lavoro di ricerca sono stati utilizzati lipidi polari ottenuti dall'archea alofila *Halobacterium salinarum* per la preparazione di liposomi (archeosomi), con lo scopo di incapsulare un estratto fenolico di provata attività antiossidante. È importante evidenziare che la tecnica utilizzata per ottenere questi lipidi è stata ottimizzata per lo svolgimento del lavoro di ricerca descritto nella presente memoria.

Una delle caratteristiche biochimiche degli archei è la struttura dei lipidi che formano la loro membrana cellulare, composti da catene isoprenoidi di lunghezza variabile, di solito saturi, che sono uniti tramite un legame etere ad una molecola di glicerolo. Questa struttura chimica fa sì che questi lipidi siano più resistenti all'ossidazione, all'idrolisi e all'attacco di esterasi, in confronto ai lipidi contenuti nelle membrane di organismi che non appartengono a questo Dominio, rendendo quindi i lipidi degli archei un ottimo materiale per la preparazione di liposomi. I liposomi, in quanto sistema per la vettorizzazione o veicolazione di sostanze attive, vengono ampiamente utilizzati attualmente per l'applicazione topica tanto di farmaci quanto di sostanze cosmetiche.

La tendenza negli ultimi anni è stata quella di operare una ricerca di sostanze antiossidanti d'origine naturale per l'utilizzo sia in cosmetica che nell'industria alimentare, con speciale interesse nei confronti dei composti fenolici presenti nelle piante, i quali hanno un'elevata attività antiossidante. Tra essi ci sono i fenoli presenti nelle olive che, durante il processo di estrazione dell'olio di oliva, si trasferiscono all'olio estratto ma soprattutto ai rifiuti finali, all'acqua di vegetazione e alle sanse umide. Perciò, nel presente lavoro di ricerca è stato studiato il contenuto fenolico e l'attività antiossidante di estratti preparati con solventi diversi su tre campioni di sanse umide diverse a secondo della varietà di olive di provenienza (picudo, picual e hojiblanca). Tra i tre, quello che ha presentato sia il maggiore contenuto in composti fenolici che la maggiore attività antiossidante è stato il campione di sanse umide della varietà Picual, perciò questo campione è stato scelto come substrato al fine di ottenere dei composti fenolici da incapsulare nei liposomi.

Diverse formulazioni di archeosomi sono state elaborate a seconda della loro concentrazione in lipidi e del rapporto molare di colesterolo e, per confronto, sono stati elaborati liposomi di fosfatidilcolina di composizione analoga a quella dei primi. Le vescicole multilaminari sono state preparate con il metodo di idratazione del film lipidico, e tramite il trattamento di queste con ultrasuoni si sono ottenute vescicole unilaminari. La caratterizzazione delle vescicole è stata eseguita grazie alla determinazione del diametro medio delle particelle, indice di polidispersione, potenziale zeta, efficienza di incapsulazione e attività antiossidante. Inoltre la verifica della formazione e la morfologia delle vescicole è stata determinata tramite l'osservazione al microscopio elettronico a trasmissione. La stabilità delle formulazioni è stata valutata durante tre mesi attraverso la determinazione di questi parametri.

Le formulazioni con rapporto molare lipido/colesterolo 1:0.5 sono state quelle ad avere mostrato i più piccoli diametri. In generale, gli archeosomi hanno presentato diametri e indici di polidispersione leggermente superiori a quelli dei liposomi di fosfatidilcolina. Inoltre, praticamente tutte le formulazioni hanno mantenuto costanti i parametri studiati durante il periodo di sperimentazione

Il potenziale zeta è risultato negativo in tutte le formulazioni, essendo significativamente più alto negli archeosomi.

L'efficienza di incapsulazione degli archeosomi è stata maggiore di quella ottenuta nei liposomi di fosfatidilcolina. Le formulazioni più stabili nel tempo riguardo a questo parametro sono state quelle che contenevano un rapporto molare lipido/colesterolo 1:1.

L'attività antiossidante di tutte le formulazioni è stata molto elevata, mantenendosi costante fino alla fine dello studio di stabilità.

Una volta che le formulazioni sono state caratterizzate e valutate per quanto riguarda la stabilità, sono stati condotti studi di tossicità *in vitro*, sia dell'estratto fenolico come di alcune delle formulazioni liposomiali. L'estratto fenolico ha mostrato proprietà antiproliferative nella linea cellulare usata, diminuendo la percentuale di viabilità cellulare a seconda dell'aumento della concentrazione degli estratti.

L'influenza dei componenti delle vescicole nella sopravvivenza cellulare è stata studiata utilizzando vescicole vuote, risultando la tossicità degli archeosomi significativamente inferiore

a quella dei liposomi di fosfatidilcolina. In entrambi i tipi di vescicole la viabilità cellulare si è mostrata fortemente diminuita quando l'estratto era incorporato in esse.

Infine, al fine di inserire le vescicole così costituite in un preparato farmaceutico per applicazione topica, sono stati valutati diversi eccipienti (Carbopol 940, Pluronic 720 ed eccipiente cetilico) per l'incorporazione delle stesse. Il rilascio *in vitro* della sostanza attiva è stato studiato e valutato. Gli archeosomi, sia in gel di carbopol come di pluronic, hanno rilasciato la sostanza incapsulata gradualmente nel corso di 8 ore. Nel caso dei liposomi di fosfatidilcolina solamente il gel di carbopol è stato utile allo scopo, dal momento che l'uso di pluronic ha causato una grande ritenzione della sostanza attiva, con tassi di rilascio molto bassi alla fine del processo.



## **I. INTRODUCCIÓN**

## 1. CONCEPTO DE AMBIENTE EXTREMO

El estudio de los ambientes extremos y de las zonas áridas es un tema de gran interés tanto desde un punto de vista científico como por su importancia económica y medioambiental.

Podemos considerar las condiciones extremas como aquellas que se desvían considerablemente de las condiciones en que la mayoría de los seres vivos pueden desarrollar sus funciones biológicas de manera óptima. Estas condiciones se describen atendiendo a los siguientes parámetros (J. L. van de Vossenberg *et al.*, 2000):

- **Concentración de oxígeno:** podemos encontrar un gran número de ambientes en los que la concentración de oxígeno es baja, o incluso donde no existe (anaeróbicos). El intestino, las aguas residuales o profundas formaciones rocosas son ejemplos de este tipo de ambiente.
- **Temperatura:** existen ambientes extremos con respecto a la temperatura tanto por ser muy fríos como por ser extremadamente cálidos. Así, como ambientes fríos podemos considerar los mares y océanos que cubren el 70% de la superficie terrestre, donde se hallan organismos que viven a temperaturas entre 2-4°C, y organismos que viven en los polos a temperaturas por debajo de los 0°C. En el otro extremo, existen también numerosos ambientes cálidos, como las áreas volcánicas o las fuentes hidrotermales submarinas, en donde las aguas minerales salen a la superficie y que deben sus altas temperaturas al calor interno de la Tierra.
- **Salinidad:** la mayoría de organismos no halófilos pueden sobrevivir en medios con concentraciones de sal que llegan hasta 0,85 M de cloruro sódico, que es casi el doble de la concentración del agua marina. Sin embargo, existen organismos que viven en ambientes con concentraciones de cloruro sódico que van desde 3M hasta completa saturación. La adaptación a la salinidad será descrita más ampliamente por tratarse del ambiente en el que se desarrollan los microorganismos utilizados para el presente estudio.
- **pH:** En la superficie terrestre podemos encontrar ambientes ácidos producidos por procesos geotérmicos. Así, el sulfuro desprendido por los volcanes es oxidado a  $\text{SO}_3$  que al reaccionar con el agua ambiental produce ácido sulfúrico. También existen en

la Tierra ambientes alcalinos, aunque sólo unos pocos de ellos son estables; la mayoría son lagos salados donde el carbonato sódico es la principal fuente de alcalinidad. El pH en estos lagos puede ser superior a 10,5.

- Presión: los ambientes con altas presiones se encuentran en las profundidades marinas, en formaciones rocosas profundas así como en los yacimientos petrolíferos.
- Radiación: las radiaciones de alta energía como la luz ultravioleta son nocivas para muchos organismos porque perjudican a las células debido a la formación de radicales libres que reaccionan con las moléculas biológicas, como el ADN, alterándolas e incluso destruyéndolas. Compuestos como los carotenoides (presentes en muchos organismos), flavonoides (en algas verdes y plantas superiores) o aminoácidos del tipo micosporina (en diatomeas) absorben la radiación nociva y protegen a los organismos previniendo la formación de radicales libres nocivos. También se ha observado que los organismos adaptados a las radiaciones altamente energéticas tienen sistemas muy eficientes de reparación del DNA (Doods, 2002).

Es importante destacar que es bastante común la existencia de ambientes en donde más de uno de estos parámetros extremos se encuentran de manera combinada (J. L. van de Vossenberg *et al.*, 2000)

Los seres vivos que habitan en estos ambientes se denominan extremófilos, y no sólo toleran las condiciones extremas sino que frecuentemente las requieren para su desarrollo. La mayoría de organismos extremófilos son microorganismos y probablemente son predominantes porque los organismos superiores, como plantas y animales, tienen sistemas multicelulares que son menos susceptibles de sufrir cambios para poder adaptarse a las condiciones extremas que encontramos en estos medios (Doods, 2002).

El estudio de los ambientes extremos, así como de los microorganismos que se desarrollan en ellos, es de crucial importancia para entender la evolución de las formas de vida sobre la

Tierra, ya que las condiciones ambientales en ella han cambiado a lo largo de la historia, y lo que hoy en día consideramos extremo puede que fuera normal en el pasado, incluso puede ocurrir que siga siéndolo más allá de nuestro planeta. Así, los extremófilos se encuentran entre las primeras formas de vida en la Tierra, y todavía se desarrollan en un amplio rango de ambientes extremos sin apenas haber sufrido cambios en su morfología, fisiología o hábitat después de 4 mil millones de años (Javaux, 2006). Entre los extremófilos están bien representados los microorganismos pertenecientes al tercer Dominio, el dominio *Archaea*, un linaje procariota diferente al Dominio *Bacteria*, así como al de las células eucariotas del Dominio *Eucarya*. De hecho, las arqueas habitan una gran variedad de los ambientes más hostiles y, así, poseen el record por desarrollarse a la más elevada temperatura de crecimiento de todos los organismos conocidos (121°C, cepa 121)(Kashefi y Lovley, 2003), al más bajo valor de pH (pH≈0, *Picrophilus*)(Schleper *et al.*, 1995) y a las más altas concentraciones de cloruro sódico (desde saturación a 5,2M, la mayoría de *Halobacteriales*) (Grant *et al.*, 2001). A pesar de que las arqueas se consideran predominantes sobre las bacterias en todos los ambientes extremos, esto no es del todo cierto y sólo se cumple estrictamente en el caso de ambientes de alta temperatura, mientras que en las demás situaciones, se pueden encontrar también bacterias y eucariotas (Rothschild y Mancinelli, 2001), del mismo modo que también se han hallado arqueas fuera de hábitats extremos, como en aguas de procedencia oceánica o sedimentos de corrientes de agua. De hecho, el desarrollo de técnicas independientes de cultivo para el estudio de las muestras medioambientales revela una amplia distribución de arqueas en ambientes no extremos (DeLong, 1998).

## 1.2. Ambientes hipersalinos

Los ambientes hipersalinos pueden encontrarse en todos los continentes y prácticamente en todos los países. Se definen como medios extremos donde la concentración de sal, referida normalmente a NaCl, es superior al 3,5%, aunque el requerimiento para la aplicación del término hipersalino varía según los autores y normalmente se aplica del 3 al 12% de salinidad.

Son de especial relevancia los **medios hipersalinos acuáticos**, clasificándose éstos en dos tipos (Litchfield y Gillevet, 2002):

- **Atalashalino**: la composición iónica difiere considerablemente de la del agua marina, ya que se originan por la disolución de sales continentales, y donde predominan sales potásicas, magnésicas, cálcicas y sódicas. Como ejemplo de este tipo de ambiente podemos citar el Mar Muerto (Jordania), el Wadi Natrum (Egipto) o la laguna salada de Fuente de Piedra (Málaga, España).
- **Talashalinos**: su origen es del agua del mar y contienen cloruro sódico como sal predominante, siendo el pH neutro o ligeramente alcalino. El Gran Lago Salado (Utah, EE.UU), aguas de drenaje de minas de sal y piscinas naturales en zonas costeras son ejemplos de aguas talashalinas.

Las **salinas solares**, ampliamente distribuidas geográficamente, y que normalmente se encuentran en zonas marítimas, son un ecosistema creado por el hombre para la producción de cloruro sódico por evaporación solar del agua del mar. Consisten en una serie de estanques poco profundos en donde el agua del mar entra directamente y se acumula. Desde los primeros estanques el agua va pasando a los siguientes por gravedad o bombeo, de manera que cada vez el agua de los estanques se va volviendo más concentrada en cloruro sódico respecto al contenido total en sales. A una concentración total de sales entre el 8-10% las sales cálcicas precipitan, y cuando el total de sales alcanza una concentración del 40% la salmuera originada se pasa a unos cristalizadores en cuyo fondo precipita el cloruro sódico (Litchfield y Gillevet, 2002).

La figura 1 muestra algunos ejemplos de ambientes hipersalinos.

Por último, otro ambiente extremo a tener en cuenta respecto a la salinidad son los **suelos salinos**, considerando como tales aquellos que tienen una concentración de sales solubles igual o superior al 0,2%, y que por lo general se localizan en zonas áridas. Las altas temperaturas frecuentes en estos ambientes forman costras de sales sobre la superficie del suelo o cristales de sal que se encuentran en las capas superiores mezclados con otros constituyentes del suelo (Sarig *et al.*, 1993).

La figura 1 muestra algunos ejemplos de ambientes hipersalinos en diferentes puntos del planeta.



Figura 1. Ambientes hipersalinos: A) Gran Lago Salado (EE.UU); B) Salinas solares; C) Wadi Natrum (Egipto); D) Mar Muerto (Jordania); E) Laguna Salada de Fuente de Piedra (España)

### 1.3. Halofilismo

Se consideran microorganismos halófilos aquellos que requieren sal para su desarrollo, y según el criterio de Kushner y Kamekura (1988) se consideran los siguientes grupos de microorganismos atendiendo a los márgenes de concentración salina en los que crecen de forma óptima:

- Halotolerantes: no requieren la sal para su desarrollo pero pueden soportar concentraciones de NaCl de hasta 0,85 M.
- Halófilos débiles: crecen óptimamente en medios que contienen una concentración de cloruro sódico comprendida entre 0,2 y 0,5 M.
- Halófilos moderados: presentan su crecimiento óptimo entre 0,5 y 2,5 M de concentración de cloruro sódico. En esta categoría se incluyen la mayoría de las bacterias halófilas.
- Halófilos extremos: crecen óptimamente en medios que contienen una concentración de cloruro sódico comprendida entre 2,5 y 5 M. En este grupo se incluyen la mayoría de arqueas halófilas extremas.

#### 1.3.1. Adaptación osmótica de los microorganismos halófilos

Existen diferentes mecanismos por los que los microorganismos halófilos y halotolerantes soportan la elevada presión osmótica ejercida por el medio altamente salino que los rodea. Las membranas biológicas son permeables al agua, por lo que el citoplasma debe ser lo más isoosmótico posible con el medio para evitar la salida de agua del interior de la célula. En todos los casos estudiados los iones sodio son excluidos del citoplasma en el mayor grado posible, y aunque no está del todo claro por qué dichos iones son tan perjudiciales para el correcto funcionamiento de la célula, es cierto que todos los microorganismos halófilos poseen eficientes mecanismos de transporte para ellos, generalmente bombas  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que expulsan el sodio fuera de la célula (Oren, 1999).

Fundamentalmente se utilizan dos estrategias para alcanzar altos valores osmóticos en el interior de la célula manteniendo bajo el nivel de de iones sodio. Uno de estos mecanismos es

la acumulación de  $K^+$  y  $Cl^-$  para mantener el equilibrio osmótico, el cual es utilizado por un número limitado de halófilos. Así, las arqueas del orden *Halobacteriales* acumulan KCl a concentraciones iguales o superiores a la de NaCl en el medio externo, llegando a alcanzar concentraciones de 5 M de KCl (Grant *et al.*, 1998). En el dominio *Bacteria* esta estrategia sólo aparece en un grupo, en el orden *Halanaerobiales*. Este tipo de adaptación es poco costosa energeticamente aunque la presencia de altas concentraciones de KCl en el citoplasma requiere ulteriores adaptaciones de las proteínas y sistemas enzimáticos para poder ser activos con esta alta salinidad (Oren, 1999).

La segunda estrategia para la adaptación osmótica es la exclusión de sales del citoplasma en el mayor grado posible, acumulando solutos orgánicos que proporcionen el balance osmótico. Existe una gran variedad de compuestos, denominados solutos compatibles, que son utilizados con esta finalidad. Entre ellos podemos destacar alcoholes de azúcares como el glicerol, aminácidos y derivados como glicina, betaína y ectoína, azúcares simples como sacarosa y trehalosa (Galinski, 1995). Esta estrategia es usada en los tres dominios. Así, el alga verde *Dunaliella*, que se desarrolla en aguas salinas, sintetiza grandes concentraciones de glicerol para contrarrestar el efecto de la alta salinidad, mecanismo que es utilizado por muchas otras especies de algas y hongos (Javor, 1989). Los solutos compatibles más usados por las bacterias parecen ser la ectoína y glicina-betaína, sintetizada casi exclusivamente por procariontes fotosintéticos pero que es tomada del medio y acumulada en el citoplasma por muchas bacterias heterótrofas. En el dominio *Archaea* también se ha encontrado la utilización de solutos orgánicos; es el caso de las metanógenas halófilas, en donde se ha detectado la 2-sulfotrehalosa como soluto compatible (Galinski, 1995). El uso de solutos ósmóticos orgánicos requiere mucha menos adaptación del sistema enzimático intracelular, pero la producción de dichos compuestos conlleva un elevado gasto de energía (Oren, 1999).

## 2. ARQUEAS

Los trabajos pioneros de Carl Woese y colaboradores en los años 70 utilizando las secuencias de ARNr 16S de la subunidad ribosomal menor pusieron de manifiesto que el ARNr así como las proteínas ribosomales de un determinado grupo de procariotas eran drásticamente diferentes al de los eucariotas y las bacterias consideradas clásicas (Woese y Fox, 1977). Este descubrimiento supuso una revolución en la biología de la evolución y condujo a finales de la década de los 70 a la reclasificación de todos los organismos vivos en tres reinos primarios: *Eucariotas*, *Eubacterias* y *Arqueobacterias*, dándose este nombre a las últimas porque se les quería conferir una connotación de antigüedad, debido a que presentaban características que hacían pensar en que hubieran sido una forma de vida predominante en la era geológica Arcaica debido a sus nichos ecológicos (Woese *et al.*, 1978; Fox *et al.*, 1980).

En la década de los 90 se reconstruyó la organización filogenética de todos los seres vivos estableciendo tres dominios diferentes: *Eukarya*, *Bacteria* y *Archaea* (Woese *et al.*, 1990). Además, los descubrimientos a lo largo de las siguientes décadas así como la revolución en las técnicas de biología molecular han hecho surgir una nueva hipótesis acerca de la existencia de un ancestro común último (LUCA, Last Universal Common Ancestor) que estaría en el origen de toda forma de vida y relacionaría filogenéticamente los tres dominios (Forterre *et al.*, 2002; Glansdorff *et al.*, 2008).

El Dominio *Archaea* consiste en dos reinos mayoritarios, *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota*. El reino *Crenarchaeota*, compuesto por cuatro ordenes (*Caldisphaerales*, *Desulfurococcales*, *Sulfolobales* y *Thermoproteales*) engloba a las arqueas hipertermófilas. En él hay organismos tanto aerobios como anaerobios y una amplia distribución de fisiologías, encontrando quimiheterótrofos, quimiolitotrofos y fermentadores.

En el reino *Euryarchaeota* existe mayor diversidad de microorganismos, al menos en lo que respecta al tipo de ambiente en el que se desarrollan, agrupándose en este reino cinco ordenes de metanógenos (*Methanobacterales*, *Methanococcales*, *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* y *Methanopyrales*), uno de halófilos extremos (*Halobacterales*), uno de

sulfato reductores (*Archaeoglobales*) y dos termófilos (*Thermococcales* y *Thermoplasmatales*) (Chaban *et al.*, 2006).

Además de estas dos ramas principales del dominio *Archaea*, otros dos reinos han sido recientemente propuestos. El primero, *Korarchaeota*, que ha sido detectado y reconocido únicamente mediante análisis del ARNr 16S de muestras ambientales (Barns *et al.*, 1994; Barns *et al.*, 1996). El segundo reino adicional, *Nanoarchaeota*, ha sido propuesto recientemente para simbioses hipertermófilos de nanodimensiones que crecen pegados a la superficie de una especie nueva de *Ignococcus* (Huber *et al.*, 2002; Huber *et al.*, 2003; Jahn *et al.*, 2008). *Nanoarchaeum equitans*, la primera especie identificada representativa de este nuevo reino propuesto, además de un tamaño muy pequeño, posee una secuencia del ARNr 16S muy divergente que es sustancialmente diferente de la secuencia universal de arqueas.

La figura 2 muestra un esquema con la distribución actual de los seres vivos.

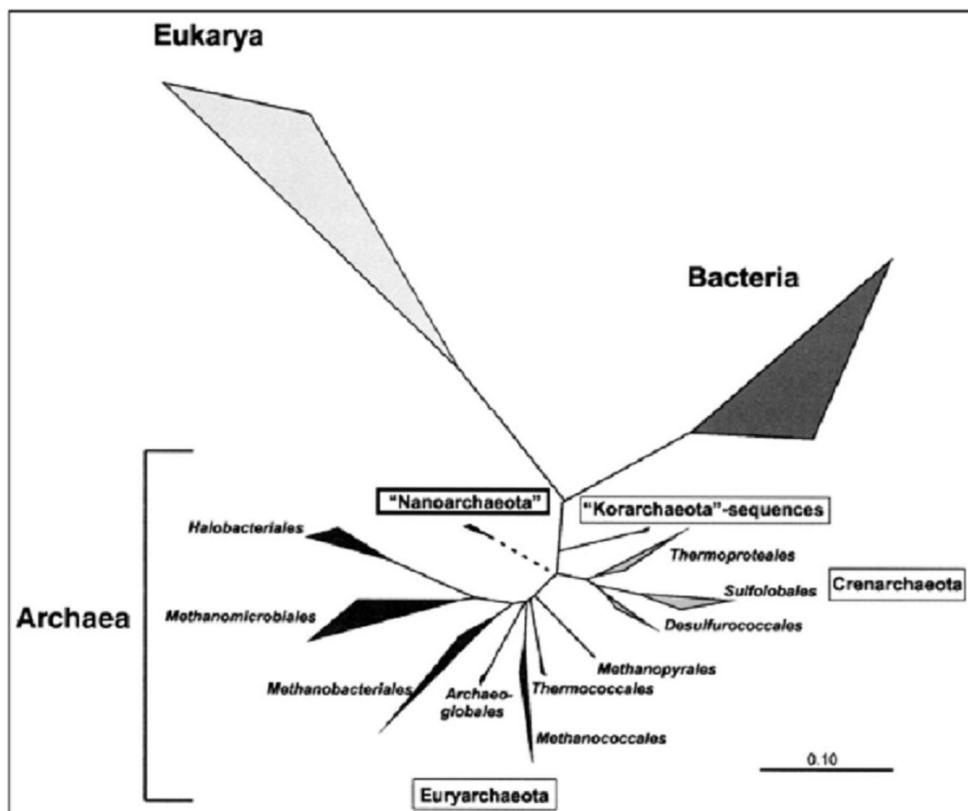


Figura 2. Árbol filogenético de los seres vivos (Tomado de Chaban *et al.*, 2006)

Aparte de las bien conocidas colecciones de arqueas cultivables, a lo largo de las últimas décadas se han descubierto una gran cantidad de especies no cultivables, tanto en los reinos principales *Crenarchaeota* y *Euryarchaeota* como en los nuevos reinos sugeridos, y la detección por medio de técnicas moleculares indican la prevalencia e importancia de estos microorganismos más allá de los ambientes extremos (DeLong, 1998), lo que ha hecho que se intensifique la búsqueda de arqueas no cultivables tanto en nichos ecológicos no extremos como extremos (Chaban *et al.*, 2006).

## **2.1. Características del Dominio *Archaea* y diferencias con los Dominios *Bacteria* y *Eukarya***

Las arqueas son procariotas pues carecen de núcleo, y son difíciles de distinguir de las bacterias por forma o tamaño. A pesar de que la mayoría de las arqueas tienen la apariencia típica de las bacterias, algunas tienen morfologías que no se encuentran en las bacterias, como formas poligonales encontradas en arqueas halófilas o cocos de formas muy irregulares como ocurre en determinadas hipertermófilas.

Como se ha descrito anteriormente, las arqueas poseen una gran diversidad de fenotipos, agrupándose de manera clásica atendiendo a los tres fenotipos reconocidos primariamente (Woese y Fox, 1977):

- Arqueas metanógenas, microorganismos anaerobios estrictos productores de metano.
- Arqueas halófilas o haloarqueas, microorganismos aerobios estrictos que requieren altas concentraciones de sal.
- Arqueas termoacidófilas, microorganismos aerobios que crecen en ambientes cálidos y a pH ácido.

Muchos fenotipos se fueron descubriendo en el Dominio a lo largo de las décadas sucesivas a su establecimiento y, así, dentro de las metanógenas se encontraron también hipertermófilas, psicrófilas y halófilas, y dentro de las hipertermófilas algunas anaerobias, alcalófilas y neutrófilas (Chaban *et al.*, 2006).

La diversidad metabólica en el dominio *Archaea* es también reminiscente de *Bacteria*. Excepto para la metanogénesis, desconocida para *Bacteria*, todas las rutas metabólicas encontradas en *Archaea* existen también en *Bacteria*. Así, estos microorganismos pueden ser heterótrofos o autótrofos (quimio o fotolitotrofos) usando una gran variedad de moléculas donadoras yceptoras de electrones, así como las halófilas pueden realizar la fotosíntesis usando para ello la bacteriorrodopsina y halorrodopsina (Schafer *et al.*, 1999).

El Dominio *Archaea* se distingue de los otros dos dominios también por la naturaleza de los lípidos de las membranas celulares, que son de naturaleza isoprenoide y con enlaces de tipo éter, mientras que los lípidos de bacterias y eucariotas son ésteres de glicerol y ácidos grasos.

Otra diferencia existente entre *Archaea* y *Bacteria* es la ausencia de mureína en *Archaea*, mientras que ésta es componente de las paredes celulares de prácticamente todos los taxones de *Bacteria*.

En cuanto a las diferencias moleculares, aparte de las encontradas a nivel del ARNr 16S, el genoma de las arqueas codifica muchas proteínas informacionales que tienen homólogos en eucariotas pero no en bacterias. Esto es particularmente llamativo en el caso de la replicación del ADN, de manera que los genes de arqueas codifican homólogas de prácticamente todas las proteínas eucariotas implicadas en la replicación y sólo una homóloga de una proteína bacteriana de replicación del ADN (Forterre *et al.*, 2002).

## **2.2. Arqueas halófilas extremas**

Hacemos especial énfasis en el estudio de este grupo ya que el microorganismo utilizado para el presente trabajo, *Halobacterium salinarum*, pertenece a él.

En el Dominio *Archaea* podemos encontrar diferentes familias con representantes halófilos, pero cuando se habla de halófilas extremas nos referimos al Orden *Halobacteriales*, que posee una única familia, *Halobacteriaceae*, cuyos miembros son todos halófilos extremos, y que se conocen también como haloarqueas o “bacterias halófilas rojas”, debido a su pigmentación característica.

Dichos microorganismos crecen de manera óptima a concentraciones de cloruro sódico iguales o superiores a 3,5 M y hasta 5M. Son aerobios y quimiorganótrofos. La degradación

aerobia de las fuentes de carbono está basada en el ciclo del ácido tricarboxílico, y cuando es necesario, en combinación con el ciclo del glioxilato y el transporte de electrones en la cadena respiratoria mediante citocromos. Diferentes tipos de citocromos respiratorios y otros tipos de proteínas transportadoras de electrones relacionadas con la respiración han sido caracterizadas en diferentes miembros de esta familia (Oren, 2006).

Miembros de muchos géneros requieren aminoácidos para el crecimiento, y muchas especies tienen requerimientos nutricionales complejos. Los sustratos utilizados incluyen aminoácidos, azúcares (glucosa, fructosa, ribosa, lactosa, etc) y ácidos orgánicos (Grant *et al.*, 2001). Más inusual es el uso de ciertos hidrocarburos alifáticos y aromáticos por algunos de ellos (Bertrand *et al.*, 1990). Algunos de ellos son fotoheterótrofos usando pigmentos para obtener energía de la luz solar.

Debido a la baja disponibilidad de oxígeno que hay en determinados ambientes en los que se desarrollan estas arqueas, como en las aguas saturadas en sales, el oxígeno se convierte en un factor limitante para el desarrollo de estos microorganismos, por lo que han desarrollado mecanismos para contrarrestar la limitación de oxígeno, tales como la producción de vesículas de gas que le permiten flotar y disponerse en la superficie. Además, muchas haloarqueas son capaces de crecer anaeróbicamente en estas circunstancias, usando aceptores alternativos de electrones, como el nitrato, el dimetilsulfóxido, fumarato, tiosulfato y azufre, entre otros. Un número limitado de especies de *Halobacterium* han demostrado la capacidad de crecer anaeróbicamente realizando fermentación de la arginina, aunque no es un fenómeno de amplia distribución entre las halófilas extremas (Oren, 2006). *Halobacterium* puede crecer de manera fotoheterótrofa en condiciones de baja concentración de oxígeno utilizando bacteriorrodopsina como una bomba de protones mediada por luz (Oesterhelt y Stoeckenius, 1974).

En la naturaleza muchos hábitats son apropiados para el crecimiento de las halófilas extremas. Se han aislado en ambientes extremos tales como lagos salinos naturales, el Mar Muerto, lagos alcalinos, salinas solares, suelos salinos y alimentos en salazón, a los que conferían una pátina roja sobre la superficie. Sin embargo, los estudios más recientes revelan

la presencia de un grupo especializado de arqueas halófilas en ambientes de más baja salinidad, haciendo suponer que su rango ecológico es mucho más amplio de lo que se suponía (Chaban *et al.*, 2006).

### 2.2.1. Estado actual de la taxonomía de arqueas halófilas extremas

Definir taxonómicamente a las haloarqueas ha sido un proceso confuso que ha necesitado de continuas revisiones para establecer nuevos géneros y especies. Actualmente las arqueas halófilas extremas se agrupan en una única familia, *Halobacteriaceae*, en la que se describen, según el manual Bergey de Sistemática y Bacteriología, los siguientes géneros:

Géneros de arqueas halófilas no alcalófilas:

- *Halobacterium*, que cuenta con 4 especies.
- *Halorubrum*, donde se incluyen 23 especies.
- *Haloarcula*, que incluye 8 especies.
- *Haloferax*, que comprende 10 especies.
- *Halococcus*, que agrupa 7 especies.
- *Halobaculum*, con una única especie, *H. gomorrense*.
- *Halobiforma*, que cuenta con 3 especies.
- *Halogeometricum*, con la especie *H. borinquense*.
- *Halomicrobium*, que cuenta con 2 especies.
- *Halorhabdus*, con 2 especies.
- *Halosimplex*, con la especie *H. carlsbadense*.
- *Haloterrigena*, que agrupa a 8 especies.
- *Halovivax*, que cuenta con 2 especies.
- *Haloastagnicola*, con la especie *H. larsenii*.
- *Haloplanus*, con una sola especie, *H. natans*.
- *Haloquadratum*, con la especie *H. walsbyi*.
- *Haladaptatus*, con la especie *H. paucihalophilus*.
- *Halopiger*, que cuenta con 2 especies.

- Dos géneros nuevos han sido recientemente aceptados, *Halonotius pteroides* y *Halogramma rubrum*.

Géneros de arqueas haloalcalófilas:

- *Natrialba*, que incluye 6 especies.
- *Natrinema*, que agrupa a 6 especies.
- *Natrobacterium*, con una única especie, *N. gregoryi*
- *Natrococcus*, que cuenta con 3 especies.
- *Natromonas*, con la especie *N. pharaonis*.
- *Natrorubrum*, que incluye 4 especies.
- *Natrolimnobius*, que agrupa a 2 especies.
- *Halalkalicoccus*, que cuenta con 2 especies.

## 2.3. Estructuras celulares

### 2.3.1. Lípidos de membrana

Uno de los rasgos bioquímicos más característicos del Dominio *Archaea* es la estructura de los lípidos de membrana, estructuralmente diferentes de los que poseen bacterias y eucariotas. Los lípidos de las arqueas están compuestos por cadenas hidrocarbonadas de naturaleza isoprenoide (2-metil-1,3-dieno) de longitud variable, normalmente saturadas, que se unen mediante un enlace de tipo éter (-CH<sub>2</sub>OR) a una molécula de glicerol en el carbono con configuración sn-2,3, en vez de, como ocurre en los lípidos de membrana de los otros dos Dominios, cadenas de ácidos grasos, normalmente insaturados, que se unen mediante enlace éster (CH<sub>2</sub>-O-COR) al carbono con configuración sn-1,2 de una molécula de glicerol (Kates, 1972).

Los principales componentes de las membranas arqueales son un diacilglicerol diéter C<sub>20</sub>-C<sub>20</sub> (sn-2,3-difitanilglicerol diéter) y su dímero dibifitanil-diglicerol tetraéter, formado por la unión covalente de ambas moléculas del diéter. Ambas estructuras presentan varias configuraciones.

Debido a la compleja nomenclatura química de estas estructuras, se convino denominar genéricamente “arqueol” al difitanilglicerol diéter y “cardarqueol” al dímero del primero (Nishihara *et al.*, 1987).

Variantes de estas dos estructuras básicas pueden encontrarse también entre las arqueas, pero todas repiten la cadena de fitanil ramificada formada por repetidas unidades de 5 átomos de carbono y la estequiometría del glicerol. Así, dentro de las variaciones que puede sufrir el arqueol encontramos arqueoles insaturados, estructura diéter C<sub>20</sub>-C<sub>25</sub> (en *Halococcus*) ó C<sub>25</sub>-C<sub>25</sub>, un arqueol macrocíclico con un anillo de 36 átomos, originado por la condensación de una molécula de glicerol o hidroxilaciones en el C<sub>20</sub> de la cadena alquílica que origina arqueoles hidroxilados.

En la estructura tetraeter del cardarqueol es frecuente la aparición de hasta 4 anillos de ciclopentano dentro de la cadena isoprenoide o la sustitución de uno de los gliceroles por un inositol, que es considerado el segundo modelo de lípido tetraeter y que se denomina “nonitol cardarqueol”. Una peculiaridad de los lípidos con estructura tetraeter es que debido a la presencia de dos cabezas polares, son moléculas anfipáticas bipolares, mientras que la mayoría de lípidos de estructura éster son anfipáticas monopolares (Gambacorta *et al.*, 1995). Además, los lípidos aislados de la especie *Sulfolobus solfataricus* poseen un lípido fundamental derivado del nonitol cardarqueol, donde el radical polihidroxilado se cicla, y que se ha denominado calditol cardarqueol. Parece ser que la presencia del calditol se restringe al orden *Sulfolobales*, por lo que puede considerarse un marcador taxonómico (Gambacorta *et al.*, 2002). Las figuras 3 y 4 representan las principales estructuras de los lípidos de arqueas.

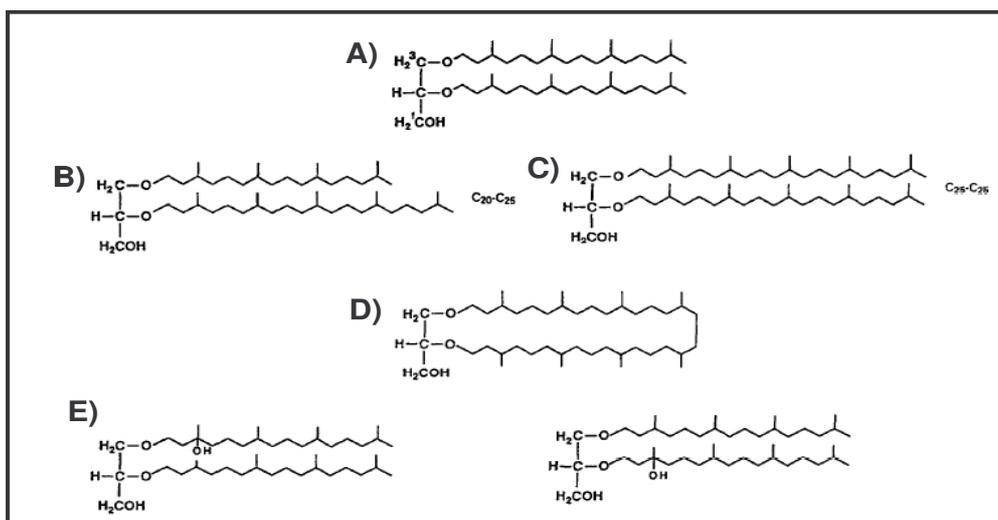


Figura 3. Estructura del arqueol (A) y sus derivados: B) diéter C<sub>20</sub>-C<sub>25</sub>; C) diéter C<sub>25</sub>-C<sub>25</sub>; D) arqueol macrocíclico; E) arqueoles hidroxilados

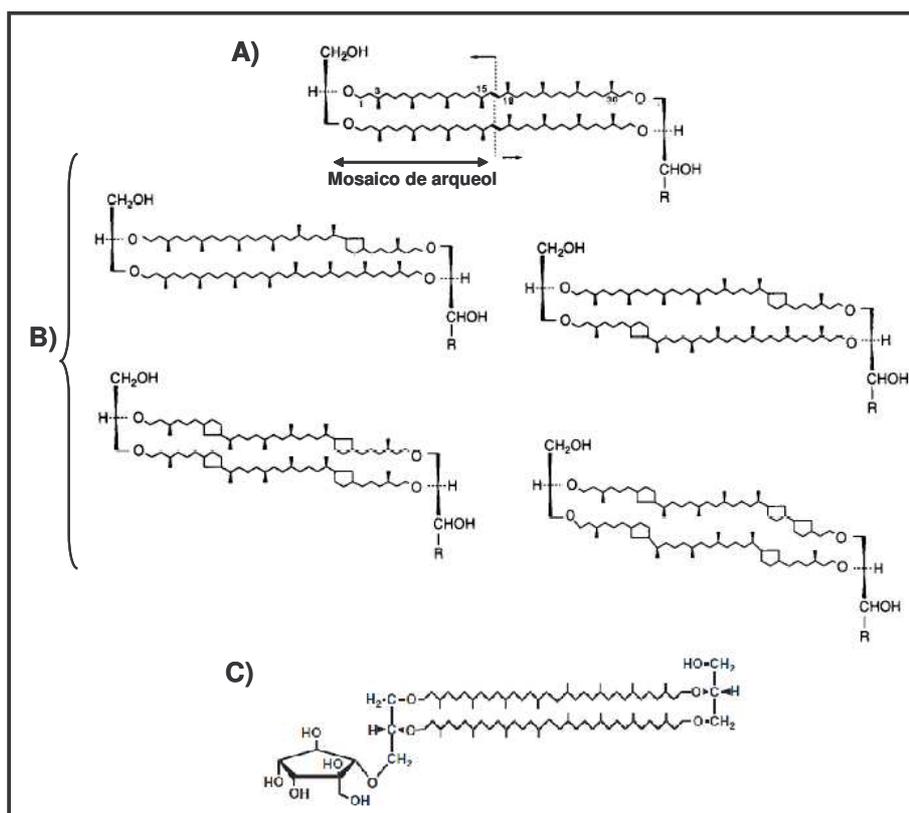


Figura 4. Estructura de los lípidos de estructura tetraeter: A) Caldarchaeol si R=H; Nonitolcaldarchaeol si R=HOCH<sub>2</sub>-C(OH)-(CHOH)<sub>3</sub>-CH<sub>2</sub>OH; B) Derivados tetraeter cíclicos; C) Cadiol

En la última década cada vez más estructuras de lípidos únicos de arqueas se han ido describiendo, tanto de especies aisladas como de muestras medioambientales. Así se ha descrito un isómero del caldarqueol, denominado isocaldarqueol, ya que se ha visto que caldarqueoles aislados de algunas especies (*Thermoplasma acidophilum* y *Sulfolobus solfataricus* entre otras) que se consideraban homogéneos, al hacer una cromatografía en capa fina, resultaban ser en realidad la mezcla de dos isómeros, paralelo y antiparalelo, del mosaico de glicerol. Otro ejemplo lo tenemos en los lípidos aislados de *Methanothermus fervidus*, una arquea hipertermófila metanógena, que presenta un nuevo tipo de lípido nuclear originado por un enlace covalente C-C de dos cadenas C<sub>40</sub>, es decir, dos moléculas de caldarqueol. Se le denominó caldarqueol en forma de H (Morii *et al.*, 1998). Este lípido se ha detectado posteriormente en especies de diferentes familias, lo que indica que no es específico de una determinada familia (Sugai *et al.*, 2004).

Todas las arqueas presentan en sus lípidos de membrana arqueol, aunque sea en forma de trazas, lo que hace suponer que es el lípido fundamental universal en todas ellas. Se presentará como un componente mayoritario o no dependiendo del tipo de arquea. Así, supone el 100% de la composición de los lípidos en halófilas, y en la mayor parte de formas cocoides de metanógenas y termófilas del reino *Euryarchaeota*, con la excepción de *Thermoplasma*. Por el contrario, lípidos complejos basados en la estructura del arqueol son minoritarios en las termófilas del Reino *Crenarchaeota*, y se encuentran en diferentes proporciones en las metanógenas. Dentro de las variantes del arqueol cabe destacar la presencia del arqueol macrocíclico como lípido fundamental mayoritario del género *Methanococcus*, y especies de *Methanosarcina* y *Methanosaeta* contienen hidroxiarqueoles como lípido nuclear.

El caldarqueol está presente en las metanógenas, y salvo algunas excepciones, constituye el lípido fundamental en la totalidad de los lípidos presentes en las termófilas del Reino *Crenarchaeota*. El nonitolcaldarqueol, así como su forma cíclica, sólo se ha detectado en el Orden *Sulfolobales* (Sprott, 1992; Gambacorta *et al.*, 1995).

### 2.3.1.1. Lípidos polares

Los lípidos polares de las arqueas consisten en una parte no polar, constituida por alguno de los lípidos fundamentales antes descritos, y un grupo de cabeza polar, como puede ser un fosfato orgánico o un resto sacarídico.

Aparte de la configuración estereoquímica sn-2,3 del glicerol, los lípidos polares de los diéteres tienen estructura análoga a los correspondientes glucosil o fosfatidil diacilgliceroles de bacterias y eucariotas, mientras que los lípidos polares con estructura tetraeter no tienen correspondencia en los otros dominios (Gambacorta *et al.*, 1995).

#### ➤ Fosfolípidos:

El fosfolípido mayoritario en las halófilas extremas es el análogo isopranoide del fosfatidilglicerolfosfato monometilado (PGP-Me)(Kates, 1993). Los fosfolípidos minoritarios en este grupo han sido identificados como los análogos diéter del fosfatidilglicerol (PG), cuya proporción con respecto al derivado monometilado depende de las condiciones de cultivo (Oren, 2006), fosfatidilglicerolsulfato (PGS) y ácido fosfatídico (PA) (Kates, 1993; Gambacorta *et al.*, 1994)

También se han identificado otro tipo de fosfolípido y fosfoglucolípido en la membrana púrpura de *Halobacterium salinarum*, la cual contiene la bacteriorrodopsina. El fosfolípido individualizado es un análogo de estructura éter de la cardiolipina, y con éste se completa la serie de fosfolípidos análogos a los de bacterias y eucariotas. Así, se han hallado análogos de tipo éter de los fosfolípidos éster de etanolamina, colina, serina, glicerol y mio-inositol, aunque por el momento no se han encontrado análogos de los fosfolípidos éster de la monometil y dimetil etanolamina. Estos fosfolípidos pueden originarse tanto a partir del arqueol como del caldarqueol (Corcelli *et al.*, 2000; Koga y Morii, 2005).

La presencia de aminofosfolípidos y aminofosfoglucolípidos es frecuente entre las metanógenas, sin embargo este tipo de lípidos están ausentes tanto en las halófilas como en el género *Thermoplasma* (Gambacorta *et al.*, 1995).

➤ Glicolípidos:

Una gran variedad de glicolípidos han sido también determinados en las membranas arqueales, sobre todo en las arqueas halófilas. Las halófilas metanógenas y no alcalófilas presentan derivados diéter mono, di, tri o tetraglicosilados, mientras que las alcalófilas en general carecen de glicolípidos (Sprott, 1992; Gambacorta *et al.*, 1994). Los residuos sacarídicos están compuestos por glucosa, manosa o galactosa, todos ellos en la configuración de piranosa (Kates, 1993). Algunos de estos glicolípidos descritos son los siguientes:

- S-DGD-1: manosil-6-sulfato-(1-2)-glucosil-difitanilglicerol, que es el glicolípidos mayoritario en el género *Haloferax* (Kushwaha *et al.*, 1982). Aparece también como glicolípidos minoritario en los géneros *Halobaculum*, *Halococcus* y en la especie *Halorubrum saccharovororum* (Lanzotti *et al.*, 1988; Oren *et al.*, 1996). Se ha detectado también como glucolípidos mayoritario en muestras de biomasa del Mar Muerto (Oren y Gurevich, 1993). El producto desulfatado (DGD-1) se presenta como glicolípidos minoritario en *Haloferax* (Oren, 2006).
- S-DGD-3: manosil-2-sulfato-(1-4)glicosil-difitanilglicerol, es el glicolípidos de varias especies de *Halorubrum*, como *H. sodomense* y *H. lacusprofundi* (Trinconne *et al.*, 1990).
- TGD-2: glucosil-manosil-glucosil-difitanilglicerol, es el triglicosil arqueol mayoritario en la mayoría de especies de *Haloarcula* (Evans *et al.*, 1980). Un diglicosil arqueol de estructura desconocida (DG-2) pero que contiene manosa y glucosa es componente minoritario en las especies de este género (Oren, 2006).
- S-TGD-1: galactosil-(3)-sulfato-(1-6)-manosil-(1-2)-glucosil-difitanilglicerol está presente en el género *Halobacterium* (Kates, 1978), y se encuentra en la membrana púrpura (Corcelli *et al.*, 2000). Éste triglicosil en la forma desulfatada se presenta como glicolípidos minoritario en *Halobacterium salinarum*, así como un tetraglicosil difitanilglicerol (TeGD)(Smallbone y Kates, 1981)

Los glicolípidos identificados en metanógenas son derivados mono o diglicosilados del arqueol. Los residuos glicosídicos son glucosa y/o galactosa en conformación piranosa o furanosa (Gambacorta *et al.*, 1994).

➤ Fosfoglicolípidos:

Este tipo de lípidos es frecuente en los lípidos polares a base de caldarqueol o nonitolcaldarqueol, ya que pueden presentar grupos polares en ambos lados, y una característica de los lípidos basados en estructura tetraeter es la ausencia de simetría en la molécula (Sprott, 1992; Gambacorta *et al.*, 1994). De hecho, cuando el tetraeter se funcionaliza los residuos polares son de diferente tipo químico, de manera que un extremo es glicosilado mientras que el otro es fosforilado (Gambacorta *et al.*, 1995). Este tipo de lípidos polares son los componentes mayoritarios de las membranas en el Reino *Crenarchaeota*, que en el caso de derivados de nonitolcaldarqueol sólo se han encontrado en el orden *Sulfolobales*. El fosfo grupo detectado en todos los casos es el mio-inositol, y como azúcares aparecen glucosa y/o galactosa para lípidos de caldarqueol, y glucosa o glucosa-sulfato unidos en el caso de derivados del nonitolcaldarqueol (Gambacorta *et al.*, 1994)

#### 2.3.1.2. Lípidos neutros: quinonas

Los lípidos neutros representan el 10% del total extractable de lípidos.

Las quinonas, componentes de la fracción lipídica neutra, juegan un importante papel en el transporte de electrones, fosforilación oxidativa y mecanismos de transporte activo (Taber, 1980).

En las arqueas aparecen dos grupos mayoritarios de quinonas isoprenoides (Gambacorta *et al.*, 1994):

- Naftoquinonas, del tipo MK o TPQ (termoplamaquinonas) y variaciones de ellas modificando la longitud o el grado de saturación de la cadena isoprenoide.
- Benzotiofenquinonas, que contienen grupos sulfuro, y que se aislaron por primera vez en el orden *Sulfolobales*, que pueden ser de tres tipos: tipo CQ, tipo SQ y tipo SSQ.

Las menaquinonas del orden Halobacteriales son fundamentalmente dos con 8 unidades isoprenoides, MK-8 junto con su correspondiente forma hidrogenada, MK-8(H<sub>2</sub>). La proporción entre ambas formas va a depender de las condiciones de crecimiento. Como menaquinonas minoritarias aparecen MK-7 y MK-7 (H<sub>2</sub>) (Tindall, 1990; Tindall *et al.*, 1991).

A pesar de la falta de homogeneidad observada en las arqueas respecto a las quinonas isoprenoides, algunas características generales pueden sacarse en conclusión. Así, todas las halófilas presentan las menaquinonas descritas, las metanógenas por lo general no contienen menaquinonas ni ubiquinonas, y las arqueas termófilas poseen fundamentalmente quinonas con cadenas laterales totalmente saturadas y pueden dividirse en dos grupos atendiendo a la composición de menaquinonas. Los géneros *Thermoproteus* y *Archaeoglobus* contienen menaquinonas mientras que *Thermoplasma* tiene menaquinonas y termoplasmaquinonas. En miembros del orden *Sulfolobales* se han encontrado quinonas isoprenoides sulfatadas (Gambacorta *et al.*, 1994).

#### 2.3.1.3. Organización de los lípidos en las membranas

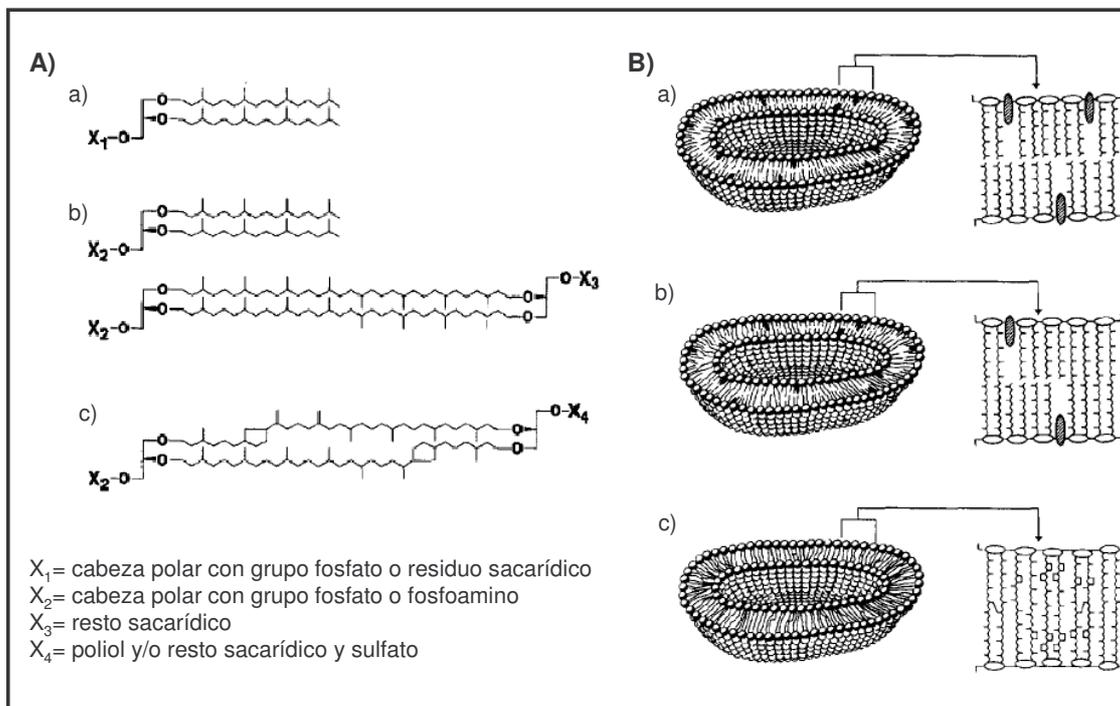
La figura 5 representa los modelos hipotéticos de las membranas de los tres grupos principales de arqueas según el tipo de lípido que forma parte de ellas (Itoh *et al.*, 2001).

La interacción de las cadenas isoprenoides en la estructura de la bicapa de las halófilas extremas se vuelve más fuerte en el caso de las haloalcalófilas, debido a una mayor penetración de la cadena C<sub>25</sub> en la capa opuesta. Esto les permite mantener una correcta fluidez de membrana bajo las condiciones de estrés de salinidad y alto pH a las que se ven sometidas.

Las membranas de las arqueas metanógenas, que pueden contener tanto arqueol como caldarqueol, consisten en la combinación de estructuras de bicapas y monocapas bipolares. Este tipo de arquitectura supone una ventaja para sobrevivir a altas concentraciones de metano, que podría provocar la interrupción de la membrana, a pesar de que algunas metanógenas, con lípidos basados únicamente en arqueol, pueden vivir en las citadas condiciones únicamente con la membrana bicapa.

En las termófilas, cuyos lípidos son a base de caldarqueol y nonitolcaldarqueol, la membrana se organiza como una monocapa con enlaces covalentes centrales. Esta organización confiere estabilidad a la membrana para las altas temperaturas a las que estos microorganismos se desarrollan. Además, los anillos de ciclopentano controlan también la fluidez de la membrana, y su número está relacionado con la temperatura de crecimiento (Gambacorta *et al.*, 1995).

La alta proporción de lípidos glicosilados en las membranas de termófilas metanógenas y sulfurodependientes podría deberse a la estabilización de la estructura de la membrana mediante enlaces de hidrógeno interglicosídicos entre las cabezas polares (Kates, 1992).



**Figura 5. Estructuras típicas de los lípidos de membrana (A) y esquemas de la membrana (B) de los tres grupos principales de arqueas: a) halófilas extremas; b) metanógenas; c) termófilas**

#### 2.3.1.4. Significado biológico de los lípidos de arqueas

A pesar de la gran variedad de estructuras encontradas en los lípidos arqueales, hay tres características comunes y únicas en los lípidos de arqueas. Éstas son:

- La configuración estereoquímica del glicerol, sn-2,3.
- La unión mediante enlace éter entre las cadenas hidrocarbonadas y el glicerol.
- La presencia de ramificaciones metílicas en las cadenas isoprenoides.

La aparición de estas características comunes en todos los lípidos de membrana de arqueas sugiere que estos peculiares lípidos tienen una función fisiológica común en todas ellas.

Una de las características generales, requerida de forma esencial para cualquier lípido de membrana para cumplir de manera correcta su función biológica, es la de mantenerse en la fase de cristal líquido. En relación con esto, la primera propiedad fisicoquímica de los lípidos arqueales es la temperatura de transición de fase, que es mucho más baja que la de los lípidos ésteres de ácidos grasos. Por ejemplo, estudios mediante escaneo calorimétrico diferencial han puesto de manifiesto temperaturas de transición entre  $-20^{\circ}\text{C}$  y  $-15^{\circ}\text{C}$  para lípidos de *Thermoplasma acidophilum*, mientras que para la dipalmitoil fosfatidilcolina es de  $55^{\circ}\text{C}$ . La temperatura de transición de fase va a depender de la longitud de la cadena, número de insaturaciones y ramificaciones metílicas, por lo que para los lípidos a base de arqueol y caldarqueol se puede asumir que estarán en el estado de cristal líquido en un amplio rango de temperatura, de 0 a  $100^{\circ}\text{C}$ , rango en el que se encuentra la temperatura de crecimiento de prácticamente todas las arqueas.

Otra característica de estos lípidos es la baja permeabilidad a solutos, lo cual depende del grado de ramificación de las cadenas isoprenoides, lo cual se pone también de manifiesto a altas temperaturas (Koga y Morii, 2005).

El enlace de tipo éter es estable a la degradación en condiciones ácidas, lo que le confiere a estos lípidos estabilidad química en un amplio rango de pH, estabilidad que también se asume en un amplio rango de temperaturas.

Las cadenas alquílicas saturadas ofrecen estabilidad frente a la degradación oxidativa, lo cual es particularmente interesante en el caso de las halófilas extremas, que se encuentran expuestas al aire y la luz solar.

La inusual configuración estereoquímica del glicerol confiere a estos lípidos estabilidad frente a fosfolipasas que pueden ser liberadas al medio por otros microorganismos (Kates, 1993).

Todas estas propiedades van a permitir una aplicación biotecnológica de los lípidos de arqueas, como se describirá con más detalle a lo largo de esta memoria.

### **2.3.2. Pigmentos retinales de haloarqueas**

La presencia de proteínas que contienen este tipo de pigmentos en algunas especies de haloarqueas es un hecho peculiar tanto por las implicaciones fisiológicas que representa como por las aplicaciones que se pueden hacer de ellas, por lo que vamos a describirlas más en detalle.

Han sido identificadas cuatro proteínas con pigmentos retinales implicadas en la obtención de energía a partir de la luz. Dos de ellas son bombas de protones dirigidas por la luz, una externa, la bacteriorrodopsina, y una interna, la halorrodopsina. Las otras dos proteínas identificadas son rodopsinas sensoriales, implicadas en la fotosensibilidad para la fototaxis. La rodopsina I es un receptor de luz verde, que es un estímulo atractivo o positivo para las células, mientras que la rodopsina II, también llamada fotorrodopsina, es un receptor de la luz azul, luz que actúa como repelente (Oren, 2006).

La bacteriorrodopsina, un pigmento púrpura, fue descrita por primera vez en *Halobacterium salinarum* (Oesterhelt y Stoeckenius, 1974). Es una proteína de 27 kDa que lleva el retinal como grupo prostético. Se localiza en unos gránulos, denominados membrana púrpura, en la membrana celular de ciertas especies. Sirve como bomba externa de protones, y cuando se excita por una determinada longitud de onda, los protones son transportados desde el citoplasma al exterior de la célula. El gradiente de protones que se origina se usa en la realización de procesos celulares que requieren energía, como la fosforilación de ADP a ATP

(Danon Y Stoeckenius, 1974). Bajo las condiciones apropiadas *H. salinarum* produce este pigmento en grandes cantidades, lo que proporciona una tonalidad púrpura a los cultivos. Otra especie que produce bacteriorrodopsina en grandes cantidades es *Halorubrum sodomense* (Oren, 1983), y también se han encontrado pequeñas cantidades de la proteína en diferentes especies de *Haloarcula* (Kitajima *et al.*, 1996).

La segunda proteína retinal, halorrodopsina, tiene una estructura muy similar a la bacteriorrodopsina, pero el mecanismo de acción es diferente, ya que actúa como una bomba de iones cloro. Cuando es excitada por la luz, se produce el transporte de dichos iones desde el exterior al citoplasma. El transporte de iones cloro es importante para mantener el apropiado balance iónico y es esencial para el crecimiento (Oren, 2006).

### **2.3.3. Envoltura celular**

Al igual que las bacterias, casi todas las arqueas tienen una pared celular que protege la integridad celular, pero los componentes de esta pared son diferentes a los integrantes de la misma en las bacterias. En lugar de la mureína, las paredes celulares de las arqueas con tinción de Gram positiva poseen una serie de polímeros de diferente naturaleza química que forman una pared celular rígida. La mayoría de las arqueas son negativas en la tinción de Gram, y poseen solamente unas envolturas celulares (capa S) de naturaleza proteica o glicoproteica.

La envoltura celular de las arqueas puede ser clasificada en tres tipos según sus principales componentes (Kandler y König, 1998; Bullock, 2000):

- Pseudomureína: está presente en miembros de las *Methanobacteriales* y el género *Methanopyrus*. La estructura de este peptidoglicano contiene ácido L-talasoaminomurámico en vez de ácido murámico, y carece de D-aminoácidos.
- Heteropolisacáridos: este tipo de pared celular se da en los géneros *Methanosarcina* y *Halococcus*. La pared celular en el género *Methanosarcina* está constituida por metanocondroitina, compuesta por galactosamina, ácido glucurónico o galacturónico y glucosa, recordando al condroitín sulfato presente en los tejidos conectivos de

vertebrados. Sin embargo, la metanocondroitina no está sulfatada y las proporciones entre los distintos azúcares son también diferentes.

Otro tipo de heteropolisacárido, altamente sulfatado, lo encontramos en el género *Halococcus*. Consiste en una mezcla de azúcares neutros y aminados, ácidos hurónicos y un ácido aminurónico, el ácido gulosamirónico

- Capa S formada por proteínas o glicoproteínas: este tipo de envoltura podemos encontrarla en metanógenas, algunas especies de hipertermófilas y halófilas extremas, como *Halobacterium* donde la glicoproteína de la pared es rica en aminoácidos de carácter ácido (aspartato y glutamato) en forma de sales sódicas.

## **2.4. Aplicaciones biotecnológicas de las arqueas**

Desde los años 80 el interés por los microorganismos extremófilos se ha ido incrementando debido a la continua aparición de aplicaciones biotecnológicas para ellos (Schiraldi *et al.*, 2002; Antranikian *et al.*, 2005). A continuación se detallan algunas de las principales aplicaciones de los tres grupos de arqueas.

### 1. Arqueas metanógenas:

La aplicación industrial principal de las metanógenas es el tratamiento anaeróbico de residuos como aguas y fangos residuales procedentes de la industria, agricultura y de las depuradoras municipales, con la consiguiente producción de metano, que puede ser recuperado y utilizado (Schiraldi *et al.*, 2002).

Las ventajas de la metanogénesis industrial son considerables, sobre todo si tenemos en cuenta que es un proceso fácil y económico, ya que el material sobre el que se trabaja es un residuo, y es una alternativa a complicados y caros sistemas para la eliminación de residuos perjudiciales para el medio ambiente (Cowan, 1992).

## 2. Arqueas termófilas:

La principal aplicación biotecnológica de estas arqueas reside en su sistema enzimático, con enzimas que presentan amplias posibilidades de aplicación industrial. En general, puede asumirse que cualquier enzima aislada de un organismo termófilo extremo será más termoestable que si la aislamos de uno que no sea termófilo. Además parece ser que si una proteína es más termoestable, tendrá también un mayor grado de resistencia ante otros potenciales agentes desnaturalizadores, como detergentes, disolventes orgánicos o agentes oxidantes (Cowan, 1992). Así, se utilizan un gran número de enzimas procedentes de arqueas termófilas. A continuación se detallan las más relevantes:

- Enzimas procesadoras del almidón: el procesado industrial del almidón con el fin de obtener productos como dextrinas, glucosa, fructosa o trehalosa puede beneficiarse de la utilización de enzimas termoestables, ya que en todos los procesos de conversión del almidón se usan elevadas temperaturas para licuarlo y facilitar así la acción de las enzimas. De este modo, en la industria del almidón se utiliza una gran variedad de  $\alpha$ -amilasas, pululanasas tipo II, pululan-hidroxilasa,  $\alpha$ -glucosidasas y glucoamilasas provenientes de arqueas termo e hipertermófilas (Antranikian *et al.*, 2005). Con estas enzimas se consigue la hidrólisis de almidón soluble, amilosa, amilopectina y glicógeno, obteniéndose principalmente maltotriosa, junto con cantidades pequeñas de glucosa y maltosa (Kobayashi *et al.*, 1994)
- Celulasas: la degradación de la celulosa para obtener su monómero, glucosa, puede hacerse mediante la acción de tres enzimas: endoglucanasas, exoglucanasas y  $\beta$ -glucosidasas. Las dos últimas han sido aisladas de diferentes especies de *Sulfolobales* y de la especie *Pyrococcus furiosus* (Cubellis *et al.*, 1990; Voorhorst *et al.*, 1995).
- Enzimas degradadoras de polímeros, como xilanasas y otros tipos de celulasas, pueden ser de especial importancia en industrias químicas y farmacéuticas así como en la industria del papel (Schiraldi *et al.*, 2002).

- Proteasas, que son de especial importancia en la formulación de detergentes (Schumacher *et al.*, 2001).
- Lipasas y esterases, aisladas de *Archaeoglobus fulgidus* y *Sulfolobus shibatae*, son también interesantes por su efecto detergente de aplicación en la industria lechera (Schiraldi *et al.*, 2002).
- Enzimas para biología molecular: una serie de polimerasas termoestables procedentes de arqueas termófilas son usadas para las reacciones de ampliación y secuenciación del ADN (Antranikian *et al.*, 2005).

### 3. Arqueas halófilas:

Las arqueas halófilas poseen un gran número de aplicaciones útiles con una gran variedad de campos de aplicación, por lo que nuevos potenciales y aplicaciones en biotecnología siguen siendo investigados (Ventosa y Nieto, 1995; Margesin y Schinner, 2001). Además, las haloarqueas presentan ciertas ventajas frente a otros microorganismos para la aplicación en procesos biotecnológicos, ya que el cultivo es relativamente fácil, los riesgos de contaminaciones son bajos debido a la alta concentración de sales utilizada y el tamaño del cultivo puede ser escalado para el uso de grandes fermentadores (Oren, 2006).

Entre estas aplicaciones cabe destacar las siguientes:

- Aplicación en alimentación: la elaboración de salsas a base de pescado fermentado es frecuente en Asia, como la salsa Nam Pla en Tailandia, elaboración en la que están implicadas arqueas halófilas. El producto se hace de manera tradicional añadiendo dos partes de pescado y una parte de sal marina. La mezcla se cubre de una salmuera muy concentrada (4,4-5,1 M) y se deja fermentar durante un año aproximadamente. El desarrollo de arqueas halófilas rojas, identificadas como *Halobacterium* y *Halococcus*, es máximo a partir de la tercera semana y persiste durante todo el proceso de fermentación. Parece ser que las proteasas halobacteriales participan en el proceso de fermentación (Thongthai y Suntainalert, 1991; Thongthai *et al.*, 1992).

- Producción de biopolímeros: varias especies de haloarqueas, en especial *Haloferax mediterranei*, produce cantidades intracelulares importantes de polihidroxicanoatos (PHAs), en concreto poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) y poli- $\beta$ -hidroxivalerato (PHV) (Rodríguez-Valera y Lillo, 1992). Copolímeros de PHB y PHV se sintetizan en la industria como plásticos biodegradables, y son una buena alternativa a los termoplásticos derivados del petróleo. Además estos plásticos son biocompatibles, de manera que también pueden ser utilizados para aplicaciones farmacéuticas y clínicas, desde la liberación controlada de medicamentos hasta el uso para aplicaciones quirúrgicas y protésicas. *H. mediterranei* produce 0,3 g de biopolímero, mezcla de PHB y PHV, por gramo de peso seco. El rendimiento es menor del producido por *Ralstonia eutropha*, bacteria usada industrialmente con el mismo fin pero el uso de *H. mediterranei* conlleva ciertas ventajas si se compara con el uso de la citada bacteria, con una mayor producción de biomasa, crecimiento rápido sobre sustratos carbonados baratos, como almidón, producción de diferentes tipos de polihidroxicanoatos (PHA) en función del sustrato suministrado, lisis celular espontánea en agua, lo que facilita la recuperación del polímero y alta estabilidad genética (Cowan, 1992).
- Producción de polisacáridos: *Haloferax mediterranei* produce también un polisacárido extracelular con potencial biotecnológico. Es un heteropolisacárido ácido con una alta viscosidad a concentraciones relativamente bajas del mismo, resistente a extremos de salinidad, pH y temperatura. El rendimiento de la producción es de 3-8 g/l (Oren, 2006). Se ha visto que otras especies de éste género también producen exopolisacáridos, como *Haloferax gibbonsi* y *Haloferax volcanii* (Severina *et al.*, 1990; Paramonov *et al.*, 1998). Estos polímeros se usan para modificar las propiedades reológicas de los sistemas acuosos, como agentes espesantes para la estabilización de la viscosidad, gelantes y emulsificantes, que pueden aplicarse para mejorar la recuperación del petróleo (Ventosa y Nieto, 1995).

- Degradación de compuestos tóxicos: un número considerable de sustratos inusuales pueden ser utilizados para el desarrollo de determinados tipos de haloarqueas, característica que puede utilizarse en tareas de biorremediación medioambiental. Así, una arquea aislada de un pantano salino en el sur de Francia era capaz de degradar compuestos como hidrocarburos saturados (tetradecano, hexadecano, eicosano, heneicosano), alcanos (pristano), hidrocarburos aromáticos (fenantreno, antraceno, acenafteno) y ácidos grasos de cadena larga como ácido palmítico (Bertrand *et al.*, 1990). Estas propiedades se han encontrado también en cepas taxonómicamente cercanas a *Halobacterium salinarum*, *Haloferax volcanii* y *Halorubrum distributum* (Kulichevskaya *et al.*, 1991).
- Enzimas: como amilasas, amiloglucosidasas, proteasas y lipasas, que tienen la peculiaridad de ser funcionales a alta salinidad; mientras que la mayoría de enzimas se inactivan por altas concentraciones de sal, éstas requieren al menos una concentración 1M de cloruro sódico para su correcta estabilidad y funcionamiento (Cowan, 1992). Esta propiedad puede ser útil en procesos biotecnológicos que requieran altas concentraciones de sal para la degradación de macromoléculas.
- Pigmentos retinales: la bacteriorrodopsina y halorrodopsina presente en la membrana púrpura de determinadas arqueas halófilas tiene múltiples aplicaciones tecnológicas, debido a su alta estabilidad termodinámica y fotoquímica, y a la facilidad de inmovilizarla sobre sustratos sólidos, produciendo señales fotoeléctricas altamente reproducibles. Así, se usa para el desarrollo de potentes procesadores y memorias computacionales (biochips), procesadores de la luz espacial, retinas artificiales y holografía, entre otras. Para convertir la bacteriorrodopsina en un sensor de luz se extiende en una fina capa a modo de sandwich entre un electrodo y un gel conductor de la electricidad. Cambios conformacionales en la molécula crean un desplazamiento de la carga, generando una señal eléctrica que viaja a través del electrodo. El uso de esta proteína tiene muchas ventajas: es estable en un amplio rango de temperaturas (0-45°C), de pH

(1-11) y la reacción fotoquímica es autoregenerativa (Ventosa y Nieto, 1995). Bacteriorrodopsina aislada de *H. salinarum* está siendo comercializada en la actualidad por dos compañías, COBEL (Barcelona, España) y MIB (Munich Innovative Biomaterials, Munich, Alemania) (Margesin y Schinner, 2001).

- Solutos compatibles: los solutos orgánicos sintetizados por las células para el mantenimiento del equilibrio osmótico tienen también aplicación biotecnológica. La ectoína y sus derivados han sido patentados como sustancia hidratante para cosméticos (Montitsche *et al.*, 2000), aunque la aplicación más prometedora es usarlos como estabilizadores en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ya que son excelentes estabilizadores de biomoléculas (Sauer y Galinski, 1998).
- Aplicaciones clínicas: la DNA topoisomerasa tipo II de las arqueas halófilas es sensible a algunos fármacos antitumorales que son activos frente a la topoisomerasa tipo II de células eucariotas. Esto abre la posibilidad de usar la enzima halófila para realizar screenings de nuevos agentes citostáticos, que se haría mediante un ensayo sencillo utilizando plásmidos superenrollados de arqueas halófilas, los cuales en presencia de la DNA topoisomerasa se relajan, de manera que la inhibición de la topoisomerasa por parte de un fármaco puede ponerse de manifiesto visualizando los cambios de movilidad del plásmido en un gel de agarosa (Forterre y Mouldy, 1989). Además, una proteína de 84 kDa encontrada en *H. salinarum* tiene epítomos relacionados con la proteína humana c-myc, producto de un oncogen encontrado en el suero de pacientes con determinados tipos de cánceres. La proteína de 84 kDa puede utilizarse como antígeno para detectar anticuerpos frente a la proteína humana, pudiendo hacer un diagnóstico precoz de los tumores que presentan este tipo de marcador (Benmahrez *et al.*, 1988).

Aparte de todas las aplicaciones que se han descrito hasta el momento, no podemos olvidarnos de los peculiares lípidos de membrana que presentan los microorganismos de este Dominio. Así, por sus características químicas, son una excelente materia prima para la formación de liposomas, de aplicación en ámbito clínico, farmacéutico y cosmético como

vehículo de sustancias activas, liposomas que han demostrado una destacable estabilidad y una limitada pérdida de los solutos encapsulados (Gambacorta *et al.*, 1995).

Estos liposomas, denominados arqueosomas, serán ampliamente descritos en el punto 3.7 de la introducción por tratarse del tema central de esta memoria.

Los lípidos de arqueas también se han propuesto para la utilización como monómeros en bioelectrónica, principalmente porque la estructura bipolar de los lípidos tetraeter ofrece nuevas oportunidades para la interacción lípido-proteína, lo cual es interesante en el desarrollo de dispositivos electrónicos a base de proteínas o enzimas con potencial redox (De Rosa *et al.*, 1994).

### 3. SISTEMAS DE VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS: LIPOSOMAS

El objetivo de cualquier sistema de vectorización, vehiculización o direccionamiento de fármacos es modular su farmacocinética y/o su distribución tisular de un modo beneficioso. Este beneficio se puede considerar atendiendo a diferentes características relacionadas con la acción del fármaco (Storm y Crommelin, 1998):

- **Dirección:** transportando al fármaco al lugar concreto de acción en el organismo, es decir, al órgano diana, se potencia su efecto terapéutico por la liberación del mismo en el sitio específico. Este fenómeno de direccionamiento tiene un segundo efecto positivo, ya que aísla al fármaco en su paso por el organismo, evitando así la distribución tisular indiscriminada y disminuyendo o evitando la aparición de efectos adversos indeseados y de fenómenos de toxicidad.
- **Duración:** los sistemas de vectorización pueden actuar como un reservorio del fármaco, de manera que éste se va liberando poco a poco desde el transportador. Esta liberación sostenida puede aprovecharse para mantener los niveles terapéuticos en sangre, aumentando la duración de la acción y disminuyendo por tanto la frecuencia de administración.
- **Protección:** el fármaco encapsulado dentro del vector se encuentra protegido de factores que, como las enzimas degradativas, pueden degradarlo cuando se encuentra en forma libre.
- **Internalización:** algunos tipos de transportadores, como los liposomas, son capaces de interaccionar directamente con la célula diana promoviendo la liberación intracelular del fármaco, en particular de aquellos que en la forma libre no son capaces de entrar en la célula debido a características fisicoquímicas incompatibles.

A lo largo de las últimas décadas se han desarrollado un gran número de sistemas de vectorización, y si los clasificamos atendiendo a su magnitud estructural, podemos considerar dos grandes grupos: macroparticulares, que pueden ser moléculas de origen natural o sintético, y vectores de tamaño de partícula. Dentro de éstos últimos se distinguen los sistemas microparticulares, como microesferas, microcápsulas y partículas de látex, y sistemas

nanoparticulares, integrados por nanocápsulas, nanosferas, sistemas micelares, niosomas y liposomas (Storm y Crommelin, 1998).

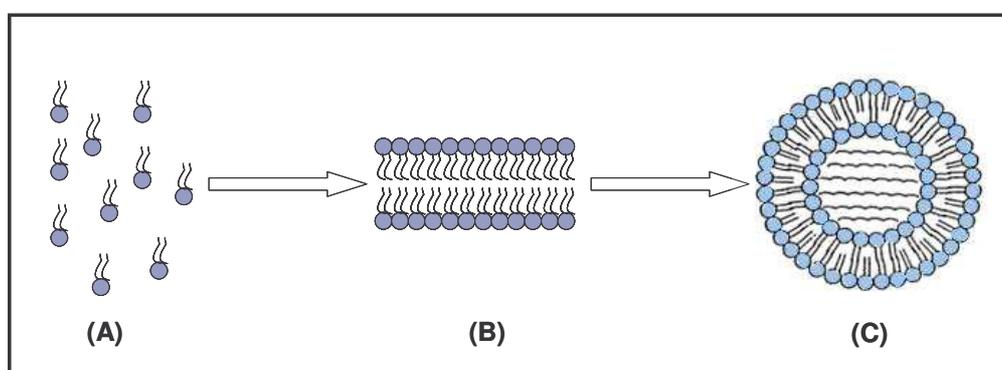
### **3.1. Generalidades sobre liposomas**

Las primeras vesículas elaboradas a partir de fosfolípidos, denominadas liposomas, fueron obtenidas en 1965 por Bangham y colaboradores (Bangham *et al.*, 1965) con el fin de estudiar las membranas biológicas. A partir de los años 70 una gran variedad de aplicaciones han ido emergiendo, siendo muy útiles como modelos y herramientas en diversas disciplinas científicas, como física teórica, biofísica, química, ciencias de los coloides, bioquímica y biología, entre otras. Sin embargo, la aplicación más importante de los liposomas es el campo de la vectorización de fármacos, habiéndose utilizado por primera vez con esta finalidad por Gregoriadis y colaboradores (Gregoriadis, 1976a, 1976b). Desde entonces el interés por los liposomas como sistemas de transporte ha ido en aumento y en la actualidad se desarrollan numerosas investigaciones en este ámbito, encontrándose en el mercado sistemas liposomiales como transportadores de fármacos, formulaciones cosméticas, sustancias para diagnóstico y diversas aplicaciones en la industria alimentaria (Lasic, 1998).

Los liposomas son vesículas microscópicas constituidas por una o varias bicapas, normalmente compuestas de fosfolípidos, conformando una membrana que deja en su interior uno o varios compartimentos acuosos. En dichas bicapas los fosfolípidos se disponen orientados con las cadenas hidrófobas situadas paralelamente entre sí, lo cual constituye una capa, que se enfrenta a las cadenas hidrófobas de la otra capa. Las cabezas polares se orientan hacia el exterior, originando una estructura concéntrica que alberga en su interior el compartimento acuoso (Jesorka y Orwar, 2008). Los liposomas se generan mediante un proceso de autoensamblamiento al poner en contacto los fosfolípidos con un medio acuoso, fenómeno que no es del todo espontáneo ya que en general se puede considerar que los liposomas no son un sistema termodinámicamente estable y, por tanto, necesitan del aporte de un cierto grado de energía (agitación, sonicación o extrusión) para formarse (Lasic, 1998). La figura 6 representa un esquema de cómo se forma el liposoma.

Los lípidos más frecuentemente usados para la elaboración de liposomas son fosfolípidos de origen natural, en particular fosfatidilcolina de carga neutra, o fosfolípidos cargados negativamente, como ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina. La esterilamina se usa cuando se requiere una carga positiva sobre los liposomas, y existe también un grupo de lípidos sintéticos con determinadas propiedades que se utilizan cuando se quiere donar una funcionalidad más concreta a los liposomas obtenidos (Jesorka y Orwar, 2008). Además es común incluir colesterol en la composición de las formulaciones, ya que aumenta la estabilidad del liposoma al inducir una conformación más ordenada de las cadenas lipídicas (Raffy y Teissie, 1999).

Los liposomas se asemejan a las membranas celulares tanto en estructura como en composición. Típicamente están elaborados con lípidos de origen natural, lo que hace que sean biodegradables, no tóxicos y no inmunógenos. Además, por el carácter anfipático de la membrana son capaces de transportar sustancias tanto de carácter lipófilo, que se albergan en la membrana, como hidrófilo, que son transportadas en el compartimento acuoso interior, lo que hace de ellos un sistema ampliamente versátil (Lasic, 1998).



**Figura 6. Esquema del fenómeno de autoensamblamiento de los fosfolípidos que conduce a la formación del liposoma: (A) Moléculas de fosfolípido; (B) Bicapa de fosfolípidos; (C) Liposoma**

### 3.2. Clasificación de los liposomas

Existen diversos criterios en base a los que se clasifican los liposomas en diferentes tipos.

1. Atendiendo a parámetros estructurales: basándose en el número de compartimentos y en el tamaño de las vesículas se distinguen los siguientes tipos de liposomas (Barenholz y Crommelin, 1994):

- Vesículas plurilaminares o multicompartimentales: se caracterizan por poseer varias bicapas que encierran un número igual de compartimentos acuosos. Dentro de ellos se distinguen varias especies:
  - Multilaminares o multilamelares (MLV): su tamaño oscila desde 0,5  $\mu\text{m}$  a varias decenas de  $\mu\text{m}$ . Se obtienen al dispersar los fosfolípidos mediante agitación en un exceso de solución acuosa. El número de bicapas así como la distribución de tamaños en la suspensión liposomal obtenida va a depender de la magnitud de la energía empleada para su elaboración. Su estabilidad es muy buena y suelen usarse en aplicaciones industriales así como para el transporte de fármacos.
  - Oligolamelares (OLV): se caracterizan por tener menor número de bicapas que el tipo anterior y un tamaño de partícula inferior, que oscila entre 0,1 y 1  $\mu\text{m}$ .
  
- Vesículas unilaminares o unilamelares (UV): se caracterizan por poseer una única bicapa que alberga en su interior el compartimento acuoso. Se distinguen diferentes tipos en función de su tamaño:
  - Vesículas unilaminares de pequeño tamaño (SUV) o microvesiculares: su tamaño está comprendido entre 20 y 100 nm. La capacidad de encapsulación es pequeña, al igual que su estabilidad. Se obtienen a partir de una suspensión de MLV mediante tratamiento con ultrasonidos, extrusión o tecnología de deshidratación-rehidratación vesicular.
  - Vesículas unilaminares grandes (LUV) o macrovesiculares: su tamaño se considera mayor de 100 nm, pudiendo llegar hasta 1  $\mu\text{m}$ . Poseen una buena eficiencia de encapsulación y su estabilidad es media. Son especialmente efectivas para la encapsulación de sustancias hidrosolubles, ya que poseen un gran

compartimento acuoso, y se obtienen fácilmente mediante evaporación en fase reversa.

- Vesículas unilaminares gigantes (GUV): son vesículas con tamaño mayor de 1  $\mu\text{m}$ , pudiendo alcanzar hasta los 50  $\mu\text{m}$ . Se consiguieron primeramente mediante agitado cuidadoso de una película lipídica fina y homogénea en agua pura templada (Reeves y Dowben, 1970). Posteriormente se desarrollaron otros métodos para la elaboración de este tipo de vesículas, siendo particularmente interesante el descrito por Moscho y colaboradores, que permite obtenerlas en tiempos muy breves (2 min aproximadamente) lo cual supone una ventaja para la encapsulación de sustancias fácilmente alterables (Moscho *et al.*, 1996).
- Liposomas multivesiculares (MVV): consisten en una vesícula que a su vez contiene en su interior otras vesículas. Normalmente su tamaño es superior a 1  $\mu\text{m}$ .

La figura 7 recoge los diferentes tipos de liposomas comentados.

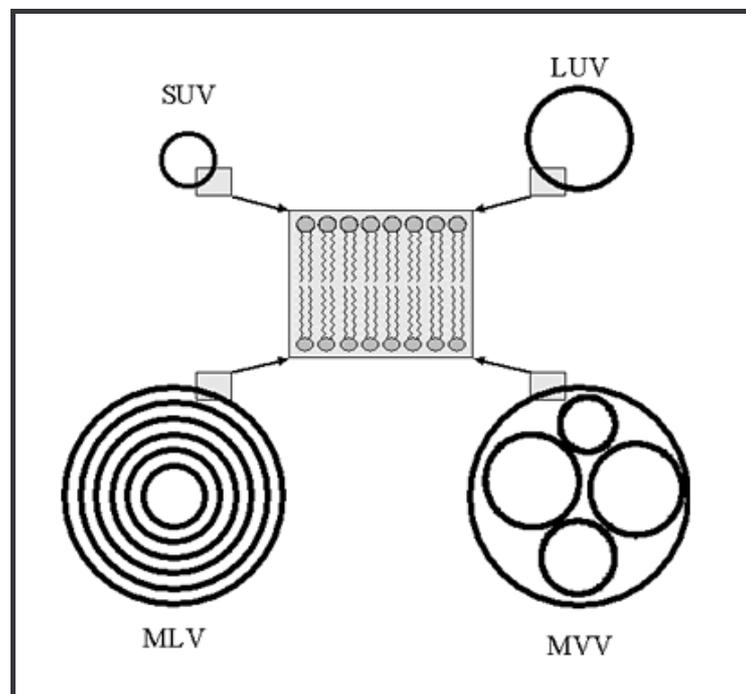


Figura 7. Tipos de liposomas según su estructura

## 2. Atendiendo a su composición y aplicación:

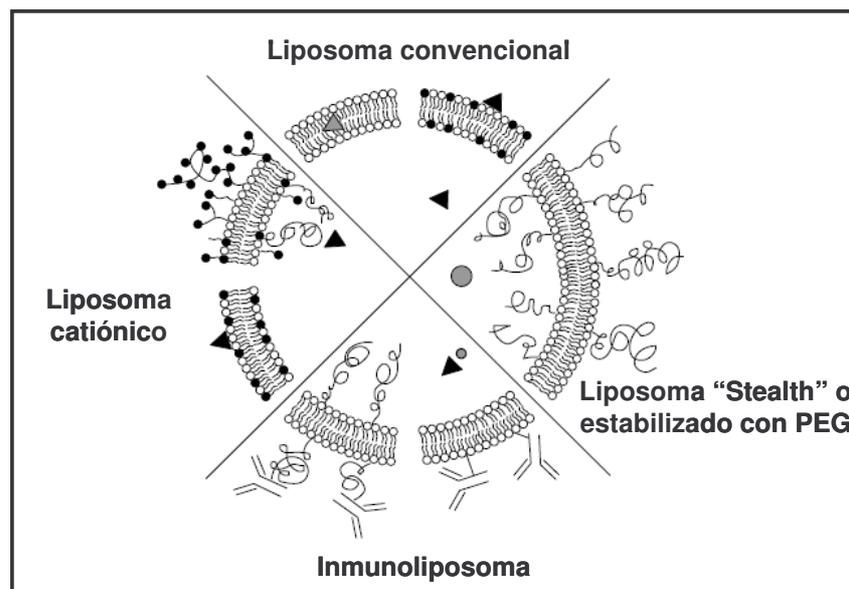
Según este criterio de clasificación podemos distinguir cuatro grandes tipos de liposomas (Lasic, 1998)(Figura 8):

- Liposomas convencionales: este tipo puede definirse como liposomas típicos compuestos únicamente por fosfolípidos, neutros o cargados negativamente, y colesterol. Las primeras investigaciones en el campo de los liposomas fueron llevadas a cabo utilizando este tipo de vesículas. Dentro de ellos los hay con una amplia variedad de propiedades fisicoquímicas tales como tamaño, composición lipídica, carga superficial y número de bicapas. Se caracterizan por tener una vida media de circulación en sangre muy corta, ya que cuando se administran parenteralmente tienen una gran tendencia a acumularse rápidamente en células fagocitarias del sistema fagocítico mononuclear (SFM). Los órganos donde se acumulan en mayor grado son el hígado y el bazo. Esto puede utilizarse terapéuticamente convirtiendo a los liposomas convencionales en candidatos para la liberación de fármacos a nivel de los macrófagos. Así, se han obtenido buenos resultados al usarlos para la administración de agentes antimicrobianos directamente en macrófagos de tejidos infectados (Bakkerwoudenberg, 1995) y para la liberación de inmunomoduladores que aumentan la capacidad de los macrófagos en la eliminación de células neoplásicas (Killion y Fidler, 1994).
- Liposomas de larga circulación: la aparición de este tipo de vesículas supuso, a finales de los años 80, un gran avance y resurgimiento de las investigaciones con liposomas ya que superaban una de las limitaciones de los liposomas convencionales, su corta vida en circulación en el organismo. Este nuevo tipo, al permanecer más tiempo en circulación, les permitía extravasarse a zonas del cuerpo donde la permeabilidad de los vasos estaba aumentada, incluyendo áreas patológicas como tumores sólidos (Maruyama *et al.*, 2005) y sitios de infección y de inflamación. La forma más frecuente para obtener liposomas de larga circulación es uniéndoles en la superficie, mediante enlace covalente, polímeros hidrofílicos de

polietilenglicol (PEG), los cuales, al estar altamente hidratados, crean una barrera estérica que les impide interactuar con moléculas y células del organismo. Estos liposomas recubiertos de PEG se denominan también estéricamente estabilizados o sigilosos (“stealth”), debido a su capacidad de escapar al SFM.

- **Inmunoliposomas:** estos liposomas poseen, ligados en su superficie, anticuerpos específicos o fragmentos de ellos que potencian la unión a las células diana. A pesar de que los sistemas con inmunoliposomas han sido estudiados con diferentes fines terapéuticos, la principal aplicación es la liberación dirigida de agentes antineoplásicos (Tuffin *et al.*, 2005; Mamot *et al.*, 2006; Noble *et al.*, 2009). Los inmunoliposomas presentan también el problema de llegar rápidamente al hígado y el bazo, por lo que para garantizar la accesibilidad a otros órganos diana ha cobrado cierto interés la administración local directa en las cavidades corporales. Para prolongar la vida media de los inmunoliposomas se puede cubrir su superficie con polietilenglicol, lo cual aumenta la posibilidad de alcanzar otras dianas diferentes de los macrófagos del SFM (Chekhonin *et al.*, 2007). Otras aplicaciones de este tipo de liposomas son la liberación dirigida de insulina (Yang *et al.*, 2009) la detección de determinados tipos de cánceres de manera precoz y sensible (Freedman *et al.*, 2009) y su uso en tomografía vascular (Danila *et al.*, 2009).
- **Liposomas catiónicos:** son los miembros más jóvenes de la familia de los liposomas. Los componentes del liposoma son lípidos catiónicos que interactúan con la molécula de ADN, de carga negativa, de manera que se forma un complejo lípido-ADN con carga neutra (lipoplejos) que condensa el ADN en una estructura más compacta, proporcionándole protección frente a procesos de degradación enzimática y favoreciendo la internalización y expresión celular de dicho material genético. Este tipo de liposomas se utilizan para terapia génica, que consiste en el tratamiento de las enfermedades a nivel molecular, activando o desactivando genes y modificando así la síntesis de proteínas. El liposoma ideal para el uso terapéutico de genes debe

encapsular plásmidos de ADN con una alta eficiencia y tiene que tener un tamaño de partícula no superior a los 100 nm, de manera que pueda salir fácilmente de los vasos sanguíneos (Templeton y Lasic, 1999; Patil *et al.*, 2005). Al igual que en los otros casos, estos liposomas también pueden ser estabilizados mediante el recubrimiento de la superficie con moléculas de polietilenglicol (Lasic, 1998).



**Figura 8. Tipos de liposomas según su composición y aplicación (tomado de Storm y Crommelin, 1998)**

### 3.3. Métodos de elaboración de liposomas

Existen diversos métodos para la elaboración de liposomas de diferente tamaño y número de bicapas lipídicas. En el proceso de elaboración podemos distinguir tres fases: hidratación del lípido, homogenización del tamaño y eliminación de la sustancia no encapsulada.

#### 1. Fase de hidratación:

Diversos métodos están basados en la obtención de liposomas a partir de una película seca de lípidos que posteriormente es hidratada con una solución acuosa que contiene la sustancia a encapsular. Se realiza mediante agitado manual, usando un vórtex o mediante un homogenizador o agitador mecánico. De este modo la mayoría de vesículas que se forman son multilaminares (MLV), con una alta eficiencia de encapsulación pero una gran

heterogeneidad de tamaños, por lo que es necesaria una segunda fase en la que se homogeneiza la distribución de tamaños en la muestra. Otra técnica reemplaza el solvente orgánico, que contiene los lípidos disueltos, por una solución acuosa donde va disuelta la sustancia a encapsular. Este intercambio de solvente se realiza de manera muy rápida y se caracteriza por una transferencia directa de la mezcla de lípidos desde el solvente orgánico a un tampón acuoso. El método es muy rápido y proporciona eficiencias de encapsulación considerablemente altas. Un tercer método es el de inyección del solvente, que consiste en la inyección muy lenta de una solución etanólica de lípidos en una fase acuosa, lo que permite la formación de vesículas unilaminares. Los liposomas así obtenidos tienen una distribución de tamaño muy bien definida y una alta eficiencia de encapsulación. El etanol residual de la muestra se elimina mediante diálisis repetida en agua destilada. Otras metodologías se basan en la adición de detergentes a los lípidos en una mezcla de agua/solvente orgánico, eliminando posteriormente estos agentes mediante diálisis o filtración en gel. Otros nuevos métodos han sido también utilizados, como la coacervación o formación mediante microfluidificación, con la que se obtienen principalmente liposomas unilaminares (Jesorka y Orwar, 2008).

## 2. Fase de homogenización del tamaño:

Los métodos utilizados con este fin son fundamentalmente dos (Jesorka y Orwar, 2008):

- **Extrusión:** la suspensión de vesículas multilaminares es obligada a pasar a través de un sistema de membranas de policarbonato apiladas de manera que cada vez el tamaño de poro es más pequeño. Este proceso se repite entre 5 y 10 veces, hasta obtener el tamaño de partícula deseado.
- **Tratamiento con ultrasonidos:** es un método bastante sencillo para la reducción del tamaño de los liposomas. La suspensión MLV se trata durante algunos minutos con un sonicador de sonda de titanio en baño de hielo para disipar el calor producido durante la sonicación. Posteriormente es recomendable filtrar los liposomas a través de un filtro de 0,45  $\mu\text{m}$  para eliminar pequeñas partículas de titanio que pueden desprenderse de la superficie de la sonda.

### 3. Fase de separación de la sustancia no encapsulada:

Como se viene refiriendo, la capacidad de encapsulación de los liposomas es limitada y va a depender del tipo de vesícula obtenida. Para determinar la eficiencia de la encapsulación es necesario retirar de la suspensión liposomal la fracción de sustancia no encapsulada. Esto se lleva a cabo principalmente mediante cuatro métodos (Barenholz y Crommelin, 1994):

- Diálisis.
- Ultracentrifugación.
- Cromatografía en gel.
- Utilizando resinas de intercambio iónico.

### **3.4. Estabilidad de los liposomas**

La estabilidad de los liposomas va a ser una característica muy importante a tener en cuenta desde un punto de vista farmacéutico, ya que una forma farmacéutica debe ser estable desde su preparación hasta su utilización, por lo que la estabilidad va a condicionar la duración del período de tiempo durante el cual las propiedades de la preparación farmacéutica se mantienen inalteradas. En los liposomas podemos distinguir dos tipos de estabilidad, la química y la física.

#### 1. Estabilidad química de los liposomas

Este tipo de estabilidad es debida a los fosfolípidos que conforman la membrana del liposoma, ya que pueden sufrir procesos degradativos por diferentes vías. Las principales vías de degradación que van a limitar la vida media de las dispersiones liposomiales son dos (Grit y Crommelin, 1993):

- Vía oxidativa: la oxidación de los fosfolípidos ocurre fundamentalmente en aquellos que poseen cadenas de ácidos grasos insaturados, pero puede producirse también en fosfolípidos con ácidos grasos saturados cuando se someten a altas temperaturas. La oxidación se produce por un mecanismo de formación de radicales libres y, a mayor grado de insaturación de los ácidos grasos, mayor es la disponibilidad del fosfolípido a la formación de radicales libres. En presencia de oxígeno este proceso se ve acentuado. La peroxidación de los fosfolípidos que están

formando liposomas puede reducirse si se usan fosfolípidos de buena calidad, purificados de hidroperóxidos e iones metálicos de transición. Además, la elaboración en atmósfera inerte, la conservación a bajas temperaturas y la protección de la luz disminuye las posibilidades de que se produzcan fenómenos de oxidación, e incluso se pueden añadir sustancias antioxidantes a la formulación para potenciar la protección frente a la oxidación. Otra estrategia es la utilización de fosfolípidos que contengan el menor número posible de insaturaciones.

- Vía hidrolítica: los cuatro enlaces éster que hay en una molécula de fosfolípido son susceptibles de sufrir una hidrólisis cuando se encuentran en medio acuoso. Los ésteres de los grupos carboxi en posición sn-1 y sn-2 se hidrolizan más rápidamente que los ésteres de los grupos fosfato, y como resultado se producen respectivamente 2-acil y 1-acil lisofosfolípidos, los cuales sufren ulteriores hidrólisis. Esto ocurre tanto en medio ácido como en básico, y aumenta al incrementarse la temperatura, como ocurría en la oxidación. Otro parámetro que afecta a esta vía degradativa es la longitud y grado de insaturación de la cadena hidrocarbonada del fosfolípido, de manera que a medida que aumenta la longitud de la cadena y el grado de saturación se reduce la hidrólisis en medio acuoso. La presencia de colesterol en la bicapa lipídica parece no influir en la cinética de hidrólisis, aunque algunos autores consideran que podría acelerar la tasa de hidrólisis al aumentar la hidratación de los grupos polares (Zaslavsky *et al.*, 1984).

## 2. Estabilidad física de los liposomas

La estabilidad física de los liposomas concierne a dos parámetros: cambios en el tamaño de partícula debido a fenómenos de agregación y fusión, y pérdida de la sustancia encapsulada.

Los cambios en el tamaño medio de partícula de una suspensión liposomal se ve fuertemente afectada por la composición de los fosfolípidos, composición del medio y pH. Los liposomas que carecen de carga eléctrica superficial también tienden a ser menos

estables frente a los fenómenos de agregación que los que están cargados. Por tanto, se puede prevenir la fusión de los liposomas utilizando lípidos cargados para preparar las formulaciones. También se debe prestar particular atención al medio de hidratación, el cual no debe contener cationes polivalentes ya que inducen la agregación y fusión de los liposomas (Lichtenberg y Barenholz, 1988). La pérdida de la sustancia encapsulada por escape a través de la membrana, sobre todo de aquellas hidrosolubles, depende de factores como la composición del liposoma, su tamaño y el estado físico de los lípidos que componen la membrana, es decir, que se encuentren en estado de gel o de cristal líquido. En general, el escape de la sustancia es menor cuando los lípidos de la membrana se encuentran en el estado de gel que cuando están en el estado de cristal líquido. La incorporación de colesterol en las bicapas disminuye la permeabilidad de la membrana. Esta permeabilidad se puede ver también alterada por la degradación de los fosfolípidos que forman el liposoma, tanto por la oxidación como por la aparición de compuestos procedentes de la hidrólisis de los grupos éster descritos anteriormente (Grit y Crommelin, 1993). La temperatura también es un factor influyente en la estabilidad física de los liposomas. El almacenamiento de los mismos a temperaturas cercanas a la de transición de fase aumenta la permeabilidad de las bicapas; de hecho se ha visto que la inestabilidad aumenta de forma acentuada si comparamos entre vesículas conservadas a 4°C y a 25°C, y por ello suelen conservarse a 4°C (duPlessis *et al.*, 1996). El tipo de fosfolípido empleado también condiciona la estabilidad física, y a medida que aumenta la longitud de la cadena de los ácidos grasos que forman el fosfolípido se reduce la pérdida de sustancia encapsulada (Betageri, 1993).

Al elaborar una formulación liposómica para uso farmacéutico es necesario evaluar diferentes parámetros para la caracterización de la misma. Además, es frecuente hacer un seguimiento de esos mismos parámetros a lo largo del tiempo para evaluar la estabilidad de la formulación. Este estudio puede considerarse como un control de calidad, y podemos distinguir tres tipos de ensayos validados (Barenholz y Crommelin, 1994):

- Caracterización y estabilidad física:
  - Distribución de tamaño de partícula: se realiza fundamentalmente mediante técnicas espectroscópicas de dispersión de láser
  - Microscopía para determinar la estructura del liposoma
  - Potencial eléctrico de la superficie (potencial zeta)
  - Porcentaje de sustancia activa libre o eficiencia de encapsulación
  - Proporción sustancia activa/fosfolípido
- Caracterización y estabilidad química (mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) o cromatografía en capa fina (TLC):
  - Peroxidación de los fosfolípidos
  - Hidrólisis de los fosfolípidos
  - Autooxidación del colesterol
  - Degradación del principio activo
- Ensayos biológicos:
  - Esterilidad
  - Pirogenicidad
  - Toxicidad

### **3.5. Usos terapéuticos y vías de administración de liposomas**

Como ya se ha descrito más detalladamente al hacer la clasificación de los liposomas según su composición y aplicación, son diversas las aplicaciones terapéuticas de los liposomas. Dentro de ellas, las más destacables son (Antimisiaris, 2009):

- Quimioterapia para el tratamiento del cáncer, incluyendo las metástasis hepáticas
- Terapia de enfermedades infecciosas
- Terapia génica mediante la encapsulación de plásmidos u oligonucleótidos
- Administración transdérmica de fármacos
- Inmunomodulación

- Vacunas: los liposomas actúan como adyuvantes y además pueden llevar encapsulados coadyuvantes, como glicolípidos y glicoproteínas virales, potenciando la respuesta al antígeno de la vacuna. El mecanismo de acción por el que los liposomas inducen la respuesta inmune ha sido atribuido a la liberación lenta del antígeno y a la habilidad de las vesículas que lo llevan encapsulado de migrar a los nódulos linfáticos después de una inyección local o, cuando se administran de forma oral, de ser endocitadas por las células M que presentarán el antígeno a las células linfoides de las placas de Peyer (Lasic, 1998).
- Diagnóstico mediante la encapsulación de contrastes

Como sistema de transporte de fármacos se han ensayado diferentes vías de administración para los liposomas, entre las que podemos destacar:

- Vía intravenosa: después de una inyección intravenosa de liposomas, éstos son rápidamente retirados de la circulación, a no ser que se trate de liposomas estéricamente estabilizados, capaces de permanecer más tiempo en circulación. Esta rápida retirada se produce por dos vías, una es debida a las lipoproteínas plasmáticas HDL, que retiran los fosfolípidos de la membrana del liposomas, y otra es por un proceso de opsonización, que promueve la fagocitosis de los liposomas y por tanto su rápida degradación (Antimisiaris, 2009). En el caso de la administración de liposomas de larga circulación se consigue que lleguen a las áreas patológicas donde interesa que se produzca la liberación del fármaco. Ésta característica proporciona aplicaciones no sólo en el campo de la oncología, siendo útiles además para el transporte de antibióticos, citoquinas y agentes usados en escintigrafía. La persistencia en sangre hace que sean también efectivos para la lenta liberación de agentes terapéuticos a la circulación sistémica, tales como biomacromoléculas, y en este sentido se han hecho estudios utilizando el péptido de acción hormonal vasopresina (Storm y Crommelin, 1998).

En el caso de los inmunoliposomas el transporte hasta las células diana después de una infusión intravenosa es muy efectivo. Es particularmente interesante el fácil

acceso a las dianas cuando se encuentran en el compartimento sanguíneo, es decir, cuando se trata de células sanguíneas o células endoteliales. El inmunoliposoma se une a la célula diana que se encuentra en circulación y este complejo es rápidamente fagocitado por los macrófagos porque la célula así recubierta es reconocida como extraña, lo que conduce a la rápida eliminación de la misma (Crommelin *et al.*, 1992).

- Vía oral: esta vía es la más fácil y usada para la administración de fármacos. Sin embargo, el desarrollo de formulaciones liposómicas orales encuentra una barrera significativa por la susceptibilidad de los componentes de los liposomas al pH ácido del estómago y a la acción de las enzimas digestivas y sales biliares en el intestino. Los liposomas convencionales no consiguen proteger la sustancia encapsulada de la degradación en el tracto gastrointestinal. Los liposomas estéricamente estabilizados pueden soportar estas condiciones, pero consecuentemente son demasiado estables en el intestino y no liberan el fármaco encapsulado para que sea absorbido. Una solución sería el diseño de liposomas con estabilidad dependiente del tiempo, o la administración de los liposomas dentro de una cápsula que los liberara al llegar al intestino. Es posible que la mera presencia de los lípidos que constituyen su membrana aumente la absorción en el intestino, ya que las vesículas mezcladas con micelas favorecerían el paso de moléculas hidrofóbicas a través del epitelio intestinal (Lasic, 1998).
- Vía oftálmica: los fármacos aplicados de forma tópica sobre la superficie ocular son rápidamente eliminados por diferentes mecanismos (lacrimación, dilución por la lágrima y renovación de la misma) lo que resulta en una baja biodisponibilidad ocular del fármaco. La utilización de liposomas mejora considerablemente la biodisponibilidad del fármaco, y así se han obtenido buenos resultados con liposomas que contenían genciclovir, siendo la permeabilidad corneal del fármaco el doble cuando se administra en forma liposomal que en forma de solución, y con distribución en diferentes estructuras oculares, como esclera, córnea y humor vítreo (Shen y Tu,

2007). Una formulación de tropicamida a base de liposomas cargados positivamente produjo un significativo incremento de la absorción transcorneal del fármaco. La mayor afinidad de los liposomas cargados positivamente por los tejidos oculares se ha atribuido a que la superficie corneal está cargada negativamente (Nagarsenker *et al.*, 1999).

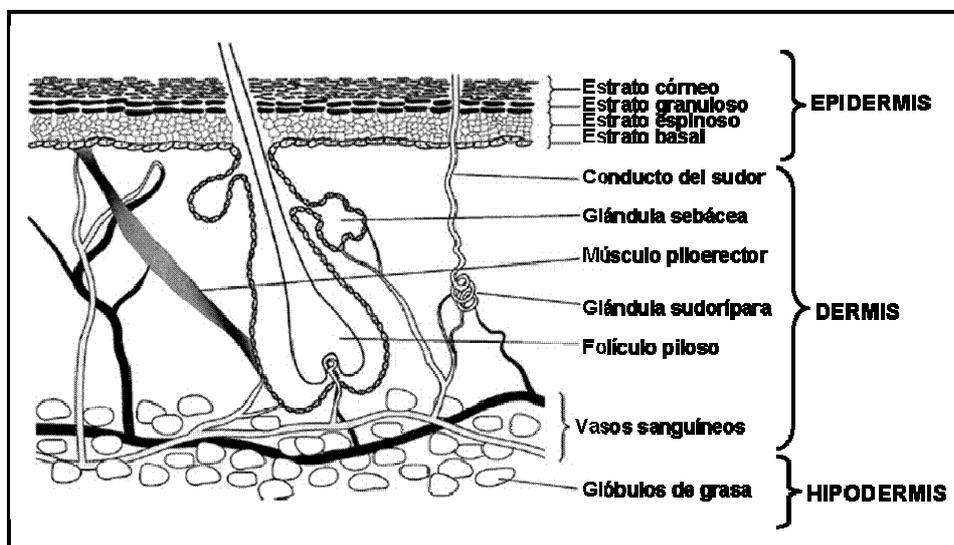
- Tópica: ésta vía ha sido ampliamente estudiada para la liberación dérmica y transdérmica mediante transportadores, como los liposomas, tanto de fármacos como de activos cosméticos. Por ser ésta la vía de administración elegida para las formulaciones preparadas en este trabajo se realizará a continuación una descripción más detallada.

### **3.6. Sistemas vesiculares de aplicación tópica**

La piel puede ofrecer varias ventajas como ruta de administración de fármacos, aunque su naturaleza de barrera dificulta la penetración y el paso a través de ella para la mayoría de las sustancias. Desde los primeros estudios en los años 80 (Mezei y Gulasekharam, 1980, 1982) el interés por las vesículas lipídicas como una herramienta para mejorar la administración tópica de fármacos ha ido en aumento, y así se han desarrollado múltiples tipos de sistemas vesiculares como liposomas, niosomas (vesículas a base de surfactantes no iónicos), etosomas (fosfolípidos, etanol a una concentración entre el 20% y el 45% y agua) y vesículas elásticas deformables o transferosomas (fosfolípidos y surfactantes). Las vesículas actúan como transportadores de fármacos pudiendo controlar su liberación de forma activa, produciendo fundamentalmente dos efectos que van a depender del tipo de vesícula y su composición. Estos efectos son la localización y formación de un depósito de los fármacos dermatológicamente activos que se usan a nivel tópico, y potenciar la vía transdérmica para fármacos de uso sistémico, evitando el metabolismo de primer paso (Sinico y Fadda, 2009).

### 3.6.1. Estructura de la piel

La piel forma una eficiente barrera entre el organismo y el ambiente que lo rodea, previniene la entrada de patógenos, protege frente a agresiones físicas y químicas e impide la pérdida no regulada de agua e iones de los tejidos internos. La piel humana está formada por una serie de capas que a veces son atravesadas por folículos pilosos y conductos de glándulas sebáceas y sudoríparas (Figura 9). Las tres capas fundamentales de la piel son, de adentro afuera, la hipodermis, constituida por la grasa subcutánea, la dermis, formada por tejido conectivo, y la epidermis, la capa más externa, estratificada a su vez en varias capas y avascular (El Maghraby *et al.*, 2008).



**Figura 9. Representación esquemática de una sección vertical de piel humana (Tomada de El Maghraby *et al.*, 2008)**

La dermis está formada por fibras de elastina y colágeno y un gel interfibrilar de glicosaminoglicanos, sal y agua. Posee vasos sanguíneos y linfáticos así como terminaciones nerviosas, unidades pilosebáceas (folículo piloso y glándula sebácea) y las glándulas sudoríparas que se encuentran inmersas en ella. Los folículos pilosos así como los conductos sudoríparos conectan directamente con el exterior al abrirse en la superficie de la piel, y constituyen la ruta apendical para el fenómeno de permeación de la piel, como se verá más adelante (El Maghraby *et al.*, 2008).

La epidermis no contiene vasos sanguíneos, por lo que los nutrientes y las sustancias de desecho tienen que difundir a través de la confluencia entre dermis y epidermis para que ésta se mantenga viable. El tipo celular más abundante en la epidermis es el queratinocito. La epidermis está estratificada y en ella podemos distinguir cinco capas bien diferenciadas que son, empezando por la más interna, el estrato germinativo o capa basal, donde se localizan los melanocitos, células productoras del pigmento melanina que absorbe la radiación ultravioleta antes de que pueda llegar al núcleo de las células y dañe al ADN. A la capa basal le siguen el estrato espinoso, el estrato granuloso, el estrato lúcido y el estrato córneo, constituido por queratinocitos muertos (corneocitos queratinizados), unas 15 o 20 capas, que varía de espesor según el grado de hidratación de la piel (Popa, 2009)

El estrato córneo (SC) se considera la verdadera barrera física para el paso transdérmico de la mayoría de las sustancias. Los corneocitos se encuentran unidos por una matriz extracelular constituida por ácidos grasos, colesterol y ceramidas de cadena larga, constituyendo una estructura que se ha denominado “ladrillos y cemento”, donde los ladrillos son las células y el cemento la matriz rica en lípidos. Esta arquitectura es la responsable de la efectiva función de barrera que cumple el estrato córneo (Sinico y Fadda, 2009).

### **3.6.2. Liposomas para administración tópica y transdérmica**

Las primeras investigaciones de Mezei y Gulasekharam en 1982 utilizando liposomas para la aplicación tópica de acetónido de triamcinolona pusieron de manifiesto que se conseguían mayores concentraciones del fármaco en epidermis y dermis, mientras que los niveles sistémicos eran más bajos que cuando se aplicaba mediante formulaciones convencionales con la misma concentración de fármaco (Mezei y Gulasekharam, 1982). Las investigaciones llevadas a cabo desde entonces por diferentes grupos de investigación hacen evidente el hecho de que los liposomas clásicos o convencionales son poco efectivos en la administración transdérmica de fármacos ya que no penetran en capas profundas de la piel. A pesar de que existen algunas evidencias de que en determinados casos la sustancia activa administrada en forma de liposomas es capaz de pasar a través de las capas de la piel alcanzando la circulación sistémica, la mayoría de estudios coinciden en que este tipo de

liposomas favorecen el acúmulo del fármaco en la piel y sus anejos, y por tanto se puede aprovechar esta característica para el tratamiento tópico de afecciones locales, reduciéndose el paso al resto del organismo y por consiguiente los efectos secundarios (Elsayed *et al.*, 2007; El Maghraby *et al.*, 2008). Con este fin se han encapsulado en liposomas fundamentalmente tres tipos de principios activos: anestésicos locales, diferentes corticoesteroides y retinoides, mejorando el acúmulo en la piel en relación a la aplicación en formulaciones tópicas convencionales (Elsayed *et al.*, 2007; Sinico y Fadda, 2009).

Tanto la composición lipídica, el método de preparación y el estado termodinámico de las bicapas como las propiedades fisico-químicas (tamaño de partícula, carga y lamelaridad de las vesículas) han demostrado ser factores que influyen en el comportamiento y efectividad de los liposomas cuando se aplican tópicamente (Bouwstra y Honeywell-Nguyen, 2002). Parece ser que a medida que se reduce el tamaño de partícula se ve favorecido el paso hasta capas más profundas de la piel. Sin embargo se ha visto que este efecto es mayor con vesículas de tamaño intermedio en vez de con las más pequeñas, lo que sugiere que existe un tamaño de partícula óptimo para una buena liberación tópica (Duplessis *et al.*, 1994; Verma *et al.*, 2003).

Los liposomas convencionales también son útiles en el direccionamiento de agentes terapéuticos y cosméticos hacia los anejos cutáneos, especialmente a las unidades pilosebáceas, y así se han conseguido mejores resultados al tratar el acné con preparaciones vesiculares que cuando se hacía con otro tipo de formulaciones (El Maghraby *et al.*, 2008).

### **3.6.3. Vías de entrada y mecanismo de acción de los liposomas**

La cesión a nivel dérmico y transdérmico requiere una eficiente penetración de los compuestos activos a través de la barrera de la piel mediante un proceso de difusión pasiva. Aplicada sobre la superficie de la piel, una molécula puede seguir dos rutas: la transapendicular y la transepidermica.

La ruta transapendicular incluye en transporte a través de las glándulas sudoríparas y los folículos pilosos con sus respectivas glándulas sebáceas. A pesar de que esta ruta era

considerada de menor importancia, se ha visto que las unidades pilosebáceas pueden contribuir significativamente en la cesión tópica de fármacos actuando como una vía de baja resistencia para los iones y moléculas polares grandes que difícilmente pueden pasar a través del estrato córneo. Además, los folículos pilosos están asociados a diferentes patologías, como acné, alopecia y tumores severos de piel, de manera que se puede localizar la acción del fármaco en sus células diana utilizando esta ruta.

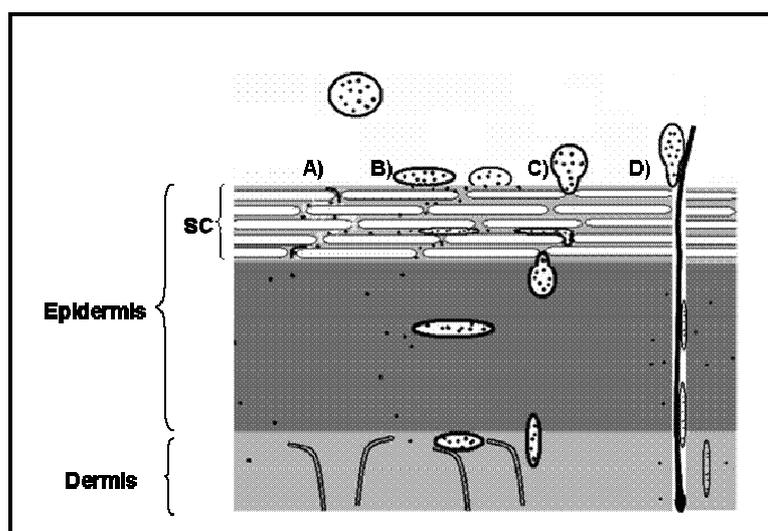
En la ruta transepidérmica podemos distinguir dos vías, la transcelular, en la que la sustancia activa atraviesa los corneocitos y la matriz lipídica, y la intercelular, en la que el paso es a través de los espacios libres entre los corneocitos, y que es considerada la principal vía de permeación para la mayoría de sustancias (Sinico y Fadda, 2009).

Para la donación del fármaco a la piel por parte del liposoma que lo tiene encapsulado se han descrito varios mecanismos (Elsayed *et al.*, 2007) (Figura 10):

- Penetración de vesículas intactas: la posibilidad de que las vesículas penetraran en la piel de forma intacta fue sugerida por Mezei y Gulasekharam. Así, apuntaban a que los liposomas, al ser grandes, no eran capaces de entrar en los capilares sanguíneos, permaneciendo en la dermis como un reservorio de fármaco. Es difícil de imaginar que las vesículas intactas pudieran pasar a través del tan bien empaquetado estrato córneo. Es por ello que se han realizado múltiples investigaciones para comprobar esta hipótesis. Mediante microscopía electrónica se han detectado liposomas intactos en la dermis, sin embargo, los liposomas detectados eran todos unilaminares, mientras que sobre la piel se habían aplicado liposomas multilaminares. Parece ser que esto es debido a que durante el fenómeno de penetración las vesículas multilaminares pierden sus capas más externas (Foldvari *et al.*, 1990). Se podría pensar por tanto que a menor tamaño de partícula se facilita la entrada de ésta a capas profundas de la piel. Sin embargo el hecho de que partículas con un tamaño intermedio produzcan un depósito mayor que las más pequeñas es un índice de que los liposomas no pueden penetrar la piel intactos (Duplessis *et al.*, 1994), y sólo podrán hacerlo en caso de piel no sana

que tenga alterada la estructura del estrato córneo (El Maghraby *et al.*, 2008), teoría que en la actualidad es generalmente aceptada.

- Penetración aumentada: el hecho de que los liposomas no puedan atravesar la piel sin alterarse sugería este segundo mecanismo de acción, el efecto de penetración aumentada. Así, los liposomas entran en el estrato córneo por adhesión sobre la superficie de la piel, de manera que se mezclan, funden y desestabilizan la matriz lipídica. Por este motivo actúan como potenciadores de la penetración, ya que debilitan la estructura lipídica del estrato córneo y al originar una estructura intercelular peor empaquetada se altera la función de barrera que esta capa presenta a la entrada de la sustancia activa, con un subsecuente aumento del coeficiente de partición del fármaco en la piel. En este tipo de mecanismo tiene gran importancia la composición lipídica de los liposomas, y parece ser que los liposomas con una composición heterogénea, es decir, aquellos que van a presentar en coexistencia diferentes propiedades de fluidez en su membrana, son útiles para potenciar la penetración de la sustancia activa (Verma *et al.*, 2003).
- Adsorción y fusión con el estrato córneo: según este mecanismo, los liposomas se adsorben sobre el estrato córneo de manera que se forma una estructura lamelar desigual sobre la superficie de los corneocitos más externos. Esto puede aumentar la permeación de las moléculas liberadas, produciendo una transferencia directa del fármaco a la piel. Sin embargo, el colapso de las vesículas sobre la superficie de la piel formaría una barrera adicional que reduciría el paso de sustancias hidrofílicas encapsuladas en el compartimento acuoso central del liposoma.



**Figura 10. Esquema de los distintos mecanismos de acción de los liposomas en la cesión del principio activo a la piel: A) Potenciación de la penetración; B) Adhesión y fusión con el SC; C) Entrada de liposomas intactos; D) Ruta transpendicular**

#### **3.6.4. Uso cosmético de los liposomas**

El estado de hidratación de la piel es de considerable interés desde un punto de vista cosmetológico, dermatológico y farmacéutico. En cosmética, el grado de hidratación de la piel, concretamente del estrato córneo, está directamente relacionado con su apariencia, como por ejemplo una textura lisa. Desde un punto de vista dermatológico la hidratación de la piel es indicativo de piel sana, y desde el punto de vista farmacéutico, el contenido en agua del estrato córneo va a condicionar la permeabilidad de los fármacos administrados tópicamente (Esposito *et al.*, 2007).

Unos de los vectores cosméticos de mayor incidencia en la actualidad son los liposomas, y son numerosos los trabajos científicos que les atribuyen una actividad favorable sobre la hidratación del estrato córneo, debido a su semejanza estructural con las membranas celulares (Bouwstra *et al.*, 2003; Esposito *et al.*, 2007).

Asimismo, si la humedad cutánea está regulada fundamentalmente por los lípidos del estrato córneo, parece lógico que la composición lipídica de una formulación liposómica podría afectar al grado de hidratación de la piel. Existen evidencias de que los liposomas y

las formulaciones liposomiales están implicados en el fenómeno de hidratación de la piel, debido al potencial efecto oclusivo de la película lipídica depositada en la superficie cutánea (Betz *et al.*, 2005). Los lípidos que constituyen el liposoma tienen efecto hidratante y restaurador, de manera que las preparaciones liposomiales reducen la aspereza de la piel al interaccionar con los corneocitos y la matriz lipídica intercelular, proporcionando una piel más suave y uniforme. En la actualidad existen en el mercado numerosas cremas hidratantes y antienvjecimiento a base de liposomas (Kaur *et al.*, 2007).

Aparte de la acción beneficiosa aportada por los lípidos que conforman el liposoma, la encapsulación de diferentes agentes de acción cosmética se ve favorecida por el fenómeno de depósito de sustancia activa que genera el liposoma. Estas formulaciones son importantes para la aplicación en cosmética ya que mejoran la estabilidad y la tolerancia de algunos ingredientes, como ácidos grasos, vitaminas, o antioxidantes que se encuentran encapsulados dentro de las vesículas, así como mejoran la eficacia y tolerancia de los filtros solares UV (Nohynek *et al.*, 2007).

El papel de los antioxidantes como agentes terapéuticos para combatir el envejecimiento cutáneo y el fotoenvejecimiento se estudiará más profundamente en el punto 4.1.2. del capítulo correspondiente de esta memoria.

### **3.7. Arqueosomas**

Se utiliza este término para definir a los liposomas elaborados con lípidos polares procedentes de las membranas de arqueas. Como se comentó anteriormente, estos lípidos son característicos de estos microorganismos y, debido a su naturaleza química, poseen unas propiedades que los hacen más estables y resistentes frente a diferentes tipos de degradación, propiedades que se ponen también de manifiesto en las vesículas obtenidas con ellos (Gambacorta *et al.*, 1995). Así, las cadenas alquílicas saturadas les proporcionan resistencia frente a la oxidación, y la naturaleza éter del enlace entre las cadenas y el glicerol imparte estabilidad frente a la hidrólisis química y la acción de esterases, lo que hará que sean más estables durante el almacenamiento. Estas características permiten la elaboración de

arqueosomas en condiciones relativamente duras, como bajos valores de pH o la presencia de oxígeno (Choquet *et al.*, 1992).

Diferentes grupos de investigadores han elaborado este tipo de liposomas con el fin de establecer un modelo para el estudio del comportamiento de estos lípidos en las membranas de arqueas, así como para estudiar sus propiedades fisicoquímicas, tales como temperatura de transición y permeabilidad a solutos (Yamauchi *et al.*, 1993; Elferink *et al.*, 1994; J. van de Vossenberg *et al.*, 1999).

En 1986, Ring y colaboradores realizaron unos estudios iniciales acerca de la estabilidad y permeabilidad de los liposomas obtenidos a partir de lípidos tetraéter de una arquea termoacidófila e introdujeron por primera vez la posibilidad de usar los arqueosomas como vehículo de sustancias activas (Ring *et al.*, 1986).

Posteriormente, en 1992, Patel y colaboradores utilizaron los lípidos polares de diferentes arqueas metanógenas (*Methanococcus voltae*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanosarcina mazei*, *Methanospirillum hungatei* y *Methanosaeta concilii*) que contenían una composición lipídica distinta entre sí, presentando diferentes proporciones de la estructura diéter y tetraéter en sus membranas. Las vesículas obtenidas fueron unilaminares y presentaban una distribución homogénea de tamaños, excepto para las obtenidas a partir de los lípidos de *M. hungatei*, que formaron arqueosomas muy heterogéneos tanto en forma como en tamaño. El tamaño de los arqueosomas fue diferente según la procedencia de los lípidos. Con los extractos lipídicos de *M. voltae*, *M. mazei*, *M. concilii* y de *M. jannaschii* crecido a 50° C se obtuvieron vesículas unilaminares con tamaño inferior a los 100 nm, mientras que eran de tamaño mayor en el caso de los lípidos extraídos de *M. jannaschii* crecido a 65° C. Los lípidos polares de *M. hungatei* y de *M. jannaschii* crecido a 65° C, los cuales están constituidos a base de núcleos lipídicos de estructura tetraéter, son los que produjeron vesículas de mayor tamaño. Esto parece indicar que la presencia de lípidos tetraéter promueve la formación de vesículas más grandes, probablemente debido a la forma en la que se empaquetan este tipo de lípidos en la membrana. Además, las diferencias en la composición de grupos polares de los lípidos también puede influenciar el tamaño de partícula (Choquet *et al.*, 1992).

A la vista de estos resultados, se realizó un estudio más exhaustivo acerca de la estabilidad de los arqueosomas, utilizando para ello una amplia gama de arqueas, tomando representantes de los tres grupos fenotípicos, y así se incluyeron en el estudio metanógenas (*Methanococcus voltae*, *Methanococcus jannaschii*, *Methanosarcina mazei*, *Methanospirillum hungatei*, *Methanosaeta concilii*, *Methanobrevibacter smithii*, *Methanosphaera stadtmanae* y *Methanobacterium espanolae*), halófilas extremas (*Halobacterium cutirubrum* y *Natrobacterium magadii*) y termoacidófilas (*Thermoplasma acidophilum* y *Sulfolobus acidocaldarius*).

A partir de los extractos de lípidos polares se obtuvieron, mediante extrusión, arqueosomas fundamentalmente unilaminares de variados tamaños, excepto para *S. acidocaldarius*, cuyos lípidos no formaron vesículas, y *T. acidophilum* que presentó entre un 15 y un 20% de liposomas oligolamelares.

Tras un período de entre 10 y 18 meses de almacenamiento a 4 y 25° C y diferentes valores de pH, el diámetro medio de la mayoría de arqueosomas permanecía constante, indicando que no se habían producido fenómenos de fusión o agregación y que por tanto las vesículas eran estables, excepto para *M. espanolae* donde el tamaño aumentó considerablemente. Respecto a los cambios en el pH, los arqueosomas demostraron ser más resistentes a la pérdida de la sustancia encapsulada que los liposomas convencionales, excepto para los obtenidos con los lípidos polares de *N. magadii*. Todos los arqueosomas resultaron ser estables a la acción hidrolítica de la fosfolipasa A<sub>2</sub>, B y la lipasa pancreática. En cuanto al efecto que la temperatura produce sobre las vesículas, los arqueosomas formados por lípidos con estructura tetraéter fueron los más estables cuando se incubaban a altas temperaturas. De este estudio no se puede concluir, al menos aparentemente, que haya una correlación entre la estabilidad de los arqueosomas y el ambiente de donde se aisló la correspondiente arquea (Choquet *et al.*, 1994).

Debido a la estabilidad de algunos arqueosomas frente a altas temperaturas, se pensó en la posibilidad de poder esterilizarlos mediante calor, lo cual aumentaría sus aplicaciones prácticas en el campo de la medicina y la vehiculización de fármacos. Así, se usaron para encapsular carboxifluoresceína arqueosomas de los obtenidos a partir de los lípidos polares de

algunas de las especies usadas en el estudio anterior y fueron sometidos a un proceso de esterilización en autoclave, 15 min a 121° C. Se determinó la pérdida de carboxifluoresceína encapsulada mediante fluorescencia, así como la distribución de tamaño en las suspensiones de arqueosomas después del proceso de esterilización.

El diámetro medio de las vesículas no se vio alterado por este proceso. Los arqueosomas de *T. acidophilum*, que contienen una gran proporción de lípidos tetraéter (90%) fueron los más estables durante el autoclavado, conservando el 92% de la carboxifluoresceína encapsulada. Estabilidades similares se observaron en el caso de *M. espanolae*, cuyos lípidos también tienen una alta proporción de tetraéteres. En general, los arqueosomas menos estables durante la esterilización fueron los obtenidos de mezclas de lípidos que no contienen tetraéteres (*M. mazei*) o que los contienen en baja proporción (*M. stadtmannae*). La estabilidad termal moderada de los arqueosomas de *M. voltae*, que no contiene lípidos tetraéter, puede deberse a la presencia de fosfolípidos cargados negativamente, ya que en liposomas éster la presencia de carga superficial influencia la pérdida de sustancia encapsulada. En todas las formulaciones podría incrementarse la estabilidad introduciendo en la composición colesterol en alta concentración, ya que este tiene un efecto positivo al estabilizar la membrana. De hecho, la utilización de colesterol en los arqueosomas de *M. mazei* hizo que la pérdida de carboxifluoresceína, un 86% sin colesterol, se redujera a medida que aumentaba la concentración de colesterol, siendo del 55% al usar una proporción molar de lípido/colesterol 2:1,25 (Choquet *et al.*, 1996).

### **3.7.1. Arqueosomas como adyuvante y vehículo de vacunas**

Desde los inicios de la investigación acerca de los arqueosomas como vehículos para la encapsulación de sustancias activas, prácticamente todos los estudios realizados se limitan al grupo candiense del Dr. Sprott, los cuales han direccionado sus investigaciones hacia el campo de la inmunología desarrollando una amplia actividad científica en la utilización de arqueosomas como adyuvantes de vacunas y su uso para la encapsulación de antígenos.

Los primeros estudios realizados mostraron que arqueosomas con diferente composición lipídica eran capaces de provocar una fuerte respuesta de anticuerpos frente a la albúmina

de suero bovino encapsulada en ellos, proporcionando unos resultados similares a los provocados con el adyuvante de Freund, mientras que la administración del antígeno en PBS originaba una ligera reacción humoral, confirmando así su escaso potencial inmunógeno. Estos resultados se compararon con los del antígeno encapsulado en tres formulaciones diferentes de liposomas convencionales, los cuales tenían un efecto inmunoestimulador mucho más pequeño que el de los arqueosomas (Sprott *et al.*, 1997). La habilidad de diferentes tipos de arqueosomas para originar una fuerte respuesta humoral debe residir en la particular estructura de sus lípidos que no sólo confiere estabilidad a las membranas, sino que también facilita el efecto de depósito del antígeno. Así, se ha visto que el antígeno debe estar físicamente asociado al arqueosoma, ya que la respuesta inmune se pierde cuando se administran por separado el antígeno y los arqueosomas, en este caso vacíos, lo que sugiere que la encapsulación asegura la cesión del antígeno y el arqueosoma a la misma célula presentadora de antígeno, asegurando un correcto procesamiento y presentación del antígeno. La superioridad de los arqueosomas en la inducción de la respuesta humoral ha sido puesta de manifiesto con diferentes tipos de antígenos y por varias vías de administración, como la intraperitoneal, intramuscular y subcutánea (Krishnan *et al.*, 2000).

La capacidad adyuvante de los arqueosomas no sólo se debe a un transporte más eficiente del antígeno hasta el lugar de acción, sino a la propia acción inmunoestimuladora del arqueosoma. Así, el tratamiento de macrófagos con arqueosomas vacíos aumenta la expresión de marcadores coestimuladores (B7.1 y B7.2) así como de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC II) en la superficie celular. Además, la administración intraperitoneal potencia el reclutamiento y activación de las células presentadoras de antígeno (APC), como células dendríticas y macrófagos, en el lugar de inyección, las cuales presentan aumentada la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) (Krishnan *et al.*, 2001). El mecanismo por el cual los arqueosomas *per se* tienen un efecto inmunoestimulador no está del todo claro. Existen numerosos ejemplos de componentes bacterianos que sirven como agonistas para activar los receptores de tipo Toll (TLR) presentes en la superficie de las células presentadoras de antígeno, y cuya activación son la señal de alarma para activar el sistema inmune innato. Es probable que en la

inmunoestimulación mediada por arqueosomas estén también implicados este tipo de receptores. El por qué los lípidos de arquea, componentes de superficie de un grupo de microorganismos no patógenos, sirvan como señal de alarma es todavía una materia que genera especulación, pero refleja la capacidad de ser reconocidos como extraños o de mimetizar los componentes superficiales de los patógenos (G.D. Sprott *et al.*, 2003). Así, la fagocitosis del arqueosoma va a estar mediada por diferentes tipos de receptores, tales como receptor de manosa, receptor endocítico CD 36, que reconoce la fosfatidilserina, y receptores que reconocen fosfolípidos. Esto sugiere que según los grupos polares presentes en los lípidos que conforman el arqueosoma la interacción con la célula fagocitaria va a ser diferente (G. D. Sprott *et al.*, 2003).

Una vez fagocitados, los arqueosomas tienen la capacidad de ceder el antígeno encapsulado tanto al MHC II como al MHC I para la presentación de antígeno. Así, la actividad adyuvante fue más intensa con arqueosomas de *Halobacterium salinarum*, mientras que los de *Methanobrevibacter smithii* y *Thermoplasma acidophilum* originaban títulos de anticuerpos más bajos, aunque superiores en los tres casos a los producidos por el aluminio y los liposomas convencionales. Parece posible que arqueosomas muy estables por su alto contenido en caldarqueol permitan un procesamiento del antígeno menor en el fagosoma para la presentación por el MHC II, favoreciendo la presentación por el MHC I, que por su parte provoca la activación de la inmunidad celular mediada por los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (G. D. Sprott *et al.*, 2003). Si comparamos los títulos e isotipos de anticuerpos producidos por arqueosomas con los de otros adyuvantes, como el aluminio, se observa que los primeros producen un fuerte título de IgG1, IgG2a e IgG2b, mientras que el segundo origina un pequeño título de IgG2a, por lo que los arqueosomas van a provocar una fuerte activación antígeno-específica de los tipos celulares Th1 y Th2 (Krishnan *et al.*, 2000).

La gran activación de células T CD8<sup>+</sup> que los arqueosomas provocan con diferentes tipos de antígenos (ovoalbúmina, toxina colérica, listeriolisina de *Listeria monocytogenes*, antígenos peptídicos, etc) es muy superior en magnitud a la provocada por otros sistemas de vehiculización, tales como los liposomas convencionales, lo que hace de los arqueosomas un vehículo mejorado para la utilización en vacunación.

Uno de los aspectos más importantes en la administración de vacunas es su capacidad para generar una memoria inmunológica a largo plazo. Por este motivo se estudió la capacidad de diferentes tipos de arqueosomas para generar este tipo de memoria. Así, muchos de ellos aplicados en modelos murinos proporcionaban un mantenimiento a largo plazo de los títulos de anticuerpos frente al antígeno encapsulado, con tiempos superiores a los 6 meses. Además, la administración del antígeno sin adyuvante producía *in vivo* una gran respuesta de rellamada después de más de 300 días de la primera dosis, de manera que para la vacunación parecen ser suficientes dos dosis, una inicial y una recuerdo a los 21 días, para el mantenimiento de los títulos de anticuerpos, de modo que una tercera dosis no produjo ulteriores beneficios (Krishnan *et al.*, 2007). La activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> induce la activación de los linfocitos T citotóxicos (CTL), lo cual es importante para proporcionar protección frente a infecciones intracelulares y la aparición de tumores. Parece ser que existe una correlación inversa entre los tipos de arqueosomas que favorecen la respuesta de anticuerpos y los que promueven la respuesta CTL, lo cual es lógico si tenemos en cuenta las dos vías que se activan por arqueosomas para la presentación de antígeno. Se ensayaron arqueosomas de nueve especies diferentes, y aunque todos ellos provocaban una fuerte respuesta CTL primaria, sólo 2, *Methanobrevibacter smithii* y *Thermoplasma acidophilum*, ricas en caldarqueol, originaban una fuerte respuesta después de 50 semanas desde el tratamiento. Esta capacidad para provocar fuertes respuestas CTL frente al antígeno puede ser aprovechada para desarrollar vacunas protectoras frente a determinados tipos de cáncer (Krishnan y Sprott, 2004).

Es importante destacar la biocompatibilidad de los arqueosomas, ya que los adyuvantes y vacunas de uso potencial en humanos deberán ser seguros y carecer de efectos tóxicos. Las arqueas son un grupo de microorganismos ambientales, no patógenos, no asociados con endotoxinas ni algún otro metabolito tóxico, por lo que parece presumible aceptar que los arqueosomas van a carecer de toxicidad. Unos primeros estudios de toxicidad *in vivo* (modelo murino) indican que la administración de arqueosomas unilaminares con diferente composición lipídica por vía intravenosa y oral era bien tolerada y carecía de efectos tóxicos

(Omri *et al.*, 2003) . Además, en ratón no hubo detección significativa de anticuerpos anti-arqueosomas después de repetidas inyecciones (Patel *et al.*, 2002).

Por todas las características descritas hasta el momento, alta estabilidad, inocuidad, capacidad para originar una respuesta tanto humoral como celular, así como proporcionar una potente memoria inmunológica, los arqueosomas se presentan como unos prometedores transportadores de antígenos para el desarrollo de nuevas vacunas (Krishnan y Sprott, 2008).

### **3.7.2. Otras aplicaciones de los arqueosomas**

Además de los estudios realizados por el grupo canadiense, el grupo de investigación del Dr. Ramos-Cormenzana de la Universidad de Granada inició unos primeros estudios sobre arqueosomas obtenidos a partir de arqueas halófilas extremas en los años 90 (Arias, 1993) y en la actualidad cuenta con una línea de investigación en esta materia. En este sentido, en un estudio preliminar se obtuvieron arqueosomas de 4 especies del género *Haloarcula* (*H. californiae*, *H. marismortuis*, *H. hispanica* y *H. sinaiensis*), dos cepas de *Halobacterium salinarum*, tres cepas de *Halococcus morrhuae* y 5 especies del género *Halorubrum* (*H. coriense*, *H. saccharovorum*, *H. sodomense*, *H. tebenquichense* y *H. trapanicum*).

Los más adecuados por sus características de encapsulación y estabilidad fueron los obtenidos a partir de los lípidos polares de *H. californiae*, *H. salinarum*, *H. morrhuae* y *H. coriense*. En ellos se utilizó, como principio activo a encapsular dipropionato de betametasona, un glucocorticoide de potencia moderada con actividad antiinflamatoria e inmunosupresora utilizado en el tratamiento tópico de diferentes afecciones (Cuerda-Correa, 2005).

Un estudio más profundo fue llevado a cabo con los arqueosomas obtenidos a partir de lípidos polares de *H. salinarum*, concretamente la cepa CECT 396, con el fin de probar su eficacia como sistemas de liberación tópica del dipropionato de betametasona y compararla con la de liposomas convencionales de fosfatidilcolina. En cuanto a la caracterización, no hubo diferencias sustanciales entre ambos tipos de vesículas, salvo por el valor de carga de la superficie (potencial zeta), que siendo negativo tanto en arqueosomas como en liposomas

convencionales, era muy elevado en el caso de los arqueosomas, lo que hace esperar un mejor comportamiento de estabilidad. Se investigó también el comportamiento reológico de ambas formulaciones con el fin de establecer si la composición lipídica influye en la naturaleza viscosa o elástica del sistema. Los liposomas convencionales presentaron una estructura mucho más compacta con un comportamiento prevalentemente elástico, mientras que los arqueosomas fueron más fluidos debido a una estructura menos rígida.

Por último se evaluó la capacidad de los arqueosomas para transportar el principio activo penetrando a través de la piel. Para ello se realizaron estudios de cesión *in vitro* a través de piel de cerdo. Los arqueosomas produjeron un acúmulo de dipropionato de betametasona en la piel mayor que los liposomas convencionales, tanto a nivel del estrato córneo como de la epidermis viable. Este mayor acúmulo producido por los arqueosomas puede ser debido a la mayor fluidez de las vesículas detectada en el estudio reológico, ya que resultados tanto *in vivo* como *in vitro* han demostrado que las vesículas con lípidos en estado de cristal líquido tienen una mayor capacidad para interactuar con la piel que las vesículas en estado de gel. Estos resultados presentan a los arqueosomas como un ventajoso sistema para la vehiculización de fármacos de uso tópico (Gonzalez-Paredes *et al.*, 2009).

Existe también un estudio preliminar sobre la estabilidad de los arqueosomas bajo condiciones similares a las encontradas en el tracto gastrointestinal. Se midió la pérdida de sustancia encapsulada en arqueosomas obtenidos con los lípidos polares de diferentes especies (*Methanosarcina mazei*, *Methanobacterium espanolae* y *Thermoplasma acidophilum*) después de ser sometidos a diferentes valores de pH ácido, entre 1,5 y 6,2, acción de lipasas y bilis humana simulada (BHS).

Los arqueosomas de *M. mazei* resultaron ser los más inestables a todos los valores de pH ensayados, mientras que los lípidos de las otras dos especies proporcionaban vesículas más estables, estabilidad que se veía fuertemente incrementada cuando el valor de pH era superior a 2.

La estabilidad frente a la acción de la lipasa fue, en los tres casos, superior que cuando se trataba con BHS. De todos ellos, los lípidos de *T. acidophilum* originaron los arqueosomas

más estables, con pérdida de sólo un 15% de la sustancia encapsulada tras el tratamiento con BHS. La estabilidad que determinados tipos de arqueosomas presentan *in vitro* frente a condiciones gastrointestinales sugieren que pueden convertirse también en sistemas de transporte de fármacos por vía oral (Patel *et al.*, 2000).

## **4. ANTIOXIDANTES: LOS RESIDUOS DEL ACEITE DE OLIVA COMO FUENTE DE ANTIOXIDANTES DE ORIGEN NATURAL**

En los últimos tiempos el interés de los antioxidantes ha ido creciendo debido al papel protector que desempeñan frente a la aparición de ciertas enfermedades con alta incidencia y mortalidad en nuestros días, tales como las enfermedades cardiovasculares, las neurodegenerativas y determinados tipos de cáncer. Además del más o menos reciente interés clínico que han despertado, los antioxidantes son importantes en distintos sectores industriales, como el alimentario, farmacéutico y cosmético pues se usan en ellos con diferentes fines.

### **4.1. Antioxidantes, radicales libres y estrés oxidativo**

Para definir qué es un antioxidante primero es necesario conocer el término radical libre. Un radical libre es un átomo o molécula que contiene uno o más electrones desapareados, o que lo convierte en una molécula altamente inestable, con gran capacidad para generar nuevos radicales libres al reaccionar con otras moléculas. Una vez generados, los radicales libres tienden a aparear ese electrón, con el fin de estabilizarse, bien uniéndose a otro radical libre, bien cediendo o tomando un electrón de una molécula adyacente no radicalaria. En el último caso la molécula atacada se convierte en un radical libre, iniciándose una reacción en cadena por la que se pueden formar numerosos radicales libres nuevos (Halliwell, 1994). En el organismo se generan continuamente radicales libres por los procesos normales del metabolismo, muchos de ellos incluso desempeñan una función fisiológica, como por ejemplo el radical superóxido, que es producido por las células fagocíticas del sistema inmune durante la reacción inflamatoria con el fin de eliminar potenciales patógenos, o el óxido nítrico, que tiene la función de relajar la musculatura lisa de los vasos. Podemos distinguir dos tipos de radicales libres endógenos, las especies reactivas de oxígeno (ROS) y las especies reactivas de nitrógeno (RNS), dentro de las cuales encontramos radicales propiamente dichos y agentes oxidantes. La tabla 1 refleja las principales especies reactivas que se encuentran en nuestro organismo (Halliwell, 1996).

**Tabla 1. Especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) que se producen de forma endógena en el organismo**

	Radicales	No radicales
ROS	Superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ) Hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) Peroxilo ( $RO_2$ )	Peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) Oxígeno molecular singlete ( $O_2$ )
RNS	Ácido nítrico ( $NO^{\bullet}$ ) Dióxido de nitrógeno ( $NO_2^{\bullet}$ )	Ácido nitroso ( $HNO_2$ ) Tetróxido de dinitrógeno ( $N_2O_4$ ) Peroxinitritos alquílicos ( $ROONO$ )

Además existen diferentes factores exógenos que inducen la formación en el organismo de ROS y RNS, tales como la radiación ultravioleta del sol (UV), radiación ionizante, metales pesados, contaminantes ambientales, xenobióticos tóxicos como pesticidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos o incluso fármacos. El metabolismo de estas sustancias genera metabolitos que tienen una toxicidad aún mayor y que produce una disminución de los antioxidantes celulares (Limon-Pacheco y Gonsebatt, 2009).

La mayoría de las moléculas del organismo no son radicales, pero pueden ser atacadas por ellos cuando se generan. De especial interés es el ataque de los radicales libres a los ácidos grasos presentes en membranas y lipoproteínas iniciando la reacción en cadena de la peroxidación lipídica, la cual está implicada en el desarrollo de la aterosclerosis. El radical sustrae un átomo de hidrógeno de la cadena del ácido graso poliinsaturado, lo que deja un átomo de carbono con un electrón desapareado; éste reacciona con el oxígeno, generando un radical peroxilo que ataca los ácidos grasos adyacentes generando nuevos radicales de carbono. Otra molécula susceptible del ataque de los radicales libres es el ADN. Si el radical hidroxilo se genera cerca de él, puede atacar el esqueleto de desoxirribosa así como las bases púricas y pirimidínicas, formando múltiples productos. Así, la guanina puede transformarse en el producto final 8-hidroxiguanina, una lesión mutagénica, o en guanina de anillo abierto, que tiene que ser eliminada por las enzimas reparadoras del ADN lo cual puede al final hacer que

aparezcan errores. De hecho, la cantidad de productos finales originados por el ataque de ROS y RNS es pequeña en el ADN de tejidos sanos, pero se encuentran en cantidad significativa en los aislados de tumores (Halliwell, 1996).

Por todo ello nuestro organismo ha ideado sistemas antioxidantes para defenderse de los radicales libres. Un antioxidante se puede definir como cualquier sustancia que a una concentración pequeña, si lo comparamos con la concentración de sustratos oxidables, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato. El antioxidante al encontrarse con el radical libre le cede un electrón, convirtiéndose en un radical libre débil, más o menos estable, que impide que se propague la reacción (Halliwell *et al.*, 1995). Estos antioxidantes del organismo incluyen sistemas enzimáticos, como superóxido dismutasa, catalasa y glutatión reductasa; factores endógenos, como el glutatión, urato y coenzima Q; sistemas de secuestro de iones metálicos, como hierro y cobre, mediante proteínas de transporte o de almacenamiento, de manera que no se encuentren en circulación ya que pueden promover el ataque radicalario; y antioxidantes que ingresan mediante la dieta y que también desempeñan un papel fundamental, como los tocoferoles, vitamina C, carotenoides y minerales que actúan como cofactores de algunas de las anteriores enzimas, como selenio, zinc, cobre y manganeso (Halliwell, 1996; Temple, 2000).

Existen diferentes formas para clasificar los antioxidantes. Una particularmente útil es la clasificación funcional e indica la localización preferencial de los antioxidantes en el organismo.

Así se identifican 4 clases de antioxidantes (Cornetti, 2009):

- Antioxidantes de membrana: también conocidos como antioxidantes lipofílicos, representados por la vitamina E y la vitamina A, que tienen preferencia por las membranas de las células y lipoproteínas
- Antioxidantes circulantes: también llamados antioxidantes hidrosolubles, como la vitamina C, diferentes aminoácidos y polifenoles, que se encuentran circulando libremente en los fluidos corporales
- Antioxidantes citosólicos: son producidos por las células, como intermediarios en la síntesis de moléculas endógenas o macromoléculas. Pertenecen a esta categoría la coenzima Q 10 y el escualeno (intermediario en la síntesis de colesterol).

- Antioxidantes sistémicos: como metales traza, selenio y cinc fundamentalmente, y aminoácidos, como L-cisteína.

Dado que en el organismo la producción de radicales y defensas antioxidantes se encuentra aproximadamente equilibrada, es fácil desplazar ese equilibrio en favor de la producción de radicales, lo que se denomina estrés oxidativo. Si éste es ligero los tejidos responden con un aumento de la producción de las defensas antioxidantes, pero cuando se trata de un estrés oxidativo severo, éstas no pueden hacer frente a los radicales y acaba por producirse daño tisular. Una de las vías por las que puede establecerse una situación de estrés oxidativo es por la exposición a sustancias tóxicas que al metabolizarse originan radicales libres, particularmente interesante en el caso de fármacos que al metabolizarse originan productos que incrementan el daño oxidativo. También puede producirse por malnutrición o ingesta inadecuada de tocoferol, ácido ascórbico, aminoácidos azufrados (necesarios para regenerar el glutatión), entre otros (Halliwell, 1996).

Existen numerosas enfermedades cuya aparición se ha relacionado con el estrés oxidativo, entre ellas (Temple, 2000):

- Deficiencias en el sistema inmune, con lo que se incrementa el riesgo de sufrir infecciones.
- Diferentes tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón y de colon.
- Diabetes, tanto de tipo I como de tipo II.
- Procesos autoinmunes.
- Enfermedades respiratorias.
- Enfermedades cardiovasculares, por la oxidación del colesterol en las lipoproteínas de baja densidad (LDL), siendo éstas más aterógenas que las LDL nativas.
- Alteraciones oculares, incluyendo cataratas y degeneración macular.
- Procesos neurodegenerativos, como alzheimer y parkinson, siendo el cerebro particularmente sensible al daño oxidativo por su alta contenido en ácidos grasos poliinsaturados y la presencia de metales de transición como hierro y cobre.

Parece razonable proponer un aporte exógeno de antioxidantes, ya que las defensas endógenas no son efectivas al 100%, sobre todo en situaciones de estrés oxidativo. Existen numerosas evidencias de la disminución de la incidencia y prevalencia de las enfermedades citadas anteriormente por determinados hábitos alimentarios, como la reducción en la ingesta de grasas e incremento del consumo de frutas, cereales y verduras, las cuales poseen en su composición sustancias antioxidantes.

En cualquier caso, hay que ser cauteloso con la ingesta dietética de antioxidantes, ya que se ha visto que estas sustancias de probada actividad antioxidante *in vitro*, en determinadas ocasiones pueden actuar como prooxidantes. Así, el ácido ascórbico, con múltiples propiedades antioxidantes, puede ser prooxidante en presencia de metales iónicos de transición, generando hidroxilo y provocando una reacción de peroxidación lipídica. Este efecto prooxidante también se ha puesto de manifiesto *in vitro* para fenoles de diferentes plantas, a pesar de que normalmente inhiben la peroxidación lipídica (Halliwell, 1996).

A la luz de estos resultados sería importante subrayar para los antioxidantes el concepto del paradigma nutricional. Este concepto hace referencia a que una enfermedad que es causada por deficiencia de un elemento desaparece cuando este elemento se ingiere en una cantidad suficiente. Sin embargo, si aumentamos más la dosis y se da un exceso, se alcanza un límite a partir del cual ese elemento se vuelve tóxico. Por lo tanto, para contrarrestar el estrés oxidativo habrá que tener en cuenta estas consideraciones, y por ejemplo, es mejor utilizar, sólo cuando sea necesario, una combinación de antioxidantes en vez de uno sólo a altas dosis, ya que existe el riesgo de que la acción prooxidante prevalezca sobre la antioxidante (Cornetti, 2009).

#### **4.1.1. Estrés oxidativo y piel: envejecimiento**

El envejecimiento, proceso biológico inevitable, se puede considerar la consecuencia directa de dos procesos biológicos independientes: la pérdida de funcionalidad, y la pérdida de resistencia o adaptabilidad a las situaciones de estrés. La piel, el órgano más grande del cuerpo humano, es un gran candidato del estrés oxidativo, siendo más susceptible al daño producido por él debido a la presencia de dianas biológicas apropiadas para este tipo de reacciones. A pesar de que el envejecimiento cutáneo está también asociado a otros

procesos fisiológicos y es inevitable, el envejecimiento exógeno es causado por factores ambientales perjudiciales y puede ser prevenido en cierta medida (Kaur *et al.*, 2007). Uno de los factores externos más perjudiciales para la piel es la radiación ultravioleta (UV), tanto la de tipo A (UVA) como la B (UVB). La exposición a estas radiaciones induce la formación de ROS, incluyendo radical superóxido aniónico ( $O_2^{\bullet-}$ ), peróxido de hidrógeno, hidroxilo, oxígeno singlete, peróxidos lipídicos y radicales de ellos. Estas especies reactivas, además de en el envejecimiento cutáneo, denominado también fotoenvejecimiento, están implicadas en reacciones de fototoxicidad, inflamación, empeoramiento de enfermedades cutáneas existentes y desarrollo de tumores malignos (Sakurai *et al.*, 2005).

Para contrarrestar el estrés oxidativo en la piel funcionan también todos los sistemas antioxidantes endógenos previamente descritos, prevaleciendo unos sobre otros dependiendo de la capa de la piel. Así, en el estrato córneo (SC) la principal defensa antioxidante es el escualeno, un intermediario de la síntesis de colesterol, la cual es muy activa en los queratinocitos, ya que en el proceso de diferenciación pierden los receptores para las LDL y por tanto no pueden recibir colesterol de fuentes externas. De hecho, el 20% de la síntesis endógena de colesterol es realizada por la epidermis. El escualeno tiene una actividad antioxidante comparable con la de las vitaminas antioxidantes. En la matriz lipídica intercelular del SC, el escualeno representa entre un 12 y un 15% del total. Éste es segregado activamente, junto con vitamina E, por las glándulas sebáceas y difunde en la epidermis creando la primera barrera antioxidante de la piel. A partir de los 35-40 años estas glándulas reducen drásticamente la secreción, y la cantidad de escualeno disponible es insuficiente para una correcta protección.

En la dermis existe una mayor variedad de sistemas antioxidantes. El colágeno se forma cuando dos moléculas de procolágeno (PC) se unen gracias a una reacción de oxidación. Sin embargo, si ésta es excesiva, se forman demasiadas uniones entre las moléculas de PC y el colágeno resultante es rígido, no elástico. En la piel envejecida predomina este tipo de colágeno. Un mecanismo similar ocurre con las fibras de elastina, la cual se forma por la unión de tres unidades de proelastina, unión que también se forma por oxidación de los restos de lisina. Al igual que en el caso del colágeno, una oxidación excesiva de los residuos

de lisina genera también una elastina ineficaz. Los vasos sanguíneos de la dermis también pueden resultar dañados por los radicales libres. En general las defensas antioxidantes en este compartimento son fundamentalmente del tipo antioxidantes circulantes o hidrosolubles, como el  $\beta$ -caroteno o la vitamina C. En cuanto a las células de la dermis, células dendríticas, fibroblastos y melanocitos fundamentalmente, las dos primeras producen ROS mientras que los melanocitos se activan por la luz UV, por lo que de alguna manera el estrés oxidativo está implicado en su activación. Se puede considerar, por tanto, que en ellas es realmente importante el equilibrio entre oxidación y capacidad antioxidante. En ellas se dan los cuatro tipos de antioxidantes, es decir, de membrana, circulantes, citosólicos y de sistema (Cornetti, 2009).

Al incrementarse la edad es más frecuente que aparezcan situaciones de estrés oxidativo, ya que las defensas antioxidantes naturales del organismo son incapaces de contrarrestar el ataque oxidativo. Parece por tanto lógico que un aporte externo de antioxidantes, bien por vía oral o tópica, va a retardar o prevenir la aparición de los síntomas de envejecimiento cutáneo, tales como arrugas, pérdida de elasticidad, aspereza, manchas y, mucho más importante, prevenir la agresión sobre el ADN que puede derivar en diferentes tipos de cánceres cutáneos. Es por esta razón que se ha hecho necesario diseñar productos que protejan a la piel de la agresión producida por la exposición de manera crónica a la luz solar, incluso aunque sean exposiciones leves. La principal ventaja de usar antioxidantes y sustancias sequestradoras de radicales con este fin es la amplia cobertura que proporcionan al ayudar o potenciar el sistema defensivo natural de la piel. La utilización de cremas y lociones protectoras solares es la forma más habitual de protección frente al sol. A pesar de que protegen frente a ciertos daños de la radiación solar no son efectivas al 100%. Además, algunos ingredientes de ellas pueden transformarse en radicales libres por acción de la radiación, absorberse a través de la piel y por tanto ser potencialmente dañinos.

Parece ser que la vía más efectiva para este aporte extra de antioxidantes a la piel es la tópica, ya que tiene la ventaja de concentrar el antioxidante justo en la zona que necesita ser protegida. El aporte por vía oral también es válido, pero los procesos fisiológicos de absorción, solubilidad y transporte van a hacer que la cantidad que llega finalmente a la piel

sea mucho más pequeña que si se aplica directamente sobre ella (Pinnell, 2003). Así, existen numerosos estudios de la protección frente a los efectos nocivos de la radiación UV mediante el uso tópico de diferentes sustancias antioxidantes, como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico, sales de selenio y cinc y  $\beta$ -caroteno, entre otros (Kaur *et al.*, 2007).

#### **4.1.2. Liposomas antioxidantes**

Con este término nos referimos a liposomas que transportan encapsuladas en su interior sustancias antioxidantes, tanto hidrófilas como lipófilas.

Al aplicar un antioxidante sobre la piel va a encontrar una serie de dificultades para poder penetrar a través del estrato córneo, y por tanto parece lógico pensar, que la encapsulación de la sustancia antioxidante dentro de liposomas va a tener un doble efecto, por un lado va a protegerla de fenómenos que puedan alterar su estructura química o su actividad biológica, y por otro va a facilitar el paso a través de la piel y la formación de un depósito en capas más profundas respecto al estrato córneo, como se describió en el correspondiente capítulo acerca de los liposomas.

Se han realizado estudios con diferentes vitaminas y sustancias antioxidantes. Así, la aplicación de diferentes formulaciones de fosfato de ascorbil sódico en la superficie de la piel potenciaba la entrada de la sustancia activa hasta capas más profundas de la epidermis que cuando se aplicaba una solución acuosa de la misma sustancia (Foco *et al.*, 2005). El mismo efecto se observó con liposomas de vitamina E, de manera que la penetración en la piel se veía enormemente aumentada cuando se encontraba encapsulada (Padamwar y Pokharkar, 2006).

Un estudio más exhaustivo acerca del papel de los antioxidantes en la fotoprotección fue realizado con liposomas que contenían resveratrol, un polifenol con gran actividad antioxidante y antiradicalaria. Así, se evaluó la viabilidad de un cultivo celular tratado con liposomas de resveratrol tras la irradiación con UVB, y se comparó con los resultados del mismo cultivo celular pero tratado con una solución del polifenol. Los resultados resultan interesantes, ya que la incorporación del resveratrol en liposomas disminuye su efecto tóxico a altas concentraciones, probablemente porque evita la inmediata distribución dentro de la

célula, y aumenta la capacidad del mismo para estimular la proliferación celular y supervivencia bajo las condiciones de estrés causadas por la luz UVB (Caddeo *et al.*, 2008).

Estos resultados ponen de manifiesto que la encapsulación de los antioxidantes va a potenciar el efecto de fotoprotección en la piel y que proporcionan una efectiva herramienta para combatir el estrés oxidativo en la piel.

A pesar de que en esta memoria se ha resaltado el papel de los liposomas antioxidantes para tratamiento de la piel, representan también una gran promesa en el tratamiento de enfermedades en las que esté implicado el estrés oxidativo. En este sentido, destaca la encapsulación de  $\alpha$ -tocoferol y de ácido ascórbico en liposomas, los cuales han demostrado prevenir la peroxidación lipídica y formación de edema en cerebro de rata durante un fenómeno de isquemia (Sinha *et al.*, 2001), así como el papel protector de los liposomas del flavonoide quercetina en el daño oxidativo hepático inducido por  $\text{CCl}_4$ , el cual promueve la formación en el hígado de dienos conjugados. Los liposomas de quercetina eran más potentes que la quercetina libre en el control del aumento de dienos conjugados en hígado, fenómeno que se potenciaba al estabilizar dichos liposomas con un recubrimiento de manosa (Mandal *et al.*, 2002).

Otro amplio ámbito de aplicación de los liposomas antioxidantes es la industria alimentaria, ya que en ella los antioxidantes se utilizan para proteger las propiedades sensoriales y nutritivas de los productos alimenticios. Los liposomas son buenos candidatos por su papel protector del antioxidante durante el procesado alimentario, en el que se pueden producir pérdidas o alteraciones del antioxidante que van a reducir su eficacia (Mozafari *et al.*, 2006).

## **4.2. Fuentes naturales de antioxidantes**

Existen numerosas evidencias de que en los países del área mediterránea la esperanza de vida es mayor. Asimismo, la incidencia de enfermedades cardiovasculares y ciertos cánceres, como colon y pulmón, es mucho menor que en países del norte de Europa y en América (Visioli y Galli, 2002). La dieta tradicional de los países bañados por el Mediterráneo está basada en el consumo de hidratos de carbono (pan, legumbres, pasta), pescado, grandes cantidades de fruta y verdura, y poca carne y grasas animales. Como grasa fundamental se

utiliza el aceite de oliva (Uccella, 2000). A través de diferentes estudios se ha llegado a la conclusión de que existe una relación directa entre el tipo de dieta y un mejor estado de salud (Keys, 1995; Mancini y Stamler, 2004). En un principio, el aspecto saludable de la dieta Mediterránea se atribuía exclusivamente al aceite de oliva y el alto contenido de éste en ácidos grasos poliinsaturados, sin embargo actualmente se reconoce la acción de ciertos componentes que existen en las frutas y verduras, los compuestos fenólicos, los cuales tienen un amplio rango de actividades biológicas, aunque el efecto beneficioso derivado de su consumo se atribuye fundamentalmente a sus propiedades antioxidantes (Heim *et al.*, 2002).

La tendencia en los últimos años es la de buscar antioxidantes de origen natural para su aplicación en industria alimentaria y cosmética con el fin de sustituir los antioxidantes sintéticos que se venían utilizando hasta ahora, como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT), ya que se sospecha que a pesar de ser utilizados a bajas concentraciones, estos compuestos tengan un efecto carcinogénico (Botterweck *et al.*, 2000). Así, diversas especies vegetales se han convertido en nuevas fuentes de antioxidantes naturales (Dessi *et al.*, 2001).

#### **4.2.1. Compuestos fenólicos de plantas superiores**

Los compuestos fenólicos (CF), en ocasiones también denominados con los términos polifenoles y biofenoles, son metabolitos secundarios, constituyen el grupo fitoquímico más ampliamente distribuido en las plantas y son de considerable importancia en la fisiología y morfología vegetal. Así, juegan un importante papel en el crecimiento y la reproducción, proporcionan protección frente a patógenos, y contribuyen al color y las características sensoriales de frutas y vegetales (Balasundram *et al.*, 2006). El contenido fenólico de las plantas depende de diversos factores tanto intrínsecos (especie, cultivo) como extrínsecos (agrónomos, ambientales, manejo, almacenamiento) (Tomas-Barberan y Espin, 2001).

Estructuralmente son un grupo complejo, ya que comprende un gran número de moléculas con estructuras muy heterogéneas, desde moléculas simples hasta compuestos altamente polimerizados. La característica común de este importante grupo de moléculas biológicas es la presencia de al menos un anillo aromático con, como mínimo, un grupo hidroxilo como

sustituyente. La tabla 2 presenta las principales clases de fenoles en función de su estructura. Normalmente en la naturaleza los compuestos fenólicos se encuentran en forma de conjugados con mono o polisacáridos, que se unen a través de los grupos fenólicos, y es también frecuente la presencia de otros grupos funcionales derivados, tales como ésteres y metil-ésteres. De todos ellos, los ácidos fenólicos (hidroxibenzoicos e hidroxicinámicos), flavonoides y taninos son los principales CF de la dieta (Balasundram *et al.*, 2006). La figura 11 muestra algunos ejemplos de ellos.

La actividad antioxidante de los CF es debida a la capacidad de donar átomos de hidrógeno o electrones, de atraer radicales libres y de quelar cationes metálicos. Su estructura va a determinar su actividad antioxidante, ya que ésta va a depender del número y la posición de los grupos hidroxilo con respecto al grupo funcional carboxilo. Así, en los ácidos fenólicos, la actividad antioxidante aumenta con el incremento del grado de hidroxilación, de manera que los fenoles monosustituidos de cada serie tienen escasa actividad, mientras que los que presentan mayor número como el ácido gálico, con 3 grupos hidroxilo, tienen gran capacidad antioxidante. Sin embargo, la sustitución de los grupos hidroxilo en posición 4 y 5 por grupos metoxi, como ocurre en el ácido sirínico, reduce la actividad (RiceEvans *et al.*, 1996). Otro tipo de sustitución que reduce significativamente la actividad antioxidante es la orto-metilación del grupo hidroxilo en posición 3 de los ácidos benzoicos y fenilacéticos sustituidos en posición 3 y 4, mientras que en la serie de los hidroxicinámicos la reducción de la actividad por este tipo de sustitución no es tan patente (Briante *et al.*, 2003). En general estos últimos exhiben una mayor actividad antioxidante que los hidroxibenzoicos. Esta mayor actividad puede deberse al grupo  $\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$ , que asegura una capacidad mayor de donar grupos H para la estabilización de radicales que el grupo  $\text{COOH}$  de los ácidos hidroxibenzoicos (RiceEvans *et al.*, 1996).

La relación estructura-actividad en los flavonoides en general es más complicada que la de los CF recién descritos, debido a la relativa complejidad estructural de la molécula del flavonoide. Las características estructurales que determinan la actividad en estos compuestos se deben a los sustituyentes en los anillos B y C (Balasundram *et al.*, 2006).

Tabla 2. Tipos de compuestos fenólicos presentes en plantas

Tipo	Estructura básica
Fenoles simples, benzoquinonas	C <sub>6</sub>
Ácidos hidroxibenzoicos	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Ácidos fenilacéticos, acetofenonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>
Ácidos hidroxicinámicos, fenilpropanoides	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>
Naftoquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>
Xantonas	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>
Estilbenos, antraquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>
Flavonoides, isoflavonoides	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>
Lignanós, neolignanós	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Biflavonoides	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Ligninas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Taninos condensados (proantocianidinas o flavolanos)	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

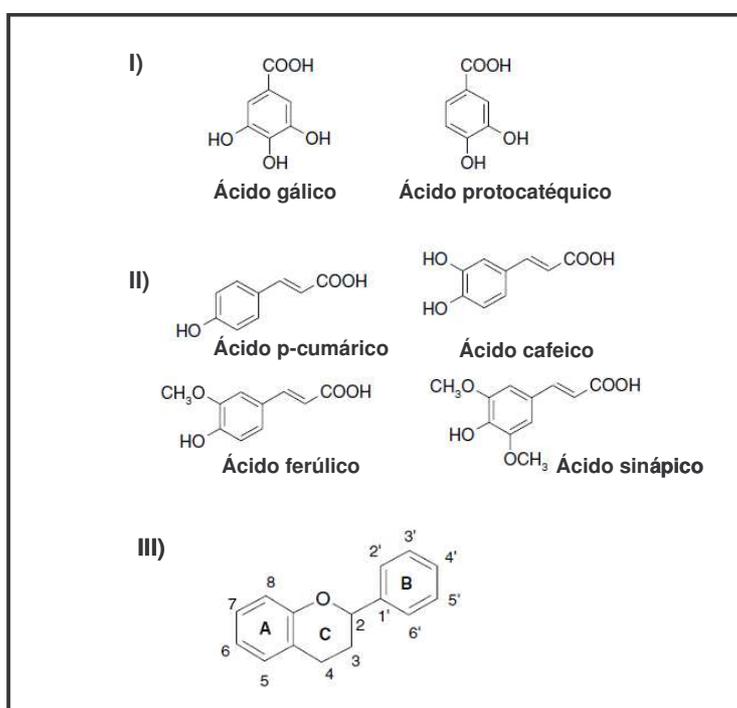


Figura 11. Ejemplos de ácidos hidroxibenzoicos (I), hidroxicinámicos (II) y estructura genérica de la molécula de los flavonoides (III). Diferentes sustituyentes en el anillo C originan los diferentes tipos de flavonoides

#### 4.2.1.1. Compuestos fenólicos del olivo

El olivo, *Olea europaea*, contiene una cantidad importante de biofenoles con numerosas funciones biológicas, como la de defensa frente a los ataques patógenos. Por otro lado, los biofenoles del olivo (OBF) también juegan un papel importante en el mantenimiento del esqueleto de la pared celular, al servir de enlaces entre los polisacáridos que constituyen las paredes celulares de la planta, lo cual influye en la textura de los productos alimenticios que se producen a partir de ella (Appel, 1993). Se localizan fundamentalmente en la hoja y el fruto, la aceituna. Ésta es una drupa formada por tres partes diferenciadas, el epicarpio, el mesocarpio o pulpa de donde se saca la mayor parte del aceite, y el endocarpio o hueso. Los componentes mayoritarios del fruto son aceite y agua (hasta un 50% dependiendo del contenido en aceite). Además contiene azúcares, celulosa y proteínas, y otros compuestos como minerales, vitaminas y biofenoles que se encuentran en menor proporción (Kiritsakis *et al.*, 1998).

Los biofenoles presentes en el olivo presentan estructuras muy diferentes, desde fenoles de bajo peso molecular que presentan sustituciones sencillas en el anillo aromático, como el tirosol e hidroxitirosol, hasta fenoles complejos, ligados a unidades glucosídicas o monoterpénicas, como los secoiridoides oleuropeína y ligstrósido, y el hidroxitirosilelenolato (Bianco y Uccella, 2000). Es por esto que los biofenoles del olivo no deben ser considerados polifenoles, nomenclatura que proviene de la terminología del vino, ya que estos últimos son polímeros con un peso molecular entre 500 y 4000, mientras que los OBF son monómeros de peso molecular hasta 624 (Haslam, 1996).

Aparte de la reactividad típica de los fenoles, los OBF se distinguen también por su capacidad para unirse fuertemente con metabolitos primarios como proteínas y azúcares, originando unidades supramoleculares, responsables de su biodisponibilidad (Bianco y Uccella, 2000).

A partir del fruto del olivo el hombre elabora diferentes productos alimenticios, fundamentalmente aceite y aceitunas de mesa. Los biofenoles van a estar presentes en ellos en mayor o menor medida según el proceso de elaboración, y son en parte los responsables del efecto beneficioso que estos productos poseen sobre la salud.

Entre los diferentes efectos positivos para la salud podemos destacar los siguientes (de Castro y Japon-Lujan, 2006):

- La oleuropeína previene la peroxidación lipídica de las membranas, la dilatación coronaria y posee también acción antiarrítmica. Posee actividad hipoglucemiante, antihipertensiva, antimicrobiana y antiviral, y también protege frente al cáncer por su actividad citostática.
- El hidroxitirosol inhibe la agregación plaquetaria y la producción de eicosanoides, e incrementa la capacidad antioxidante del plasma, ejerciendo una protección cardiaca. También es efectivo contra el cáncer, ya que inhibe la proliferación celular e induce la apoptosis de las células tumorales. Previene la aparición de diabetes y es efectivo en situaciones de estrés oxidativo disminuyendo la formación de peróxido de hidrógeno.
- Diferentes biofenoles presentes en el aceite de oliva ejercen una protección cardiaca por inhibición de la oxidación de lipoproteínas e inducen la apoptosis en determinados cánceres como el de próstata, mama y colon.

### **4.3. Obtención del aceite de oliva**

Gran parte de la producción mundial de aceite de oliva se lleva a cabo en países del sur de Europa y el noroeste de África, donde el cultivo del olivo se hace de forma tradicional desde hace siglos. España está a la cabeza de los productores mundiales, con 2 millones y medio de hectáreas de cultivo de olivos productivos, estando el 60% de ellos en Andalucía. Le siguen Italia y Grecia, y en menor medida países como Turquía, Túnez, Siria, Portugal, Marruecos y Argelia, entre otros. El mercado del aceite de oliva está en continua expansión debido al creciente interés por la dieta mediterránea, y de este modo nuevos países han incorporado el cultivo del olivo a sus actividades agrícolas como por ejemplo USA (California), Australia y Argentina (Agencia Española del Aceite de Oliva, 2010).

El aceite de oliva se obtiene del fruto del olivo. La composición del fruto es muy variable, en función de la variedad de la aceituna, del suelo, del clima y del cultivo. Las aceitunas se tratan

en las almazaras mediante procedimientos mecánicos o medios físicos en condiciones térmicas controladas. De forma general, durante el proceso de extracción de aceite se producen tres fases o efluentes:

- Aceite de oliva.
- Residuo sólido: denominado orujo, está compuesto por una mezcla de la pulpa y los huesos de las aceitunas. Este material se suele reutilizar en plantas especializadas para la extracción de aceite residual o aceite de orujo, mediante su extracción con hexano tras secar el orujo con aire a 60 °C.
- Residuo líquido: se denomina alpechín y proviene del agua y los tejidos blandos de la aceituna mezclados con el agua que se utiliza en las diferentes etapas de la producción del aceite de oliva.

La tecnología para la extracción del aceite de oliva en España ha experimentado diversos cambios desde los inicios en los años 60 hasta ahora. En la actualidad se emplean fundamentalmente tres métodos, que tienen en común una serie de operaciones preliminares al proceso de extracción. Estas son:

- Recepción y selección, separando las aceitunas defectuosas.
- Limpieza, lavado y pesada.
- Molienda, el objetivo de esta operación consiste en romper las células de la pulpa y provocar la salida del aceite de las vacuolas para su reunión en gotas más gruesas y permitir de este modo su separación. Para ello se usan trituradores metálicos o molinos de martillos.
- Batido, esta operación tiene como finalidad romper la emulsión agua/aceite y facilitar la reunión de las minúsculas gotas de aceite en gotas de tamaño superior que permita la separación del aceite. Para ello la pasta de las aceitunas obtenida tras la molienda se somete a un removido lento y continuo que se efectúa en recipientes de acero inoxidable (batidoras) provistas de un sistema de calentamiento adecuado. Este proceso no es eficiente al 100% por lo cual parte del aceite se mantiene en

gotas de pequeño tamaño formando una emulsión y es arrastrada a los subproductos.

Una vez finalizados estos procesos se procede a la extracción, mediante tres métodos diferentes:

- Sistema de extracción por presión: Es el procedimiento más antiguo para extraer aceite de oliva. Este sistema utiliza un proceso de filtrado favorecido por presión para separar la parte líquida de la pasta (mezcla del aceite con el agua de las aceitunas) del orujo o parte sólida. El sistema discontinuo permite obtener aceites de gran calidad debido a las bajas temperaturas a lo largo del proceso. Los principales inconvenientes derivan de los elevados costes de mano de obra, la discontinuidad del proceso y los gastos inherentes al empleo de materiales filtrantes en condiciones óptimas.
- Sistema de extracción por centrifugación de tres fases: El sistema de tres fases se desarrolló en los años 70 con el fin de mejorar el rendimiento del sistema tradicional usado hasta entonces. Esta tecnología, ampliamente utilizada todavía en la actualidad a escala mundial, explota la diferencia de densidad entre el agua y el aceite. La pasta de las aceitunas se somete a un proceso de centrifugación a muy alta velocidad en centrifugadoras horizontales. Se requiere la adición de agua caliente y el resultado es que la pasta de aceitunas se separa en tres fases: aceite, alpechín y orujo. Entre las desventajas de este proceso, se incluye el problema ambiental generado por la gran cantidad de alpechín, líquido altamente contaminante, y el elevado consumo de agua en las regiones generalmente secas donde se cultiva el olivo.
- Sistema de extracción por centrifugación de dos fases: este sistema fue desarrollado en los años 90 con el fin de solucionar el problema del alpechín. El sistema en dos fases se basa en un tipo de centrifugación más efectivo y no requiere agua de procesado, produciendo tan solo dos efluentes: aceite de oliva y un nuevo tipo de subproducto de consistencia pastosa con un alto contenido en agua: el alpeorujo. A pesar de que es llamado el sistema ecológico, al reducir enormemente la generación de aguas residuales,

con él nació un nuevo problema de tipo ambiental, ya que aunque no se produce un vertido líquido como en el anterior sistema, la naturaleza “semi-sólida” del alpeorujo, complica notablemente su transporte y tratamiento.

La figura 12 muestra un esquema comparativo entre los sistemas de dos y tres fases para la obtención del aceite.

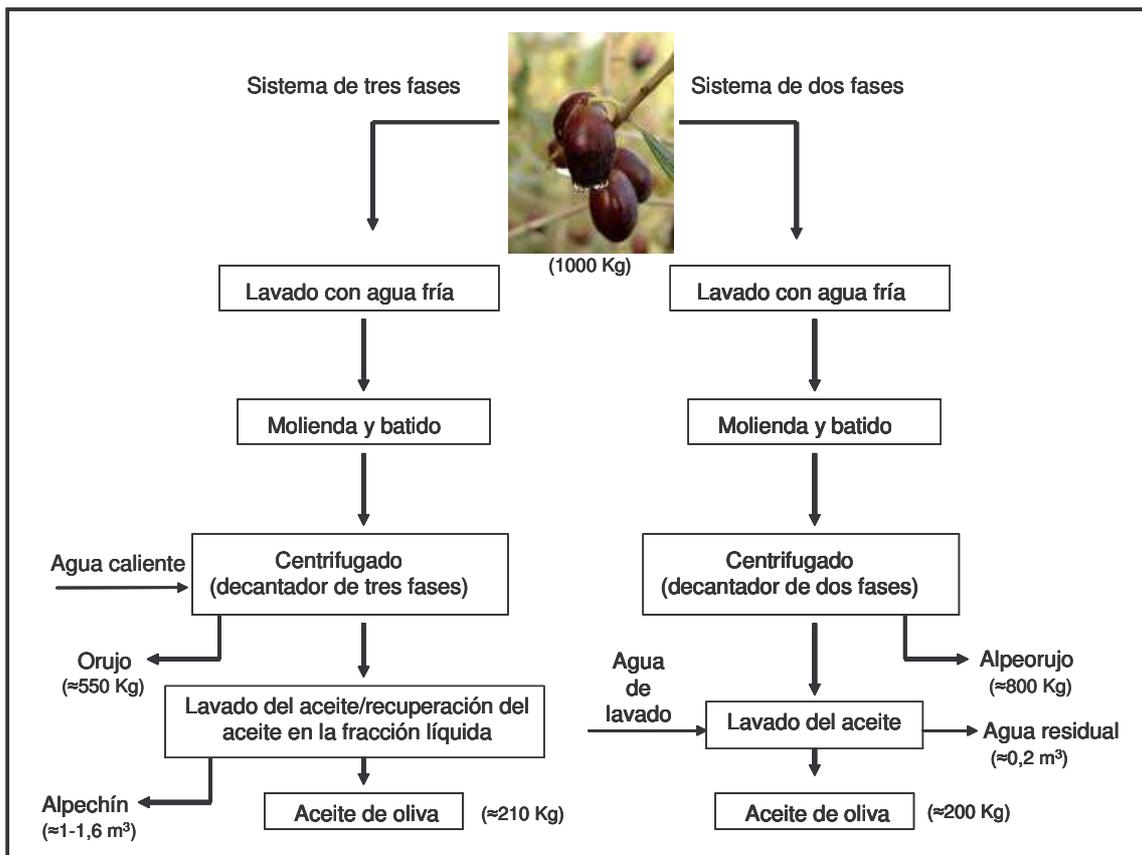


Figura 12. Comparación de los sistemas de extracción de tres y dos fases para obtención de aceite de oliva. Adaptado de (Albuquerque *et al.*, 2004)

#### 4.3.1. Caracterización de los residuos del aceite de oliva

Debido al origen común de ambos residuos, alpechín y alpeorujo, su composición va a ser muy similar, con variaciones fundamentalmente cuantitativas originadas por las diferencias en el proceso de extracción. Así, el contenido en fenoles totales del alpechín es del 24% respecto al peso seco del residuo, frente a un 20,4% encontrado en el alpeorujo (Lesage-Meessen *et al.*, 2001). Visioli y colaboradores (1995) sugirieron que estas diferencias se producían porque en el sistema de tres fases los compuestos fenólicos son extraídos en mayor medida por el lavado continuo que se aplica a la pasta de aceituna, y debido a su solubilidad terminan concentrándose en el residuo, alpechín (Visioli *et al.*, 1995).

Dado que el residuo utilizado en el presente trabajo es el alpeorujo, se procederá a hacer una descripción más detallada de dicho residuo.

La mayoría de las publicaciones científicas en las que se recoge información sobre la composición química del alpeorujo describen algún tratamiento realizado sobre una o varias muestras, incluyendo información específica sobre la composición de las muestras utilizadas (Cayuela *et al.*, 2004; Mulinacci *et al.*, 2005). Como referencia para tener una idea general acerca de la composición química del alpeorujo, es conveniente resaltar el trabajo de Albuquerque y colaboradores (2004) en el que se caracterizaron químicamente 20 muestras del residuo procedentes de almazaras localizadas en diferentes provincias de España (Albacete, Córdoba, Cuenca, Granada, Jaén, Málaga, Murcia y Tarragona), durante sucesivas campañas incluidas en el periodo 1997-2000, aportando información estadísticamente válida sobre la composición general del residuo. Determinaron los siguientes parámetros: conductividad eléctrica y pH en extractos acuosos 1:10 (w/v), sólidos volátiles que reflejan el contenido en materia orgánica (OM) mediante pérdidas por ignición, contenido en nitrógeno total (NT) y carbono orgánico total (COT), contenido en P, K, Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mn, y Zn, y contenido total en grasas. En extractos acuosos 1:20 se analizó en contenido fenólico y en carbohidratos. Por último se determinó la concentración de lignina, celulosa y hemicelulosa.

Los resultados obtenidos en estos análisis se muestran en las Tablas 3 y 4.

**Tabla 3. Composición química del alpeorujó (n=20) (Alburquerque *et al.* 2004)**

Parámetro	Media	Rango	Coefficiente Variación (%)
Humedad (% peso fresco)	64	55,6-74,5	7,6
pH	5,32	4,86-6,45	6,6
Conductividad (dS m <sup>-1</sup> )	3,42	0,88-4,76	33,9
Cenizas (g kg <sup>-1</sup> )	67,4	24,0-151,1	42,5
COT (g kg <sup>-1</sup> )	519,8	495,0-539,2	2,8
índice C/N	47,8	28,2-72,9	22,1
Nitrógeno Total (g kg <sup>-1</sup> )	11,4	7,0-18,4	24,5
P (g kg <sup>-1</sup> )	1,2	0,7-2,2	29,7
K (g kg <sup>-1</sup> )	19,8	7,7-29,7	34,2
Ca (g kg <sup>-1</sup> )	4,5	1,7-9,2	57,3
Mg (g kg <sup>-1</sup> )	1,7	0,7-3,8	58,7
Na (g kg <sup>-1</sup> )	0,8	0,5-1,6	36,6
Fe (mg kg <sup>-1</sup> )	614	78-1462	74,9
Cu (mg kg <sup>-1</sup> )	17	12-29	28,8
Mn (mg kg <sup>-1</sup> )	16	5-39	70,2
Zn (mg kg <sup>-1</sup> )	21	10-37	36,3

**Tabla 4. Principales componentes de la fracción orgánica del alpeorujó (g kg<sup>-1</sup> peso seco) (n=20) (Alburquerque *et al.* 2004)**

Parámetro	Media	Rango	Coefficiente Variación (%)
Materia orgánica total	932,6	848,9-976,0	3,1
Lignina	426,3 [45,8]	323,0-556,5	16
Hemicelulosa	350,8 [37,7]	273,0-415,8	12,7
Celulosa	193,6 [20,8]	140,2-249,0	14,8
Grasas	121,0 [13,0]	77,5-194,6	28,9
Proteínas	71,5 [7,7]	43,8-115,0	24,5
Carbohidratos (solubles)	95,8 [10,1]	12,9-164,0	50
Fenoles (solubles)	14,2 [1,5]	6,2-23,9	41

Los datos entre corchetes representan los porcentajes respecto al contenido orgánico total.

Como se aprecia en las dos tablas, el alpeorujo presenta un alto grado de humedad (mayor a 56%) que junto al pequeño tamaño de partícula lo hace un material poco poroso, plástico y con tendencia a compactarse, lo que supone un problema a la hora del transporte y el manejo, así como para utilizarlo como sustrato de compostaje, ya que este debe llevarse a cabo con unas determinadas condiciones. Este material presenta también un pH ligeramente ácido (media de 5,32). El alpeorujo es especialmente rico en K (19,8 g kg<sup>-1</sup>), lo cual es característico de los residuos procedentes de las almazaras. Sin embargo este residuo es pobre en P, Ca y Mg si se compara con residuos sólidos municipales y aguas residuales de procesado de otros vegetales. El contenido en N (7-18,4 g kg<sup>-1</sup>), fundamentalmente orgánico, es también bajo si se compara con otros residuos. Como micronutriente destaca el Fe (valor medio de 614 g kg<sup>-1</sup>) aunque, junto con el Mn, presenta grandes variaciones con un coeficiente de variación muy alto (Alburquerque *et al.*, 2004).

El alpeorujo tiene un alto contenido en materia orgánica muy alto, mucho mayor que el del alpechín y el residuo seco de alpechín. Los principales constituyentes de esta materia orgánica son lignina, hemicelulosa y celulosa que constituyen el 46%, 38% y 21% del total de materia orgánica respectivamente. Precisamente este alto contenido en lignina dificulta la degradación bacteriana del residuo cuando se usa como sustrato para compostaje. Otros componentes importantes del contenido orgánico son las grasas (13%), carbohidratos solubles (10%) y proteínas (cerca del 8%). El alto índice C/N (28.2-72.9) está por encima de los valores aconsejados para un eficiente compostaje de un residuo (25-35) (Alburquerque *et al.*, 2004).

#### **4.3.2. Compuestos fenólicos del alpeorujo**

Durante la elaboración del aceite de oliva, los compuestos fenólicos presentes originalmente en la aceituna y los que se originan durante el procesado, como la oleuropeína de la cual el 80% se degrada en otros compuestos, van a estar presentes en los productos finales de este proceso, es decir, en el aceite y en los residuos, distribuyéndose en ellos según su solubilidad en las dos fases mayoritarias de estos productos, agua y aceite. Así, en la pasta de aceituna, que es un sistema multifásico, los fenoles se encuentran repartidos en

las diferentes fases según su afinidad hacia ellas. Debido a que los compuestos fenólicos tienen un coeficiente de partición aceite/agua ( $\kappa_p$ ) bajo, del orden de  $6 \cdot 10^{-4}$  a 1.5, tienden a concentrarse en los residuos (con elevado contenido en agua) y en menor medida en el aceite. En consecuencia, sólo una fracción de los fenoles presentes en el fruto van a encontrarse en el aceite, aproximadamente el 1-2% del total de fenoles disponibles, mientras que el resto se pierde en el agua residual ( $\approx 53\%$ ) y el residuo sólido ( $\approx 45\%$ ), valores que varían en función del método de extracción (Rodis *et al.*, 2002).

La composición fenólica del alpeorujo va a estar influenciada por diferentes factores y va a depender del fruto (variedad, grado de maduración), del tipo de cultivo, de variaciones estacionales, de la temporada de recolección, del tiempo y condiciones de almacenamiento, entre otros (Obied *et al.*, 2008). Los biofenoles mayoritarios encontrados en el alpeorujo (Figura 13) son hidroxitirosol, en forma libre o como glucósido, oleuropeína, tirosol, ácido cafeico, ácido vainílico, verbascósido, ácido elenoico, ácido p-cumárico, catecol y rutina, todos ellos con actividad antioxidante y otras numerosas actividades biológicas (cardioprotectiva, antiaterogénica, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, anticáncer, etc), aunque los avances en las técnicas analíticas han permitido identificar en el alpeorujo una gran cantidad de compuestos fenólicos minoritarios con diversas estructuras (Obied *et al.*, 2005).

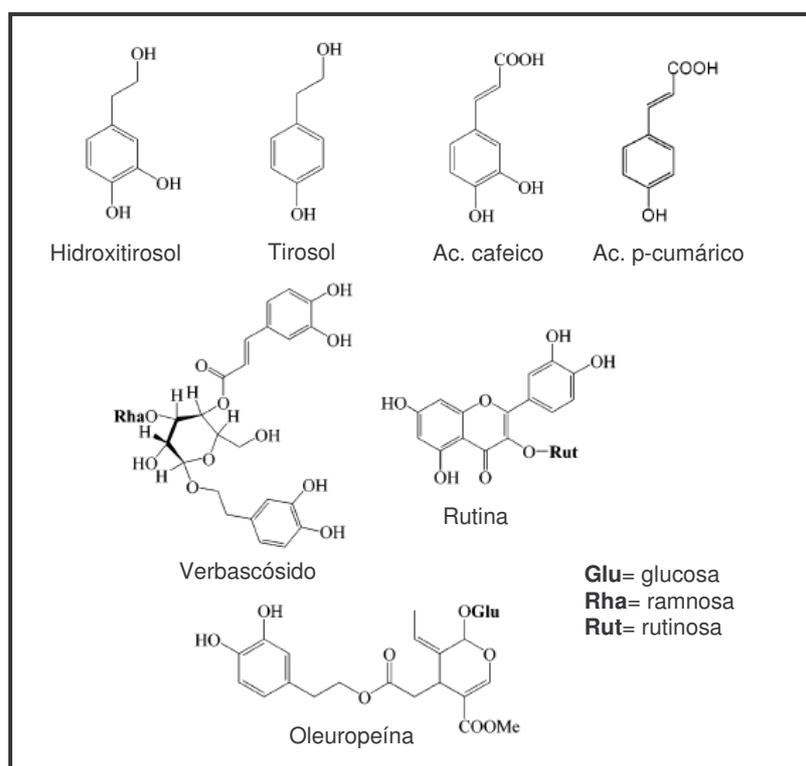


Figura 13. Estructura de algunos de los biofenoles mayoritarios del alpeorjujo

#### 4.3.3. Impacto de los residuos en el medio ambiente: soluciones

El principal problema de los residuos derivados de la industria oleícola es que son generados en grandes cantidades durante un corto período de tiempo (noviembre-febrero) y son muy contaminantes, sobre todo el alpechín, por lo que es necesario encontrar alternativas para la correcta gestión de estos residuos.

Entre los efectos medioambientales de los residuos de la obtención del aceite de oliva podemos destacar los siguientes:

- Efecto antimicrobiano: este efecto ha sido relacionado con el contenido de los residuos en compuestos fenólicos, ácidos grasos y ácidos orgánicos (Gonzalez *et al.*, 1990).
- Fitotoxicidad: los fenoles han sido también descritos como los responsables de este efecto, mediante una acción sinérgica con otros compuestos no identificados

presentes en el residuo. Así se ha visto que inhiben la germinación de las semillas del trigo, calabazín y tomate (Capasso *et al.*, 1992).

- Efectos sobre sistemas acuáticos: fundamentalmente el alpechín, ya que el alpeorujo no puede considerarse un vértido líquido debido a su consistencia sólida. Entre ellos se puede destacar la decoloración de las aguas, eutrofización y efectos tóxicos sobre especies de la fauna acuática de los ríos (Morillo-Pérez, 2007).

Es debido a estos efectos que a lo largo de los años se han buscado soluciones para el tratamiento de los residuos de manera que se consiga un mejor aprovechamiento y reciclado de los mismos.

En la práctica, el método de eliminación de alpechín mas empleado es almacenarlo en balsas de evaporación debido a la baja inversión requerida y a las condiciones climáticas favorables en los países mediterráneos. Sin embargo este método precisa de grandes áreas y produce diversos problemas como mal olor, infiltraciones y proliferación de insectos (Roig *et al.*, 2006). La evaporación del alpechín produce fangos. La mayoría del fango producido en las balsas de evaporación se traspasa a vertederos, aunque puede ser utilizado en la agricultura o como biocombustible(Vitolo *et al.*, 1999).

La mayoría de los estudios sobre valorización de este residuo se centran en el compostaje, que consiste en el tratamiento del residuo para transformarlo en un producto que se usa como fertilizante. Así, se ha conseguido obtener un buen abono mediante un compostaje combinado del residuo sólido de alpechín y residuos provenientes del cultivo del algodón (Paredes *et al.*, 2002).

En cuanto al tratamiento del alpeorujo se han propuesto diversos tratamientos. Se puede realizar el secado del residuo para proceder a una segunda extracción mediante disolventes obteniendo el aceite residual (Arjona *et al.*, 1999). El alpeorujo extractado normalmente se utiliza como combustible en las propias plantas extractoras para la producción de calor o electricidad. Este método se utiliza en la mayoría de las extractoras debido a que el alpeorujo extractado tiene un elevado poder calorífico (400kcal/kg) (Caputo *et al.*, 2003). También se ha propuesto su utilización como sustrato para la obtención de biogas (Tekin y Dalgic, 2000).

Puede aplicarse también directamente sobre el suelo, ya que ciertas ventajas del uso directo del alpeorujo como abono orgánico son su alto contenido en potasio, su bajo valor económico y que se produce cerca de zonas agrarias, por lo cual no es necesario transportarlo a grandes distancias. Sin embargo, diferentes experiencias han demostrado que, si bien es menos fitotóxico que el alpechín, su aplicación directa provoca una pérdida del equilibrio nutricional del suelo debido al alto índice C/N, por lo que debe ser aplicado junto a una fuente de nitrógeno (Thompson y Nogales, 1999).

El alpeorujo también puede servir como sustrato de bajo coste para la producción de exopolisacáridos y enzimas de aplicación en diferentes industrias como la alimentaria, farmacéutica y petrolíferas (Morillo *et al.*, 2009).

Una solución interesante al problema del alpeorujo es la utilización del mismo como sustrato para la obtención de compuestos con valor añadido. Dentro de ellos cabe destacar la utilización del alpeorujo como una fuente barata de antioxidantes naturales, dada la gran concentración de compuestos fenólicos biológicamente activos que posee (Obied *et al.*, 2005). La recuperación efectiva de estos compuestos aportaría un doble beneficio, ya que se reduciría el contenido fenólico en el residuo, transformándolo en un producto menos contaminante para posteriores tratamientos y aplicaciones (Sayadi *et al.*, 2000). La mayoría de las investigaciones se han centrado en la obtención de hidroxitirosol por ser uno de los compuestos presentes en mayor concentración en el alpeorujo y además con probada actividad antioxidante y antibacteriana y diferentes efectos beneficiosos sobre la salud (Fernandez-Bolanos *et al.*, 2002; Allouche *et al.*, 2004). No obstante, podrían obtenerse de forma individualizada otros de los muchos biofenoles que contiene, o utilizarse extractos totales de compuestos fenólicos, que mantendrían todas las propiedades beneficiosas anteriormente descritas y al no tratarse únicamente de un compuesto podrían actuar de forma sinérgica. Estos fenoles antioxidantes pueden proporcionar una alternativa al uso de antioxidantes sintéticos en productos farmacéuticos, cosméticos y alimentarios, como ya se citó anteriormente.

Otro tipo de productos con valor añadido que pueden obtenerse del alpeorujo son una serie de azúcares que se obtienen por hidrólisis del residuo. Así, se pueden conseguir

monosacáridos (xilosa, arabinosa y glucosa), y oligosacáridos, fundamentalmente manitol y productos de degradación de otros azúcares. Éstos pueden ser aplicados en la industria alimentaria (Fernandez-Bolanos *et al.*, 2004).

## **II. OBJETIVOS**

Los liposomas constituyen un prometedor sistema para la vehiculización de fármacos y sustancias biológicamente activas debido a las numerosas aplicaciones que se han encontrado para ellos. Las numerosas investigaciones que existen en el campo de los liposomas están encaminadas a mejorar propiedades tales como la estabilidad o la capacidad de encapsulación. En este aspecto los arqueosomas proporcionan una ventaja frente a los liposomas convencionales, ya que la mayor estabilidad química de los lípidos constituyentes del mismo permite anticiparle una mayor resistencia frente a la degradación, y por tanto, mejor estabilidad que los liposomas elaborados con lípidos tipo éster.

El ámbito de aplicación de los liposomas es muy amplio, y dentro de él, en la introducción se ha resaltado el papel de los liposomas como sistemas para la utilización en dermatología y cosmética. Particularmente interesante el papel que pueden desempeñar los “liposomas antioxidantes” en la fotoprotección de la piel, previniendo tanto el envejecimiento como la aparición de patologías relacionadas con el estrés oxidativo.

Los residuos de la producción del aceite de oliva plantean un problema porque se generan en grandes cantidades y son muy contaminantes, fundamentalmente por el contenido en compuestos fenólicos, por lo que es necesario la búsqueda de soluciones para ellos. Una muy interesante es la utilización del residuo como sustrato para la extracción de estos compuestos fenólicos, los cuales han demostrado tener diversas actividades biológicas y ser beneficiosos para la salud.

Por tanto, y de acuerdo con lo anteriormente descrito, se plantean los siguientes objetivos para el presente trabajo de investigación:

1. Estudio de la capacidad antioxidante de diferentes extractos de alpeorujo, con el fin de seleccionar un extracto que proporcione una buena actividad antioxidante para su posterior aplicación.
2. Diseño, elaboración y caracterización de diferentes formulaciones de arqueosomas para la encapsulación de los extractos fenólicos obtenidos y, con fines comparativos, se prepararán liposomas convencionales de fosfatidilcolina con idéntica composición. Se llevará a cabo la evaluación de la estabilidad de las formulaciones a lo largo del tiempo con el fin de identificar las más estables.

3. Estudio *in vitro* de la toxicidad de los extractos fenólicos y de las formulaciones elaboradas.
4. Elaboración de una forma farmacéutica de aplicación tópica para la incorporación de las vesículas obtenidas y facilitar su aplicación cosmética. Estudio de liberación de los activos cosméticos encapsulados.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

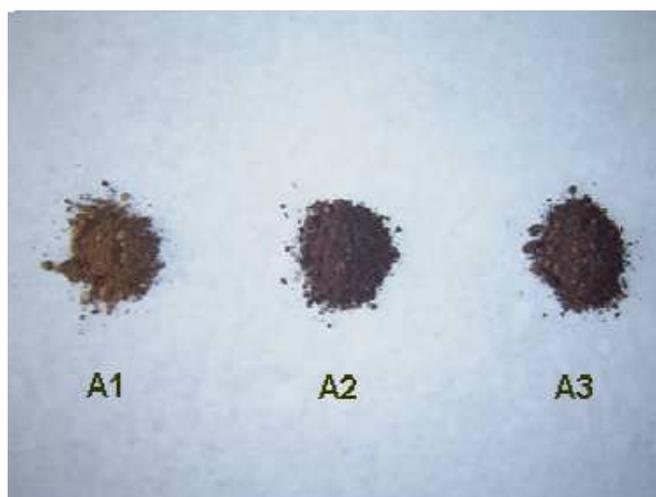
# 1. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS DE ALPEORUJO

## 1.1. MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.1.1. Obtención de extractos fenólicos de alpeorujos

Se obtuvieron tres muestras de alpeorujos de 5Kg cada una, procedentes de diferentes variedades de aceituna: picudo (alpeorujos 1), picual (alpeorujos 2) y hojiblanca (alpeorujos 3) de cooperativas de Córdoba, Jaén y Granada, respectivamente.

Las muestras fueron recogidas en contenedores de plástico y conservadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Para el proceso de extracción se procedió a la liofilización del alpeorujos y posterior molido hasta reducirlo a un polvo fino. La figura 14 muestra los diferentes tipos de alpeorujos una vez liofilizados.



**Figura 14. Muestras de alpeorujos liofilizado utilizadas en este estudio: A1) variedad picudo; A2) variedad picual; A3) variedad hojiblanca**

En la extracción de los compuestos fenólicos se utilizaron diferentes disolventes en función de su polaridad, y así se realizaron extracciones con etanol, metanol y una mezcla de metanol/agua 80:20 (v/v). A 5 g de muestra se le añadieron 25 ml del correspondiente disolvente, se mantuvo en agitación magnética durante 10 min y se centrifugó a 4000 r.p.m.

durante 10 min. Este proceso se repitió seis veces. Con el fin de concentrar las muestras se procedió a la evaporación del disolvente (etanol o metanol) en un rotavapor Laborota 4000 efficient (Heidolph, Alemania) a 40° C, llevándolos hasta un volumen final de 20 ml en el correspondiente disolvente. En el caso del extracto metanol/agua se evaporó el metanol hasta la obtención de 20 ml de un extracto acuoso.

Todos los extractos se conservaron a -20° C hasta su utilización.

### **1.1.2. Cuantificación de fenoles totales en los extractos obtenidos**

La cuantificación de fenoles totales se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton y Rossi en 1965, con algunas modificaciones en los volúmenes.

El método original, fundamentado en el carácter reductor de los polifenoles, fue desarrollado en 1927 y consistía en la obtención de un producto coloreado por la oxidación de los fenoles al reaccionar con un compuesto molibdotúngstico. Es un método sencillo, sensible y preciso, sin embargo Singleton y Rossi mejoraron el método introduciendo algunas modificaciones que le proporcionaba mayor especificidad. Así cambiaron el reactivo molibdotúngstico por un heteropolianión molibdotungsto-fosfórico ( $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-13\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$  y  $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5-14\text{WO}_3-4\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ ) que reduce los fenoles de manera más específica, originando un color azul intenso que tiene su máximo de absorción a 765nm.

Se procedió como se describe a continuación:

Una alícuota del extracto a analizar (15 µl) se hizo reaccionar con 75 µl de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N, proporcionado por Sigma Aldrich. Se agitó hasta conseguir una mezcla homogénea y antes de pasados 8 minutos desde la adición del reactivo se añadieron 225 µl de una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20%. Se agitó y posteriormente se añadió agua bidestilada para llevar a un volumen final de 1,5 ml. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 2 h, pasadas las cuales se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro (UV/VIS Cintra 10). La recta de calibrado ( $y = 1,0804x - 0,009$ ;  $r^2=0,9$ ) se hizo con una solución patrón de ácido cafeico (0-0,25 mg/ml) y el contenido en fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido cafeico por gramo de alpeorujó ( EAC mg/g).

### 1.1.3. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos fenólicos obtenidos

Existen numerosos métodos *in vitro* para medir la capacidad antioxidante tanto de compuestos puros como de extractos vegetales, alimentos, nutraceúticos, etc. Todas las sustancias antioxidantes reaccionan con los radicales libres quelándolos mediante dos mecanismos principales, uno por transferencia de un átomo de hidrógeno (HAT) y otro por transferencia del electrón desapareado (SET). El resultado final es el mismo sin tener en cuenta el mecanismo, pero son diferentes en cuanto a las cinéticas de reacción así como a la posibilidad de que aparezcan reacciones laterales. Los métodos basados en el mecanismo HAT miden la habilidad del antioxidante para bloquear los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno, mientras que los que se basan en el mecanismo SET detectan la capacidad de la sustancia a ensayar para transferir un electrón reduciendo el compuesto que lo capta, tales como metales, carbonilos y radicales libres.

Podríamos clasificar los métodos para determinar la capacidad antioxidante según el mecanismo que utilizan, encontrando métodos exclusivos de mecanismo HAT o mecanismo SET, y métodos que utilizan ambos tipos de reacción (Prior *et al.*, 2005).

El método elegido para determinar la actividad antioxidante de los extractos de alpeorujó fue el que utiliza el radical libre DPPH<sup>•</sup> (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), y se puede considerar un método mixto, es decir, en él se dan reacciones tanto de tipo HAT como SET (Prior *et al.*, 2005). Se eligió este método por ser descrito por muchos autores para evaluar la actividad antioxidante de los fenoles (Visioli *et al.*, 1998; Foti y Daquino, 2006; Villano *et al.*, 2007)

La molécula de DPPH se caracteriza por ser uno de los pocos radicales de nitrógeno orgánico estable, con la capacidad de deslocalizar el electrón no apareado a lo largo de toda la molécula, de manera que ésta no sufre dimerización, como ocurre en la mayoría de los radicales libres. Asimismo, esta deslocalización le permite alcanzar un color violeta intenso, de modo que cuando se encuentra en solución etanólica o metanólica presenta un pico máximo de absorción a 515 nm.

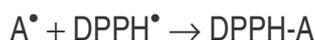
Cuando una solución de DPPH entra en contacto con una sustancia antioxidante, se transforma en la molécula reducida, con la consiguiente pérdida del color violeta, quedando un

color residual amarillo pálido debido a la presencia del grupo picril. La disminución de la absorbancia es proporcional a la concentración y la actividad de dicho antioxidante (Brand-Williams *et al.*, 1995).

Representando la sustancia antioxidante como AH, el DPPH pierde su color en presencia de esta sustancia según la siguiente reacción primaria:



El resultado de la reacción es la forma reducida del DPPH y un radical libre  $\text{A}^{\bullet}$  producido en este primer paso. Este radical sufrirá ulteriores reacciones, del tipo que se representa a continuación, reacciones que controlan la estequiometría global, es decir, el número de moléculas de DPPH reducidas por una molécula de sustancia reductora.



La figura 15 representa la reacción entre el DPPH y la sustancia antioxidante.

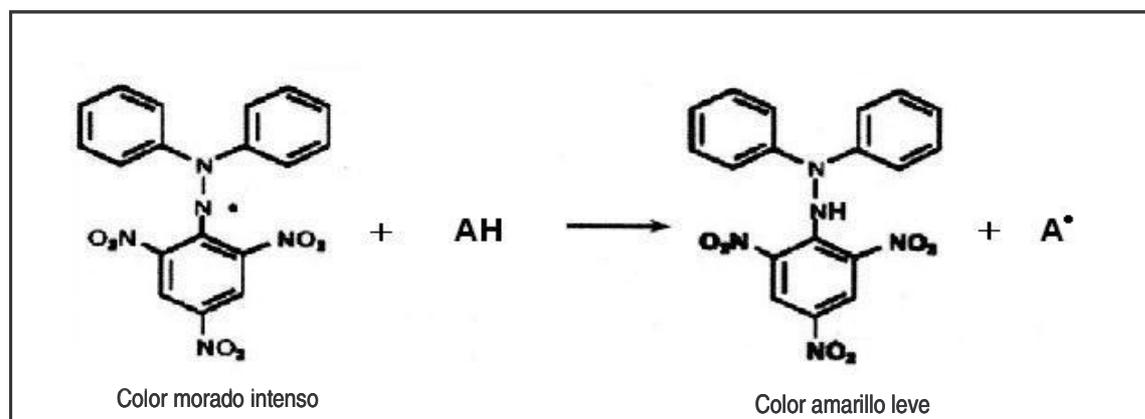


Figura 15. Reacción primaria del antioxidante con el DPPH

De esta forma, se realizan medidas de la absorbancia hasta que la reacción llega al estado de equilibrio, el cual se alcanza cuando la absorbancia presenta valores prácticamente constantes.

Como sustancia de referencia se utilizó Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo carboxílico), un antioxidante sintético hidrosoluble análogo del tocoferol.

Para la preparación de dicho estándar de referencia se realizó una disolución madre de Trolox en metanol 2 mM y se prepararon diluciones en metanol con concentraciones que iban desde 0,02-1 mM., para la realización de la curva estándar referida a porcentaje de inhibición del DPPH respecto a las diferentes concentraciones de Trolox.

El ensayo se llevó a cabo como se describe a continuación:

Se preparó una solución metanólica extemporánea de DPPH (25 mg/l); 3,9 ml de esta solución se mezclaron con 0,1 ml de las diferentes diluciones de Trolox para la realización de la curva estándar o con 0,1ml del extracto al que se quería determinar la actividad antioxidante. Asimismo se preparó otra alícuota de 3,9 ml de la solución de DPPH a la que se añadieron 0,1ml del correspondiente disolvente, muestra que nos servirá para determinar la absorbancia del DPPH en ausencia de sustancia antioxidante. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente y se midió su absorbancia a 515 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Cintra 10) cada treinta minutos durante un período de 2 h, tiempo suficiente para asegurarnos que la reacción ha llegado al equilibrio. El ensayo fue realizado por triplicado.

El porcentaje de inhibición del DPPH fue calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de DPPH} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Donde  $A_{\text{DPPH}}$  es la absorbancia inicial del DPPH y  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia del DPPH tras finalizar la reacción.

La actividad antioxidante de las distintas muestras se expresó en milimoles de Trolox equivalentes por gramo de alpeorujo (Teow *et al.*, 2007). Para ello se interpolaron los valores de porcentaje de inhibición de las muestras ensayadas en la curva obtenida para el Trolox ( $y=77,798x + 13,991$ ;  $r^2= 0,9957$ ), la cual nos proporcionaba así la concentración de Trolox equivalente a los valores de inhibición que produjeron las muestras.

Se prepararon diluciones de cada una de las muestras, ya que el valor del porcentaje de inhibición dependerá de la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos presentes en ellas. Si representamos gráficamente la actividad antioxidante como porcentaje de inhibición

de DPPH frente a la dilución ensayada, obtenemos un gráfico lineal para un determinado rango de concentraciones. Es importante que los valores de inhibición utilizados para interpolar en la curva de Trolox estén dentro de este rango de linealidad (Villano et al., 2005).

#### **1.1.4. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se estudiaron, desde un punto de vista estadístico, mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor utilizando un nivel de significación  $<0,05$  para el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias. Una vez decidido que las medias poblacionales comparadas son diferentes se utilizó el método de Tukey de comparaciones múltiples para discriminar las diferencias de medias que eran estadísticamente significativas en un intervalo de confianza al 95%.

## 1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.2.1. Cuantificación de los fenoles totales en los extractos obtenidos

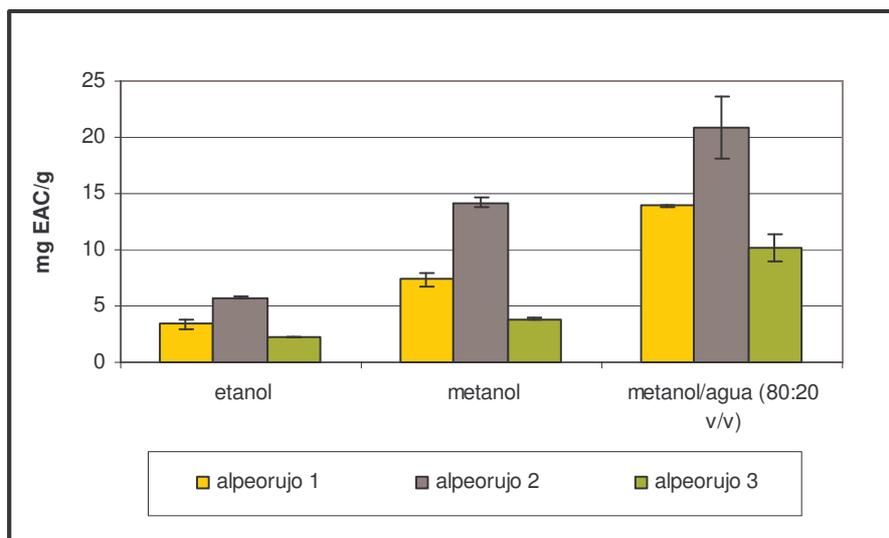
Se ha empleado el método de Folin-Ciocalteu para la determinación del contenido total en polifenoles por ser el método de cuantificación más común y ampliamente usado (Prior *et al.*, 2005).

El contenido medio en fenoles de los extractos difiere significativamente según el tipo de disolvente utilizado para la extracción ( $p < 0,01$ ) y según el alpeorujo de partida ( $p < 0,05$ ).

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 y la figura 16. De ellos se deduce que hay una clara relación entre la polaridad del disolvente y el rendimiento de la extracción, ya que como se puede observar en la figura 16, a medida que aumenta la polaridad del disolvente aumenta también el contenido en polifenoles de los extractos obtenidos. Así, la mezcla de metanol:agua (80:20 v/v) resultó ser el disolvente más efectivo, seguido de los extractos metanólicos, y por último, de los extractos realizados con etanol. Este fenómeno se observa en las tres muestras de alpeorujo estudiadas.

**Tabla 5. Concentración de fenoles totales (mg equivalentes de ácido cafeico/g de alpeorujo), valor medio y desviación estandar (n=3)**

Disolvente	Alpeorujo	mg EAC/g alpeorujo
Etanol	1	3,39 ± 0,40
	2	5,77 ± 0,14
	3	2,28 ± 0,03
Metanol	1	7,38 ± 0,61
	2	14,19 ± 0,48
	3	3,86 ± 0,11
Metanol/agua	1	13,90 ± 0,12
	2	20,88 ± 2,78
	3	10,18 ± 1,20



**Figura 16. Contenido en fenoles totales de los extractos de alpeorujo: alpeorujo 1) variedad picudo; alpeorujo 2) variedad picual; alpeorujo 3) variedad hojiblanca**

También se puede observar que de los tres alpeorujos analizados, el alpeorujo número 2, procedente de la variedad picual de aceituna, mostró la mayor concentración de fenoles totales en todos los extractos preparados, con un máximo de  $20,88 \pm 2,78$  mg EAC/g de alpeorujo liofilizado.

### 1.2.2. Evaluación de la actividad antioxidante de los extractos fenólicos obtenidos

En cada una de las muestras objeto de estudio, las diluciones que mostraron una respuesta lineal en el porcentaje de inhibición del DPPH fueron distintas, como se puede observar en las figuras 17, 18 y 19, lo cual es ya un indicativo del potencial antioxidante de cada una de las muestras. A la vista de estos resultados de cada uno de los extractos se seleccionó la dilución apropiada para que los resultados estuvieran dentro de la linealidad.

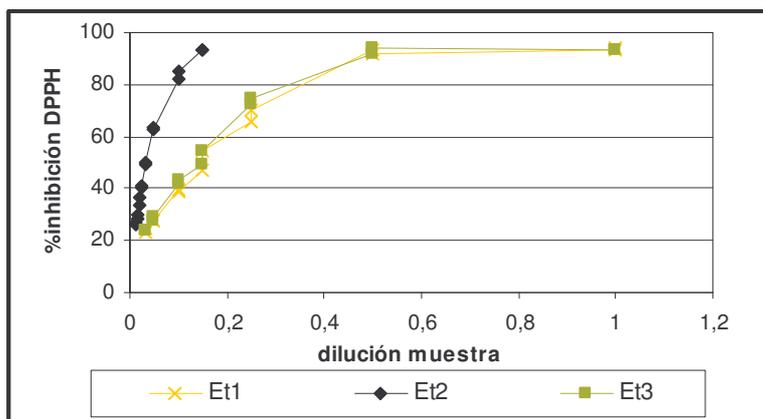


Figura 17. Relación entre dilución y porcentaje de inhibición en los extractos obtenidos con etanol: Et1) extracto alpeorujos picudo; Et2) extracto alpeorujos picual; Et3) extracto alpeorujos hojiblanca

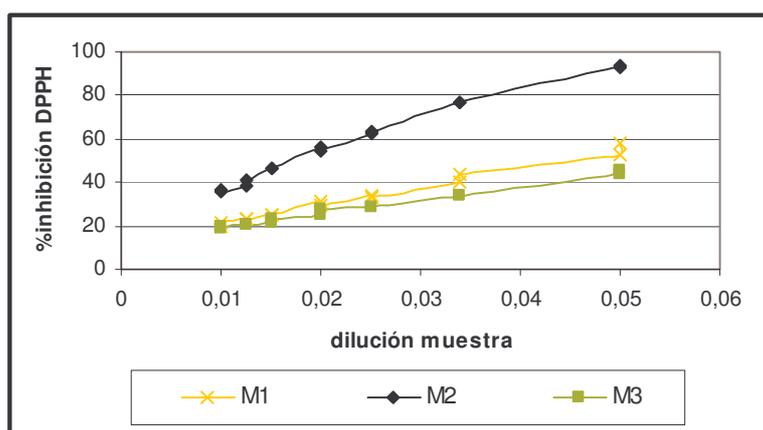
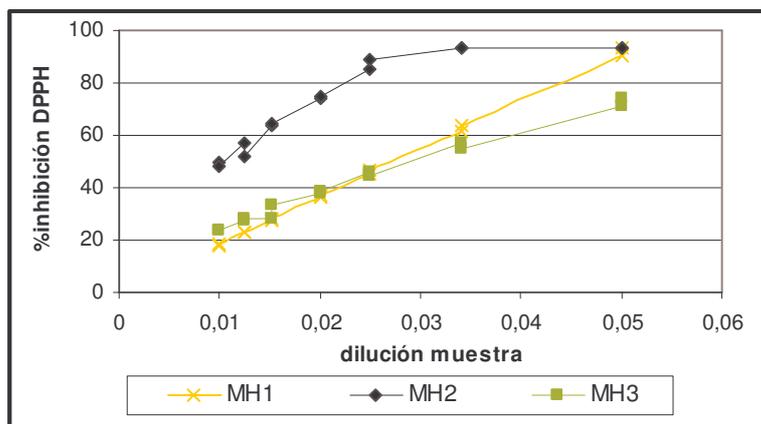


Figura 18. Relación entre dilución y porcentaje de inhibición en los extractos obtenidos con metanol: M1) extracto alpeorujos picudo; M2) extracto alpeorujos picual; M3) extracto alpeorujos hojiblanca



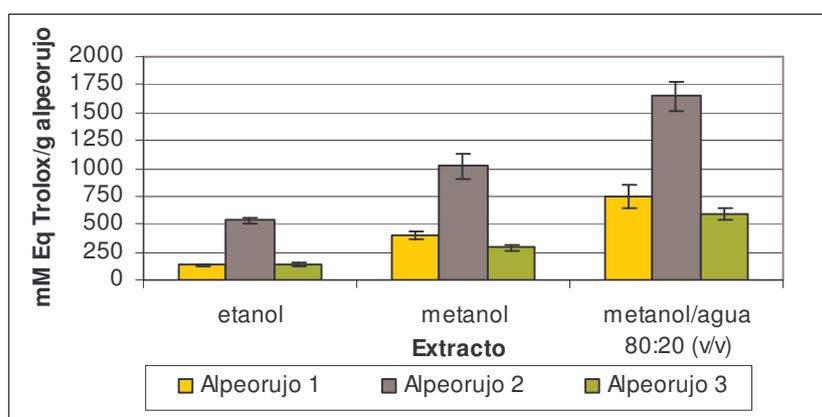
**Figura 19. Relación entre dilución y porcentaje de inhibición en los extractos obtenidos con metanol/agua (80:20 v/v): MH1) extracto alpeorujos picudo; MH2) extracto alpeorujos picual; MH3) extracto alpeorujos hojiblanca**

La actividad antioxidante media de los extractos también difiere significativamente según el disolvente utilizado en la extracción ( $p < 0,05$ ) y del tipo de alpeorujos utilizado para ella ( $p < 0,05$ ).

En la tabla 6 se muestran los valores de actividad antioxidante expresados como milimoles equivalentes de Trolox/ g de alpeorujos. En ella observamos que, en todos los casos, el alpeorujos con mayor actividad antioxidante fue el número 2, proveniente de la variedad picual de aceituna, habiéndose diferencias estadísticamente significativas frente a la actividad presentada por el alpeorujos 1(picudo) ( $M_2 - M_1 = 642$ , error estándar 141) y el alpeorujos 3 (hojiblanca) ( $M_2 - M_3 = 725$ , error estándar 141). Además, nuevamente se ve de forma clara la influencia del medio extractivo de manera que, al igual que ocurría con el contenido total en polifenoles, a medida que aumenta la polaridad del disolvente aumenta también la capacidad antioxidante. Este fenómeno podemos observarlo de manera gráfica en la figura 20, donde queda constatado que, en los tres tipos de alpeorujos, el extracto metanol/agua es el que mayor actividad antioxidante posee, seguido del extracto metanólico, mientras que la actividad del extracto obtenido con etanol fue mucho más discreta.

**Tabla 6. Actividad antioxidante de los diferentes extractos (mM equivalentes de Trolox/g de alpeorujo), valor medio y desviación estándar (n=10)**

Disolvente	Alpeorujo	mM ET /g alpeorujo
Etanol	1	130,99 ± 15,77
	2	532,28 ± 29,11
	3	139,41 ± 13,19
Metanol	1	395,25 ± 37,48
	2	1018,83 ± 107,85
	3	291,29 ± 30,04
Metanol/agua	1	744,14 ± 100,99
	2	1644,07 ± 122,68
	3	589,10 ± 56,78



**Figura 20. Actividad antioxidante de los diferentes extractos de alpeorujo: alpeorujo 1) variedad picudo; alpeorujo 2) variedad picual; alpeorujo 3) variedad hojiblanca**

En distintos estudios se describe que el contenido en polifenoles del alpeorujo es elevado puesto que, debido al coeficiente de partición que poseen estos compuestos, una gran proporción de ellos se arrastran con el agua de lavado durante el proceso de extracción del

aceite, de manera que la concentración de compuestos polifenólicos que se encuentra en el alpeorujo y en el fruto es siempre mayor que la detectada en el aceite de oliva (Keceli y Gordon, 2001; Mulinacci *et al.*, 2001).

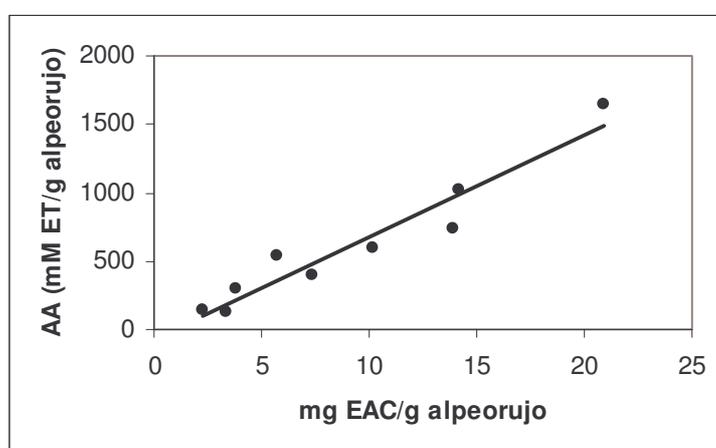
La concentración en polifenoles totales de las aceitunas depende de muchos factores, entre ellos, el tipo de cultivo, la variedad de aceituna, la madurez del fruto, el período de recogida, etc. (Gomez-Rico *et al.*, 2008), factores que condicionan a su vez el contenido polifenólico del alpeorujo (Obied *et al.*, 2008). Así, entre las variedades de aceitunas españolas, la picual está descrita junto con la picudo, como las variedades con mayor contenido en fenoles (Brenes *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2002), lo cual concuerda con los resultados obtenidos, en los que el alpeorujo de mayor contenido polifenólico es el procedente de la variedad picual, seguido del alpeorujo de picudo y finalmente por el de hojiblanca.

La utilización de disolventes para la extracción de compuestos antioxidantes de diferentes fuentes naturales es muy usada, y tanto el rendimiento de la extracción como la actividad de los extractos van a depender del disolvente, debido a las diferencias en el potencial antioxidante de compuestos con diferente polaridad. Es por ello importante hacer un estudio comparativo entre diferentes solventes para cada sustrato del cual se quiere hacer una extracción (Moure *et al.*, 2001). En el presente estudio se han utilizado tres disolventes, etanol, metanol y una mezcla hidroalcohólica de metanol y agua (80:20), aumentando en este orden la polaridad de los mismos, encontrando una relación positiva entre la polaridad y el rendimiento de las extracciones, obteniendo la mayor concentración de polifenoles y actividad antioxidante con los disolventes más polares. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en estudios sobre alpeorujo australiano, en los que se testaron diferentes disolventes en orden creciente de polaridad, obteniendo los mejores resultados de recuperación de fenoles con mezclas de metanol y agua en diferentes proporciones, y con buenos resultados también en extracciones llevadas a cabo con metanol y con agua. Con acetato de etilo se obtuvieron rendimientos muy bajos, pero puede ser interesante utilizarlo para la extracción selectiva de fenoles de bajo y medio peso molecular (Obied *et al.*, 2005).

A la vista de estos resultados, la utilización de metanol o de metanol/agua es un buen método para la extracción de los polifenoles presentes en el alpeorujo y su posterior utilización.

Diferentes autores describen la existencia de una correlación entre el contenido polifenólico y la actividad antioxidante, de manera que a medida que aumenta el primero el valor de actividad antioxidante también se incrementa (Kedage *et al.*, 2007). No obstante, es cierto que a veces, y dependiendo del tipo de ensayo utilizado para la medida de dicha actividad, no se encuentra correlación alguna (Moure *et al.*, 2001).

En nuestro caso existe un buen grado de correlación ( $r^2 = 0,93$ ) entre el contenido total en polifenoles de las muestras y la actividad antioxidante, como se refleja en la figura 21.



**Figura 21. Correlación entre el contenido polifenólico total y la actividad antioxidante medida mediante el método del DPPH**

## 2. ELABORACIÓN DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA CON COMPUESTOS FENÓLICOS

### 2.1. MATERIAL Y MÉTODOS

#### 2.1.1. Componentes de la fase lipídica de las vesículas

Como ya se indicó en el punto 3.1. de la introducción, la membrana de los liposomas está formada por diferentes tipos de fosfolípidos y colesterol. Dado que para la realización del trabajo recogido en esta memoria se han utilizado dos tipos de lípidos en función de las vesículas preparadas, arqueosomas o liposomas convencionales, a continuación se recoge la composición lipídica de cada una de ellas.

#### A) Arqueosomas: lípidos polares de arqueas. Obtención

##### A-1. Microorganismos

Se seleccionó para la realización del presente trabajo una cepa de *Halobacterium salinarum*, concretamente *H. salinarum* CECT 396, ya que en trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación se comprobó que sus lípidos polares eran capaces de originar arqueosomas estables (Cuerda-Correa, 2005; Gonzalez-Paredes *et al.*, 2009).

##### A-2. Técnicas de cultivo

Para el cultivo de la citada arquea, se utilizó el medio OS, descrito por Oesterhelt y Stoeckenius (1974), que por cada litro presenta la composición que se recoge en la tabla 7.

**Tabla 7. Composición del medio OS**

NaCl	250 g
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	20g
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> 2 H <sub>2</sub> O	3 g
KCl	2 g
peptona	10 g
Agua destilada hasta	1000ml

El medio de cultivo se suplementó con 0,1 ml/l de una disolución de metales traza cuya composición se detalla en la tabla 8 y que se preparó en un litro de HCl 0,1N.

**Tabla 8: Composición de la disolución de metales traza**

ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	6,6 g
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	1,7g
Fe(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 6H <sub>2</sub> O	3,9g
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0,7g

El medio se llevó hasta un pH de 7.3 con NaOH 1 M y HCl 1M. Para la elaboración de medio OS sólido se añadió agar purísimo (Difco) al 2%.

La obtención de biomasa se llevó a cabo en un fermentador Biostat B (Braun Biotech International) (Figura 22) en 1l de medio OS, bajo las siguientes condiciones de cultivo:

- Temperatura: 39° C.
- pH: 7,3.
- Agitación: 300 r.p.m.
- Aireación: a saturación de oxígeno.



**Figura 22. Fermentador Biostat B en el que se obtuvo la biomasa de *H. salinarum* CECT 396**

Para la inoculación del fermentador se utilizó un cultivo joven (30 h) en medio líquido OS. El volumen del inóculo fue del 10% con respecto al volumen final del fermentador. La biomasa se recogió después de 50 h de incubación, al inicio de la fase estacionaria, mediante centrifugación en frío (entre 0° y 4°C) a 9000 r.p.m. durante 20 minutos en una centrífuga Beckman J-21. Se realizó un lavado de la biomasa con NaCl 4M para eliminar posibles restos del medio de cultivo y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. La biomasa obtenida fue conservada a -20°C hasta su utilización.

### A-3. Extracción de lípidos polares totales

El protocolo de extracción está basado en el diseñado por Bligh y Dyer (1959), descrito por Kates (1986) con algunas modificaciones en los tiempos de extracción. Un esquema del proceso de extracción se muestra en la figura 23.

En un matraz Erlenmeyer se pesaron 4g de pasta celular húmeda. Ésta fue resuspendida en 10 ml de NaCl 4M hasta obtener una suspensión homogénea. Se le añadieron entonces 37,5 ml de metanol/cloroformo (2:1 v/v), manteniendo la mezcla bajo agitación magnética a temperatura ambiente durante al menos 2 horas.

Tras este tiempo de extracción la mezcla se centrifugó a 4000 r.p.m. en una centrífuga Beckman durante 10 minutos. Después de centrifugar, el residuo sólido fue resuspendido en 47,5 ml de metanol/cloroformo/agua (2:1:0,8 v/v), se homogenizó la mezcla por agitación y se centrifugó en las mismas condiciones citadas anteriormente. Los sobrenadantes de ambas centrifugaciones se unieron y fueron tratados con 25 ml de cloroformo y 25 ml de agua, y tras agitación se centrifugó de nuevo durante 10 minutos a 4000 r.p.m. La fase clorofórmica fue recuperada y tratada con unas gotas de benceno para eliminar las posibles trazas de agua. El disolvente fue eliminado en un rotavapor a 40°C hasta la total desecación de la muestra.

Para la recuperación de la fracción total de lípidos polares, el residuo lipídico seco se resuspendió en un volumen conocido de cloroformo/metanol (2:1 v/v) y los lípidos polares se obtuvieron mediante precipitación con 20 volúmenes de acetona fría, recogándose el precipitado por centrifugación a 3500 r.p.m. durante 10 minutos. Este proceso se repitió tres veces para asegurar la total eliminación de sustancias lipídicas no polares. Finalmente, los

lípidos polares totales se cuantificaron por pesada y se conservaron en cloroformo/metanol (2:1 v/v) hasta su utilización (Choquet et al., 1992).

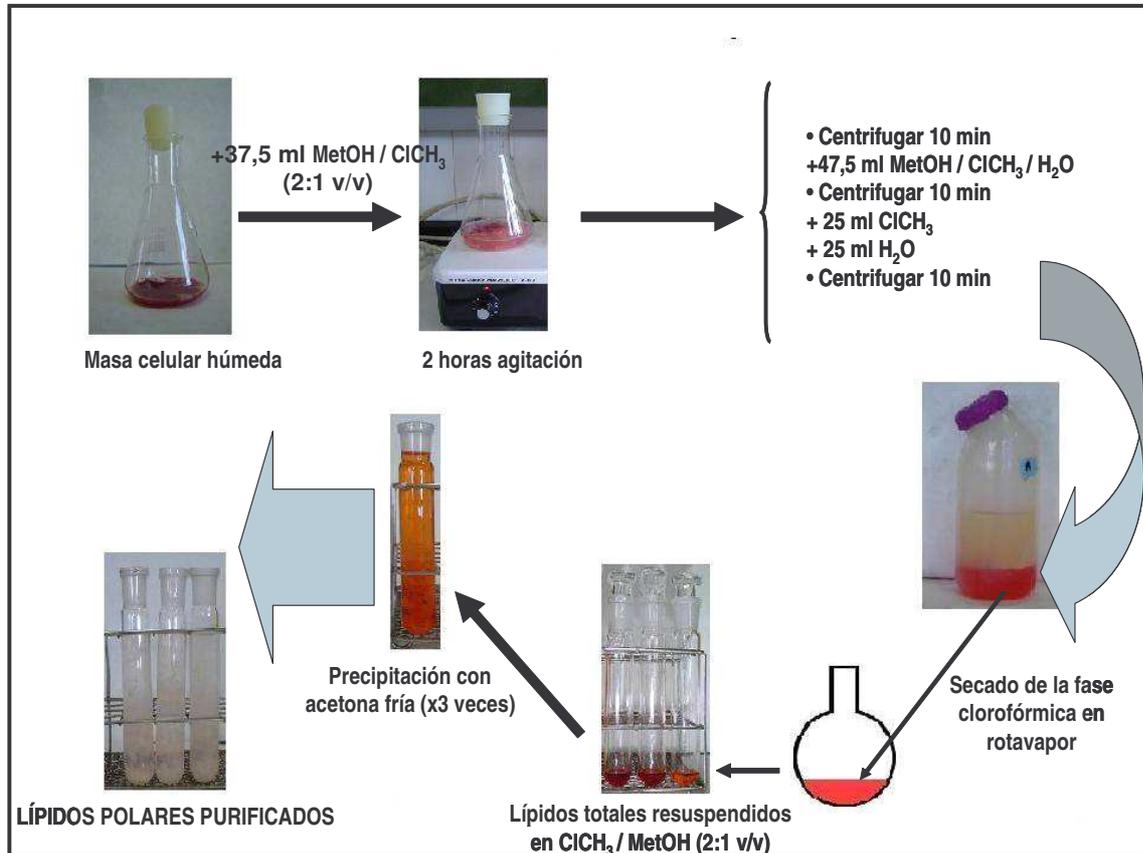


Figura 23. Proceso de extracción de los lípidos polares totales

#### A-4. Identificación y caracterización de los lípidos polares

El análisis de los lípidos polares para su identificación fue llevado a cabo por el servicio de Identificación de la DSMZ, en Alemania, a partir de pasta celular húmeda suministrada.

Para determinar la temperatura de transición del lípido se llevó a cabo un análisis calorimétrico diferencial (DSC) en un calorímetro diferencial de barrido (Shimadzu modelo DSC-50Q) de tipo flujo de calor en el Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada. Para dicho análisis se utilizó un gradiente de temperatura de 2 °C/min.

## **B) Liposomas convencionales: fosfolípidos**

Los fosfolípidos son los componentes fundamentales de la bicapa lipídica de los liposomas, y entre ellos, la fosfatidilcolina es el más frecuentemente utilizado para la preparación de liposomas, ya que parece interactuar mejor con la piel que otros fosfolípidos, como el fosfatidilinositol (Juninger *et al.*, 1991). El fosfolípido empleado en el presente trabajo es el Phospholipon® 90G (P90G), una fosfatidilcolina pura de soja (96%) estabilizada con 0,1% de palmitato ascórbico, suministrada por Nattermann Phospholipid GmbH (Colonia, Alemania).

Se presenta como un granulado de color amarillo pálido, y se conservó a -20°C hasta su utilización.

## **C) Colesterol**

Es usual la utilización de colesterol en la elaboración de liposomas ya que se ha comprobado que proporciona una estructura más ordenada. En la fase de cristal líquido el colesterol limita la movilidad de las cadenas de los fosfolípidos, haciendo la membrana más compacta, mientras que la fase de gel incrementa la movilidad de estas cadenas, produciendo una disminución de la temperatura de transición ( $T_m$ ) de un estado al otro, lo cual resulta en un aumento de la fluidez de la membrana. En la fase de cristal líquido, la región rígida de los anillos de colesterol interactúa con las cadenas hidrocarbonadas cercanas a las cabezas polares de los fosfolípidos mientras que los otros fragmentos de las cadenas tienen una libertad de movimiento relativamente alta. En el caso de la fase de gel, la presencia de colesterol en la estructura de la membrana debilita las interacciones de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas y los ácidos grasos, previniendo la cristalización de los liposomas (Sulkowski *et al.*, 2005).

La fluidez de la bicapa y el contenido en colesterol van a ser de crucial importancia para una liberación efectiva en la piel de la sustancia encapsulada dentro de los liposomas, ya que el mecanismo de penetración a través de la piel va a estar condicionado por el comportamiento de fluidez (Coderch *et al.*, 2000).

Por este motivo todas las formulaciones, tanto de arqueosomas como de liposomas convencionales, preparadas para el presente estudio contienen colesterol en su composición,

en diferentes relaciones molares como se mostrará más adelante. El colesterol utilizado fue suministrado por Sigma Aldrich.

#### **D) Disolventes de la fase lipídica**

Los disolventes utilizados para la solubilización de los componentes de la fase lipídica deben ser volátiles con el fin de que sean fácilmente eliminables durante el proceso de preparación de los liposomas. En nuestro caso se utilizó cloroformo para disolver el P90G y el colesterol, y una mezcla cloroformo/metanol 2:1 (v/v) para los lípidos polares arqueales.

Todos ellos eran eliminados mediante evaporación en rotavapor una vez que los componentes se encontraban disueltos.

#### **2.1.2. Componentes de la fase acuosa de las vesículas**

En todos los casos como fase acuosa se utilizó una solución acuosa de los compuestos fenólicos extraídos del alpeorujo. Con este fin se seleccionó el extracto metanólico del alpeorujo 2, ya que previamente había demostrado su gran capacidad antioxidante y, al tratarse de un disolvente volátil, permitía la eliminación del mismo para pasar el extracto a un disolvente apropiado para la elaboración de los liposomas.

Para ello, el extracto polifenólico fue secado en rotavapor. Una vez eliminado el disolvente se determinó el peso seco del extracto y entonces fue resuspendido en agua bidestilada y filtrado por filtros estériles con tamaño de poro 0,45  $\mu\text{m}$  con el fin de eliminar partículas en suspensión y residuos de grasa, obteniéndose una solución límpida de color pardo.

Para la encapsulación se utilizaron soluciones acuosas polifenólicas con una concentración de 10 mg de extracto seco/ml, soluciones que, cuantificadas mediante el método de Folin-Ciocalteu previamente descrito para la determinación del contenido total en fenoles, contenían  $355 \pm 12 \mu\text{g}$  EAC/ml (Equivalentes de Ácido Cafeico/ml de solución).

### 2.1.3. Composición de las formulaciones objeto de estudio

Se elaboraron diferentes formulaciones tanto de arqueosomas como de liposomas de fosfatidilcolina, un total de 12, con el fin de evaluar el efecto de parámetros tales como la concentración de lípido y de colesterol en la estabilidad de las mismas. Así, se emplearon dos concentraciones para ambos tipos de lípido, arqueal y fosfatidilcolina, y tres concentraciones molares de colesterol para cada concentración de lípido, 1:1, 1:0,5 y 1:0,25 respectivamente.

En la tabla 9 se resume la composición de cada una de las formulaciones:

**Tabla 9. Composición de las formulaciones preparadas**

Componentes	Formulación											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Lípidos polares arquea (mg/ml)	10	-	10	-	10	-	20	-	20	-	20	-
P90G (mg/ml)	-	10	-	10	-	10	-	20	-	20	-	20
Colesterol (mg/ml)	4,3	5	2,15	2,5	1,1	1,25	8,6	10	4,3	5	2,15	2,5
Extracto antioxidante (mg peso seco/ml)	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

### 2.1.4. Elaboración de las vesículas

#### A) Vesículas multilaminares

El método de elaboración de las vesículas utilizado en este trabajo fue el mismo tanto para arqueosomas como para liposomas de fosfatidilcolina. Dicho método fue el llamado de hidratación del film lipídico, descrito por Bangham y colaboradores (1974), con el que se obtienen suspensiones de liposomas multilaminares.

En el método podemos distinguir varias fases. La primera fase consiste en la solubilización de todos los componentes lipídicos y sustancias lipofílicas que van a formar parte de los liposomas. En nuestro caso se llevó a cabo en un matraz de fondo redondo de 50 ml de capacidad, y se procedió a la solubilización de los lípidos polares de arquea y colesterol para los arqueosomas, y del P90G así como el colesterol para los liposomas convencionales.

Se añadió disolvente suficiente para asegurar la completa disolución de los componentes lipídicos, de manera que la película que queda formada sobre la superficie del matraz una vez evaporado el disolvente sea delgada y homogénea, lo cual es importante en la fase siguiente.

La evaporación se llevó a cabo en un rotavapor a 40°C y 200 r.p.m. operando a vacío hasta la completa evaporación del disolvente. Una vez formada la película, el matraz se mantenía una hora a vacío para asegurar la eliminación de cualquier traza de disolvente.

La segunda fase consistió en la hidratación de la película lipídica. Para ello se añadió la fase acuosa, el extracto fenólico, en cantidad igual al volumen de suspensión liposómica que se pretende obtener, y se mantuvo en agitación durante 1 h a 1000 r.p.m. mediante un agitador de varilla mecánico Boeco OSD-20, a temperatura ambiente, dada la baja temperatura de transición de los lípidos utilizados (figura 24). De cada una de las formulaciones se prepararon dos réplicas.



**Figura 24. Elaboración de liposomas multilaminares mediante agitación**

## **B) Vesículas unilaminares**

Una vez preparadas las vesículas multilaminares, dichas suspensiones liposómicas se dejaban reposar 12 h de modo que el sistema se estabilizara y las vesículas terminaran de formarse, y pasado ese tiempo eran tratadas con ultrasonidos para reducir el tamaño de partícula y mejorar la estabilidad de las vesículas. Para ello se utilizó una sonda de ultrasonidos Hielscher UP50H (Alemania) a una amplitud del 20% del total durante 4 minutos, en ciclos de 0,8 segundos, ya que previamente se había establecido esta potencia y tiempo como idóneo para reducir el tamaño de las vesículas sin modificar la integridad de las mismas (González-Paredes *et al.*, 2009).

### **2.1.5. Caracterización de las vesículas**

La caracterización de los liposomas obtenidos es un proceso crucial ya que nos va a servir para determinar cual de las formulaciones preparadas es más ventajosa para posteriores aplicaciones.

Para dicha caracterización se realizaron medidas de diferentes parámetros:

#### **A) Diámetro medio, índice de polidispersión, potencial zeta**

El **diámetro medio** de las partículas fue determinado mediante un Zetasizer nano (Malvern, UK) que usa una técnica espectroscópica de dispersión de láser conocida como “Dynamic Light Scattering” (DLS). Mediante la técnica de DLS se mide el movimiento browniano de las partículas que se encuentran en suspensión y lo relaciona con el tamaño de las mismas. Dicho movimiento se debe al choque aleatorio de las partículas con las moléculas del líquido en el que se encuentran suspendidas. Una característica importante del movimiento Browniano para el DLS es que las partículas pequeñas se mueven rápidamente, mientras que la velocidad disminuye a medida que aumenta el tamaño de partícula. Cuando una partícula es iluminada por una fuente de luz, por ejemplo un láser, se produce dispersión de dicha luz en todas direcciones. Si pusiéramos una pantalla cerca de la partícula, ésta sería iluminada por la luz dispersada. Si consideramos muchas partículas en vez de una sola, en la pantalla tendríamos una especie de moteado, con zonas iluminadas y zonas oscuras. Las zonas iluminadas corresponderían a los haces de luz dispersados que llegan con la misma fase a la pantalla,

originando una onda constructiva que nos da el punto luminoso. Por el contrario las zonas oscuras son debidas a los haces dispersados cuya suma de fases resulta destructiva, y por tanto se cancelan, originando un área oscura. Como las partículas están en continuo movimiento, las áreas iluminadas y oscuras también se mueven, o en otras palabras, la intensidad de luz de estas áreas presenta fluctuaciones. El Zetasizer nano mide el índice de intensidad de estas fluctuaciones y lo usa para calcular el tamaño de partícula, utilizando para ello un correlador digital, el cual mide el grado de similitud o correlación entre dos señales durante un periodo de tiempo. A partir de los datos de correlación desde un tiempo 0 hasta un tiempo infinito, el aparato establece una función de correlación que le sirve para originar una distribución de tamaños. Un detector es usado para medir la intensidad de la luz dispersada. Como la luz será dispersada en todas las direcciones, el detector se puede colocar en cualquier posición y detectaría la dispersión. Así, el detector en el Zetasizer nano se sitúa con un ángulo de  $173^\circ$  respecto al rayo dispersado. En la figura 25 se representa un esquema del sistema del Zetasizer nano.

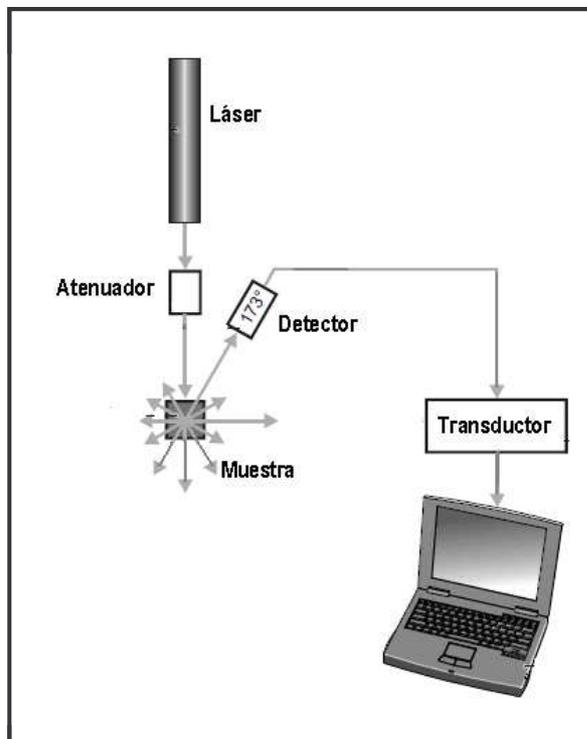


Figura 25. Representación esquemática del Zetasizer nano

Otro parámetro que podemos determinar también mediante el Zetasizer nano es el índice de polidispersión (I.P.). Dicho índice es una expresión matemática que considera el error relativo de ajustar los valores experimentales a la curva que se obtiene de la función de correlación (Pusey y Vanmegem, 1989), y sirve para determinar la homogeneidad de la suspensión. Su valor va de 0, que sería el valor para una suspensión totalmente homogénea, a 1, que representa el máximo de heterogeneidad en la distribución de tamaños de la suspensión.

El tercer parámetro que determinamos mediante el Zetasizer nano es el potencial zeta de la muestra. Cuando una partícula se encuentra suspendida en un líquido se desarrolla en la superficie de la partícula una carga neta que va a afectar la distribución de los iones alrededor de la interfase, de manera que alrededor de la superficie de la partícula se sitúan iones de carga contraria a la de la partícula. En la capa de líquido que rodea a la partícula podemos distinguir dos partes, una interna, la más cercana a la partícula, donde los iones están fuertemente unidos a ella, y otra más externa, difusa, donde esta unión no es tan firme. Esta capa difusa representa el límite dentro del cual los iones y la partícula forman una entidad estable. Así, cuando una partícula se mueve, los iones que están dentro de esta frontera se mueven con la partícula, mientras que los que están fuera no se mueven. Este límite se denomina plano de deslizamiento, y el potencial que existe en este plano es lo que se denomina potencial zeta. La figura 26 representa de forma esquemática estos conceptos.

La magnitud del potencial zeta es un indicador de la estabilidad de los sistemas coloidales. Si las partículas en suspensión tienen un potencial zeta de elevada magnitud positiva o negativa, tenderán a repelerse unas a otras y por tanto no tendrán tendencia a agregarse. Si por el contrario los valores de potencial zeta son pequeños no existirá esta fuerza de repulsión y las partículas se irán acercando y formando agregados. Los valores de potencial zeta que se consideran como línea divisoria entre suspensiones estables e inestables son de +30mV /- 30mV, es decir, las suspensiones con potencial zeta superior a +30mV o por debajo -30mV se consideran estables.

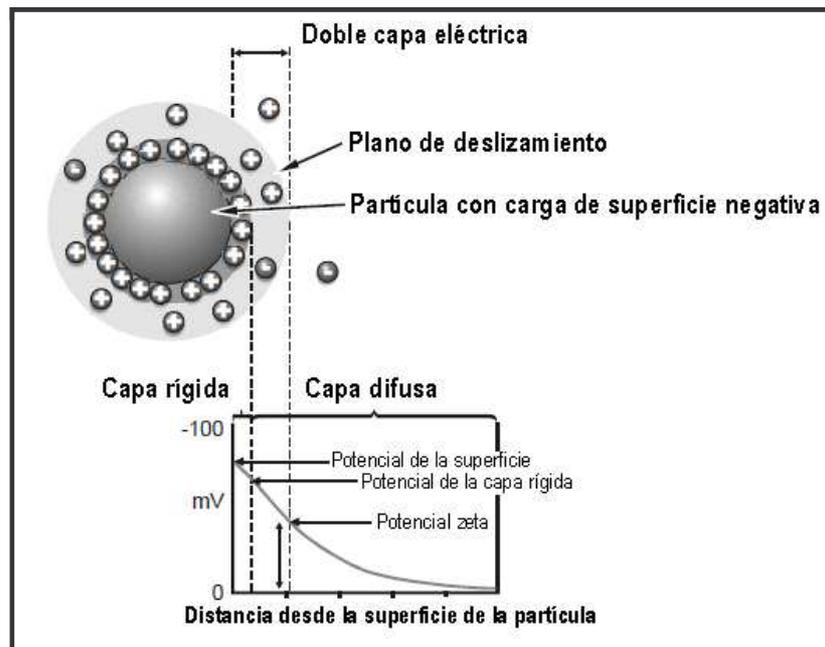


Figura 26. Representación de la distribución de cargas alrededor de la superficie de la partícula. Potencial zeta.

El Zetasizer nano mide el potencial zeta mediante la combinación de dos técnicas de medida: la electroforesis y la velocimetría laser doppler. Este método mide como de rápido se mueve una partícula en un líquido cuando se aplica un campo eléctrico. Una vez que se conoce la velocidad con la que se mueve la partícula, sabiendo el campo que se ha aplicado y dos constantes de la muestra, viscosidad y constante dieléctrica, podemos calcular el potencial zeta. Esto se consigue mediante una técnica patentada por Malvern llamada M3-PALS (Zetasizer nano user manual, 2008).

### B) Morfología de las vesículas

Para comprobar la formación de las vesículas así como su morfología, las muestras se observaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). Para ello se utilizó un microscopio Zeiss 902 (Alemania) en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (C.I.C.). Para la observación al TEM, las muestras de liposomas fueron teñidas empleando una técnica de tinción negativa, descrita a continuación:

- Incubación de rejillas de cobre cubiertas con una lámina de Formvar (Ernest F. Fullan, Inc.) con la suspensión de liposomas durante 4 min.
- Lavado de las rejillas con agua bidestilada, dos lavados de 1 min cada uno.
- Tinción con acetato de uranilo al 2% en solución acuosa, 1 min.
- Secado de la muestra en estufa a 37° C durante 10 min.

La observación de las muestras se realizó a un voltaje de aceleración de 80kV, utilizando diferentes aumentos, según cada muestra, entre 3000 y 40000X. Dichas observaciones se hicieron a diferentes intervalos de tiempo. Así, se tomaron los tiempos desde su elaboración, a 30, 60 y 90 días, con el fin de poder determinar la incidencia del paso del tiempo sobre la estructura de las vesículas.

### C) Eficiencia de encapsulación (E%)

Una vez obtenidas las suspensiones liposomiales es necesario determinar que cantidad de la sustancia activa de partida ha sido encapsulada y cual no, ya que la capacidad de encapsulación de los liposomas es limitada y los rendimientos obtenidos en la práctica nunca alcanzan el 100% de captación de la sustancia que queremos encapsular (Clares *et al.*, 2009). Para determinar la eficiencia de encapsulación es necesario purificar las vesículas obtenidas, de manera que eliminemos la porción no encapsulada de la sustancia activa que habrá quedado en la fase acuosa que rodea a los liposomas.

Existen diferentes métodos para separar la fracción no encapsulada, y así puede hacerse por cromatografía en gel, HPLC (Fang *et al.*, 1997), centrifugación, diálisis o ultrafiltración (Puissieux, 1978). La elección de un método u otro va a depender de la solubilidad del principio activo encapsulado.

Considerando que el extracto fenólico es muy hidrosoluble se realizó una diálisis en medio acuoso, de manera que la porción del extracto no encapsulada saldría al medio de la diálisis, quedando en el interior de la bolsa de diálisis exclusivamente los liposomas. Para ello se utilizó una membrana de celulosa regenerada con tamaño de poro 12-14.000 Da (Spectra/por). Previamente se había determinado el tiempo necesario para que saliera todo el extracto no

encapsulado, y se estableció que 2 h de diálisis eran suficientes para purificar las vesículas. No obstante, la diálisis se prolongó durante 4 h con el fin de asegurar que no quedaran restos de sustancia sin encapsular.

El proceso seguido es el que se describe a continuación:

1 ml de cada preparación se dializó en 200 ml de agua bidestilada durante 4 h, a temperatura ambiente y bajo continua agitación magnética (Figura 27).

Una vez purificadas las vesículas, se recuperó el contenido de las bolsas de diálisis, es decir, los liposomas purificados. Se produjo la ruptura de las vesículas mediante una dilución 1:1 en metanol y posterior centrifugación a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos, permitiendo así que la porción encapsulada quedara libre para proceder a su cuantificación y poder determinar la eficiencia de encapsulación, por diferencia con la cantidad en las vesículas sin purificar, que también se rompieron por dilución en metanol y posterior centrifugado. Una vez finalizada la centrifugación se obtuvo un sobrenadante límpido que contenía los fenoles y un precipitado constituido por los lípidos y demás componentes lipófilos contenidos en las formulaciones.



**Figura 27. Purificación de las vesículas mediante diálisis**

La cuantificación del extracto encapsulado se llevó a cabo mediante el método de Folin-Ciocalteu para cuantificación de fenoles totales, previamente descrito.

Brevemente, una alícuota del sobrenadante (15  $\mu$ l) se hizo reaccionar con 75  $\mu$ l de reactivo de Folin-Ciocalteu 2N proporcionado por Sigma Aldrich. Se agitó hasta conseguir una mezcla

homogénea, se añadieron 225 µl de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20%, se agitó y posteriormente se añadió agua bidestilada para llevar a un volumen final de 1,5 ml. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente y protegido de la luz durante 2 h, pasadas las cuales se leyó la absorbancia a 765 nm en un espectrofotómetro UV/VIS Cintra 10. La recta de calibrado se hizo con una solución patrón de ácido cafeico (0-1mg/ml) ( $y = 1,0804x - 0,009$ ;  $R^2 = 0,9853$ ) y el contenido en fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido cafeico (EAC mg/ml).

La eficiencia de encapsulación se expresó como porcentaje y se calculó usando la siguiente fórmula:

$$E\% = (C_{\text{purificadas}}/C_{\text{total}}) \times 100$$

donde  $C_{\text{purificadas}}$  es la cantidad de fenoles encontrada en las vesículas purificadas

$C_{\text{total}}$  es la cantidad de fenoles en las vesículas sin purificar

En todos los ensayos se utilizó un control negativo para comprobar que no existían interferencias con otros componentes de las formulaciones, ya que está descrito que el método de Folin-Ciocalteu puede dar falsos positivos debido a determinadas sustancias que sin ser de naturaleza fenólica originan color tras la reacción con el compuesto molibdotúngstico (Prior *et al.*, 2005). Este control consistía en la correspondiente formulación liposómica pero vacía, es decir, sin extracto antioxidante. Las medidas fueron realizadas por triplicado para cada formulación.

#### D) Actividad antioxidante

Las dispersiones liposomiales fueron sometidas al método del DPPH previamente descrito para determinar su capacidad antiradicalaria o antioxidante.

Así, 0,1ml de cada una de las formulaciones se mezclaron con 3,9 ml de DPPH en solución metanólica (25mg/l). Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 1h, tiempo suficiente para que la reacción llegara al equilibrio, y pasado ese tiempo se midió la disminución de absorbancia del DPPH a 515 nm en un espectrofotómetro UV-VIS Cintra. Los

resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de DPPH, calculado de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición de DPPH} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{muestra}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Donde  $A_{\text{DPPH}}$  es la absorbancia inicial del DPPH y  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia del DPPH tras reaccionar con los liposomas.

El ensayo fue realizado por triplicado para cada formulación.

#### **2.1.6. Estudio de estabilidad en función del tiempo**

Con el fin de evaluar la influencia de la composición de las vesículas obtenidas sobre las características de las mismas, se llevó a cabo un estudio de estabilidad de las formulaciones preparadas, tanto de arqueosomas como de liposomas de fosfatidilcolina, durante un período de tiempo de 90 días. Durante ese período se evaluaron los parámetros de caracterización anteriormente descritos, realizando medidas a tiempo 0 y posteriormente a 30, 60 y 90 días desde la preparación de las vesículas, observando como el paso del tiempo modificaba o no las características iniciales de las suspensiones liposomiales.

Así se evaluaron los cambios en las dimensiones, índice de polidispersión y potencial zeta, cambios que se consideraron indicadores de la formación de agregados, lo cual se comprobó también mediante la observación de las muestras al microscopio electrónico de transmisión.

Las variaciones en la eficiencia de encapsulación son un indicador de la capacidad de la vesícula para retener la sustancia encapsulada, pudiendo determinar la pérdida de principio activo encapsulado a lo largo del tiempo de estudio si lo comparamos con la eficiencia obtenida en el momento de la preparación.

Todas las muestras fueron conservadas a 4° C durante el período de estudio.

### **2.1.7. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se estudiaron, desde un punto de vista estadístico, mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de un factor utilizando un nivel de significación  $<0,05$  para el rechazo de la hipótesis de igualdad de medias. Una vez decidido que las medias poblacionales comparadas eran diferentes se utilizó el método de Tukey de comparaciones múltiples para discriminar las diferencias de medias que eran estadísticamente significativas en un intervalo de confianza al 95%.

## 2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.2.1. Identificación y caracterización de los lípidos polares

Los lípidos polares identificados en la cepa de *Halobacterium salinarum* CECT 396 utilizada en este estudio presentaron estructura éter y análoga de los siguientes lípidos:

- Fosfatidilglicerol (PG)
- Metil-fosfatidilglicerolfosfato (PGP-Me)
- Fosfatidilglicerolsulfato (PGS)
- Dos fosfolípidos sin identificar
- Dos glicolípidos sin identificar

Estos resultados concuerdan con lo ya descrito por Kates en 1993 y posteriormente confirmado por otros autores (Gambacorta *et al.*, 1994; Corcelli *et al.*, 2002; Renner *et al.*, 2005), quienes citan como componente mayoritario de las membranas de arqueas halófilas extremas un arqueol análogo del fosfatidilglicerolfosfato monometilado (PGP-Me) y, como lípidos minoritarios, análogos de fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerolsulfato (PGS) y ácido fosfatídico (PA), no identificado en nuestra cepa.

Como se puede observar en la figura 28, los resultados de la calorimetría diferencial de barrido (DSC) mostraron que, a las temperaturas ensayadas, los lípidos polares no sufrían ningún cambio de fase, por lo que se puede deducir que la temperatura de transición de fase de estos lípidos es inferior a los 20° C, a la que se comenzó el análisis. La pequeña inflexión que se produce hasta los 35,91° C se debe probablemente a la pérdida de trazas de disolventes del proceso de extracción, no debiendo considerarse una transición de fase. Este resultado coincide con estudios previos realizados sobre la temperatura de transición de los lípidos arqueales, que revelaban temperaturas de transición para estos lípidos muy inferiores a las obtenidas para fosfolípidos de tipo éster como la fosfatidilcolina (Blocher *et al.*, 1984; Yamauchi *et al.*, 1993). Esta baja temperatura de transición permite la hidratación del lípido a temperatura ambiente para elaborar las vesículas en el estado de cristal líquido.

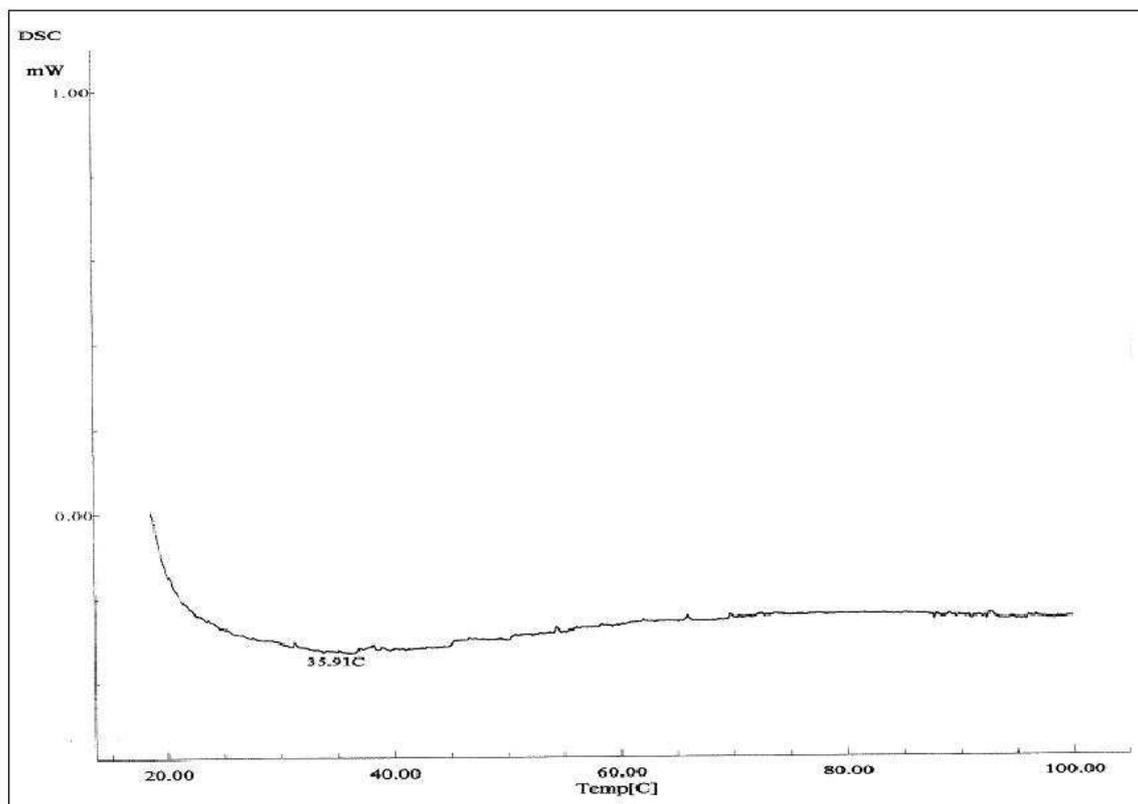


Figura 28. DSC de los lípidos polares de *H. salinarum* CECT 396

### 2.2.2. Caracterización de las vesículas elaboradas

El estudio de caracterización se ha estructurado en dos partes. En la primera se comparan las diferentes formulaciones de arqueosomas entre sí, con el fin de identificar la formulación más idónea de los mismos. En la segunda se comparan las formulaciones de arqueosomas con sus homólogas de fosfatidilcolina, con el fin de establecer si la utilización de lípidos arqueales presenta alguna ventaja frente a los lípidos tradicionalmente usados para la elaboración de liposomas.

#### 2.2.2.1. Arqueosomas

##### A) Diámetro medio, índice de polidispersión (I.P.) y potencial zeta

La tabla 10 muestra los valores obtenidos para el diámetro medio e índice de polidispersión de las diferentes formulaciones de arqueosomas elaboradas.

**Tabla 10. Diámetro medio e I.P. de las formulaciones de arqueosomas (media  $\pm$  SD, n=3)**

Concentración lípido (mg/ml)	Proporción molar colesterol	Formulación	Diámetro medio (nm)	I.P.
10	1:1	1	294,90 $\pm$ 18,43	0,532 $\pm$ 0,039
	1:0,5	3	153,4 $\pm$ 10,1	0,409 $\pm$ 0,1
	1:0,25	5	190,50 $\pm$ 7,34	0,431 $\pm$ 0,011
20	1:1	7	171,40 $\pm$ 2,98	0,392 $\pm$ 0,014
	1:0,5	9	185,4 $\pm$ 4,8	0,562 $\pm$ 0,112
	1:0,25	11	198,8 $\pm$ 8,5	0,577 $\pm$ 0,102

Como se puede observar, la formulación 1 fue la que presentó el mayor tamaño de partícula.

El índice de polidispersión está en torno a 0,5 en todos los casos, lo que indica una pequeña heterogeneidad en la distribución de tamaño debido a la existencia de dos poblaciones mayoritarias, una de mayor tamaño que la otra, como reflejaban los gráficos binodales que se obtenían del análisis mediante DLS.

En cuanto al potencial zeta todas las formulaciones de arqueosomas presentaron un valor altamente negativo, como refleja la tabla 11, lo cual es una consecuencia directa de las características químicas de los lípidos polares que componen estas vesículas, en los cuales prevalecen grupos polares con carga negativa (Patel *et al.*, 2007). Esto se puede considerar indicativo de una buena estabilidad posterior, ya que si ese valor de potencial zeta se mantiene va a hacer que las partículas se repelan y que, por tanto, no tiendan a la agregación con el paso del tiempo.

**Tabla 11. Potencial zeta de las formulaciones de arqueosomas (media  $\pm$  SD, n=3)**

Concentración lípido (mg/ml)	Proporción molar colesterol	Formulación	Potencial zeta (mV)
10	1:1	1	-63,7 $\pm$ 1,74
	1:0,5	3	-57,9 $\pm$ 1,86
	1:0,25	5	-54,9 $\pm$ 1,56
20	1:1	7	-59,6 $\pm$ 1,45
	1:0,5	9	-56,7 $\pm$ 2,07
	1:0,25	11	-60,5 $\pm$ 1,5

B) Morfología de las vesículas: observación mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

La figura 29 muestra las fotografías realizadas mediante TEM de las diferentes formulaciones, después de su elaboración y de haberlas tratado con ultrasonidos. Las vesículas presentaron una morfología irregular, sobre todo las formulaciones 3, 9 y 11. Además, en las formulaciones 1, 9 y 11 se puede observar la existencia de dos poblaciones con diferente distribución de tamaño, lo que justifica el valor más alto de I.P. que presentan estas tres formulaciones.

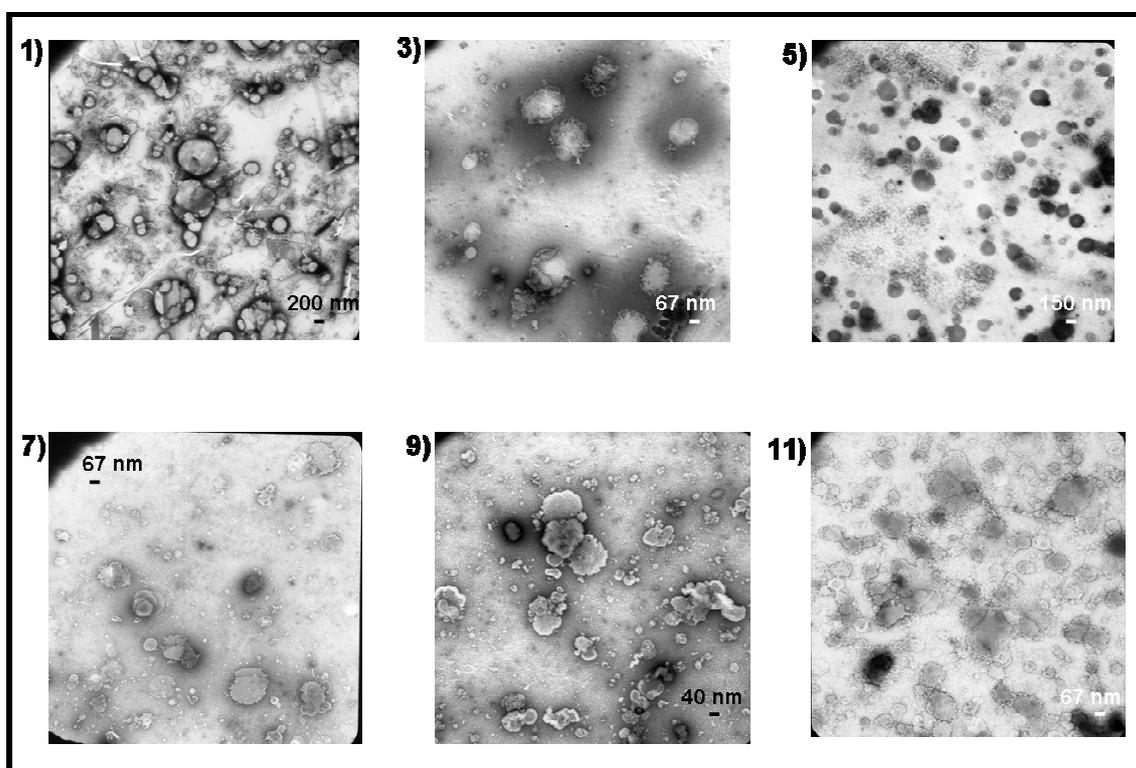


Figura 29. Morfología de las formulaciones de arqueosomas, 1, 3 y 5 (10 mg lípido/ml), 7, 9 y 11 (20 mg lípido/ml)

C) Eficiencia de encapsulación (E%)

La tabla 12 muestra las eficiencias de encapsulación alcanzadas por las diferentes formulaciones preparadas. El máximo valor de encapsulación lo presenta la formulación 9, diferenciándose significativamente del porcentaje alcanzado por todas las demás (Tabla 13).

El resto de formulaciones presentaron una eficiencia de encapsulación similar, en torno al 40%, sin que se hayaran diferencias significativas entre ellas.

**Tabla 12. Eficiencia de encapsulación de las formulaciones de arqueosomas (media  $\pm$  SD; n=2)**

Concentración lípido (mg/ml)	Proporción molar colesterol	Formulación	E%
10	1:1	1	37,79 $\pm$ 1,47
	1:0,5	3	37,53 $\pm$ 2,39
	1:0,25	5	38,80 $\pm$ 1,33
20	1:1	7	38,74 $\pm$ 2,51
	1:0,5	9	51,00 $\pm$ 1,31
	1:0,25	11	40,32 $\pm$ 0,62

**Tabla 13. Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95%**

Formulaciones comparadas (a-b)	9-1	9-3	9-5	9-7	9-11
Diferencia de medias (Ma-Mb) (error estándar= 2,4)	13,4	13,5	12,3	12,4	10,3

#### D) Actividad antioxidante (% inhibición DPPH)

La tabla 14 presenta la actividad antioxidante de las diferentes formulaciones de arqueosomas. Todas las formulaciones presentaron una alta actividad antioxidante, en torno al 90%, existiendo diferencias significativas únicamente entre las formulaciones 3 y 11 ( $M_3 - M_{11} = 5,78$ , e.e. 1,39) y entre 5 y 11 ( $M_5 - M_{11} = 5,78$ , e.e. 1,39). Este valor fue equivalente al obtenido por el extracto fenólico sin encapsular así como por un control positivo constituido por una solución metanólica de trolox (1 mg/ml); ambos proporcionaron valores de inhibición del DPPH en torno al 90%.

**Tabla 14. Actividad antioxidante (AA) de las formulaciones de arqueosomas (media  $\pm$  SD; n=2)**

Concentración lípido (mg/ml)	Proporción molar colesterol	Formulación	AA (%inhibición DPPH)
10	1:1	1	87,35 $\pm$ 3,60
	1:0,5	3	90,87 $\pm$ 0,58
	1:0,25	5	90,81 $\pm$ 0,39
20	1:1	7	85,52 $\pm$ 1,20
	1:0,5	9	88,04 $\pm$ 0,74
	1:0,25	11	85,09 $\pm$ 1,48

### 2.2.2.2. Estudio comparativo entre arqueosomas y liposomas convencionales

#### A) Diámetro medio, índice de polidispersión (I.P.) y potencial zeta

Con el fin de que la comparación entre composiciones análogas de arqueosomas y liposomas convencionales fuera más sencilla, se convino agrupar las formulaciones según su contenido en colesterol, dos formulaciones por cada concentración de lípido, lo que da lugar a tres grupos de cuatro formulaciones cada uno. La tabla 15 resume los valores de diámetro medio e índice de polidispersión para todas las formulaciones elaboradas. En general, los liposomas convencionales presentaron diámetros ligeramente inferiores a los arqueosomas, salvo para la formulación 1, cuya análoga en fosfatidilcolina presentaba un diámetro mucho menor. El tipo de lípido usado en las formulaciones es el responsable de estas diferencias ( $p < 0,05$ ). De manera también general, el índice de polidispersión es más pequeño para los liposomas convencionales, lo que indica que la distribución de tamaño dentro de este tipo de formulaciones es más homogénea.

En cuanto al potencial zeta en todos los casos fue negativo, debido a la prevalencia de cargas negativas en las cabezas polares tanto del fosfolípido P90G como de los lípidos polares de la arquea. La tabla 16 muestra los valores de potencial zeta para cada una de las formulaciones elaboradas. En ella se distinguen claramente dos grupos de valores, en torno a -60 mV para los arqueosomas, y alrededor de -35 mV para los liposomas convencionales. El valor del potencial zeta depende del tipo de lípido usado en la formulación ( $p < 0,01$ ). El valor mucho más negativo de los arqueosomas comparado con el de los liposomas convencionales

hace suponer que los primeros van a presentar un mejor comportamiento de estabilidad (pérdida de principio activo encapsulado, fenómenos de fusión y agregación, etc) y se puede asumir que es una consecuencia directa de la particular estructura química de sus lípidos.

**Tabla 15. Diámetro medio e I.P. de las formulaciones elaboradas (LP: lípidos polares, arqueosomas; P90: fosfatidilcolina, liposomas convencionales) (media  $\pm$  SD, n=3)**

Proporción molar colesterol	Concentración lípido (mg/ml)	Formulación	Diámetro medio (nm)	I.P.
1:1	10	1 (LP)	294,90 $\pm$ 18,43	0,532 $\pm$ 0,039
		2 (P90)	126,40 $\pm$ 1,61	0,19 $\pm$ 0,016
	20	7 (LP)	171,40 $\pm$ 2,98	0,392 $\pm$ 0,014
		8 (P90)	150,00 $\pm$ 4,05	0,65 $\pm$ 0,03
1:0,5	10	3 (LP)	153,4 $\pm$ 10,1	0,409 $\pm$ 0,1
		4 (P90)	125,5 $\pm$ 2,8	0,36 $\pm$ 0,02
	20	9 (LP)	185,4 $\pm$ 4,8	0,562 $\pm$ 0,112
		10 (P90)	137,2 $\pm$ 55,8	0,498 $\pm$ 0,015
1:0,25	10	5 (LP)	190,50 $\pm$ 7,34	0,431 $\pm$ 0,011
		6 (P90)	105,6 $\pm$ 0,5	0,367 $\pm$ 0,023
	20	11(LP)	198,8 $\pm$ 8,5	0,577 $\pm$ 0,102
		12 (P90)	104,7 $\pm$ 1,6	0,362 $\pm$ 0,005

**Tabla 16. Potencial zeta de las formulaciones elaboradas (LP: lípidos polares, arqueosomas; P90: fosfatidilcolina, liposomas convencionales) (media  $\pm$  SD, n=3)**

Concentración lípido (mg/ml)	Proporción molar colesterol	Formulación	Potencial zeta (mV)
10	1:1	1 (LP)	-63,7 $\pm$ 1,74
		2 (P90)	-37,1 $\pm$ 1,09
	1:0,5	3 (LP)	-57,9 $\pm$ 1,86
		4 (P90)	-38,8 $\pm$ 1,15
	1:0,25	5 (LP)	-54,9 $\pm$ 1,56
		6 (P90)	-37,5 $\pm$ 1,23
20	1:1	7 (LP)	-59,6 $\pm$ 1,45
		8 (P90)	-27,7 $\pm$ 1,12
	1:0,5	9 (LP)	-56,7 $\pm$ 2,07
		10 (P90)	-36,7 $\pm$ 0,697
	1:0,25	11(LP)	-60,5 $\pm$ 1,5
		12 (P90)	-24,9 $\pm$ 0,52

B) Morfología de las vesículas: observación mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En las figura 30 y 31 se puede comparar la morfología de los arqueosomas con la de los liposomas convencionales. En general se puede decir que los liposomas convencionales presentan una morfología más regular, con vesículas esféricas de borde liso, mientras que los arqueosomas presentan una superficie más rugosa.

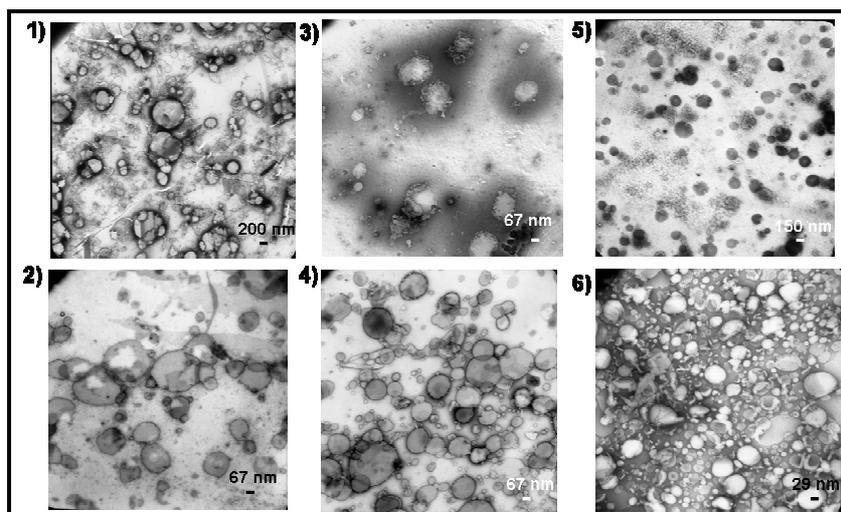


Figura 30. Morfología de las vesículas con 10 mg lípido/ml. 1,3 y 5) formulaciones de arqueosomas; 2, 4 y 6) formulaciones liposomas convencionales

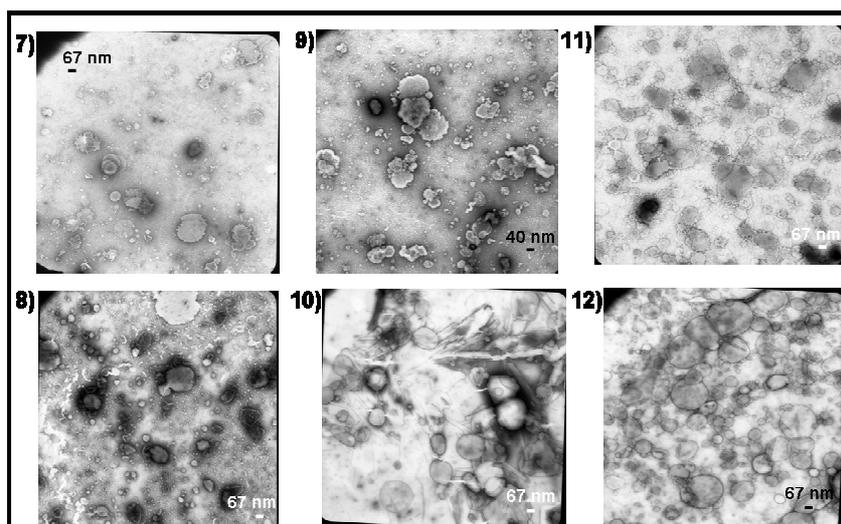


Figura 31. Morfología de las vesículas con 20 mg lípido/ml. 7,9 y 11) formulaciones de arqueosomas; 8, 10 y 12) formulaciones de liposomas convencionales

**C) Eficiencia de encapsulación (E%)**

La tabla 17 muestra los diferentes porcentajes de encapsulación alcanzados por cada formulación. Como se puede observar, en todos los casos la eficiencia de encapsulación de los arqueosomas fue mayor que la de los liposomas convencionales, por lo que se puede deducir que el tipo de lípido utilizado va a influir en el grado de captación de la sustancia activa por parte de las vesículas.

En la tabla 18 se pueden observar las diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la eficiencia de encapsulación.

**Tabla 17. Eficiencia de encapsulación de las formulaciones elaboradas (LP=lípidos polares, arqueosomas; P90= fosfatidilcolina, liposomas convencionales) (media ± SD, n=2)**

Proporción molar colesterol	Concentración lípido (mg/ml)	Formulación	E%
1:1	10	1 (LP)	37,79 ± 1,47
		2 (P90)	24,91 ± 1,20
	20	7 (LP)	38,74 ± 2,51
		8 (P90)	33,03 ± 3,84
1:0,5	10	3 (LP)	37,53 ± 2,39
		4 (P90)	25,13 ± 2,20
	20	9 (LP)	51,00 ± 1,31
		10 (P90)	35,59 ± 3,06
1:0,25	10	5 (LP)	38,80 ± 1,33
		6 (P90)	21,02 ± 0,52
	20	11(LP)	40,32 ± 0,62
		12 (P90)	37,56 ± 4,53

**Tabla 18. Comparaciones múltiples (método Tukey) del procedimiento ANOVA de un factor para la eficiencia de encapsulación (E%)**

Formulaciones comparadas (a-b)	Diferencia de medias (Ma-Mb) (Error standard 2,4)
1-2	12,8*
7-8	5,83
3-4	12,6*
9-10	15,5*
5-6	17,8*
11-12	3,25

\*Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95%

#### D) Actividad antioxidante (% inhibición DPPH)

La actividad antioxidante mostrada tanto por arqueosomas como por liposomas convencionales fue muy similar, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. En todas ellas dicha actividad presentó valores en torno al 90% de inhibición de DPPH, como se puede observar en la tabla 19. Esto indica que, independientemente del valor de eficiencia, todas las formulaciones encapsulaban el extracto fenólico en cantidad suficiente como para asegurar una buena actividad antioxidante.

**Tabla 19. Actividad antioxidante de las formulaciones elaboradas (LP=lípidos polares, arqueosomas; P90= fosfatidilcolina, liposomas convencionales) (media  $\pm$  SD, n=2)**

Proporción molar colesterol	Concentración lípido (mg/ml)	Formulación	AA (%inhibición DPPH)
1:1	10	1 (LP)	87,35 $\pm$ 3,60
		2 (P90)	85,97 $\pm$ 1,33
	20	7 (LP)	85,52 $\pm$ 1,20
		8 (P90)	86,29 $\pm$ 0,07
1:0,5	10	3 (LP)	90,87 $\pm$ 0,58
		4 (P90)	87,15 $\pm$ 1,88
	20	9 (LP)	88,04 $\pm$ 0,74
		10 (P90)	90,22 $\pm$ 0,41
1:0,25	10	5 (LP)	90,81 $\pm$ 0,39
		6 (P90)	90,51 $\pm$ 0,52
	20	11(LP)	85,09 $\pm$ 1,48
		12 (P90)	89,10 $\pm$ 0,07

### 2.2.3. Estudio de estabilidad a lo largo del tiempo

Al igual que en el estudio de caracterización de las vesículas elaboradas, el estudio de estabilidad se ha estructurado en dos partes, una primera en la que se comparan entre sí únicamente los arqueosomas con el fin de identificar la formulación más estable a lo largo del tiempo, y una segunda parte en la que se comparan entre sí arqueosomas y liposomas convencionales con la misma composición lipídica, con el fin de ver como influye el tipo de lípido en la estabilidad.

#### 2.2.3.1. Arqueosomas

##### A) Diámetro medio, índice de polidispersión (I.P.) y potencial zeta

Las figuras 32 y 33 representan respectivamente la evolución del diámetro medio y del índice de polidispersión de las formulaciones con 10 mg lípido/ml y 20 mg lípido/ml. Como se puede observar, las formulaciones resultaron estables respecto al tamaño de partícula, ya que éste se mantiene constante durante el período de estudio para todas las formulaciones, excepto para la formulación 1, cuyo valor se incrementa ligeramente pasado el primer mes. Además, el

diámetro medio de esta formulación es superior al de todas las demás, con diferencias estadísticamente significativas como refleja la tabla 20.

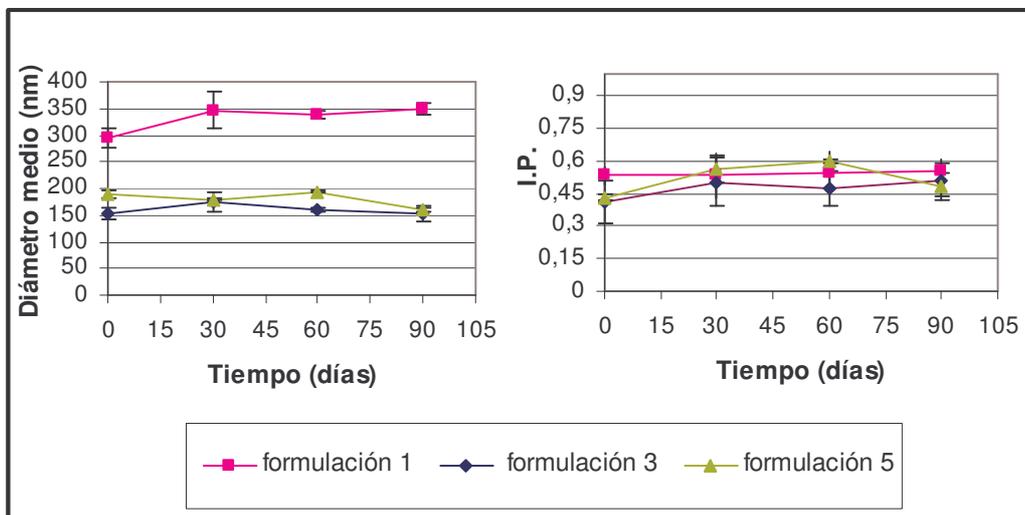


Figura 32. Evolución del tamaño e I.P. con el paso del tiempo en las formulaciones de arqueosomas con 10 mg lípido/ml [Proporción de colesterol por formulación: 1) 1:1; 3) 1:0,5; 7) 1:0,25]

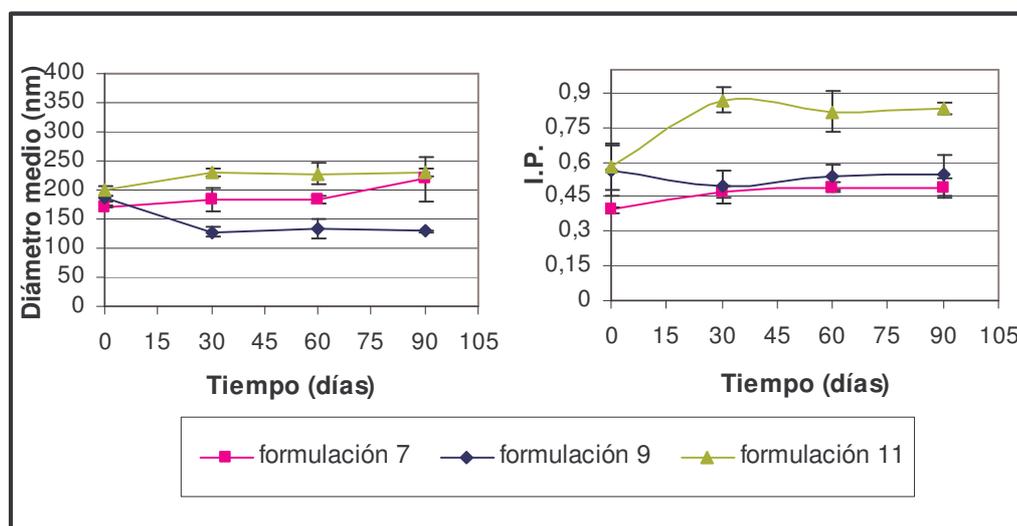


Figura 33. Evolución del tamaño e I.P. con el paso del tiempo en las formulaciones de arqueosomas con 20 mg lípido/ml [Proporción de colesterol por formulación: 7) 1:1; 9) 1:0,5; 11) 1:0,25]

En el caso de las formulaciones con 20 mg de lípido/ml, la de menor tamaño de partícula es la 9, existiendo diferencias significativas con respecto a las otras dos formulaciones con la misma concentración de lípido (Tabla 20).

En cuanto al índice de polidispersión todas las formulaciones, excepto la 11, mostraron valores similares, en torno a 0,5, valores que se mantuvieron durante el período de estudio, lo cual es también un indicativo de estabilidad, pues las suspensiones mantienen el grado de homogeneidad inicial. No ocurre así con la formulación 11, cuyo índice de polidispersión sufrió un gran aumento después del primer mes.

**Tabla 20. Comparaciones múltiples (método Tukey) del procedimiento ANOVA de un factor para el diámetro medio e I.P.**

Formulaciones comparadas (a-b)	Diferencia de medias (Ma-Mb)	
	Diámetro (nm) (error estándar 12,3)	I.P. (error estándar 0,068)
1-3	173*	0,069
1-5	152*	0,02
1-7	144*	0,083
1-9	189*	0,009
1-11	112*	-0,231
3-5	--21	-0,046
3-7	-29	0,014
3-9	15,9	-0,059
3-11	-61,2*	-0,29*
5-7	-8,07	0,059
5-9	36,9	-0,014
5-11	-40,2	-0,25*
7-9	44,9*	0,073
7-11	-32,1	-0,313*
9-11	-77*	--0,24*

\*Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95%

Se puede por tanto deducir que las formulaciones de arqueosomas con mejor comportamiento de estabilidad respecto a las dimensiones fueron la 3, 5 y 9, con diámetros medios pequeños mantenidos en el tiempo.

El potencial zeta se mantuvo estable a lo largo del tiempo de estudio para todas las formulaciones, con ligeras oscilaciones que no resultaron estadísticamente significativas. El mantenimiento de un potencial zeta altamente negativo, con valores comprendidos entre -50 y -60 mV en todos los casos, es otro parámetro indicador de estabilidad de las formulaciones de arqueosomas. La tabla 21 refleja los valores de potencial zeta para cada formulación a lo largo del tiempo.

**Tabla 21. Evolución del potencial zeta (mV) con el tiempo (media  $\pm$  SD, n=3)**

Formulación	Potencial zeta (mV)			
	t= 0 días	t= 30 días	t= 60 días	t= 90 días
1	-63,7 $\pm$ 1,74	-47 $\pm$ 1,89	-51,7 $\pm$ 1,25	-50,2 $\pm$ 1,64
3	-57,9 $\pm$ 1,86	-59,9 $\pm$ 1,51	-55,9 $\pm$ 1,76	-54 $\pm$ 1,92
5	-54,9 $\pm$ 1,56	-43 $\pm$ 3,12	-54,8 $\pm$ 1,96	-56 $\pm$ 2,1
7	-59,6 $\pm$ 1,45	-65,2 $\pm$ 1,99	-66,2 $\pm$ 1,52	-63,5 $\pm$ 1,38
9	-56,7 $\pm$ 2,07	-55,1 $\pm$ 1,001	-53,7 $\pm$ 1,95	-54,7 $\pm$ 2,29
11	-60,5 $\pm$ 1,5	-54,8 $\pm$ 1,07	-51,1 $\pm$ 1,2	-47,3 $\pm$ 8,11

B) Morfología de las vesículas: observación mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

En las siguientes figuras se puede observar como evoluciona el aspecto de los arqueosomas con el paso del tiempo.

De las formulaciones de arqueosomas con 10 mg de lípido/ ml, la figura 34 muestra microfotografías de la formulación 1. En ella se puede observar como aumenta el tamaño de partícula a medida que avanza el tiempo, y muestra también la existencia de diferentes tamaños dentro de la misma muestra, lo que justifica el valor del I.P. Las formulaciones 3 y 5 (figuras 35 y 36) muestran una morfología irregular, pero las dimensiones se mantienen más constantes que en la anterior formulación hasta el final del estudio.

Las figuras 37, 38 y 39 muestran microfotografías de las formulaciones de arqueosomas con 20 mg de lípido/ ml, donde se puede apreciar la morfología irregular de todas ellas. Además, la formulación 11 (figura 39) presenta heterogeneidad de tamaños, y en la microfotografía tomada al tiempo de 90 días se observa la formación de agregados, lo que explica los altos valores de índice de polidispersión.

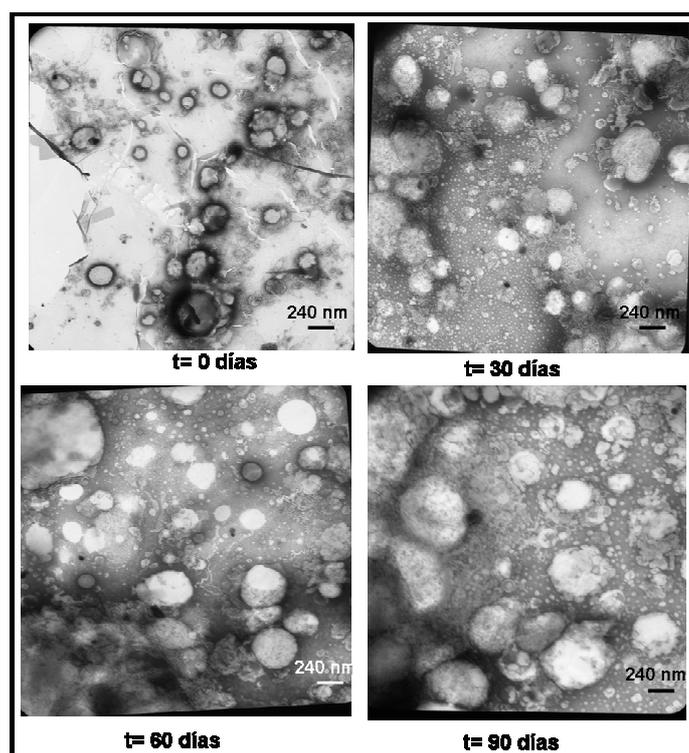


Figura 34. Microfotografías de la formulación 1 tomadas mediante TEM

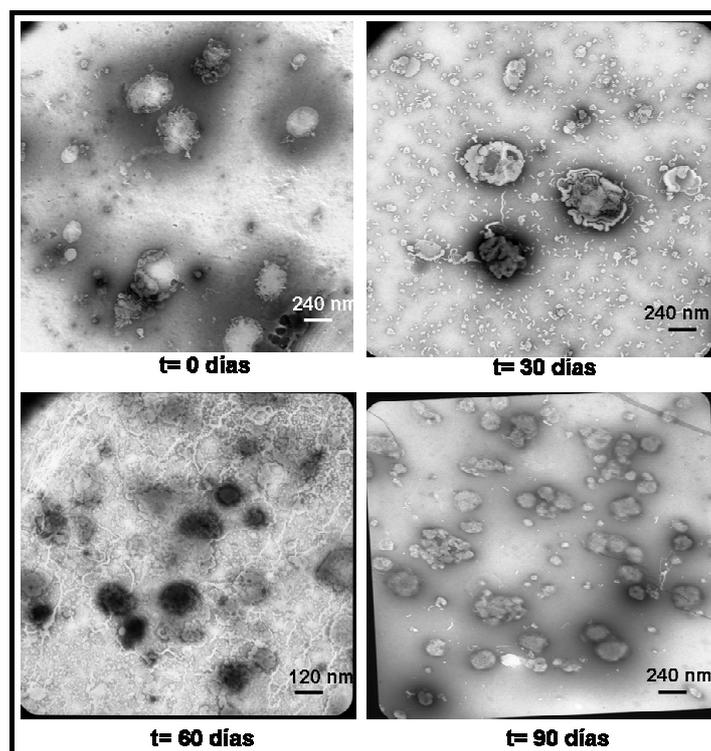


Figura 35. Microfotografías de la formulación 3 tomadas mediante TEM

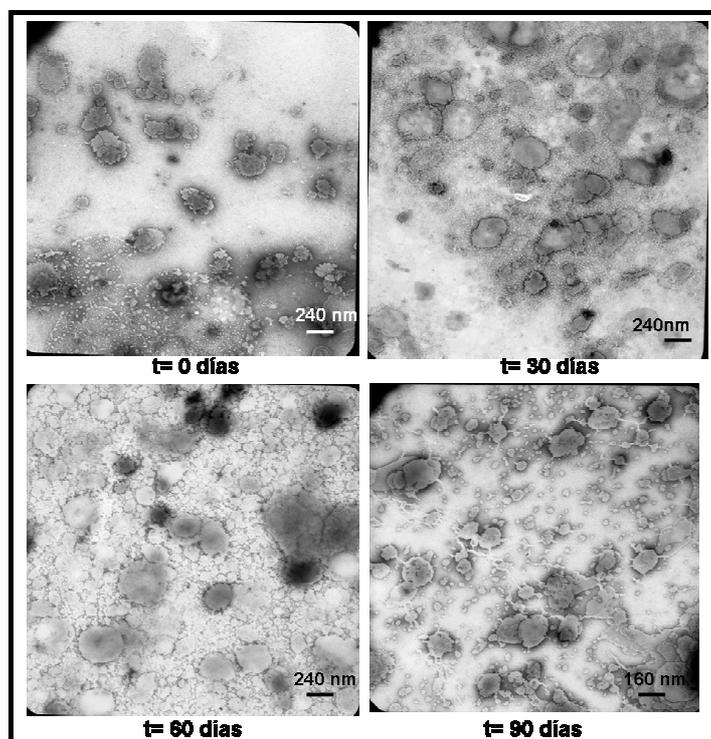


Figura 36. Microfotografías de la formulación 5 tomadas mediante TEM

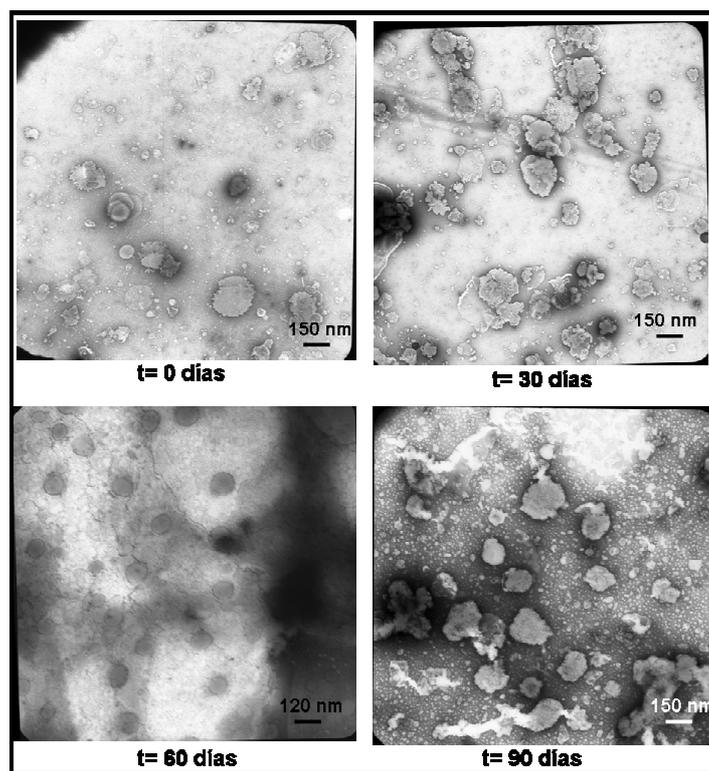


Figura 37. Microfotografías de la formulación 7 tomadas mediante TEM

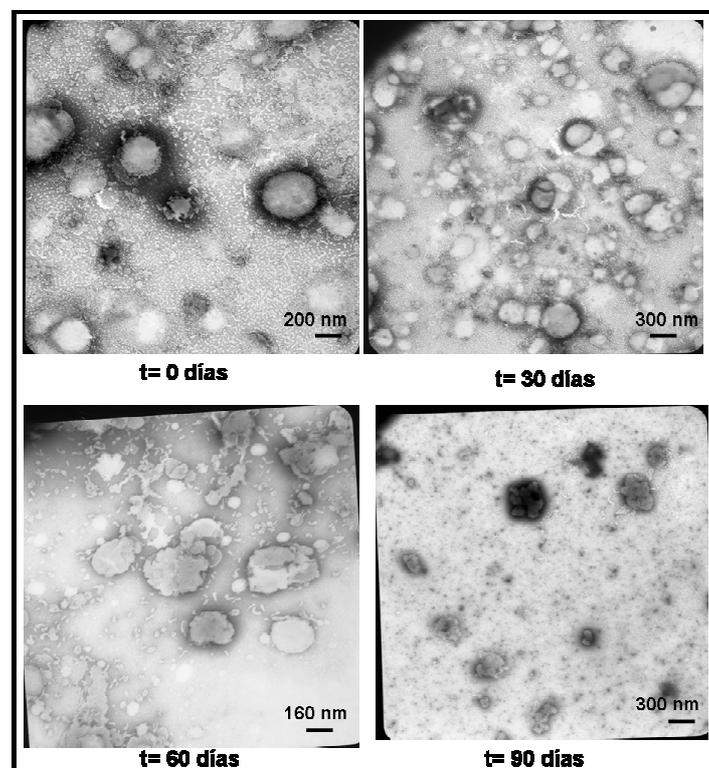


Figura 38. Microfotografías de la formulación 9 tomadas mediante TEM

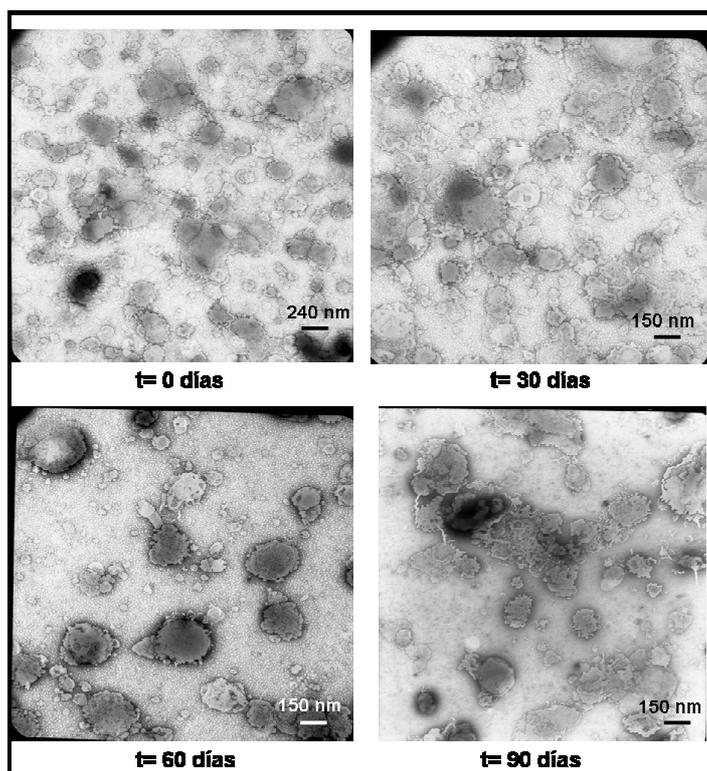


Figura 39. Microfotografías de la formulación 11 tomadas mediante TEM

### C) Eficiencia de encapsulación (E%)

De las figuras 40 y 41, que representan como evoluciona la eficiencia de encapsulación con el paso del tiempo, se puede deducir que las formulaciones más eficaces en el mantenimiento del grado de encapsulación inicial son la 1, 7 y 11, mientras que en el resto de formulaciones se producen pérdidas (Tabla 22). Cabe destacar el caso de la formulación 9, la cual presentó el máximo valor de encapsulación inicial, y sin embargo éste se mantiene apenas durante el primer mes de estudio, a partir del cual la pérdida de sustancia activa es importante, llegándose al final del estudio a perderse más del 50% de sustancia activa inicialmente encapsulada.

La tabla 23 muestra las formulaciones que presentaron diferencias estadísticamente significativas.

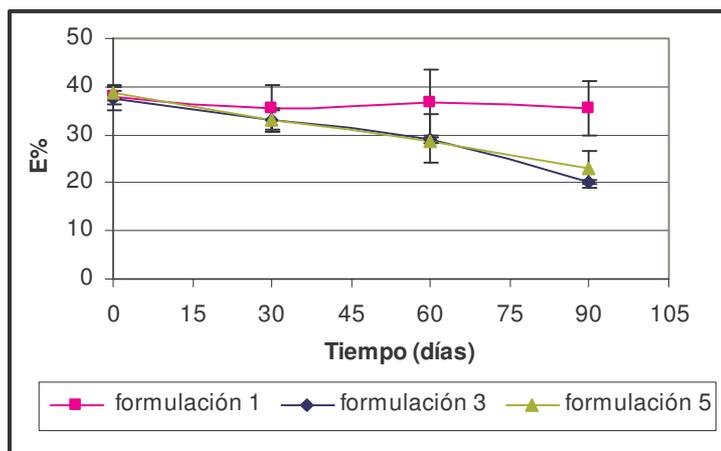


Figura 40. Evolución de la eficiencia de encapsulación (E%) con el paso del tiempo en las formulaciones de arqueosomas con 10 mg lípido/ml [proporción de colesterol por formulación: 1) 1:1; 3) 1:0,5; 7) 1:0,25]

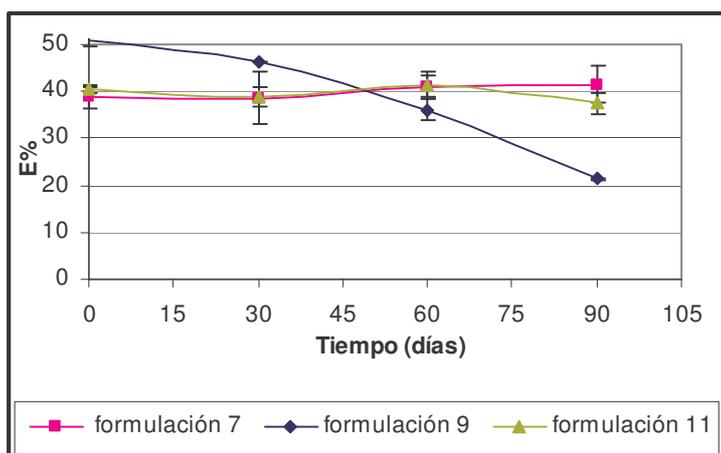


Figura 41. Evolución de la eficiencia de encapsulación (E%) con el paso del tiempo en las formulaciones de arqueosomas con 20 mg lípido/ml [proporción de colesterol por formulación: 7) 1:1; 9) 1:0,5; 11) 1:0,25]

Tabla 22. Porcentaje de sustancia activa perdida, respecto a la encapsulación inicial, al final del estudio de estabilidad

Formulación	1	3	5	7	9	11
% de sustancia activa perdida	6,47	45,85	41,22	0,8	58,06	6,95

**Tabla 23. Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95% para la eficiencia de encapsulación (E%)**

Formulaciones comparadas (a-b)	Diferencia de medias (Ma-Mb) (error estándar 1,49)
1-3	6,68
1-5	5,85
7-3	9,91
9-3	88,68
11-3	9,57
7-5	9,08
9-5	7,84
11-5	8,73

D) Actividad antioxidante (% inhibición radical DPPH)

La actividad antioxidante de las diferentes formulaciones, representado en las figuras 42 y 43, se mantuvo constante a lo largo del período de estudio, lo que indica que la cantidad de extracto fenólico encapsulada fue suficiente para mantener la actividad antioxidante durante un período de al menos tres meses.

A pesar de que todas las formulaciones ensayadas mostraron una elevada actividad antioxidante, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre algunas de ellas, como refleja la tabla 24.

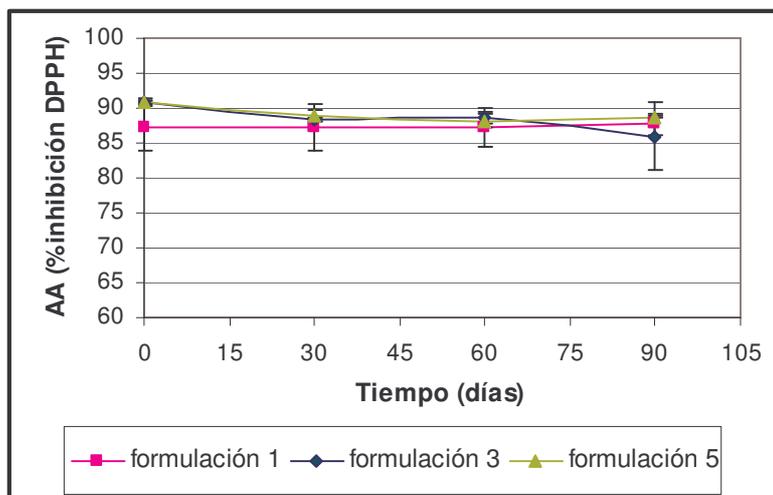


Figura 42. Evolución de la actividad antioxidante (AA%) con el paso del tiempo en las formulaciones de arqueosomas con 10 mg lípido/ml. [proporción de colesterol por formulación: 1)1:1; 3)1:0,5; 7)1:0,25]

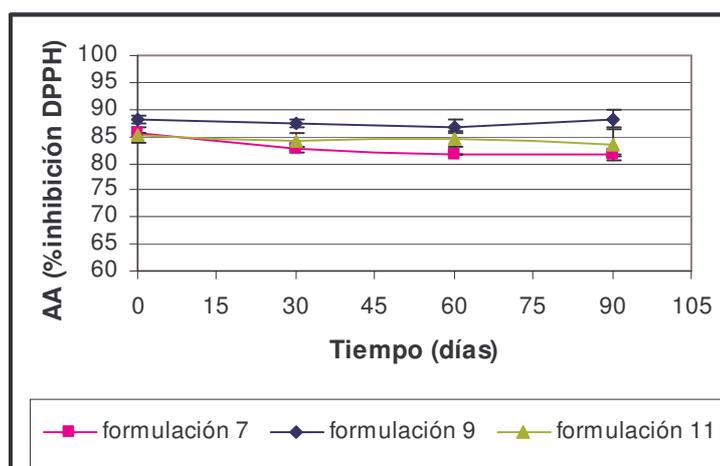


Figura 43. Evolución de la actividad antioxidante (AA%) con el paso del tiempo en las formulaciones de arqueosomas con 20 mg lípido/ml [proporción de colesterol por formulación: 7)1:1; 9)1:0,5; 11)1:0,25]

**Tabla 24. Diferencias estadísticamente significativas para un intervalo de confianza al 95% para AA (% inhibición DPPH)**

Formulaciones comparadas (a-b)	3-11	5-11	9-11	3-7	9-7
Diferencia de medias (Ma-Mb) (error estándar= 0,653)	2,74	4,86	3,35	4,24	4,85

### 2.2.3.2. Estudio comparativo entre arqueosomas y liposomas convencionales

Al igual que en el estudio de caracterización, se convino agrupar los arqueosomas con las formulaciones análogas de fosfatidilcolina según concentración de colesterol, de modo que el estudio comparativo fuera más sencillo.

#### A) Diámetro medio, índice de polidispersión (I.P.) y potencial zeta

La mayoría de las formulaciones preparadas, tanto de arqueosomas como de liposomas convencionales, resultaron estables en cuanto al mantenimiento de sus dimensiones iniciales a lo largo de los 90 días que duró el estudio.

Como se puede observar en la figura 44, las formulaciones con proporción molar de colesterol 1:1 mostraron un buen comportamiento, y todas las formulaciones eran de tamaños muy similares, entre 150 y 200 nm, no existiendo diferencias significativas entre los diámetros medios, a excepción de la formulación 1 de arqueosomas, cuyo diámetro medio difería del de la formulación análoga en fosfatidilcolina ( $M_1 - M_2 = 183$ , e.e.12,3).

El índice de polidispersión se mantuvo en torno a 0,5 para todas las formulaciones excepto para la 2, cuyo valor de I.P. fue más pequeño, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre esta formulación de liposomas convencionales y los arqueosomas análogos ( $M_1 - M_2 = 0,30$ , e.e. 0,068).

Las formulaciones que contenían la proporción molar lípido/colesterol 1:0,5 (figura 45) también fueron estables durante el período de tiempo estudiado, manteniendo constante el diámetro medio de partícula, en torno a los 150 nm, diámetro que fue el más pequeño de

todas las formulaciones elaboradas. No existieron diferencias estadísticamente significativas entre arqueosomas y liposomas convencionales.

El índice de polidispersión permaneció constante en las formulaciones de arqueosomas, mientras que en las de los liposomas convencionales sufrió una pequeña disminución pasados 30 días. La diferencia de medias tampoco resultó estadísticamente significativa.

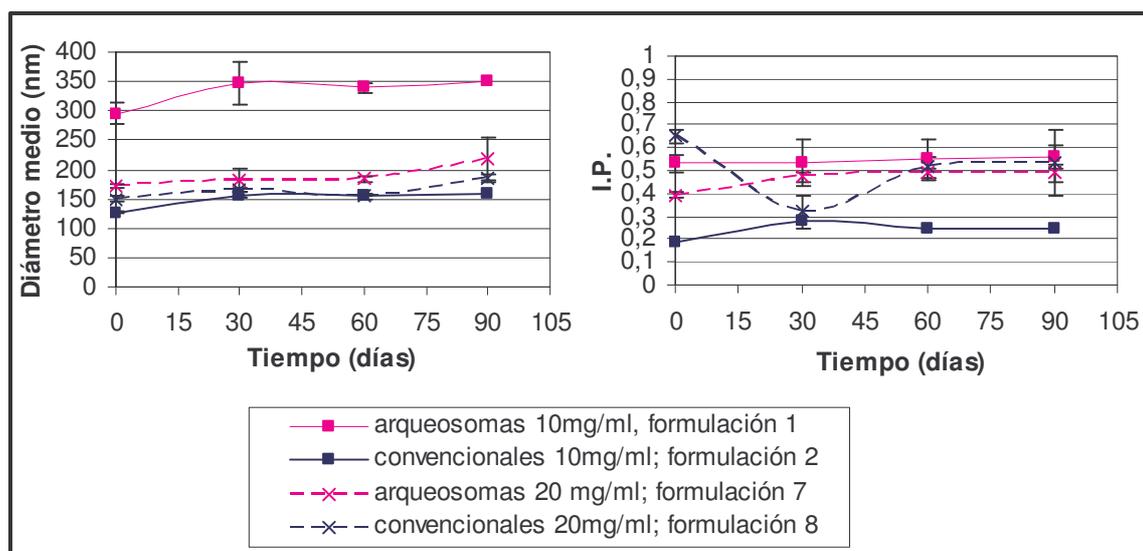


Figura 44. Evolución del tamaño e I.P. durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con proporción molar lípido/colesterol 1:1

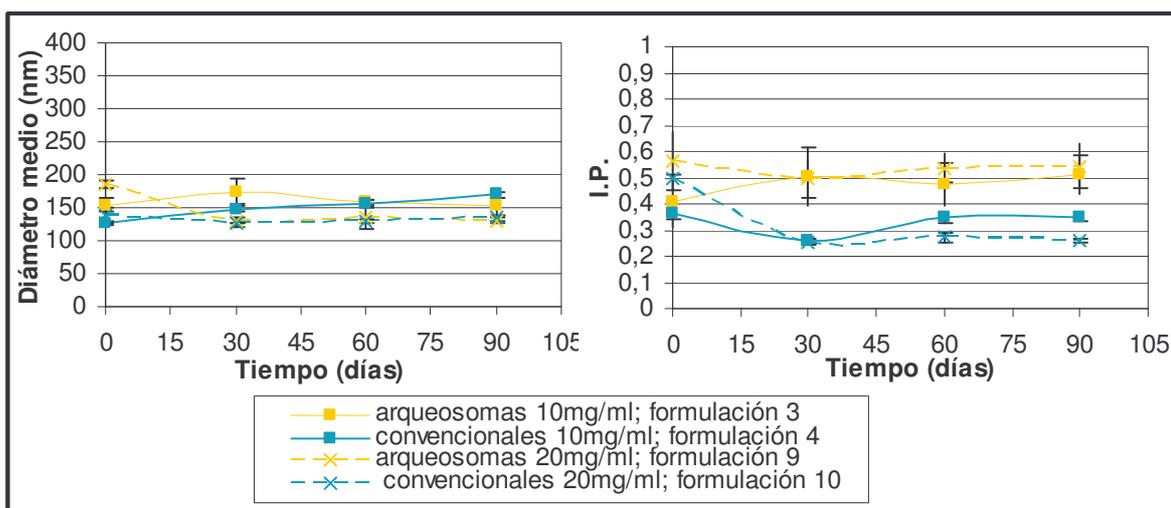
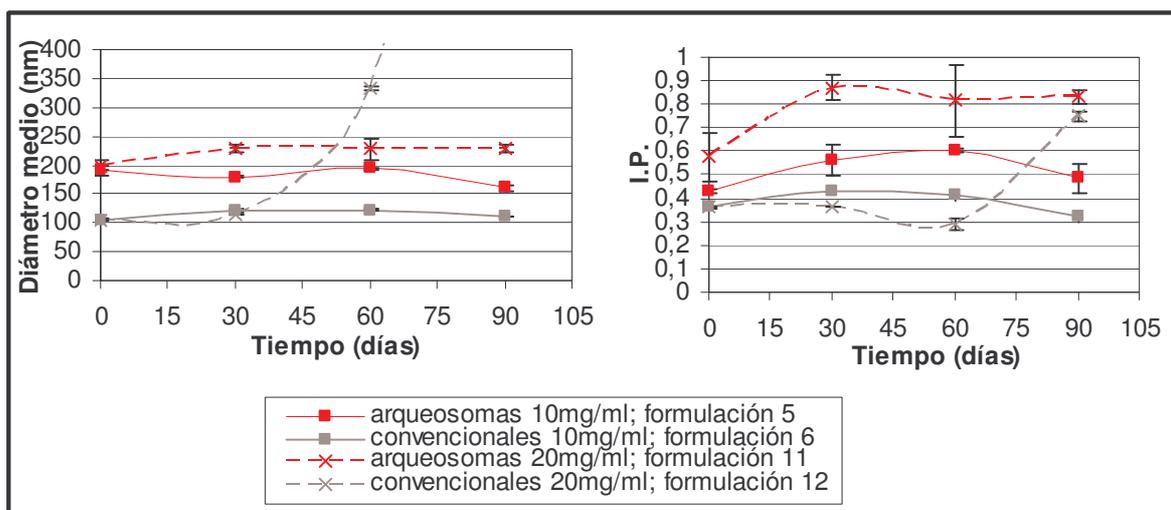


Figura 45. Evolución del tamaño durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:0,5

El estudio a lo largo del tiempo en el caso de la proporción molar lípido/colesterol 1:0,25, como se observa en la figura 46, mostró que las formulaciones con 10 mg de lípido fueron estables aunque las de arqueosomas mostraron un diámetro superior al de las análogas de liposomas convencionales ( $M_5 - M_6 = 66,2$ , e.e. 12,3). En el caso de la concentración lipídica de 20 mg/ml la formulación de fosfatidilcolina (formulación 12) resultó ser inestable, aumentando sus dimensiones a medida que pasaba el tiempo de estudio, probablemente por agregación de las partículas, mientras que los arqueosomas con dicha concentración mantuvieron sus dimensiones de forma constante hasta el final del estudio.

El índice de polidispersión de las formulaciones 5 y 6 se mantuvo estable y no se encontraron entre ambas formulaciones diferencias estadísticamente significativas. La inestabilidad de la formulación 12 se pone de manifiesto también por el aumento del I.P. a medida que transcurre el tiempo, de manera que aunque inicialmente el valor era mucho más pequeño que el de la análoga de arqueosomas, al final del estudio los valores se igualaron.

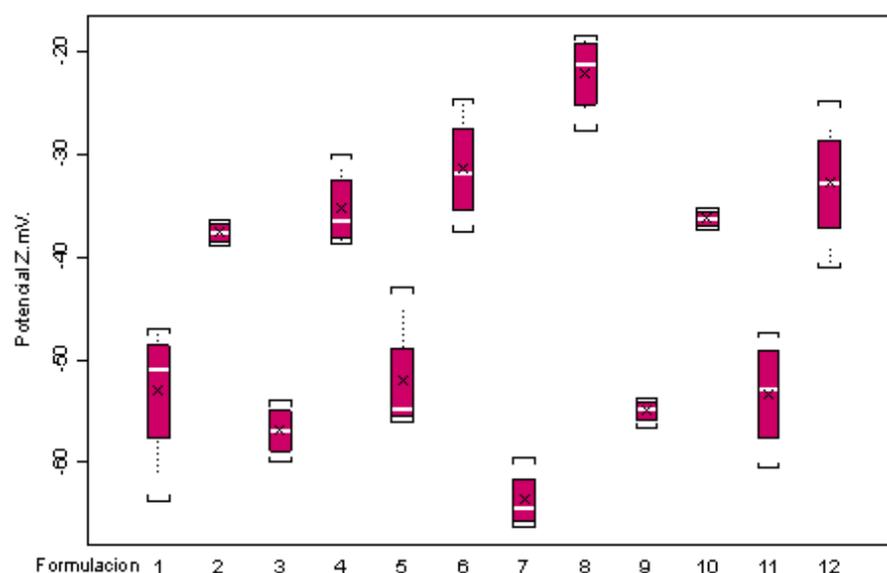


**Figura 46. Evolución del tamaño durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1: 0,25**

La observación de estos resultados lleva a la conclusión de que diferentes factores van a condicionar la estabilidad en el tiempo de las vesículas obtenidas. Así, los factores que influyen en el tamaño medio de partícula son el tipo de lípido ( $p < 0,01$ ), la concentración de colesterol utilizada ( $p < 0,01$ ) y la combinación de ambos con la concentración de lípido usada

( $p < 0,01$ ). En el caso de I.P. además de estos factores también influye la concentración de lípido usada ( $p < 0,01$ ).

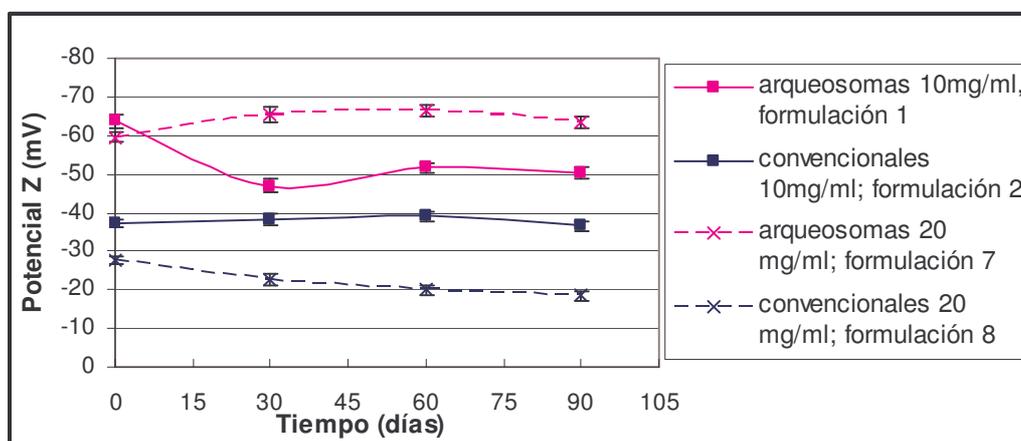
No ocurre así en el caso del potencial zeta, en el que el único factor que influye significativamente es el tipo de lípido que constituye la membrana de las vesículas ( $p < 0,001$ ). A la vista del análisis estadístico (Figura 47) las formulaciones se distribuyen en dos grupos bien diferenciados en función del valor del potencial zeta, un grupo para arqueosomas y otro para liposomas convencionales.



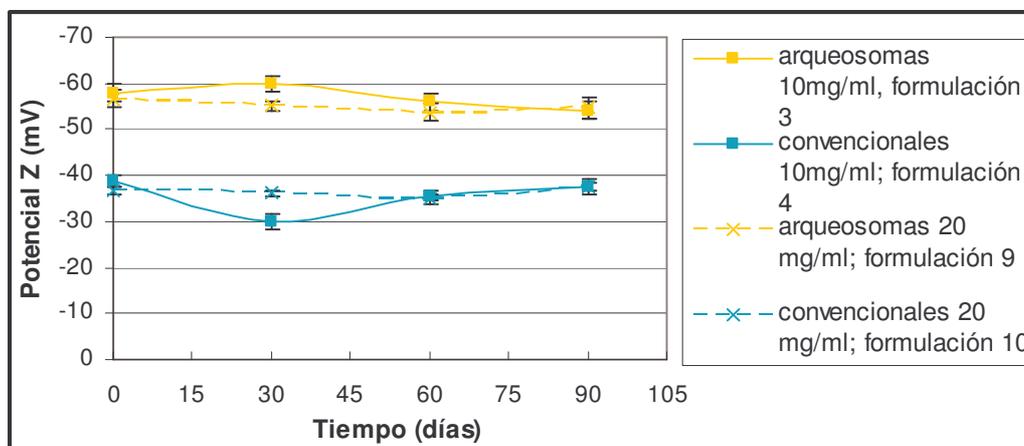
**Figura 47. Análisis estadístico de los datos obtenidos para el potencial zeta de las diferentes formulaciones, donde x representa la media, las cajas la desviación estándar y los corchetes el valor máximo y mínimo respectivamente**

Si se representa la evolución del potencial zeta a lo largo del tiempo en función del contenido en colesterol de las formulaciones, el potencial más negativo de los arqueosomas queda de nuevo patente, agrupándose las formulaciones de arqueosomas por un lado y las de liposomas convencionales por otro (Figuras 48, 49 y 50). El potencial zeta de los arqueosomas es significativamente mayor en todos los casos, siendo la diferencia de medias de distinta magnitud según las formulaciones comparadas, como se observa en la tabla 25.

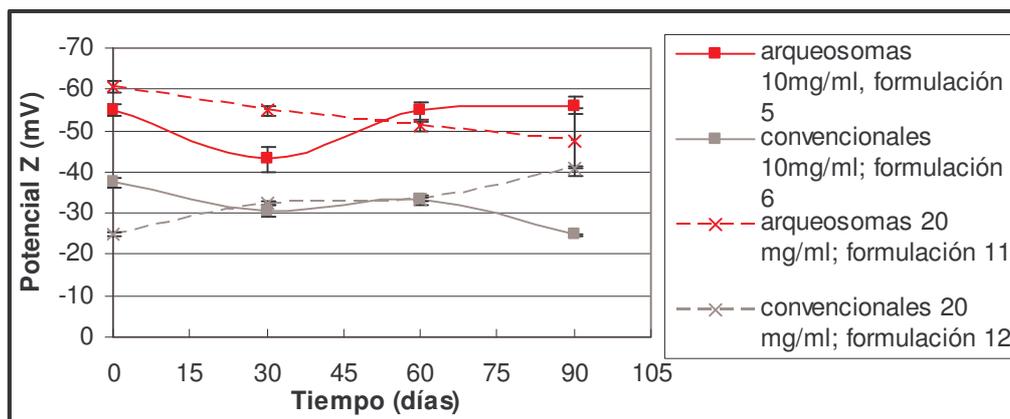
Asimismo, es importante destacar que todas las formulaciones mantuvieron de forma estable el potencial zeta hasta el fin del período de estudio.



**Figura 48. Evolución del potencial zeta durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:1**



**Figura 49. Evolución del potencial zeta durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:0,5**



**Figura 50. Evolución del potencial zeta durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:0,25**

### B) Morfología de las vesículas: observación mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Las figuras 51 a la 56 muestran las fotografías de las formulaciones de arqueosomas y de liposomas convencionales comparadas entre sí. Las figuras 51 y 54 muestran las formulaciones con proporción molar lípido/colesterol 1:1.; en las figuras 52 y 55 se pueden observar las formulaciones con proporción molar lípido/colesterol 1: 0,5; y las figuras 53 y 56 muestran las de proporción molar lípido/colesterol 1: 0,25.

De forma general se puede decir que los liposomas convencionales presentan una morfología esférica, de mayor regularidad que los arqueosomas, y una distribución de tamaño en la muestra más homogénea, manteniéndose ambas características en el tiempo. Sin embargo cabe destacar que la formulación 10 de liposomas convencionales, presentó una morfología bastante irregular, superior a la de los arqueosomas de formulación análoga. Asimismo, las microfotografías ponen de manifiesto la inestabilidad de la formulación 12 de fosfatidilcolina, observándose un aumento gradual del tamaño con el paso del tiempo y la formación de agregados de partículas, así como muchos restos de vesículas rotas.

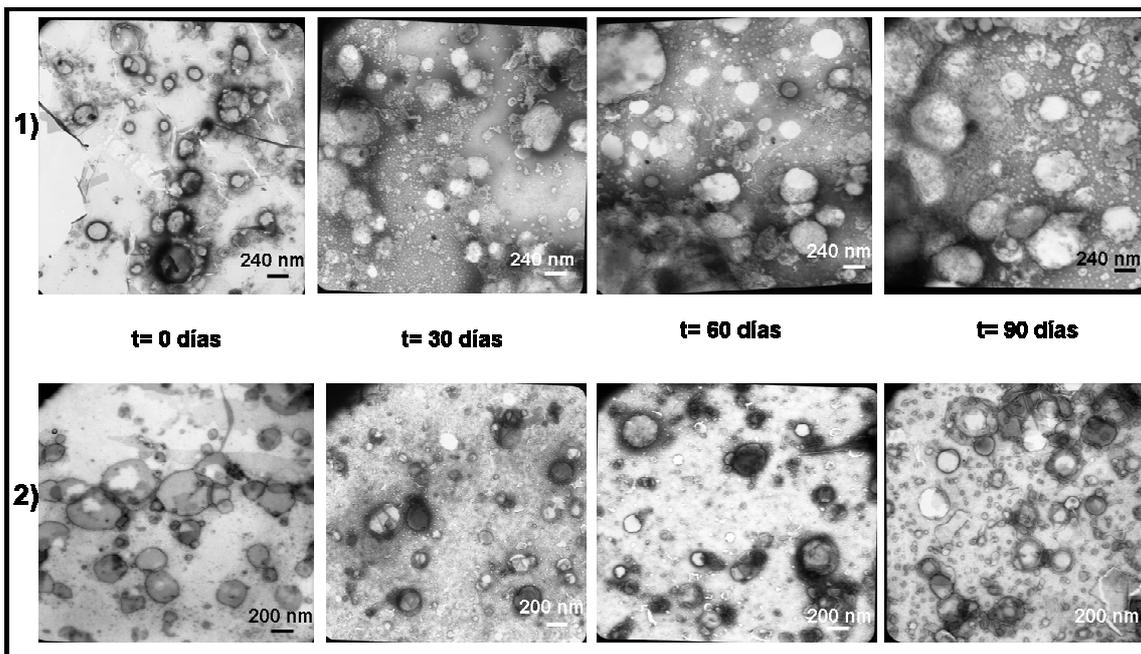


Figura 51. Microfotografías de las formulaciones 1 y 2 tomadas mediante TEM

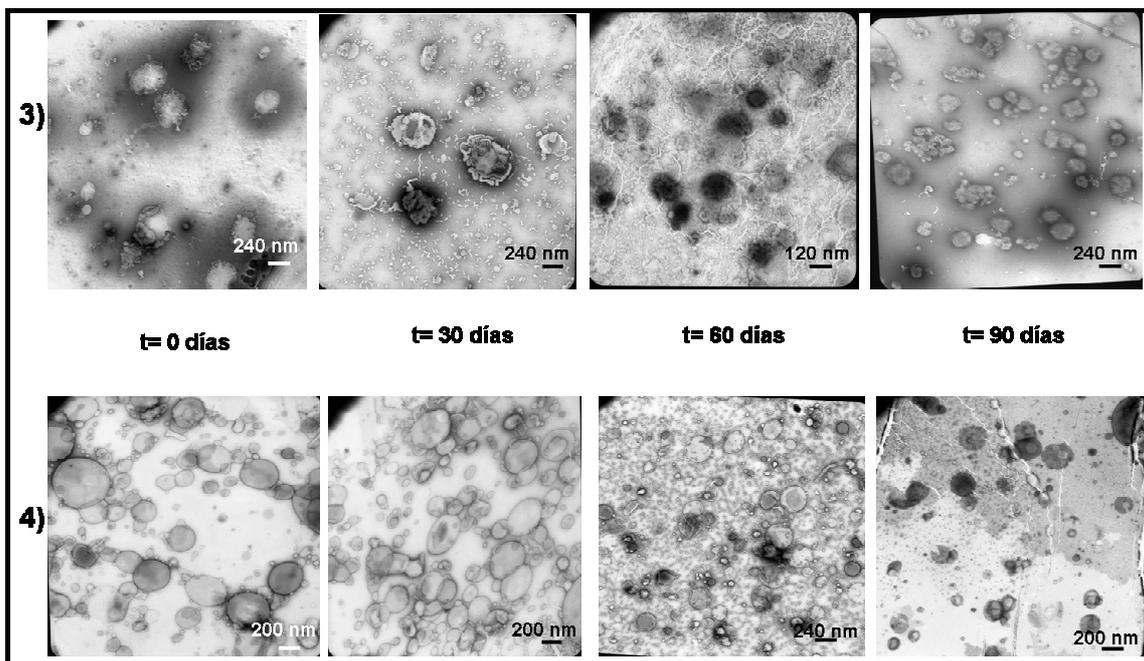


Figura 52. Microfotografías de las formulaciones 3 y 4 tomadas mediante TEM

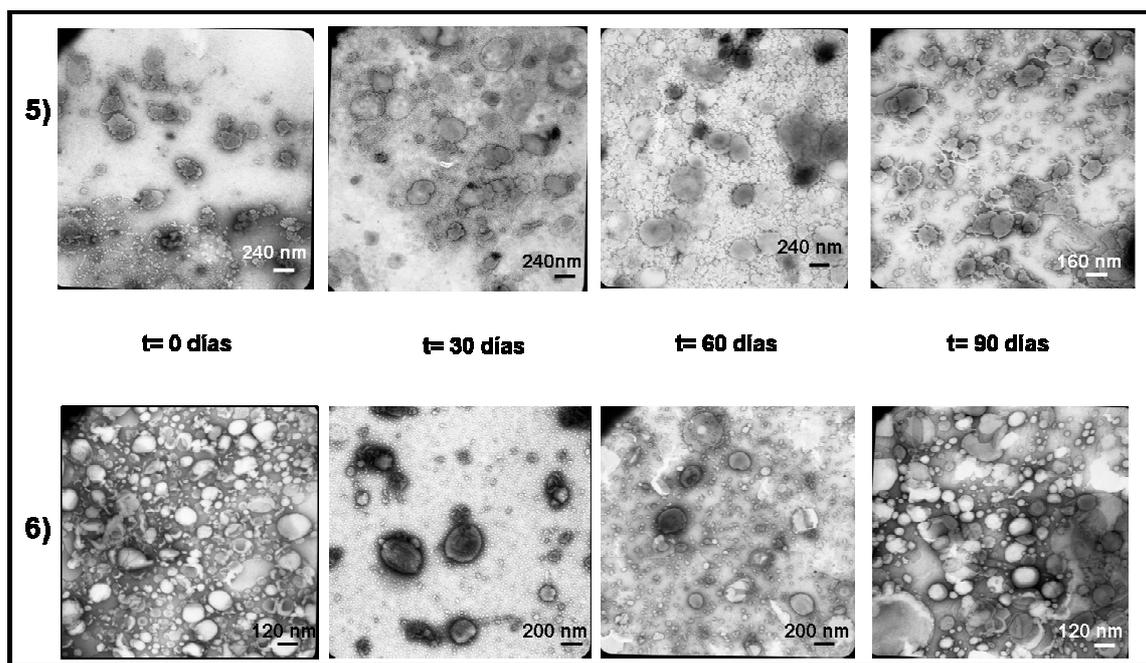


Figura 53. Microfotografías de las formulaciones 5 y 6 tomadas mediante TEM

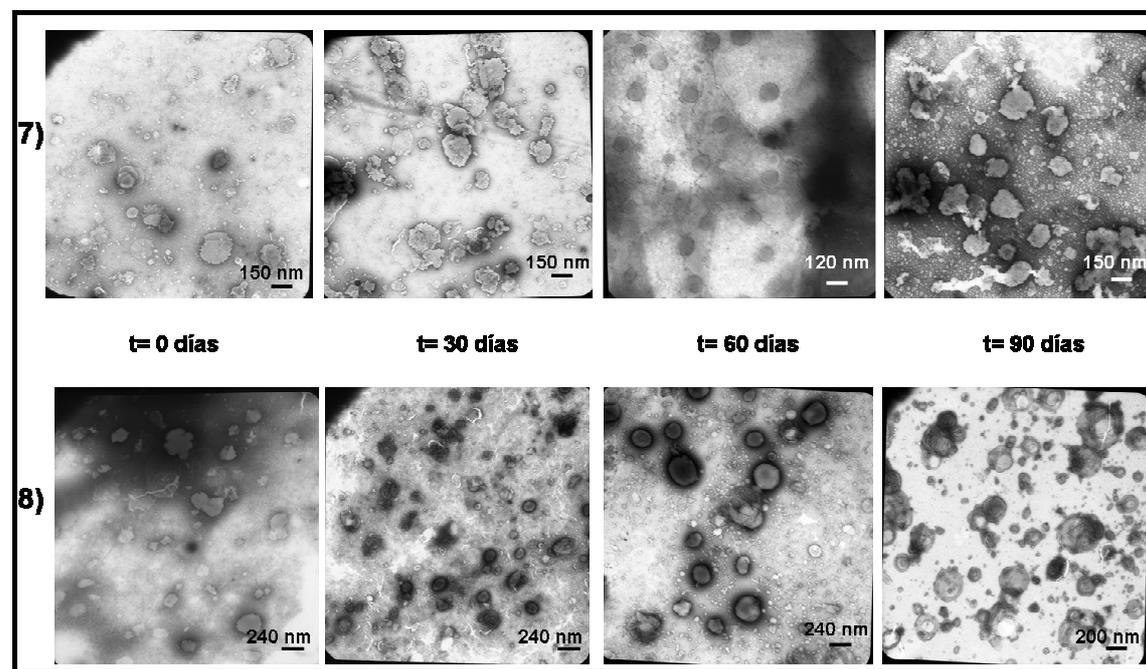


Figura 54. Microfotografías de las formulaciones 7 y 8 tomadas mediante TEM

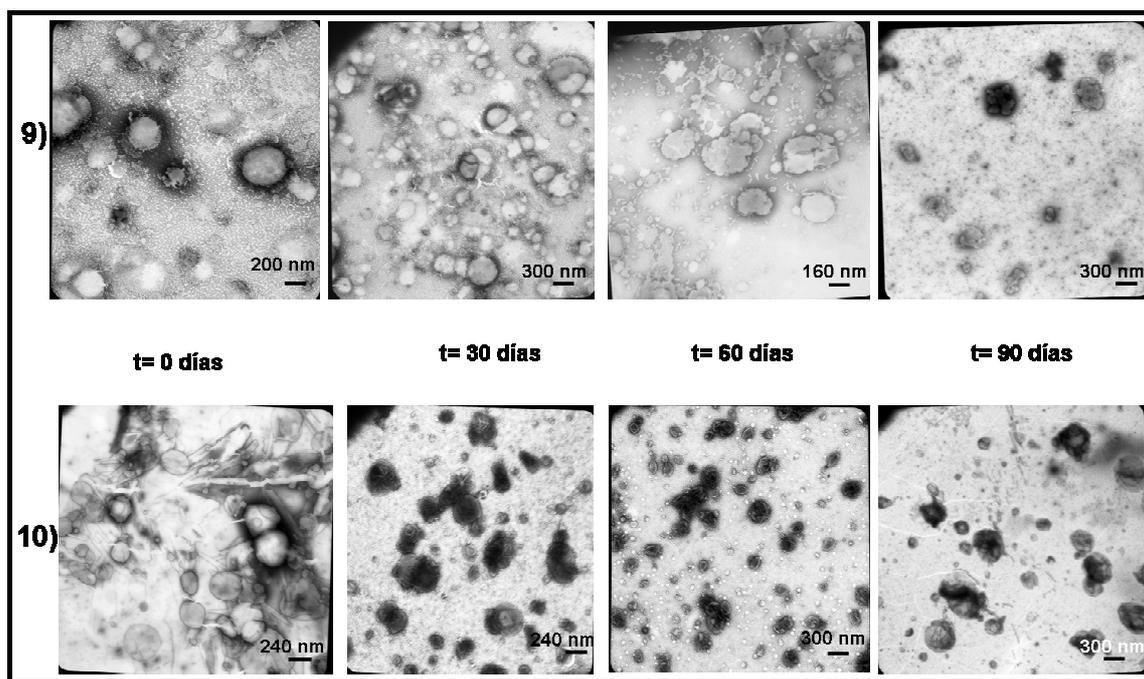


Figura 55. Microfotografías de las formulaciones 9 y 10 tomadas mediante TEM

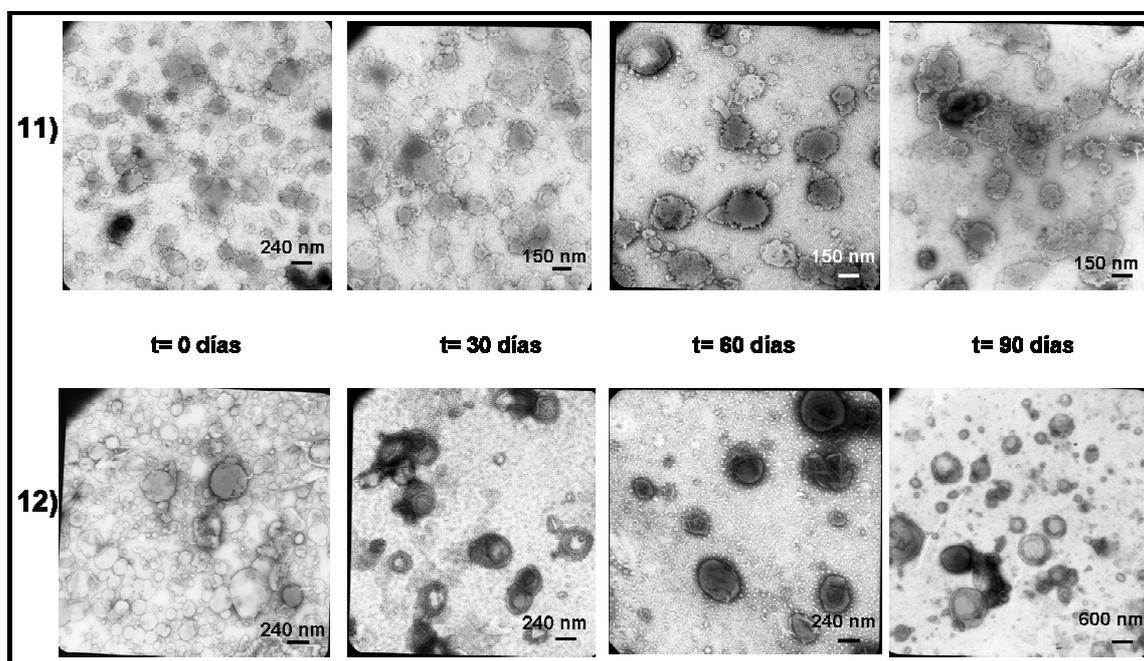


Figura 56. Microfotografías de las formulaciones 11 y 12 tomadas mediante TEM

### C) Eficiencia de encapsulación (E%)

Como ya se observó en el estudio de caracterización, durante el estudio de estabilidad la eficiencia de encapsulación de las formulaciones de arqueosomas fue superior al de las formulaciones análogas en fosfatidilcolina, existiendo entre ellas diferencias estadísticamente significativas. Los factores que influyen en la eficiencia de encapsulación a lo largo del tiempo son el tipo de lípido y su concentración ( $p < 0.001$ ), la proporción de colesterol usada ( $p < 0,05$ ), y la combinación de los tres factores ( $p < 0.01$ ).

Si comparamos las figuras 57, 58 y 59, podemos observar que la proporción molar lípido/colesterol que proporciona vesículas más estables en cuanto a pérdida de sustancia encapsulada a lo largo del tiempo es la 1:1, donde la eficiencia aparece constante a lo largo de la duración del estudio de estabilidad, tanto en arqueosomas como en liposomas convencionales.

Dentro de las formulaciones con 10 mg de lípido/ ml y proporción molar lípido/colesterol 1:0,5 y 1:0,25 cabe destacar la marcada estabilidad de las formulaciones convencionales (formulaciones 4 y 6), que a pesar de tener un rendimiento de encapsulación bajo, ligeramente superior al 20%, mantuvieron ese valor de encapsulación prácticamente inalterado hasta el final del período de estudio, frente a las análogas formulaciones de arqueosomas que, aún con una encapsulación inicial muy alta, no eran capaces de retener la sustancia activa y sufrieron pérdidas considerables con el paso del tiempo. Este hecho queda patente en la tabla 26, donde se muestra el porcentaje de sustancia activa perdida al final del estudio de estabilidad.

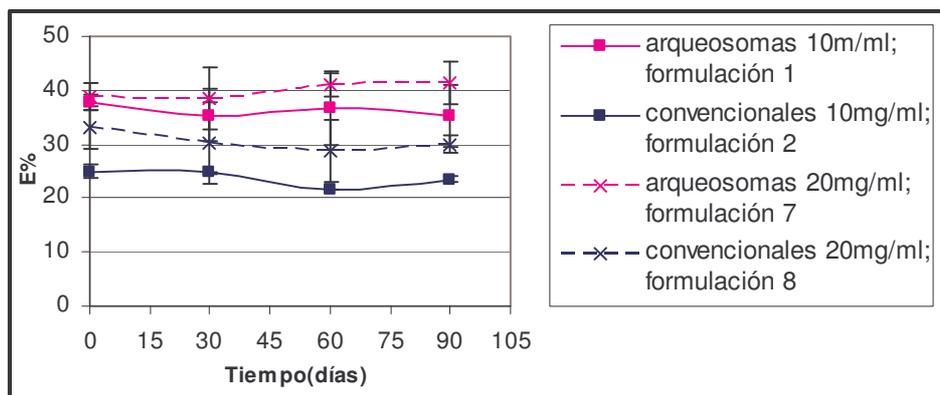


Figura 57. Evolución de la eficiencia de encapsulación durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:1

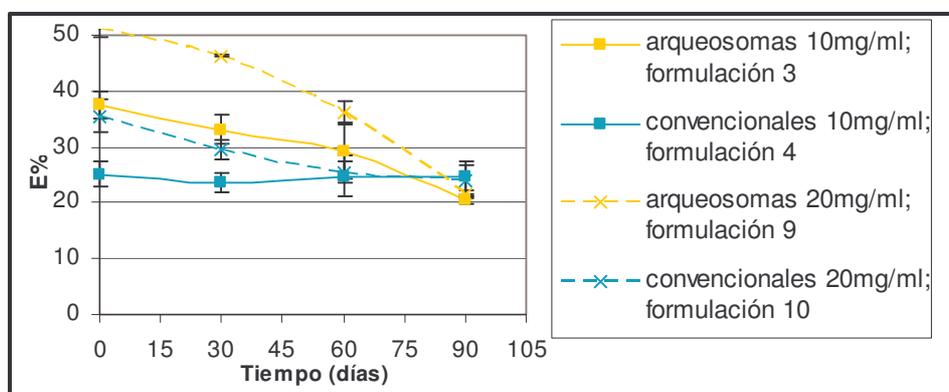


Figura 58. Evolución de la eficiencia de encapsulación durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:0,5

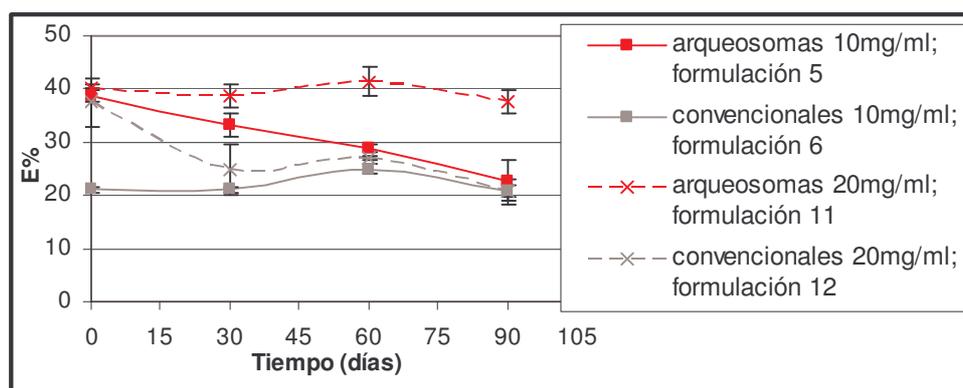


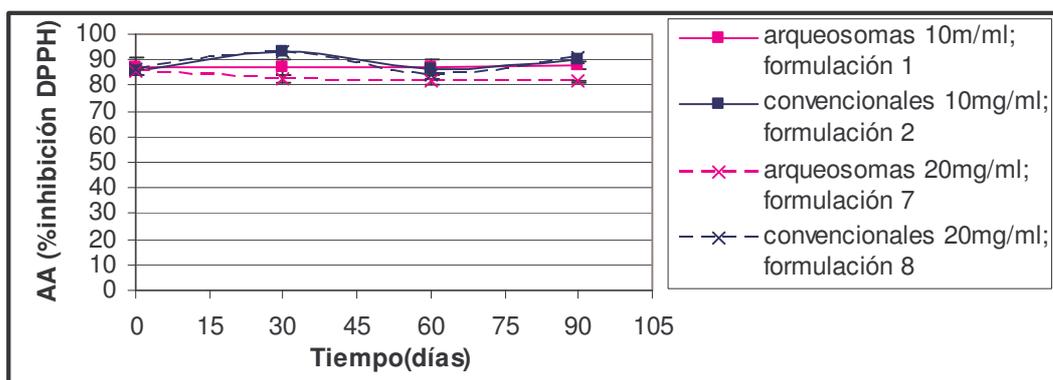
Figura 59. Evolución de la eficiencia de encapsulación durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:0,25

**Tabla 26. Porcentaje de sustancia activa perdida, respecto a la encapsulación inicial, al final del estudio de estabilidad**

Concentración lípido(mg/ml)	Proporción colesterol	% sustancia activa perdida	
		Arqueosomas	Liposomas conv.
10	1:1	6,47	5,56
	1:0,5	45,85	1,58
	1:0,25	41,21	1,45
20	1:1	0,8	9,39
	1:0,5	58,06	32,54
	1:0,25	6,95	44,65

D) Actividad antioxidante (% inhibición del radical DPPH)

El estudio de la actividad antioxidante a lo largo del tiempo mostró que, tanto arqueosomas como liposomas convencionales e fosfatidilcolina, presentaban una alta actividad antioxidante hasta el final del estudio de estabilidad, como reflejan las figuras 60, 61 y 62. El análisis estadístico de los datos reveló diferencias estadísticamente significativas entre las formulaciones 5 y 6 ( $M_5 - M_6 = -2,3$ , e.e. 0,653) y las formulaciones 9 y 10 ( $M_9 - M_{10} = -1,42$ , e.e. 6,653), aunque eran diferencias pequeñas, como se puede observar de la magnitud de la diferencia de medias.



**Figura 60. Evolución de la actividad antioxidante durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:1**

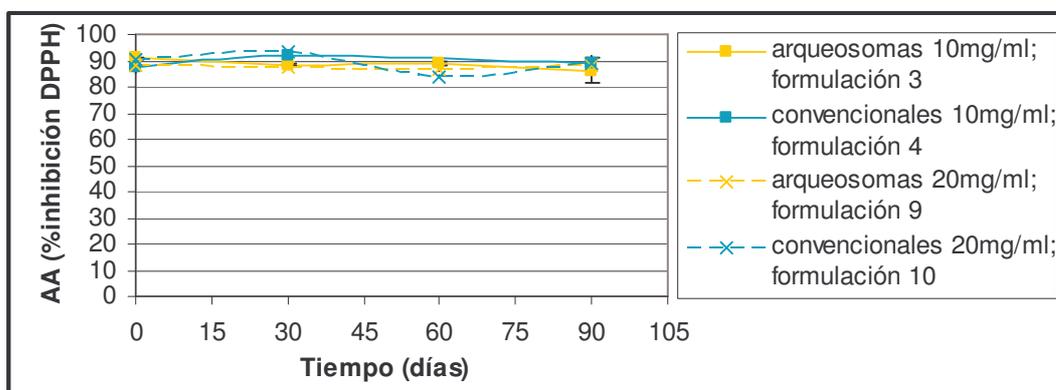


Figura 61. Evolución de la actividad antioxidante durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:0,5

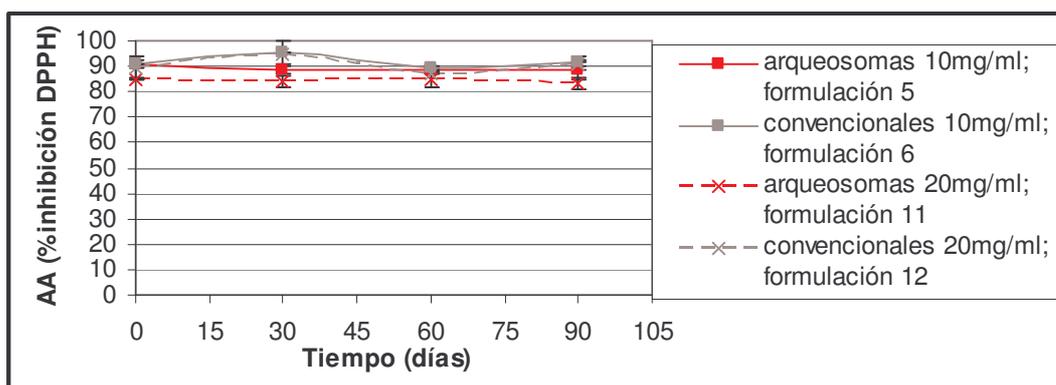


Figura 62. Evolución de la actividad antioxidante durante el estudio de estabilidad de las formulaciones con una proporción molar lípido/colesterol 1:0,25

De los resultados descritos anteriormente se puede deducir que los arqueosomas presentan ciertas ventajas frente a los liposomas convencionales de fosfatidilcolina como sistemas de vehiculización de sustancias activas ya que, a pesar de presentar un tamaño de partícula superior al de los liposomas convencionales y originar suspensiones más heterogéneas, consiguen una mayor eficiencia de encapsulación y son estables en el tiempo.

Las magnificas propiedades de estabilidad presentadas por los arqueosomas pueden atribuirse a la especial composición química de los lípidos que los constituyen. El enlace de tipo éter presente en estos lípidos hace a las vesículas elaboradas con ellos más resistentes a

la hidrólisis en medio acuoso, una de las principales vías de degradación química que sufren los liposomas. La ausencia de insaturaciones en las cadenas hidrocarbonadas de estos fosfolípidos también confiere a las vesículas resistencia frente a la degradación oxidativa, la otra vía degradativa (Grit y Crommelin, 1993).

La estabilidad en cuanto al tamaño de partícula, el cual fue constante en todas las formulaciones elaboradas, se ve afectada por la carga de superficie, de manera que los liposomas que carecen de carga eléctrica superficial tienden a agregarse, siendo menos estables que los que están cargados (Lichtenberg y Barenholz, 1988). En este aspecto todas las formulaciones elaboradas están cargadas negativamente, lo que hace suponer que tendrán predisposición a ser estables. La carga de los arqueosomas es considerablemente superior a la de los liposomas convencionales, lo que hace que la fuerza repulsiva entre partículas sea de una magnitud mayor en el primer tipo de vesículas y, por consiguiente, la tendencia a la estabilidad de los arqueosomas se puede anticipar superior a la de los liposomas de fosfatidilcolina.

La capacidad para mantener a lo largo del tiempo la sustancia activa inicialmente encapsulada es también una consecuencia de la peculiar estructura química de los lípidos que conforman su membrana, ya que estudios previos han demostrado que la permeabilidad de la membrana y la pérdida de solutos encapsulados es menor cuando se utilizan este tipo de lípidos que cuando se utiliza fosfatidilcolina u otros tipos de lípidos éster (Yamauchi *et al.*, 1993; Elferink *et al.*, 1994; Komatsu y Chong, 1998).

La incorporación de colesterol a las formulaciones tiene un efecto beneficioso ya que aumenta la densidad de empaquetamiento de los liposomas y reduce la permeabilidad de la bicapa. El efecto beneficioso de la incorporación de colesterol a las formulaciones se pone de manifiesto cuando se utiliza como mínimo en una razón molar 1:0,5 con respecto al lípido (Lian y Ho, 2001; Barenholz, 2002). Este hecho queda constatado en las vesículas elaboradas para el presente trabajo, siendo las vesículas que contienen una proporción molar lípido/colesterol 1:1 en su composición las que mejor comportamiento de estabilidad han mostrado en el tiempo con respecto a todos los parámetros analizados.

Una de las estrategias usadas normalmente para aumentar la estabilidad de los liposomas es la adición de alguna sustancia antioxidante a la formulación, como  $\alpha$ -tocoferol, ácido ascórbico o BHT (Grit y Crommelin, 1993). El hecho de que en las formulaciones elaboradas en el presente trabajo se haya utilizado una sustancia antioxidante hace pensar que ésta también contribuye a la marcada estabilidad de las vesículas obtenidas.

### 3. ESTUDIOS DE TOXICIDAD IN VITRO

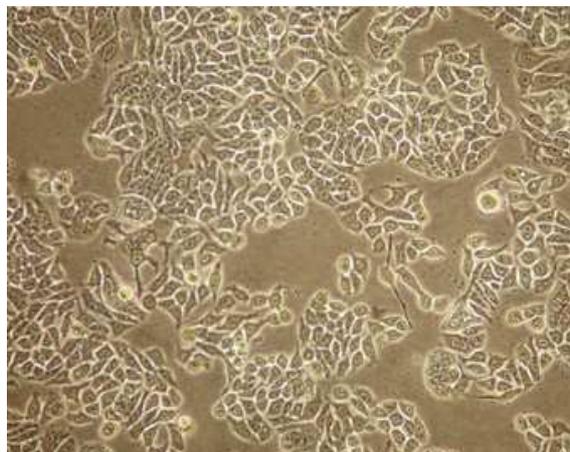
#### 3.1. MATERIAL Y MÉTODOS

##### 3.1.1. Procedimientos para el cultivo celular

###### 3.1.1.1. Líneas celulares

La toxicidad del producto a testar fue evaluada mediante el estudio de la viabilidad celular tras el tratamiento de dicho cultivo con el producto.

La línea celular utilizada fue suministrada por el banco de células del CIC de la Universidad de Granada. Ésta fue la línea celular HT-29 (ATTC HTB-38), procedente de un adenocarcinoma de colon humano tipo II, con morfología epitelial, capaz de crecer formando monocapa. La figura 63 muestra el aspecto de dichas células cuando se observan al microscopio óptico.



**Figura 63. Imagen al microscopio óptico (20x) de un cultivo celular semicofluente de la línea celular HT-29**

###### 3.1.1.2. Medio de cultivo

El medio base utilizado fue Mc Coy 5a con 2 mM de glutamina el cual fue suplementado con 10% de suero bovino fetal (SBF), ambos suministrados por Sigma Aldrich. Como tampón, este medio contiene bicarbonato sódico, por lo que se trata de cultivos abiertos que deben incubarse en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Contiene rojo fenol como indicador de pH que

revelará, por viraje a amarillo, la acidificación y agotamiento de los nutrientes del medio, lo cual indica la necesidad de sustituir ese medio acidificado por medio nuevo.

#### **3.1.1.3. Procedimiento de cultivo**

El cultivo se llevó a cabo en una campana de flujo laminar en condiciones de esterilidad, mantenidas en todo momento ya que el material, reactivos y medios que se utilizaron en la manipulación de los cultivos celulares eran estériles.

Los cultivos celulares se realizaron en frascos Falcon de 10 ml (25 cm<sup>2</sup>) y se incubaron en estufa a 37° C, con un 5% de tensión de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación. Se incubaron hasta que se formó una monocapa de células confluentes en el fondo del frasco de cultivo, cambiando el medio periódicamente cuando se observaba viraje del indicador pH del medio.

#### **3.1.1.4. Procedimiento de subcultivo: tripsinización**

Con el fin de originar nuevos cultivos a partir de los cultivos confluentes, se procedió a la tripsinización de los mismos. Para ello se retira el medio de cultivo y se lava la monocapa con una solución tampón (Sigma) con el fin de retirar posibles restos de medio que podrían interferir con el tratamiento posterior. Una vez retirada la solución tampón se añadieron 2 ml de una solución de tripsina-EDTA al 0,25% (Sigma Aldrich) y se incubó a 37° C durante 3 min. La solución de tripsina-EDTA permite el despegado de la monocapa por la acción de la tripsina, que rompe la matriz proteica extracelular responsable de que las células se adhieran formando la monocapa, y por la acción quelante del EDTA, que secuestra los iones Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> que contribuyen a la estabilización de dicha matriz extracelular, ayudando a la acción de la tripsina. En este paso se debe ser especialmente cuidadoso, ya que un exceso de tiempo de contacto de la tripsina con las células puede hacer que ésta actúe no solo en las uniones entre células, sino sobre las propias células, dañándolas y produciendo efectos citotóxicos. Con una pipeta se aspira un par de veces la solución con las células en suspensión para asegurar que las células se han despegado y homogeneizarlas. Finalmente se añade un volumen apropiado de medio de cultivo con suero al 10%, el cual va a inactivar la acción de la tripsina. Este medio con las células en suspensión se transfiere a un tubo de

fondo cónico, y se centrifuga durante 5 min a 100 g. Se retira cuidadosamente el sobrenadante y el pellet de células se resuspende en un volumen conocido de medio de cultivo nuevo, para proceder al recuento de células viables.

#### **3.1.1.5. Recuento de células viables**

Se tomaron 50 µl de la suspensión celular y se llevaron a un tubo eppendorf que contenía el mismo volumen de una solución de azul tripán. Se mezcló bien y de esta dilución 1:2 de las células se tomó el volumen necesario para rellenar una cámara de recuento de Neubauer y proceder al recuento de las células viables, identificadas por su capacidad para excluir el colorante. Una vez conocido el número de células, éstas se utilizaron para iniciar un nuevo cultivo en frasco Falcon o para realizar un cultivo en microplacas de 96 pocillos, las cuales serían utilizadas posteriormente para los ensayos de toxicidad.

#### **3.1.1.6. Conservación de la línea celular**

Para conservar las líneas celulares se utiliza la congelación, ya que evita su senescencia, reduce el riesgo de que se produzcan contaminaciones y minimiza los cambios genéticos. Para la congelación se deben usar agentes crioprotectores que protegen a las células durante el proceso, al permitir una bajada de la temperatura más lenta. Como agente crioprotector se utilizó dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich), el cual se añadió al 5% a un frasco que contenía suero bovino fetal. La solución SBF-DMSO 5% se conservó a -20° C hasta su utilización.

Una vez obtenido el pellet de células después del tripsinizado, se resuspendió en un volumen suficiente de SBF-DMSO 5% para llenar crioviales de 4 ml, los cuales se llenaron hasta la mitad de su capacidad. El congelado se realizó de manera gradual hasta -80° C, dejando el criovial a 4°C durante 1 h, a -20°C durante 2 h, y transfiriéndolo finalmente a un congelador de -80° C. Para asegurar una mejor conservación y viabilidad de las células se recomienda transferirlas a un contenedor de nitrógeno líquido.

La descongelación debe hacerse de manera rápida, en un baño a 37° C. Una vez descongelado se transfiere el líquido a un tubo cónico, se añade medio de cultivo y se

centrifuga, durante 5 min a 100 g, con el fin de eliminar el DMSO que es citotóxico. Se elimina el sobrenadante, y el pellet se resuspende en medio de cultivo suplementado con SBF y se transfiere a un frasco Falcon de cultivo. Se incuba en estufa de CO<sub>2</sub> hasta formación de la monocapa.

### **3.1.1.7. Cultivo en microplaca**

Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo en microplacas de 96 pocillos. En cada pocillo se depositó un volumen conocido de la suspensión celular, de manera que la concentración final de células fuera entre 10<sup>4</sup> y 10<sup>5</sup> células/pocillo.

La microplaca se incubó durante 24-48 h a 37° C en estufa de CO<sub>2</sub> hasta que se observó en los pocillos, mediante microscopio invertido, como mínimo un 80% de confluencia celular. Cuando se obtenía dicho grado de confluencia el medio de cultivo se cambió por el mismo medio sin suero, incubando la microplaca en esas condiciones 12 h más, pasadas las cuales se retiró el medio de cultivo y se añadió la sustancia a testar, previamente diluida en medio de cultivo sin suero, y se incubó 24 h en las mismas condiciones citadas anteriormente.

### **3.1.2. Estudio de la viabilidad celular**

La citotoxicidad fue evaluada mediante el método colorimétrico que usa MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro], descrito por Mossmann para la determinación de la viabilidad celular. El método se basa en la capacidad que las células viables tienen para reducir la sal soluble de tetrazolio MTT, de color amarillo, a la forma insoluble, formazán, que es de color morado. El anillo del tetrazolio es abierto únicamente por la actividad mitocondrial, por lo que la reacción se da sólo en las células vivas. La figura 64 representa la reacción que sufre el MTT en el interior de la célula.

Posteriormente, los cristales de formazán son solubilizados en un disolvente orgánico (DMSO o SDS normalmente) de manera que el color desarrollado, proporcional al número de células vivas, se pueda medir espectrofotométricamente (Mosmann, 1983).

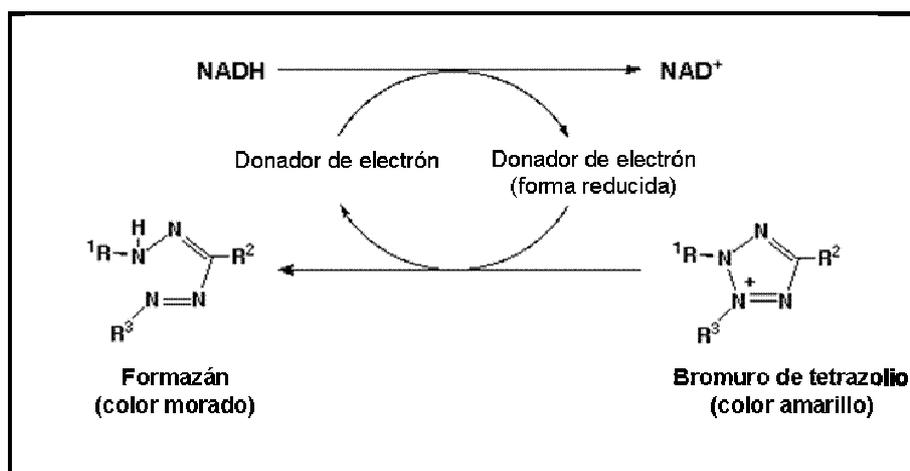


Figura 64. Esquema de la reacción que sufre el MTT dentro de la célula

El método del MTT es ampliamente usado para evaluar la citotoxicidad *in vitro* de diferentes sustancias activas y fármacos, así como es también frecuentemente usado para evaluar la citotoxicidad de las nanopartículas (Fischella *et al.*, 2009).

Una serie de estudios han investigado el mecanismo celular del MTT, el cual no está aún del todo claro. El factor principal para que el MTT sea incorporado dentro de la célula es la carga positiva de la sal de tetrazolio, que hace que se transporte mediante el potencial de la membrana plasmática. Parece ser que la reducción del MTT no se produce exclusivamente por las deshidrogenasas de la mitocondria, y que también están implicadas reductasas de membrana presentes en endosomas y lisosomas (Berridge *et al.*, 2005).

En el presente estudio se utilizó el siguiente método:

Una microplaca con la monocapa celular formada en sus pocillos fue tratada con 0,190 ml de cada una de las muestras a testar, previamente diluidas en medio de cultivo sin suero, el cual va a asegurar el aporte de nutrientes durante el ensayo. A las células control que no eran tratadas se les añadió simplemente el medio de cultivo. La microplaca se incubó durante 24 h, pasadas las cuales se retiró el medio con muestra y se inocularon los pocillos con 0,190 ml de una dilución 1:10 de una solución extemporánea de MTT (5mg/ml en PBS) en medio de cultivo sin suero. Se incubó la microplaca a 37° durante 2 h, pasadas las cuales se retiró el medio con MTT y se añadieron 0,1ml de DMSO. Se agitó hasta completa disolución de los cristales de formazán que se habían formado, y se leyó la densidad óptica a 595 nm en un lector de

microplaca Sunrise Tecan. El porcentaje de viabilidad celular se calculó según la siguiente expresión:

$$\% \text{ viabilidad celular} = (A_{\text{muestra}}/A_{\text{control}}) * 100$$

Donde  $A_{\text{muestra}}$  es la absorbancia que presentan los pocillos tratados y  $A_{\text{control}}$  es la absorbancia de los pocillos sin tratar

Se testaron dos tipos de muestras, por un lado el extracto antioxidante, diferentes diluciones con concentración creciente, y por otro algunas de las formulaciones de liposomas elaboradas. De las 12 formulaciones descritas en el capítulo 2 de la parte experimental, se seleccionó una formulación de arqueosomas y su análoga en fosfatidilcolina. Dado que todas las formulaciones tenían igual composición pero en distintas proporciones, se creyó conveniente seleccionar las formulaciones con mayor concentración de lípidos y colesterol, ya que si estas formulaciones no resultaban tóxicas parecía lógico pensar que a concentraciones menores tampoco lo serían, y así se utilizaron las formulaciones con concentración de lípido de 20mg/ml y proporción molar lípido/colesterol 1:1, es decir, las formulaciones 7 (arqueosomas) y 8 (fosfatidilcolina). Asimismo, estas formulaciones se ensayaron tanto vacías como con extracto fenólico incorporado, de manera que en caso de que resultaran tóxicas se pudiera individualizar si se debía a los componentes de los liposomas, a la sustancia encapsulada o a ambos. Se utilizó una dilución 1:1,38 en medio de cultivo, ya que previamente se había comprobado que esa dilución contenía la mínima cantidad de medio que no producía la muerte celular por falta de nutrientes.

Cada muestra se testó en sextuplicado (6 pocillos) y se realizaron 3 réplicas del ensayo completo.

La figura 65 muestra el diseño de la microplaca con los diferentes tratamientos a los que se somete el cultivo celular.

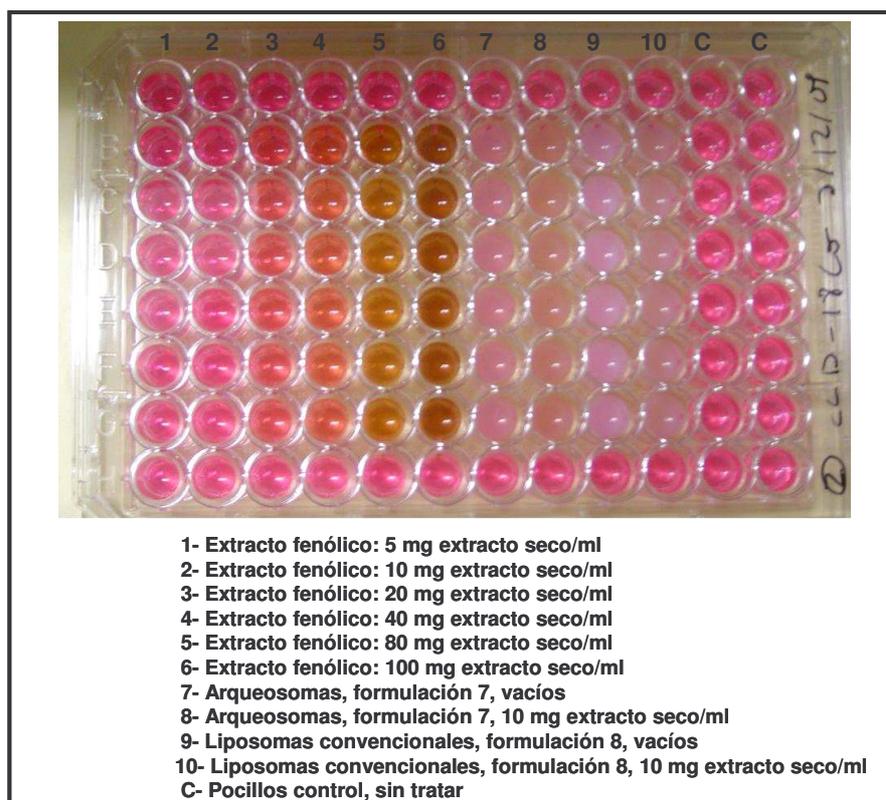


Figura 65. Diseño de la microplaca para el ensayo de toxicidad

## 3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.2.1. Citotoxicidad del extracto fenólico

La figura 66 muestra el porcentaje de viabilidad celular después del tratamiento con diferentes concentraciones del extracto fenólico. Como se puede observar, a medida que aumenta la concentración se produce una disminución del número de células viables, lo que se traduce en un aumento del efecto citotóxico. A partir de la concentración de 40 mg/ml se puede observar un ligero aumento de la viabilidad celular al aumentar la concentración de extracto.

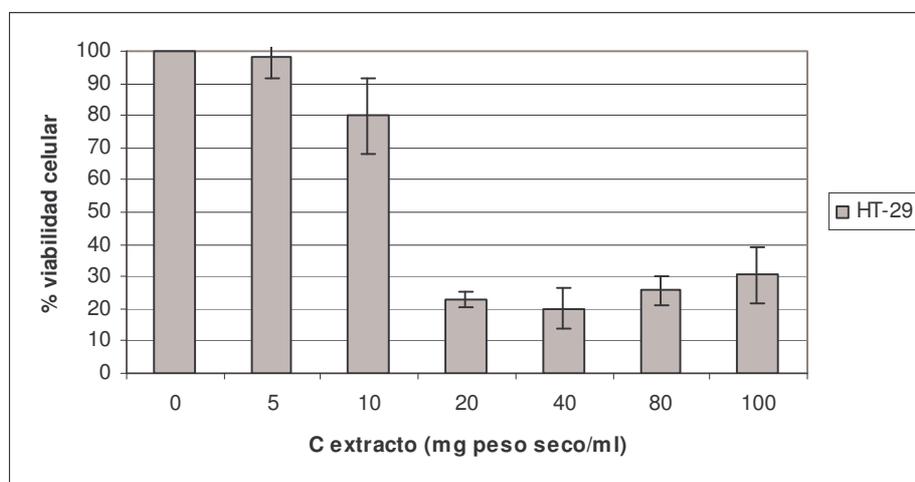


Figura 66. Citotoxicidad del extracto fenólico a diferentes concentraciones

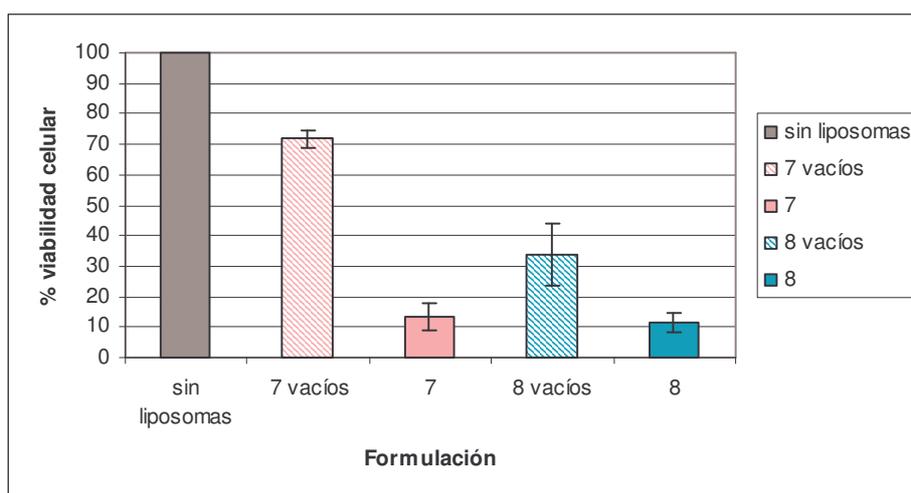
A la vista de estos resultados se puede deducir que el extracto fenólico, además de actividad antioxidante, posee también actividad antiproliferativa sobre las células tumorales. Estos resultados están en concordancia con diversos estudios realizados sobre la actividad antiproliferativa de los biofenoles del olivo. Así, uno de ellos estudia la actividad antiproliferativa de diferentes biofenoles aislados del alpeorujo, así como de un extracto crudo y de acetato de etilo también de alpeorujo. Los biofenoles usados de forma individual mostraron escasa inhibición de la proliferación celular, mientras que los extractos, de composición compleja, inhibían el crecimiento celular de una manera muy eficiente hasta una determinada concentración a partir de la cual, como en el caso que se presenta en esta memoria, parecían aumentar la viabilidad celular (Obied

*et al.*, 2009). Este mismo efecto se observó en otro estudio acerca de la actividad antiproliferativa de los fenoles del aceite de oliva, en el que se trabajó con diferentes fracciones obtenidas por cromatografía. Del mismo modo, las fracciones que correspondían a un único compuesto fenólico no mostraron efecto alguno sobre el crecimiento celular, mientras que las fracciones que eran más complejas sí inhibieron de manera eficaz el crecimiento de las células tumorales (Menendez *et al.*, 2008).

A pesar de que el mecanismo de acción por el que los biofenoles inhiben la proliferación de las células tumorales no quede establecido con este estudio, parece claro que es debido a la acción sinérgica de varios compuestos químicos presentes en el extracto y que no puede atribuirse a un compuesto en concreto.

### 3.2.2. Citotoxicidad de las vesículas elaboradas

Al igual que en el caso anterior, la figura 67 muestra la viabilidad celular después de la exposición de las células al correspondiente tratamiento, el cual consistió en utilizar vesículas vacías, tanto de arqueosomas como de liposomas convencionales, y vesículas que contenían encapsulado en su interior una concentración del extracto fenólico de 10 mg/ml, también ambos tipos de vesículas.



**Figura 67. Citotoxicidad de diferentes formulaciones de arqueosomas (formulación 7) y liposomas convencionales (formulación 8)**

Como se puede observar, en el caso de los arqueosomas existe una gran diferencia entre la formulación vacía y la cargada de extracto, con una viabilidad celular respecto al control del 72% y 13% respectivamente. Se puede considerar que los constituyentes del arqueosoma no son tóxicos sin embargo, al incorporarle el extracto fenólico, el número de células viables sufre una drástica reducción.

En el caso de los liposomas convencionales podemos considerar que los componentes presentan una toxicidad más elevada que los arqueosomas, dejando un 34% de viabilidad celular tras el tratamiento. Al igual que en los arqueosomas, la viabilidad se ve enormemente reducida al incorporar dentro de las vesículas el extracto antioxidante, llegando a un valor del 11% de viabilidad celular respecto al control.

En la tabla 27 se puede ver un resumen del porcentaje de viabilidad celular proporcionado por algunas de las concentraciones de extracto ensayadas así como por las formulaciones de liposomas. Si comparamos el valor que da el extracto sin encapsular con el valor una vez encapsulado se observa, a igualdad de concentración, una gran potenciación del efecto antiproliferativo, tanto para la encapsulación en arqueosomas como en liposomas convencionales. Éste efecto es incluso más potente que el resultante de aumentar la concentración del extracto hasta 4 veces.

**Tabla 27. Efecto citotóxico de algunos de los tratamientos aplicados sobre las células**

Tipo de tratamiento	% viabilidad celular (media±SD)
Extracto (10 mg/ml)	79,96±11,84
Extracto (40 mg/ml)	20,10±6,26
Arqueosomas vacíos	71,96±2,88
Arqueosomas con extracto (10 mg/ml)	13,48±4,36
Liposomas convencionales vacíos	33,78±9,96
Liposomas convencionales con extracto (10 mg/ml)	11,39±3,25

La explicación a este fenómeno sería que existe una consecuencia directa de la administración de los compuestos fenólicos dentro de liposomas, de uno u otro tipo, ya que, tal

como se explicó en el capítulo correspondiente de la introducción, este tipo de vesículas permiten un transporte más eficaz de la sustancia activa al interior de la célula, potenciando el efecto sin necesidad de aumentar la dosis.

Estos primeros resultados, aunque prometedores, deben tomarse con cautela ya que deberían realizarse ulteriores ensayos para corroborarlos y descartar posibles interferencias con la técnica empleada, ya que existen evidencias de que algunas sustancias pueden interferir con el MTT dando falsos positivos de citotoxicidad. Algunos de los mecanismos por los que se producen estas interferencias es porque se provoca la exocitosis de los cristales de formazán de manera que se pierden al retirar el medio y al realizar la medida espectrofotométrica el valor obtenido es inferior al que realmente debería haber dado. Este efecto se ha visto que es producido por péptidos de  $\beta$ -amiloide y por determinadas nanopartículas como las de sílice mesoporosa. Sería interesante hacer alguna determinación de la viabilidad celular complementaria mediante otras técnicas, como la citometría de flujo, mediante la actividad lactato deshidrogenasa (Fischella *et al.*, 2009) o utilizando colorantes de tetrazolio de segunda generación que originan formazán hidrosoluble, de manera que la medida se hace directamente sin necesidad de solubilizar la sal (Berridge *et al.*, 2005).

## 4. ELABORACIÓN DE FÓRMULAS FARMACEÚTICAS DE APLICACIÓN TÓPICA

### 4.1. MATERIAL Y MÉTODOS

Con el fin de proporcionar a las vesículas obtenidas una forma farmacéutica para su aplicación tópica se evaluaron diferentes excipientes para la incorporación de las mismas. Asimismo, se evaluó la liberación del principio activo desde dichas formas farmacéuticas.

#### 4.1.1. Fórmulas farmacéuticas objeto de estudio

Como fórmulas farmacéuticas para la incorporación de los liposomas se elaboraron dos tipos diferentes de geles, con dos sustancias gelificantes distintas, y un excipiente emulgente A/O de amplio uso en farmacia. Los geles son formas farmacéuticas de consistencia semirrígida, destinados a la aplicación tópica. La ventaja de los geles frente a otras formas farmacéuticas es que son bien tolerados, fácilmente lavables y que proporcionan una sensación de frescor al aplicarlos sobre la piel, sin dejar sensación pegajosa. Se utilizaron varios excipientes con diferentes propiedades para la incorporación de los liposomas. Con cada uno de los excipientes se prepararon tres tipos de formulaciones:

- Formulación de extracto libre: en él los liposomas fueron sustituidos por extracto antioxidante sin encapsular con la misma concentración que la usada para preparar los liposomas (10 mg/ml), con el fin de evaluar el grado de retención de la sustancia activa por parte del excipiente usado, ya que un grado de retención alto podría suponer un problema a la hora de la liberación desde los liposomas.
- Formulación de arqueosomas o liposomas convencionales: preparación que contenía en su interior las vesículas con el extracto antioxidante encapsulado.
- Formulación en blanco: debido a que en los ensayos de cesión el método analítico elegido era espectrofotométrico, de las preparaciones anteriores se elaboraron sus correspondientes blancos con el fin de poder restar los valores de absorbancia proporcionados por los componentes de la forma farmacéutica. Así el blanco para la

formulación de extracto libre se elaboró con agua ultrapura, el blanco para la preparación de arqueosomas se elaboró con arqueosomas vacíos, y el blanco para la formulación de liposomas convencionales se elaboró con dichas vesículas vacías.

Las formulaciones elaboradas y el modo de preparación de las mismas fue el siguiente:

1. Gel de carbopol:

- Carbopol 940 -----1%
- Suspensión de arqueosomas o liposomas convencionales c.s.p. 100 ml
- Trietanolamina c.s.p. pH≈6

El extracto antioxidante o la suspensión liposómica fue añadida al carbopol 940 lentamente y bajo continua agitación hasta la completa disolución del excipiente. Posteriormente permaneció 24 h en reposo y pasado ese tiempo se procedió a la gelificación del mismo añadiendo unas gotas de trietanolamina para conseguir el pH deseado.

2. Gel de pluronic:

- Pluronic 720----- 20%
- Suspensión de arqueosomas o liposomas convencionales c.s.p. 100 ml

El extracto antioxidante o la suspensión liposómica fue añadida al pluronic 720 lentamente y bajo continúa agitación hasta la completa disolución del excipiente. Este excipiente se caracteriza por formar geles reversibles, es decir, está en estado gel por encima de 30° C, y por debajo de esta temperatura su estado es líquido. Permaneció 24 h en reposo antes de someterlo a ensayos de liberación con el fin de que se estabilizara la estructura.

3. Excipiente cetílico (RFE):

- Vaselina-----86 g
- Alcohol cetílico-----4 g
- Lanolina-----10 g

Este excipiente se caracteriza porque es capaz de absorber hasta un 60% de agua, ya que se trata de un excipiente emulgente A/O.

Para su preparación se funde en un baño maría el alcohol cetílico, y una vez fundido se añaden progresivamente la lanolina y la vaselina. Cuando la mezcla está fundida de manera homogénea se deja enfriar mezclando en mortero con agitación constante hasta enfriamiento.

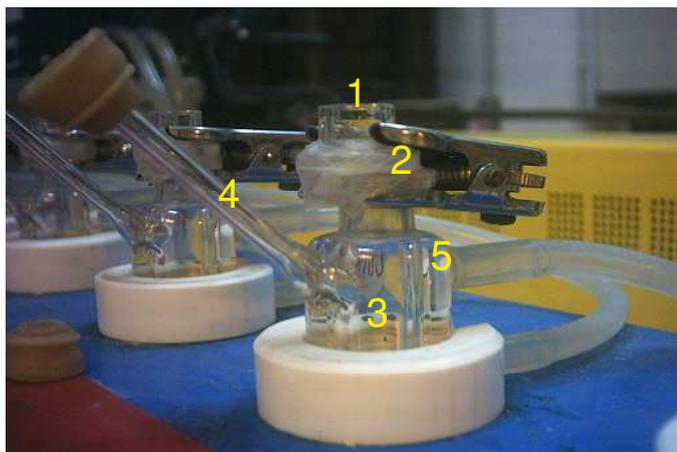
Posteriormente se adicionó un 60% (p/v) del extracto antioxidante o de la suspensión liposómica.

#### **4.1.2. Ensayo de cesión de las fórmulas farmacéuticas elaboradas**

Mediante el ensayo de cesión se evalúa la capacidad que presenta la forma farmacéutica para liberar la sustancia activa. Con estos datos podemos hallar cual es la cinética de liberación y que vehículo es más indicado para elaborar una fórmula con las mejores características de liberación posibles para que la mayor parte del principio activo sea liberado de ella.

Para los estudios de cesión de fármacos una de las metodologías más ampliamente difundida entre diferentes grupos de investigación es la que utiliza células de difusión vertical de Franz (Morales *et al.*, 2004; Sinico *et al.*, 2005) (Figura 68). Dichas células constan de dos compartimentos, uno donador y otro receptor, entre los cuales se sitúa la membrana de cesión, que puede ser piel natural o una membrana artificial. Además posee una camisa termostaticada que permite mantener la temperatura constante a lo largo del ensayo. En el compartimento donador se coloca una cantidad conocida de la formulación a evaluar (no más de 0,3 g para evitar el abombamiento de la membrana) y en el compartimento receptor se coloca la solución receptora, que en nuestro caso fue agua ultrapura ya que la sustancia activa era altamente soluble en dicho vehículo.

Las células de Franz utilizadas en el presente trabajo tenían 40 mm de diámetro y un volumen efectivo de 11,5 ml. Fueron proporcionadas por Vidra Foc (Barcelona, España).



**Figura 68. Célula de Franz: 1) Compartimento donador; 2) Membrana; 3) Compartimento receptor; 4) Toma de muestra; 5) Camisa termostatazada**

Cuando se usan membranas artificiales debe elegirse una que minimice al máximo la resistencia al paso de la sustancia activa, con el objeto de determinar la fiabilidad de la influencia de la forma farmacéutica en la cesión de la misma. Por este motivo se ensayaron dos tipos de membranas hidrófilas, dada la naturaleza del extracto. Estas membranas fueron la llamada HVLP, membrana de Durapore (polivinilideno fluoruro) y la denominada HA, formada por una mezcla de ésteres de celulosa., ambas de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro. Fueron suministradas por Millipore.

Para la selección de membrana se llevó a cabo un experimento de cesión de 2 h de duración, poniendo en el compartimento donador 0,3 ml del extracto polifenólico con una concentración de 10mg/ml en peso seco, la misma concentración usada para elaborar los liposomas. Los experimentos de cesión de las formulaciones se prolongaron durante 24 h, y también se utilizaron 0,3 g de formulación en el compartimento donador. A intervalos de tiempo prefijados se tomó una muestra de 1ml, que posteriormente era analizada espectrofotométricamente en un espectrofotómetro UV/VIS Perkin-Elmer Hitachi 124, determinando mediante una recta de calibrado ( $y = 1,2617x - 0,0093$ ,  $r^2 = 0,9981$ ) la cantidad

de extracto polifenólico cedida. El volumen extraído se reponía con solución receptora con el objeto de mantener las condiciones sink.

Se realizaron tres réplicas de cada ensayo.

## 4.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.2.1. Características organolépticas de las formulaciones elaboradas

#### 1. Gel de Carbopol:

El aspecto de los geles fue más transparente cuando incorporaban liposomas convencionales que cuando eran arqueosomas. En ambos casos la incorporación de vesículas con extracto antioxidante proporcionaba a los geles un color pardo, mientras que los geles de vesículas vacías eran de color más blanco (Figuras 69 y 70).

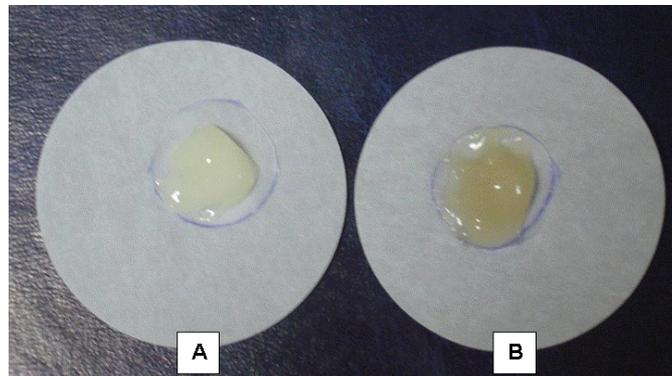


Figura 69. Arqueosomas en gel de carbopol: vacíos (A); con extracto antioxidante (B)

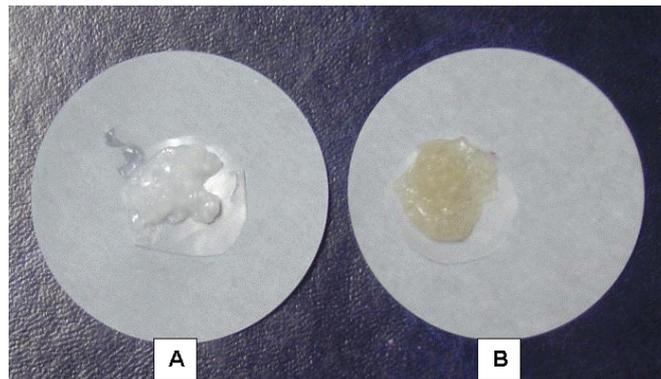
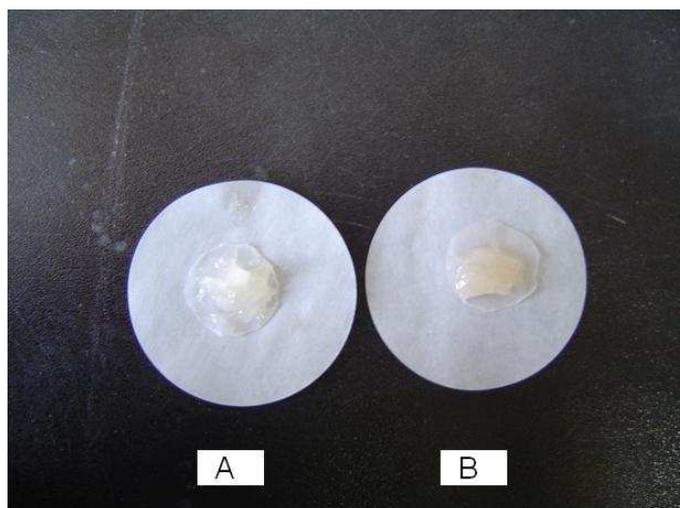


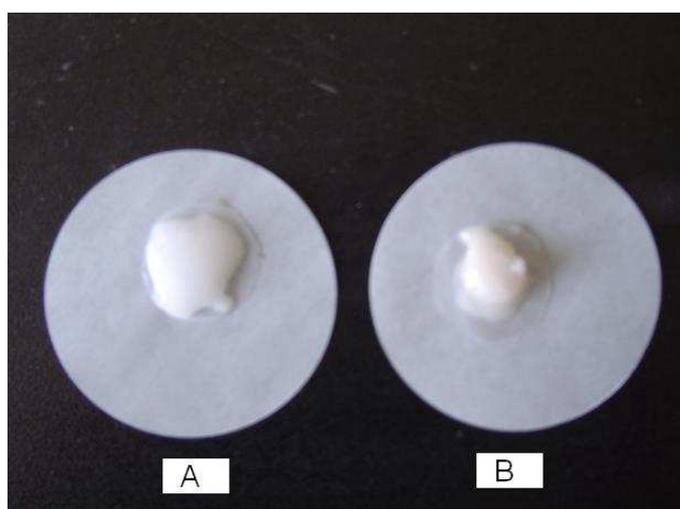
Figura 70. Liposomas convencionales en gel de carbopol: vacíos (A); con extracto antioxidante (B)

## 2. Gel de Pluronic:

Los geles que contenían arqueosomas en su composición, tanto vacíos como con extracto antioxidante, presentaron un aspecto más transparente que aquellos que contenían liposomas de fosfatidilcolina, que tenían un aspecto más lechoso (Figuras 71 y 72).



**Figura 71. Arqueosomas en gel pluronic: vacíos (A) y con extracto antioxidante (B)**



**Figura 72. Liposomas convencionales en gel pluronic: vacíos (A) y con extracto antioxidante (B)**

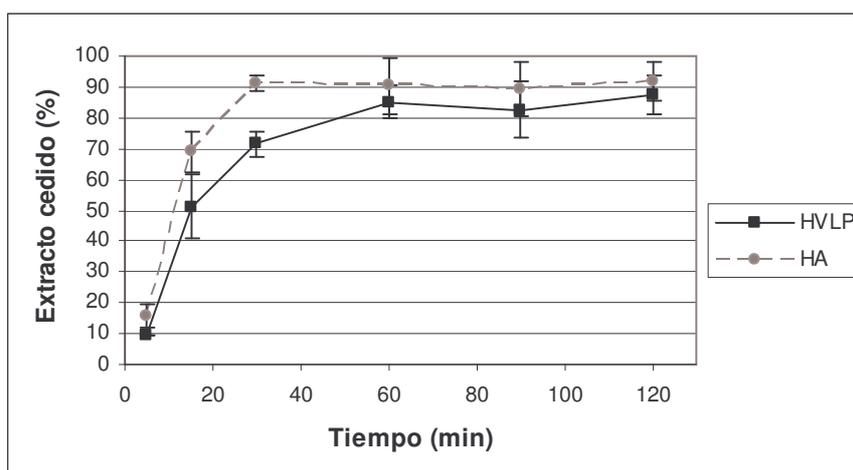
### 3. Excipiente cetílico:

De consistencia cremosa y color amarillento. No existían diferencias organolépticas entre las formulaciones con vesículas vacías y los que contenían vesículas con extracto antioxidante.

#### 4.2.2. Selección de membrana para el ensayo de cesión

De dicho ensayo se observa que ambas membranas dejaban pasar el extracto antioxidante sin oponer gran resistencia, sin embargo, como se observa en la figura , a los treinta minutos de ensayo la membrana HA había dejado pasar el 90% de la sustancia activa, en contraste con el 70% cedido a través de la HVLP en el mismo período de tiempo.

Al cabo de las dos horas la cesión a través de la membrana HA seguía siendo alrededor del 90%, valor que fue prácticamente igualado por la membrana HVLP.



**Figura . Cesión de la sustancia activa a través de membrana de HVLP (polivinilideno fluoruro) y HA (celulosa)**

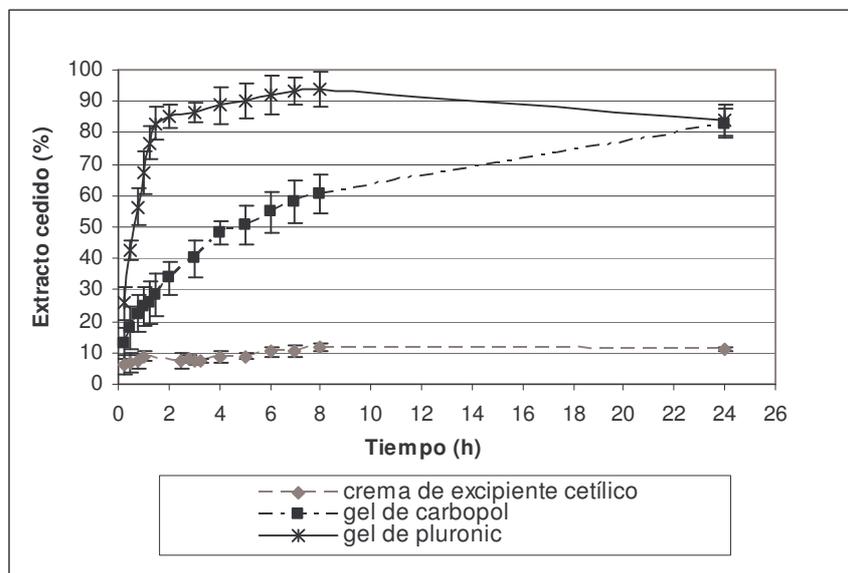
Se decidió usar la membrana de HA para los posteriores ensayos de cesión por ser la que oponía menor resistencia al paso del extracto polifenólico.

### 4.2.3. Estudio de la cesión desde las formulaciones farmacéuticas elaboradas

#### 4.2.3.1. Formulaciones con extracto libre

Con el fin de evaluar el grado de retención de la sustancia activa por parte del excipiente usado, se procedió a realizar ensayos de cesión a todas las fórmulas que contenían en su composición el extracto antioxidante en forma libre, comprobando el grado en el que el excipiente iba a influir en la liberación de la sustancia activa encapsulada en las vesículas.

Así, a cada excipiente se le incorporó una concentración de extracto antioxidante de 10 mg/ml, y se sometieron a un ensayo de liberación de 24 h de duración. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 73.



**Figura 73. Cesión del extracto antioxidante libre a través de la membrana HA desde las distintas formas farmacéuticas**

En ella podemos observar claramente que el gel de pluronic 720 es el que más rápidamente libera el extracto fenólico, con más del 50% liberado durante la primera hora. La liberación se hace más lenta a partir de la tercera hora, alcanzándose el máximo de liberación a las 8 h, con un 93% liberado.

Propiedades intermedias presenta el gel de carbopol 940, en el que la liberación es algo más progresiva, liberando en la primera hora un 25% del total, alcanzándose el 50% a las 5 h y

aumentando progresivamente hasta las 24 h, en las que se alcanzan niveles de liberación comparables a los del pluronic.

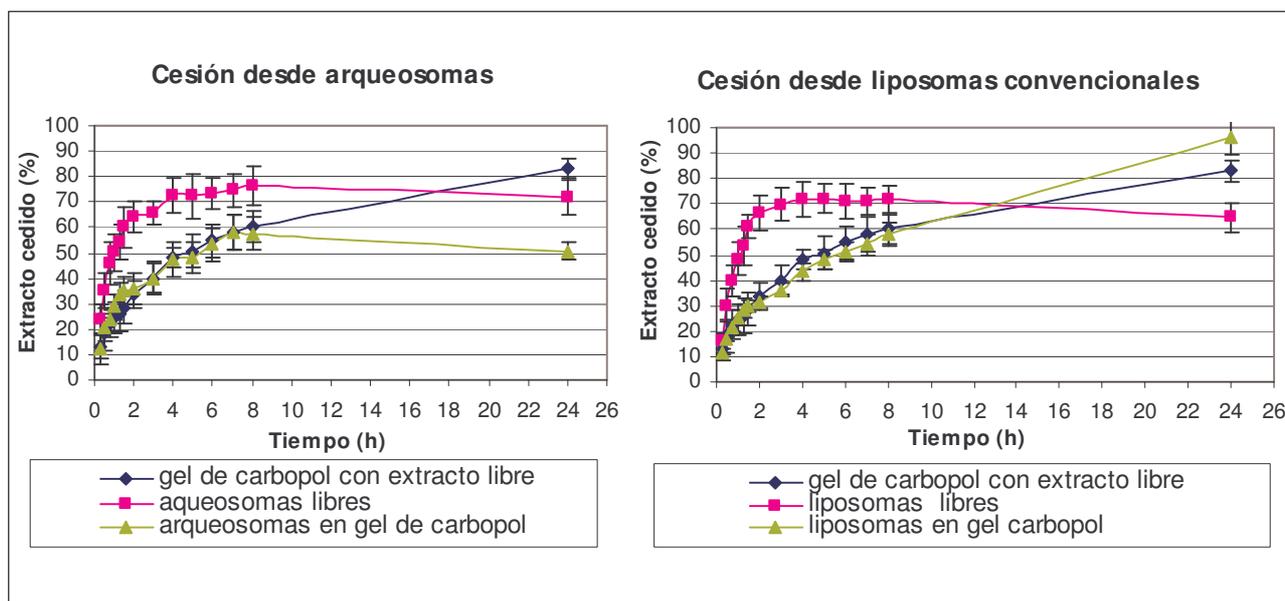
Es el excipiente cetílico el que más retiene al extracto polifenólico, liberando solamente un 12% al final del ensayo.

Posiblemente estas diferencias entre los tres excipientes sean debidas al carácter lipófilo que tiene el excipiente cetílico, frente al carácter hidrófilo de los otros dos. Las propiedades lipófilas hacen que al extracto fenólico le cueste más difundir a través de este vehículo, que cuando lo hace a través de uno con características similares, en cuanto a hidrofilia, a las que él presenta.

Por todo ello se creyó conveniente elaborar solamente geles de pluronic y carbopol para la incorporación de los liposomas, y no utilizar el excipiente cetílico, dado que el alto grado de retención del extracto que presentaba hacia previsible que al encontrarse éste incorporado dentro de liposomas la liberación fuera todavía menor, y por tanto no interesa para nuestro objeto de estudio.

#### **4.2.3.2. Gel de carbopol 940**

En la figura 74 podemos observar cual es el patrón de cesión tanto de arqueosomas como de liposomas de fosfatidilcolina una vez incorporados al gel de carbopol. Dicha liberación se ha comparado con la producida por la formulación liposómica en forma libre así como con el gel control que posee el extracto polifenólico de forma libre.



**Figura 74. Cesión de los geles de carbopol**

Los arqueosomas en forma libre, a lo largo de todo el ensayo, ceden alrededor del 20% más que los mismos cuando se encuentran incorporados en el gel de carbopol. Así, los arqueosomas sin incorporar al gel llegan a un máximo de cesión del 70%, mientras que cuando se incorporan al gel la cesión al final del ensayo es de un 50% del extracto fenólico encapsulado.

Si comparamos ambos geles, con arqueosomas y con extracto libre, podemos observar que la cinética de cesión es igual hasta las 8 h, produciéndose un acúmulo mayor pasadas 24 h en el caso del gel con extracto libre.

En el caso de los liposomas de fosfatidilcolina la diferencia entre la formulación libre y la incorporada en el gel es aún mayor, llegando en muchos casos a ser del 30%. Sin embargo esta diferencia se va haciendo más pequeña con el paso del tiempo y, así, a las 24 h del estudio la cesión producida por los liposomas en gel es mayor que la de la formulación libre, llegando a un máximo del 95%, es decir, prácticamente la cesión total de la sustancia activa.

Comparando el gel con liposomas convencionales con el de extracto libre observamos el mismo comportamiento que en el caso de los arqueosomas, con una cinética de cesión igual hasta las 8 h. En este caso pasadas 24 h el acúmulo producido por el gel con liposomas es mayor que el del gel con extracto fenólico libre.

Si comparamos el gel con arqueosomas y el de liposomas de fosfatidilcolina se observa el mismo patrón de liberación en las 8 h primeras, con un 30% liberado durante la primera hora, que aumenta progresivamente hasta alcanzar el 60% a las 8 h. A partir de ese momento la liberación por parte del gel que contiene arqueosomas se estabiliza, sin embargo el gel con liposomas convencionales continúa liberando hasta alcanzar el máximo de liberación a las 24 h.

De acuerdo con los datos anteriores se puede afirmar que tanto en el caso de liposomas convencionales como de arqueosomas las diferencias encontradas en el proceso de liberación han sido similares y es, sólomente, cuando el extracto está libre cuando la liberación es mayor. Los liposomas convencionales y arqueosomas actúan reteniendo al extracto y, consecuentemente, prolongando la duración de acción del mismo. Dado que nuestro objetivo es obtener una formulación farmacéutica de aplicación cosmética, pensamos que la cinética de liberación con 8 h de estudio es suficiente para asegurar la acción de la sustancia activa estudiada dado su proceso de liberación, ya que se obtienen concentraciones adecuadas desde el comienzo del ensayo.

#### 4.2.3.3. Gel de pluronic 720

Al igual que en el caso anterior, en la figura 75 se ha representado la cesión producida por el gel de pluronic tanto de la formulación de arqueosomas como de liposomas convencionales y se ha comparado con la de dichas formulaciones en la forma libre así como del gel con el extracto libre.

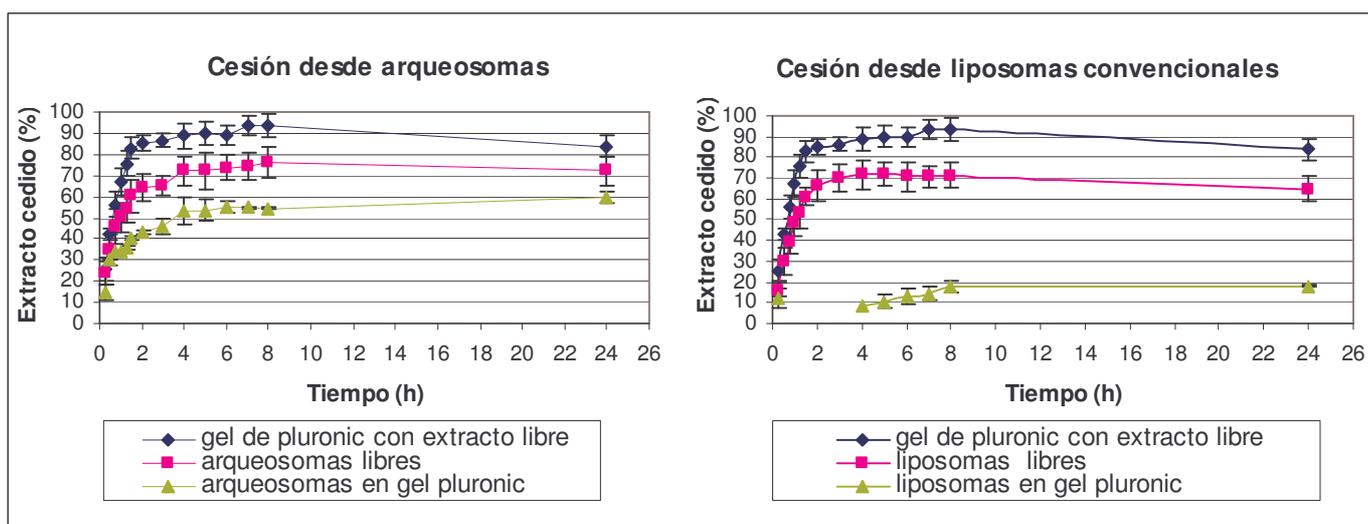


Figura 75. Cesión de los gels de pluronic

Observamos de nuevo que los arqueosomas en forma libre ceden alrededor del 20% más que los mismos cuando se encuentran incorporados al gel, en este caso de pluronic. Esta diferencia se hace ligeramente menor al final del ensayo, de manera que en dicho momento el gel ha cedido un 60% del total del extracto encapsulado, en comparación con el 70% cedido por la formulación de arqueosomas libres. La diferencia es mucho más notable si comparamos el gel control con los arqueosomas en gel. Así, el gel que contiene el extracto antioxidante en forma libre alcanza el 60% de liberación en la primera hora, llegando a un máximo de cesión del 90% a las 5 h.

Respecto a la cesión, los liposomas convencionales presentan grandes diferencias según se encuentren en la forma libre o incorporados al gel. Así, la cesión que producen los liposomas cuando se encuentran en el gel es escasa, alcanzando apenas un 20% al finalizar el ensayo, mientras que la forma libre llega a liberar un 70% de la sustancia activa encapsulada.

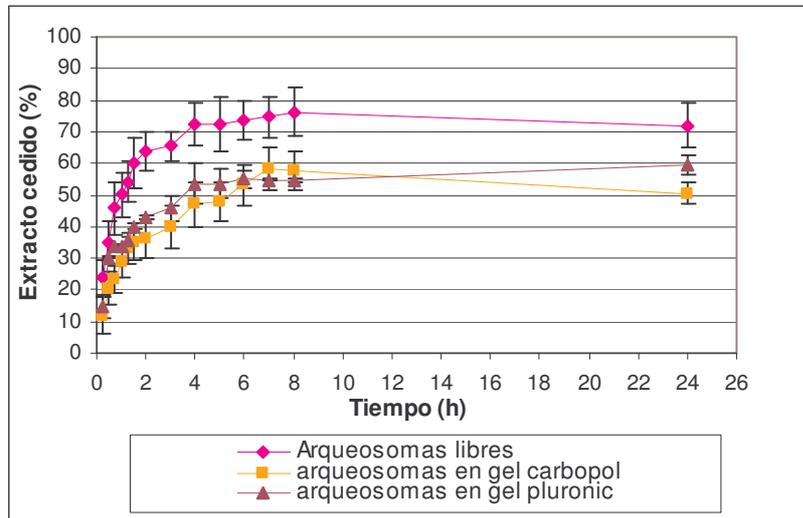
Si comparamos los tres geles (extracto libre, arqueosomas y liposomas convencionales) el de mayor liberación es, como se ha citado previamente, el del extracto libre. Un nivel intermedio de cesión se observa para el gel que contiene arqueosomas, alrededor del 60%, y muy baja en el caso del gel con liposomas convencionales. Este hecho puede ser debido a que en este caso la interacción de liposomas con pluronic es mayor y este polímero actúa como atrapador de los liposomas, no teniendo ese efecto sobre los arqueosomas, seguramente por las diferencias químicas que existen entre los lípidos usados en cada caso. La composición del gel de alguna forma actúa como estabilizador de estos compuestos, como hemos encontrado en trabajos que describen algo similar (Ruiz *et al.*, 2008).

#### **4.2.4. Estudio comparativo entre las fórmulas farmacéuticas estudiadas**

A partir de los resultados anteriores podemos concluir qué forma farmacéutica para la aplicación tópica es más adecuada para cada una de las formulaciones liposomiales. En las siguientes figuras representamos conjuntamente para ambos excipientes la liberación desde arqueosomas y desde liposomas convencionales.

### 1. Arqueosomas

En la figura 76 vemos la cesión de los arqueosomas incorporados en los dos excipientes utilizados en comparación con la misma cuando se encuentran en la forma libre.



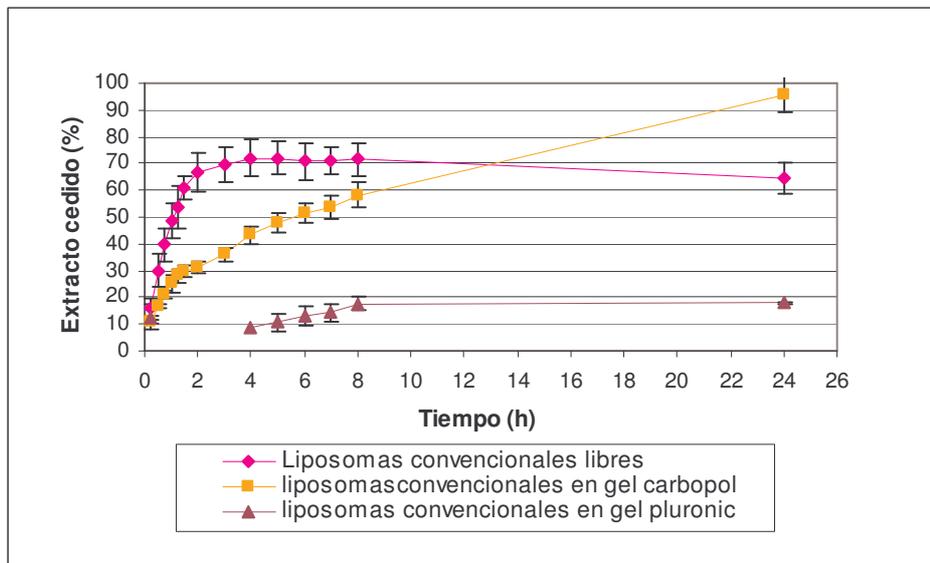
**Figura 76. Cesión desde arqueosomas**

Podemos observar cómo la cantidad cedida por ambos geles es muy similar durante las primeras 8 h de ensayo, con un 30% cedido durante la primera hora, cantidad que va aumentando progresivamente en ambos geles aunque de manera más rápida en el gel de carbopol, alcanzando su máximo de liberación a las 7 h con un 57% de liberación. El gel de pluronic, sin embargo, presenta una liberación más prolongada en el tiempo, llegando al máximo de liberación (60%) a las 24 h.

Dado que el nivel máximo de liberación alcanzado por ambos geles es prácticamente el mismo, la elección de uno u otro gel va a depender de que queramos conseguir un efecto más inmediato, para lo que utilizaríamos el gel de carbopol, o un efecto mantenido en el tiempo, en cuyo caso el gel de elección sería el de pluronic.

## 2. Liposomas convencionales

Al igual que en el caso de los arqueosomas, la figura 77 representa la cesión de los liposomas convencionales una vez incorporados a los geles de carbopol y pluronic, y en ella se compara con la cesión de la formulación liposómica en su forma libre.



**Figura 77. Cesión desde liposomas convencionales**

De dicha figura se deduce claramente que, en el caso de los liposomas convencionales, la forma farmacéutica de elección sería el gel de carbopol, ya que con el de pluronic se consigue una liberación muy escasa, empezando a tener valores de cesión a partir de la cuarta hora y no llegando a alcanzar un 20% de cesión a la finalización del ensayo. Si comparamos la cesión desde el gel carbopol con la de la forma libre, la primera es más lenta, aunque más duradera y efectiva en el tiempo, alcanzándose valores superiores después de 24 h, cuando la cesión llega al 95% del total.

## **IV. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES**

A pesar de que en cada uno de los capítulos anteriores se han discutido de forma específica y con apoyo bibliográfico los aspectos más relevantes de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se ha considerado conveniente y de utilidad presentar en este apartado un breve resumen compilativo.

Con la introducción en España en la década de los 90 del sistema de dos fases para la extracción de aceite de oliva se consiguió disminuir el consumo de agua que se requería en el proceso, aunque no se consiguió resolver el problema de los residuos, ya que el alpeorajo, residuo en este sistema de extracción, también plantea un problema medioambiental. La posibilidad potencial de su utilización como fuente de compuestos fenólicos antioxidantes ha abierto una nueva puerta de gran interés a la solución del problema, aunque sólo sea de manera parcial, ya que a pesar de que se extrajeran los compuestos valiosos aún sobraría una gran cantidad de biomasa residual que requeriría un tratamiento. Lo ideal sería una solución que aplicase de manera coordinada varias tecnologías, por ejemplo, combinar la extracción de antioxidantes, proceso sencillo que no requiere de gran inversión tecnológica, con un posterior proceso de biorremediación.

Los resultados incluidos en esta memoria muestran la influencia de la polaridad del disolvente usado en la extracción de los compuestos fenólicos, de manera que a mayor polaridad el contenido fenólico de los extractos es mayor, así como su capacidad antioxidante, ya que existe una correlación lineal entre ambos parámetros. Asimismo se ha comprobado también la influencia que tiene en el contenido fenólico de los extractos la variedad de aceituna de la que procede el residuo.

Los liposomas han sido y son ampliamente utilizados para la administración tópica de fármacos y activos cosméticos, ya que mejoran la penetración de dichas sustancias a capas más profundas de la piel y permiten la formación de un reservorio que localiza la sustancia activa en el lugar de acción. Una de las ventajas de usar los liposomas como vectores cosméticos es el efecto positivo que producen sobre el grado de hidratación de la piel. Este

efecto deriva del hecho de que la humedad cutánea está regulada fundamentalmente por los lípidos del estrato córneo, por lo que los lípidos que conforman la membrana del liposoma afectan al grado de hidratación de la piel, produciendo un efecto hidratante y restaurador. Esta acción beneficiosa que los liposomas *per se* tienen sobre la piel puede verse favorecida por la encapsulación de diferentes agentes de acción cosmética, como antioxidantes. Dado que en el envejecimiento cutáneo están fundamentalmente implicados fenómenos de estrés oxidativo, un aporte exógeno de sustancias antioxidantes ayudará a los sistemas de defensa antioxidante propios del organismo a contrarrestar los ataques oxidativos. Si este aporte de antioxidantes se hace vía tópica, y en forma de liposomas, se facilitará el acceso de estas sustancias al lugar de acción.

Los compuestos fenólicos obtenidos del alpeorujó se encapsularon en formulaciones de arqueosomas de diferente composición y en liposomas convencionales de fosfatidilcolina de composición análoga a los primeros. A pesar de que todas las formulaciones elaboradas mostraron buenas propiedades de encapsulación y de estabilidad, los arqueosomas presentaron ciertas ventajas frente a los liposomas convencionales, lo cual puede considerarse debido a las peculiaridades químicas de los lípidos que los constituyen. Así, el enlace éter presente en estos lípidos confiere a los arqueosomas resistencia frente a la hidrólisis en medio acuoso y la carga negativa de los grupos de cabeza polar de los lípidos polares de la arquea confieren a los arqueosomas una carga de superficie altamente negativa, superior a la carga también negativa de los liposomas convencionales, lo que hace que pueda esperarse un mejor comportamiento de estabilidad para los arqueosomas. Así, los arqueosomas han mostrado una gran estabilidad tanto por la falta de agregación vesicular, lo cual se demuestra tanto por el mantenimiento constante del diámetro de partícula como por la capacidad de mantener a lo largo del tiempo la sustancia activa inicialmente encapsulada.

Los resultados obtenidos de los ensayos de citotoxicidad *in vitro* ponen de manifiesto el efecto positivo de la utilización de liposomas como sistema de vehiculización para los compuestos fenólicos, facilitando el acceso al lugar de acción, como se puede deducir de la fuerte potenciación de la actividad antiproliferativa cuando se administran en forma de liposomas, tanto arqueosomas como liposomas de fosfatidilcolina.

La incorporación de las vesículas obtenidas a una forma farmacéutica de aplicación tópica y el posterior estudio de liberación *in vitro* ha mostrado que es posible la utilización de geles para la administración de los arqueosomas y liposomas convencionales con compuestos fenólicos antioxidantes, mientras que el excipiente cetílico no sería adecuado con este fin. En el caso de los arqueosomas los dos geles evaluados producen un resultado similar, liberando la sustancia antioxidante de forma progresiva desde el inicio y durante 8 horas. En el caso de los liposomas convencionales sólo el gel de carbopol sería útil ya que el gel de pluronic interacciona de alguna forma con las vesículas formando una estructura que retiene a la sustancia activa, haciendo que ésta se libere de forma muy lenta y poco efectiva.

## CONCLUSIONES

1. De las diferentes muestras de alpeorajo estudiadas, la procedente de la variedad de aceituna picual ha demostrado ser la más adecuada para la obtención de compuestos fenólicos antioxidantes. Teniendo en cuenta que esta variedad es la más abundante en Andalucía y que la producción de aceite de oliva fundamentalmente se realiza a partir de ella, el presente estudio pone de manifiesto la idoneidad de la utilización de este residuo tanto para disponer de una fuente abundante y económica de antioxidantes como para aportar una solución parcial al problema medioambiental que el residuo representa.
2. Los compuestos fenólicos obtenidos a partir de alpeorajo y empleados en este trabajo han mostrado características apropiadas para ser incorporados eficazmente en el interior de vesículas lipídicas con diferente composición, sin que se produjeran alteraciones en sus propiedades antioxidantes.
3. El hecho de que los lípidos de arqueas presenten cabeza polares de notable carga negativa condiciona el que el potencial zeta presentado por los arqueosomas sea superior al mostrado por los liposomas convencionales elaborados con fosfatidilcolina. Consecuentemente se puede esperar una mayor tendencia a la estabilidad por parte de los arqueosomas obtenidos a partir de los lípidos polares de *Halobacterium salinarum* CECT-396.
4. Todas las formulaciones de arqueosomas elaboradas en este estudio, han mostrado buenas propiedades de estabilidad, así como un óptimo rendimiento en la encapsulación de los compuestos fenólicos ensayados. Este hecho, unido a la fluidez que los lípidos arqueales proporcionan a la membrana de estas vesículas, hacen de los arqueosomas un sistema de vehiculización idóneo para la administración tópica de antioxidantes.

5. Los ensayos de citotoxicidad realizados sobre la línea celular HT-29 con vesículas vacías ponen de manifiesto una notable menor toxicidad de los arqueosomas en comparación con los liposomas convencionales. Teniendo en cuenta que la diferencia entre ambas formulaciones radica en el tipo de lípido empleado en la elaboración, se puede deducir que los lípidos arqueales son menos tóxicos que la fosfatidilcolina comercial utilizada y, por lo tanto, se pueden considerar apropiados para la preparación de formulaciones farmacéuticas.
6. La actividad antiproliferativa que los compuestos fenólicos obtenidos de alpeorajo han mostrado sobre la línea celular HT-29 fue muy superior cuando se administraron incorporados en liposomas, independientemente de que se tratara de arqueosomas o de liposomas convencionales. Este hecho permitiría la utilización de los antioxidantes en bajas concentraciones, lo que pone de manifiesto la validez de los liposomas elaborados como sistema de vehiculización de este tipo de sustancias activas.
7. A la hora de elegir un excipiente con el fin de proporcionar a las vesículas elaboradas una forma farmacéutica de aplicación cosmética cabe destacar que el excipiente cetílico, al presentar un alto grado de retención de las sustancia activa, no es adecuado para la incorporación de las vesículas; y que los arqueosomas presentan una mayor versatilidad, pudiéndose utilizar indistintamente los excipientes carbopol o pluronic, mientras que en los liposomas convencionales sólo sería adecuada la utilización de carbopol.
8. La incorporación de las vesículas al excipiente seleccionado permite la obtención de una forma farmacéutica que libera la sustancia activa de forma gradual durante 8 h., observándose una liberación más homogénea en el caso de los arqueosomas, lo cual pone de relieve la utilidad de dicha forma farmacéutica con fines cosméticos.

## CONCLUSIONI

1. Perseguendo lo scopo di utilizzare le sanse umide come fonte di antiossidanti, si dimostra che le più adatte a tal fine sono quelle che provengono dalla varietà picual. Dal momento che tale varietà è la più abbondante in Andalusia e la produzione di olio d'oliva discende per lo più proprio da questa varietà, si manifesta un doppio effetto positivo: da un lato si ha una fonte abbondante ed economica di antiossidanti e dall'altro si fornisce una soluzione parziale al problema ambientale che questo tipo di rifiuti rappresenta.
2. I composti fenolici estratti hanno mostrato la loro capacità di essere incapsulati in modo efficace all'interno delle vescicole lipidiche con differente composizione, senza che si producessero alterazioni nelle loro proprietà antiossidanti.
3. Il fatto che i lipidi degli archei possiedano gruppi polari con una notevole carica negativa fa sì che il potenziale zeta degli archeosomi sia superiore a quello dei liposomi di fosfatidilcolina. Di conseguenza ci si può aspettare una maggiore tendenza alla stabilità da parte degli archeosomi.
4. Tutte le formulazioni di archeosomi preparate hanno mostrato sia le loro proprietà di stabilità che le rese ottime nell'incapsulazione dei composti fenolici usati. Questo, sommato alla fluidità che i lipidi degli archei conferiscono alla membrana delle vescicole con essi preparate, fa sì che gli archeosomi siano ottimi sistemi di veicolazione delle sostanze antiossidanti per l'uso topico.

5. Gli studi di tossicità *in vitro* performati sulla linea cellulare HT-29 per testare gli archeosomi e i liposomi di fosfatidilcolina vuoti hanno svelato una tossicità molto minore per i primi. Tenendo conto che la differenza tra le due formulazioni testate consiste nel tipo di lipido usato nella preparazione, si può dedurre che i lipidi degli archei siano meno tossici della fosfatidilcolina commerciale usata, e quindi siano ottimi per la preparazione di preparati farmaceutici.
6. Le proprietà antiproliferative sulla linea cellulare HT-29 che i composti fenolici ottenuti dalle sanse umide hanno mostrato, sono decisamente superiori quando usati in forma di liposomi, sia archeosomi che liposomi di fosfatidilcolina. Questo farà in modo che gli antiossidanti si possano usare in concentrazioni più basse, rendendo validi questo tipo di liposomi come sistema di veicolazione per sostanze attive.
7. In riferimento alla scelta di un eccipiente per inserire le vescicole in un preparato farmaceutico per applicazione topica si può evidenziare che l'eccipiente cetilico, dato l'alto grado di ritenzione della sostanza attiva, non è appropriato per l'inserimento delle vescicole: e che gli archeosomi sono più versatili quando si deve scegliere un eccipiente per la loro incorporazione, essendo possibile l'utilizzazione di entrambi gli eccipienti proposti (carbopol e pluronic) mentre per i liposomi di fosfatidilcolina sarebbe appropriato solamente l'uso di carbopol.
8. L'incorporazione delle vescicole nell'eccipiente permette di ottenere un preparato farmaceutico che rilascia la sostanza attiva in maniera graduale nel corso di 8 ore, essendo più omogenea nel caso degli archeosomi, ponendo in rilievo l'utilità di questo preparato per l'uso cosmetico.



## **V. BIBLIOGRAFÍA**

- Alburquerque, J. A., Gonzalez, J., Garcia, D., Cegarra, J. (2004). Agrochemical characterisation of "Alperujo", a solid by-product of the two-phase centrifugation method for olive oil extraction. *Bioresource Technology*, 91(2), 195-200.
- Allouche, N., Fki, I., Sayadi, S. (2004). Toward a high yield recovery of antioxidants and purified hydroxytyrosol from olive mill wastewaters. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(2), 267-273.
- Antimisiaris, S. (2009, 27/09/09-10/10/09). *Liposomes for drug delivery*. Paper presented at the Erasmus Intensive Program in skin barrier function, Lyon (France).
- Antranikian, G., Vorgias, C. E., Bertoldo, C. (2005). Extreme environments as a resource for microorganisms and novel biocatalysts. *Marine Biotechnology* 1, 96, 219-262.
- Appel, H. M. (1993). Phenolics in ecological interactions - the importance of oxidation. *Journal of Chemical Ecology*, 19(7), 1521-1552.
- Arjona, R., Garcia, A., Ollero, P. (1999). The drying of alpeorujo, a waste product of the olive oil mill industry. *Journal of Food Engineering*, 41(3-4), 229-234.
- Bakkerwoudenberg, I. (1995). Delivery of antimicrobials to infected tissue macrophages. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 17(1), 5-20.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1), 191-203.
- Bangham, A. D., Standish, M. M., Watkins, J. C. (1965). Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology*, 13(1), 238-&.
- Barenholz, Y. (2002). Cholesterol and other membrane active sterols: From membrane evolution to "Rafts". *Progress in Lipid Research*, 41(1), 1-5.
- Barenholz, Y., Crommelin, D. J. A. (1994). In S. J. (Ed.), *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (pp. 1-39): Marcel Dekker.
- Barns, S. M., Delwiche, C. F., Palmer, J. D., Pace, N. R. (1996). Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rna sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(17), 9188-9193.
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a yellowstone-national-park hot-spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(5), 1609-1613.
- Benmarez, K., Perbal, B., Krycevmartinerie, C., Thierry, D., Kohiyama, M. (1988). A protein of halobacterium-halobium immunologically related to the v-myc gene-product. *Febs Letters*, 227(1), 56-60.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: New insights into their cellular reduction. *Biotechnology Annual Review*, Vol 11, 11, 127-152.
- Bertrand, J. C., Almallah, M., Acquaviva, M., Mille, G. (1990). Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaebacterium. *Letters in Applied Microbiology*, 11(5), 260-263.

- Betageri, G. V. (1993). Liposomal encapsulation and stability of dideoxyinosine triphosphate. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 19(5), 531-539.
- Betz, G., Aeppli, A., Menshutina, N., Leuenberger, H. (2005). In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *International Journal of Pharmaceutics*, 296(1-2), 44-54.
- Bianco, A., Uccella, N. (2000). Biophenolic components of olives. *Food Research International*, 33(6), 475-485.
- Blocher, D., Gutermann, R., Henkel, B., Ring, K. (1984). Physicochemical characterization of tetraether lipids from thermoplasma-acidophilum - differential scanning calorimetry studies on glycolipids and glycophospholipids. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 778(1), 74-80.
- Botterweck, A. A. M., Verhagen, H., Goldbohm, R. A., Kleinjans, J., van den Brandt, P. A. (2000). Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the netherlands cohort study. *Food and Chemical Toxicology*, 38(7), 599-605.
- Bouwstra, J. A., de Graaff, A., Gooris, G. S., Nijse, J., Wiechers, J. W., van Aelst, A. C. (2003). Water distribution and related morphology in human stratum corneum at different hydration levels. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(5), 750-758.
- Bouwstra, J. A., Honeywell-Nguyen, P. L. (2002). Skin structure and mode of action of vesicles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, S41-S55.
- Brenes, M., Garcia, A., Garcia, P., Rios, J. J., Garrido, A. (1999). Phenolic compounds in spanish olive oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(9), 3535-3540.
- Briante, R., Febbraio, F., Nucci, R. (2003). Antioxidant properties of low molecular weight phenols present in the mediterranean diet. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(24), 6975-6981.
- Bullock, C. (2000). The archaea - a biochemical perspective. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 28(4), 186-191.
- Caddeo, C., Teskac, K., Sinico, C., Kristl, J. (2008). Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and uv-b protection of cells. *International Journal of Pharmaceutics*, 363(1-2), 183-191.
- Capasso, R., Cristinzio, G., Evidente, A., Scognamiglio, F. (1992). Isolation, spectroscopy and selective phytotoxic effects of polyphenols from vegetable waste-waters. *Phytochemistry*, 31(12), 4125-4128.
- Caputo, A. C., Scacchia, F., Pelagagge, P. M. (2003). Disposal of by-products in olive oil industry: Waste-to-energy solutions. *Applied Thermal Engineering*, 23(2), 197-214.
- Cayuela, M. L., Bernal, M. P., Roig, A. (2004). Composting olive mill waste and sheep manure for orchard use. *Compost Science & Utilization*, 12(2), 130-136.
- Clares, B., Gallardo, V., Medina, M. M., Ruiz, M. A. (2009). Multilamellar liposomes of triamcinolone acetone: Preparation, stability, and characterization. *Journal of Liposome Research*, 19(3), 197-206.
- Coderch, L., Fonollosa, J., Estelrich, J., De La Maza, A., Parra, J. L. (2000). Influence of cholesterol on liposome fluidity by epr - relationship with percutaneous absorption. *Journal of Controlled Release*, 68(1), 85-95.

- Corcelli, A., Colella, M., Mascolo, G., Fanizzi, F. P., Kates, M. (2000). A novel glycolipid and phospholipid in the purple membrane. *Biochemistry*, 39(12), 3318-3326.
- Corcelli, A., Lattanzio, V. M. T., Mascolo, G., Papadia, P., Fanizzi, F. (2002). Lipid-protein stoichiometries in a crystalline biological membrane: Nmr quantitative analysis of the lipid extract of the purple membrane. *Journal of Lipid Research*, 43(1), 132-140.
- Cornetti, U. (2009). Antioxidant use in nutraceuticals. *Clinics in Dermatology*, 27(2), 175-194.
- Cowan, D. A. (1992). Biotechnology of the archaea. *Trends in Biotechnology*, 10(9), 315-323.
- Crommelin, D. J. A., Peeters, P. A. M., Eling, W. M. C. (1992). Targeting with igg and immunoliposomes to circulating cells - the target-cell dragging concept. *Targeting of Drugs* 3, 238, 31-44.
- Cubellis, M. V., Rozzo, C., Montecucchi, P., Rossi, M. (1990). Isolation and sequencing of a new beta-galactosidase-encoding archaeobacterial gene. *Gene*, 94(1), 89-94.
- Cuerda-Correa, M. T. (2005). *Obtención de liposomas a partir de arqueas halófilas extremas y aplicaciones en tecnología farmacéutica*. Tesis doctoral de la Universidad de Granada.
- Chaban, B., Ng, S. Y. M., Jarrell, K. F. (2006). Archaeal habitats - from the extreme to the ordinary. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(2), 73-116.
- Chekhonin, V. P., Gurina, O. I., Lokhonina, A. V., Raybinina, A. E., Maksimova, M. A., Semenova, A. V., et al. (2007). Targeted transport of stealth immunoliposomes to schwann cells. *Doklady Akademii Nauk*, 417(4), 560-562.
- Choquet, C. G., Patel, G. B., Beveridge, T. J., Sprott, G. D. (1992). Formation of unilamellar liposomes from total polar lipid extracts of methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2894-2900.
- Choquet, C. G., Patel, G. B., Beveridge, T. J., Sprott, G. D. (1994). Stability of pressure extruded liposomes made from archaeobacterial ether lipids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 42(2-3), 375-384.
- Choquet, C. G., Patel, G. B., Sprott, G. D. (1996). Heat sterilization of archaeal liposomes. *Canadian Journal of Microbiology*, 42(2), 183-186.
- Danila, D., Partha, R., Elrod, D. B., Lackey, M., Casscells, S. W., Conyers, J. L. (2009). Antibody-labeled liposomes for ct imaging of atherosclerotic plaques in vitro investigation of an anti-icam antibody-labeled liposome containing iohexol for molecular imaging of atherosclerotic plaques via computed tomography. *Texas Heart Institute Journal*, 36(5), 393-403.
- de Castro, M. D. L., Japon-Lujan, R. (2006). State-of-the-art and trends in the analysis of oleuropein and derivatives. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 25(5), 501-510.
- De Rosa, M., Morana, A., Riccio, A., Gambacorta, A., Trincone, A., Incani, O. (1994). Lipids of the archaea - a new tool for bioelectronics. *Biosensors & Bioelectronics*, 9(9-10), 669-675.
- DeLong, E. F. (1998). Everything in moderation: Archaea as 'non-extremophiles'. *Current Opinion in Genetics & Development*, 8(6), 649-654.
- Dessi, M. A., Deiana, M., Rosa, A., Piredda, M., Cottiglia, F., Bonsignore, L., et al. (2001). Antioxidant activity of extracts from plants growing in sardinia. *Phytotherapy Research*, 15(6), 511-518.

- Doods, W. K. (2002). Unusual or extreme habitats. In J. H. Thorp (Ed.), *Freshwater ecology: Concepts and environmental applications* (pp. 295-312). San Diego, California: Academic Press
- Duplessis, J., Ramachandran, C., Weiner, N., Muller, D. G. (1994). The influence of particle-size of liposomes on the deposition of drug into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 103(3), 277-282.
- duPlessis, J., Ramachandran, C., Weiner, N., Muller, D. G. (1996). The influence of lipid composition and lamellarity of liposomes on the physical stability of liposomes upon storage. *International Journal of Pharmaceutics*, 127(2), 273-278.
- El Maghraby, G. M., Barry, B. W., Williams, A. C. (2008). Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34(4-5), 203-222.
- Elferink, M. G. L., Dewit, J. G., Driessen, A. J. M., Konings, W. N. (1994). Stability and proton-permeability of liposomes composed of archaeal tetraether lipids. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1193(2), 247-254.
- Elsayed, M. M. A., Abdallah, O. Y., Naggat, V. F., Khalafallah, N. M. (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1-2), 1-16.
- Esposito, E., Drechsler, M., Mariani, P., Sivieri, E., Bozzini, R., Montesi, L., et al. (2007). Nanosystems for skin hydration: A comparative study. *International Journal of Cosmetic Science*, 29(1), 39-47.
- Evans, R. W., Kushwaha, S. C., Kates, M. (1980). The lipids of halobacterium-marismortui, an extremely halophilic bacterium in the dead-sea. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 619(3), 533-544.
- Fang, J. Y., Lin, H. H., Hsu, L. R., Tsai, Y. H. (1997). Characterization and stability of various liposome-encapsulated enoxacin formulations. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 45(9), 1504-1509.
- Fernandez-Bolanos, J., Rodriguez, G., Gomez, E., Guillen, R., Jimenez, A., Heredia, A., et al. (2004). Total recovery of the waste of two-phase olive oil processing: Isolation of added-value compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(19), 5849-5855.
- Fernandez-Bolanos, J., Rodriguez, G., Rodriguez, R., Heredia, A., Guillen, R., Jimenez, A. (2002). Production in large quantities of highly purified hydroxytyrosol from liquid-solid waste of two-phase olive oil processing or "Alperujo". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(23), 6804-6811.
- Fisichella, M., Dabboue, H., Bhattacharyya, S., Saboungi, M. L., Salvetat, J. P., Hevor, T., et al. (2009). Mesoporous silica nanoparticles enhance mtt formazan exocytosis in hela cells and astrocytes. *Toxicology in Vitro*, 23(4), 697-703.
- Foco, A., Gasperlin, M., Kristl, J. (2005). Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photoprotection. *International Journal of Pharmaceutics (Kidlington)*, 291(1-2), 21-29.

- Foldvari, M., Gesztes, A., Mezei, M. (1990). Dermal drug delivery by liposome encapsulation - clinical and electron-microscopic studies. *Journal of Microencapsulation*, 7(4), 479-489.
- Forterre, P., Brochier, C., Philippe, H. (2002). Evolution of the archaea. *Theoretical Population Biology*, 61(4), 409-422.
- Forterre, P., Mouldy, S. (1989). Eukaryotic and eubacterial type ii DNA topoisomerase inhibitors vp-16 and ciprofloxacin induce DNA cleavage at the same sites in an archaeobacterial plasmid. *Journal of Cellular Biochemistry Supplement*(13 PART D), 86.
- Foti, M. C., Daquino, C. (2006). Kinetic and thermodynamic parameters for the equilibrium reactions of phenols with the dpph(center dot) radical. *Chemical Communications*(30), 3252-3254.
- Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., et al. (1980). The phylogeny of prokaryotes. *Science*, 209(4455), 457-463.
- Freedman, M., Chang, E. H., Zhou, Q., Pirollo, K. F. (2009). Nanodelivery of mri contrast agent enhances sensitivity of detection of lung cancer metastases. *Academic Radiology*, 16(5), 627-637.
- Galinski, E. A. (1995). Osmoadaptation in bacteria. *Adv Microb Physiol*, 37, 272-328.
- Gambacorta, A., Caracciolo, G., Trabasso, D., Izzo, I., Spinella, A., Sodano, G. (2002). Biosynthesis of calditol, the cyclopentanoid containing moiety of the membrane lipids of the archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Tetrahedron Letters*, 43(3), 451-453.
- Gambacorta, A., Gliozzi, A., Derosa, M. (1995). Archaeal lipids and their biotechnological applications. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11(1), 115-131.
- Gambacorta, A., Trincone, A., Nicolaus, B., Lama, L., Derosa, M. (1994). Unique features of lipids of archaea. *Systematic and Applied Microbiology*, 16(4), 518-527.
- Garcia, A., Brenes, M., Romero, C., Garcia, P., Garrido, A. (2002). Study of phenolic compounds in virgin olive oils of the picual variety. *European Food Research and Technology*, 215(5), 407-412.
- Glansdorff, N., Xu, Y., Labedan, B. (2008). The last universal common ancestor: Emergence, constitution and genetic legacy of an elusive forerunner. *Biology Direct*, 3.
- Gomez-Rico, A., Fregapane, G., Salvador, M. D. (2008). Effect of cultivar and ripening on minor components in spanish olive fruits and their corresponding virgin olive oils. *Food Research International*, 41(4), 433-440.
- Gonzalez-Paredes, A., Manconi, M., Caddeo, C., Ramos-Cormenzana, A., Monteoliva-Sanchez, M., Fadda, A. M. (2009). Archaeosomes as carriers for topical delivery of betamethasone dipropionate: In vitro skin permeation study. *Journal of Liposome Research*, (In press).
- Gonzalez, M. D., Moreno, E., Quevedosarmiento, J., Ramoscormenzana, A. (1990). Studies on antibacterial activity of waste-waters from olive oil mills (alpechin) - inhibitory activity of phenolic and fatty-acids. *Chemosphere*, 20(3-4), 423-432.
- Grant, W. D., Gemmell, R. T., McGenity, T. J. (1998). Halobacteria: The evidence for longevity. *Extremophiles*, 2(3), 279-287.

- Grant, W. D., Kamekura, M., McGenity, T. J., Ventosa, A. (2001). Family i. Halobacteriaceae. In J. M. Garrity, Bell, J.A., Liburn, T.G. (Ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. New York: Springer-Verlag.
- Gregoriadis, G. (1976a). Carrier potential of liposomes in biology and medicine .1. *New England Journal of Medicine*, 295(13), 704-710.
- Gregoriadis, G. (1976b). Carrier potential of liposomes in biology and medicine .2. *New England Journal of Medicine*, 295(14), 765-770.
- Grit, M., Crommelin, J. A. (1993). Chemical-stability of liposomes - implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64(1-3), 3-18.
- Halliwell, B. (1994). Free-radicals, antioxidants, and human-disease - curiosity, cause, or consequence. *Lancet*, 344(8924), 721-724.
- Halliwell, B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Halliwell, B., Aeschbach, R., Loliger, J., Aruoma, O. I. (1995). The characterization of antioxidants. *Food and Chemical Toxicology*, 33(7), 601-617.
- Haslam, E. (1996). Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: Possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59(2), 205-215.
- Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., Bobilya, D. J. (2002). Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13(10), 572-584.
- Huber, H., Hohn, M. J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V. C., Stetter, K. O. (2002). A new phylum of archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature*, 417(6884), 63-67.
- Huber, H., Hohn, M. J., Stetter, K. O., Rachel, R. (2003). The phylum nanoarchaeota: Present knowledge and future perspectives of a unique form of life. *Research in Microbiology*, 154(3), 165-171.
- Itoh, Y. H., Sugai, A., Uda, I., Itoh, T. (2001). The evolution of lipids. *Space Life Sciences: Living Organisms, Biological Processes and the Limits of Life*, 28(4), 719-724.
- Jahn, U., Gallenberger, M., Paper, W., Junglas, B., Eisenreich, W., Stetter, K. O., et al. (2008). Nanoarchaeum equitans and ignicoccus hospitalis: New insights into a unique, intimate association of two archaea. *Journal of Bacteriology*, 190(5), 1743-1750.
- Javaux, E. J. (2006). Extreme life on earth - past, present and possibly beyond. *Research in Microbiology*, 157(1), 37-48.
- Javor, B. (1989). Hypersaline environments: Microbiology and biogeochemistry. *Hypersaline environments: microbiology and biogeochemistry.*, i-vii, 1-328.
- Jesorka, A., Orwar, O. (2008). Liposomes: Technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 801-832.
- Juninger, H. E., Hofland, H. E., Bouwstra, J. A. (1991). Liposomes and niosomes: Interactions with human skin. *Cosmetic and Toil*, 106(45-50).
- Kandler, O., Konig, H. (1998). Cell wall polymers in archaea (archaeobacteria). *Cellular and Molecular Life Sciences*, 54(4), 305-308.

- Kashefi, K., Lovley, D. R. (2003). Extending the upper temperature limit for life. *Science*, 301(5635), 934-934.
- Kates, M. (1972). Ether linked lipids in extremely halophilic bacteria. In F. Snyder (Ed.), *Ether lipids, chemistry and biology* (pp. 351-398). New York: Academic Press.
- Kates, M. (1978). Phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria. *Progress in the Chemistry of Fats*, 15, 301-342.
- Kates, M. (1992). Archaeobacterial lipids - structure, biosynthesis and function. *Archaeobacteria : Biochemistry and Biotechnology*, 58, 51-72.
- Kates, M. (1993). Membrane-lipids of extreme halophiles - biosynthesis, function and evolutionary significance. *Experientia*, 49(12), 1027-1036.
- Kaur, I. P., Kapila, M., Agrawal, R. (2007). Role of novel delivery systems in developing topical antioxidants as therapeutics to combat photoageing. *Ageing Research Reviews*, 6(4), 271-288.
- Keceli, T., Gordon, M. H. (2001). The antioxidant activity and stability of the phenolic fraction of green olives and extra virgin olive oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(14), 1391-1396.
- Kedage, V. V., Tilak, J. C., Dixit, G. B., Devasagayam, T. P. A., Mhatre, M. (2007). A study of antioxidant properties of some varieties of grapes (*vitis vinifera* L.). *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(2), 175-185.
- Keys, A. (1995). Mediterranean diet and public-health - personal reflections. *American Journal of Clinical Nutrition*, 61(6), S1321-S1323.
- Killion, J. J., Fidler, I. J. (1994). Systemic targeting of liposome-encapsulated immunomodulators to macrophages for treatment of cancer metastasis. *Immunomethods*, 4(3), 273-279.
- Kiritsakis, A., Nanos, G. D., Polymenopoulos, Z., Thomai, T., Sfakiotakis, E. M. (1998). Effect of fruit storage conditions on olive oil quality. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 75(6), 721-724.
- Kitajima, T., Hirayama, J., Ihara, K., Sugiyama, Y., Kamo, N., Mukohata, Y. (1996). Novel bacterial rhodopsins from *Halorubrum rubrum*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 220(2), 341-345.
- Kobayashi, T., Kanai, H., Aono, R., Horikoshi, K., Kudo, T. (1994). Cloning, expression, and nucleotide-sequence of the alpha-amylase gene from the haloalkaliphilic archaeon *Natronococcus* sp strain ah-36. *Journal of Bacteriology*, 176(16), 5131-5134.
- Koga, Y., Morii, H. (2005). Recent advances in structural research on ether lipids from archaea including comparative and physiological aspects. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69(11), 2019-2034.
- Komatsu, H., Chong, P. L. G. (1998). Low permeability of liposomal membranes composed of bipolar tetraether lipids from thermoacidophilic archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biochemistry*, 37(1), 107-115.
- Krishnan, L., Dicaire, C. J., Patel, G. B., Sprott, G. D. (2000). Archaeosome vaccine adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: Comparison to conventional liposomes and alum. *Infection and Immunity*, 68(1), 54-63.

- Krishnan, L., Gurnani, K., Dicaire, C. J., van Faassen, H., Zafer, A., Kirschning, C. J., et al. (2007). Rapid clonal expansion and prolonged maintenance of memory cd8(+) t cells of the effector (cd44(high)cd62l(low)) and central (cd44(high)cd62l(high)) phenotype by an archaeosome adjuvant independent of tlr2. *Journal of Immunology*, 178(4), 2396-2406.
- Krishnan, L., Sad, S., Patel, G. B., Sprott, G. D. (2001). The potent adjuvant activity of archaeosomes correlates to the recruitment and activation of macrophages and dendritic cells in vivo. *Journal of Immunology*, 166(3), 1885-1893.
- Krishnan, L., Sprott, G. D. (2004). Archaeosomes as self-adjuvanting delivery systems for cancer vaccines. *Journal of Drug Targeting*, 11(8-10), 515-524.
- Krishnan, L., Sprott, G. D. (2008). Archaeosome adjuvants: Immunological capabilities and mechanism(s) of action. *Vaccine*, 26(17), 2043-2055.
- Kulichevskaya, I. S., Milekhina, E. I., Borzenkov, I. A., Zvyagintseva, I. S., Belyaev, S. S. (1991). Oxidation of petroleum-hydrocarbons by extremely halophilic archaeobacteria. *Microbiology*, 60(5), 596-601.
- Kushwaha, S. C., Juezperez, G., Rodriguezvalera, F., Kates, M., Kushner, D. J. (1982). Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain. *Canadian Journal of Microbiology*, 28(12), 1365-1372.
- Lanzotti, V., Nicolaus, B., Trincone, A., Grant, W. D. (1988). The glycolipid of halobacterium-saccharovorum. *Fems Microbiology Letters*, 55(2), 223-228.
- Lasic, D. D. (1998). Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 16(7), 307-321.
- Lesage-Meessen, L., Navarro, D., Maunier, S., Sigoillot, J. C., Lorquin, J., Delattre, M., et al. (2001). Simple phenolic content in olive oil residues as a function of extraction systems. *Food Chemistry*, 75(4), 501-507.
- Lian, T., Ho, R. J. Y. (2001). Trends and developments in liposome drug delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90(6), 667-680.
- Lichtenberg, D., Barenholz, Y. (1988). Liposomes - preparation, characterization, and preservation. *Methods of Biochemical Analysis*, 33, 337-462.
- Limon-Pacheco, J., Gonsebatt, M. E. (2009). The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 137-147.
- Litchfield, C. D., Gillevet, P. M. (2002). Microbial diversity and complexity in hypersaline environments: A preliminary assessment. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 28(1), 48-55.
- Mamot, C., Ritschard, R., Kung, W., Park, J. W., Herrmann, R., Rochlitz, C. F. (2006). Egfr-targeted immunoliposomes derived from the monoclonal antibody emd72000 mediate specific and efficient drug delivery to a variety of colorectal cancer cells. *Journal of Drug Targeting*, 14(4), 215-223.
- Mancini, M., Stamler, J. (2004). Diet for preventing cardiovascular diseases: Light from ancients, distinguished centenarian scientist. *Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 14(1), 52-57.

- Mandal, A. K., Sinha, J., Mandal, S., Mukhopadhyay, S., Das, N. (2002). Targeting of liposomal flavonoid to liver in combating hepatocellular oxidative damage. *Drug Deliv*, 9(3), 181-185.
- Margesin, R., Schinner, F. (2001). Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*, 5(2), 73-83.
- Maruyama, K., Yamashita, A., Suzuki, R., Takizawa, T., Utoguchi, N. (2005). Development of peg-liposomal formulation encapsulating anti-cancer drugs. *Membrane*, 30(6), 298-303.
- Menendez, J. A., Vazquez-Martin, A., Garcia-Villalba, R., Carrasco-Pancorbo, A., Oliveras-Ferreros, C., Fernandez-Gutierrez, A., et al. (2008). Tabanti-her2 (erbb-2) oncogene effects of phenolic compounds directly isolated from commercial extra-virgin olive oil (evoo). *Bmc Cancer*, 8.
- Mezei, M., Gulasekharam, V. (1980). Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration .1. Lotion dosage form. *Life Sciences*, 26(18), 1473-1477.
- Mezei, M., Gulasekharam, V. (1982). Liposomes - a selective drug delivery system for the topical route of administration - gel dosage form. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 34(7), 473-474.
- Morales, M. E., Lara, V. G., Calpena, A. C., Domenech, J., Ruiz, M. A. (2004). Comparative study of morphine diffusion from sustained release polymeric suspensions. *Journal of Controlled Release*, 95(1), 75-81.
- Morii, H., Eguchi, T., Nishihara, M., Kakinuma, K., Konig, H., Koga, Y. (1998). A novel ether core lipid with h-shaped c-80-isoprenoid hydrocarbon chain from the hyperthermophilic methanogen methanothermus fervidus. *Biochimica Et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, 1390(3), 339-345.
- Morillo, J. A., Antizar-Ladislao, B., Monteoliva-Sanchez, M., Ramos-Cormenzana, A., Russell, N. J. (2009). Bioremediation and biovalorisation of olive-mill wastes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(1), 25-39.
- Moscho, A., Orwar, O., Chiu, D. T., Modi, B. P., Zare, R. N. (1996). Rapid preparation of giant unilamellar vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 11443-11447.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to proliferation and cyto-toxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Dominguez, J. M., Sineiro, J., Dominguez, H., et al. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.
- Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., et al. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2038-2045.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., La Marca, G., Mercalli, E., Giaccherini, C., Romani, A., et al. (2005). Solid olive residues: Insight into their phenolic composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(23), 8963-8969.

- Mulinacci, N., Romani, A., Galardi, C., Pinelli, P., Giaccherini, C., Vincieri, F. F. (2001). Polyphenolic content in olive oil waste waters and related olive samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(8), 3509-3514.
- Nagarsenker, M. S., Londhe, V. Y., Nadkarni, G. D. (1999). Preparation and evaluation of liposomal formulations of tropicamide for ocular delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 190(1), 63-71.
- Nishihara, M., Morii, H., Koga, Y. (1987). Structure determination of a quartet of novel tetraether lipids from methanobacterium-thermoautotrophicum. *Journal of Biochemistry*, 101(4), 1007-1015.
- Noble, C. O., Guo, Z. X., Hayes, M. E., Marks, J. D., Park, J. W., Benz, C. C., et al. (2009). Characterization of highly stable liposomal and immunoliposomal formulations of vincristine and vinblastine. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 64(4), 741-751.
- Nohynek, G. J., Lademann, J., Ribaud, C., Roberts, M. S. (2007). Grey goo on the skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(3), 251-277.
- Obied, H. K., Allen, M. S., Bedgood, D. R., Prenzler, P. D., Robards, K. (2005). Investigation of australian olive mill waste for recovery of biophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26), 9911-9920.
- Obied, H. K., Bedgood, D., Mailer, R., Prenzler, P. D., Robards, K. (2008). Impact of cultivar, harvesting time, and seasonal variation on the content of biophenols in olive mill waste. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(19), 8851-8858.
- Obied, H. K., Prenzler, P. D., Konczak, I., Rehman, A. U., Robards, K. (2009). Chemistry and bioactivity of olive biophenols in some antioxidant and antiproliferative in vitro bioassays. *Chemical Research in Toxicology*, 22(1), 227-234.
- Oesterhelt, D., Stoeckenius, W. (1974). Isolation of the cell membrane of halobacterium halobium and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol*, 31(Pt A), 667-678.
- Omri, A., Agnew, B. J., Patel, G. B. (2003). Short-term repeated-dose toxicity profile of archaeosomes administered to mice via intravenous and oral routes. *International Journal of Toxicology*, 22(1), 9-23.
- Oren, A. (1983). Halobacterium-sodomense sp-nov, a dead-sea halobacterium with an extremely high magnesium requirement. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(2), 381-386.
- Oren, A. (1999). Bioenergetic aspects of halophilism. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(2), 334-+.
- Oren, A. (2006). The order halobacteriales. *Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria, Vol 3, Third Edition:ARCHAEA. BACTERIA: FIRMICUTES, ACTINOMYCETES*, 113-164.
- Oren, A., Duker, S., Ritter, S. (1996). The polar lipid composition of walsby's square bacterium. *Fems Microbiology Letters*, 138(2-3), 135-140.
- Oren, A., Gurevich, P. (1993). Characterization of the dominant halophilic archaea in a bacterial bloom in the dead-sea. *Fems Microbiology Ecology*, 12(4), 249-256.

- Padamwar, M. N., Pokharkar, V. B. (2006). Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: Drug deposition and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 320(1-2), 37-44.
- Paramonov, N. A., Parolis, L. A. S., Parolis, H., Boan, I. F., Anton, J., Rodriguez-Valera, F. (1998). The structure of the exocellular polysaccharide produced by the archaeon *haloferax gibbonsii* (atcc 33959). *Carbohydrate Research*, 309(1), 89-94.
- Paredes, C., Bernal, M. P., Cegarra, J., Roig, A. (2002). Bio-degradation of olive mill wastewater sludge by its co-composting with agricultural wastes. *Bioresource Technology*, 85(1), 1-8.
- Patel, G. B., Agnew, B. J., Deschatelets, L., Fleming, L. P., Sprott, G. D. (2000). In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 194(1), 39-49.
- Patel, G. B., Omri, A., Deschatelets, L., Sprott, G. D. (2002). Safety of archaeosome adjuvants evaluated in a mouse model. *Journal of Liposome Research*, 12(4), 353-372.
- Patel, G. B., Zhou, H. Y., Ponce, A., Chen, W. X. (2007). Mucosal and systemic immune responses by intranasal immunization using archaeal lipid-adjuvanted vaccines. *Vaccine*, 25(51), 8622-8636.
- Patil, S. D., Rhodes, D. G., Burgess, D. J. (2005). DNA-based therapeutics and DNA delivery systems: A comprehensive review. *Aaps Journal*, 7(1), E61-E77.
- Pinnell, S. R. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(1), 1-19.
- Popa, I. (2009, 27/09/09-10/10/09). *Skin physiology*. Paper presented at the Erasmus Intensive Program in skin barrier function, Lyon (France).
- Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4290-4302.
- Pusey, P. N., Vanmegen, W. (1989). Dynamic light-scattering by non-ergodic media. *Physica A*, 157(2), 705-741.
- Raffy, S., Teissie, J. (1999). Control of lipid membrane stability by cholesterol content. *Biophysical Journal*, 76(4), 2072-2080.
- Reeves, J. P., Dowben, R. M. (1970). Water permeability of phospholipid vesicles. *Journal of Membrane Biology*, 3(2), 123-&.
- Renner, C., Kessler, B., Oesterheld, D. (2005). Lipid composition of integral purple membrane by h-1 and p-31 nmr. *Journal of Lipid Research*, 46(8), 1755-1764.
- RiceEvans, C. A., Miller, N. J., Paganga, G. (1996). Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20(7), 933-956.
- Rodis, P. S., Karathanos, V. T., Mantzavinou, A. (2002). Partitioning of olive oil antioxidants between oil and water phases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(3), 596-601.
- Rodriguez-Valera, F., Lillo, J. A. G. (1992). Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *Fems Microbiology Reviews*, 103(2-4), 181-186.

- Roig, A., Cayuela, M. L., Sanchez-Monedero, M. A. (2006). An overview on olive mill wastes and their valorisation methods. *Waste Management*, 26(9), 960-969.
- Rothschild, L. J., Mancinelli, R. L. (2001). Life in extreme environments. *Nature*, 409(6823), 1092-1101.
- Ruiz, M. A., Clares, B., Morales, M. E., Gallardo, V. (2008). Vesicular lipidic systems, liposomes, plo, and liposomes-plo: Characterization by electronic transmission microscopy. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 34(12), 1269-1276.
- Sakurai, H., Yasui, H., Yamada, Y., Nishimura, H., Shigemoto, M. (2005). Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to uva light: A research review on chemiluminescence and trials for uva protection. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 4(9), 715-720.
- Sarig, S., Roberson, E. B., Firestone, M. K. (1993). Microbial activity soil-structure - response to saline water irrigation. *Soil Biology & Biochemistry*, 25(6), 693-697.
- Sauer, T., Galinski, E. A. (1998). Bacterial milking: A novel bioprocess for production of compatible solutes. *Biotechnology and Bioengineering*, 57(3), 306-313.
- Sayadi, S., Allouche, N., Jaoua, M., Aloui, F. (2000). Detrimental effects of high molecular-mass polyphenols on olive mill wastewater biotreatment. *Process Biochemistry*, 35(7), 725-735.
- Schafer, G., Engelhard, M., Muller, V. (1999). Bioenergetics of the archaea. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(3), 570-+.
- Schiraldi, C., Giuliano, M., De Rosa, M. (2002). Perspectives on biotechnological applications of archaea. *Archaea*, 1(2), 75-86.
- Schleper, C., Puehler, G., Holz, I., Gambacorta, A., Janekovic, D., Santarius, U., et al. (1995). Picrophilus gen-nov, fam-nov - a novel aerobic, heterotrophic, thermoacidophilic genus and family comprising archaea capable of growth around ph-0. *Journal of Bacteriology*, 177(24), 7050-7059.
- Schumacher, K., Heine, E., Hocker, H. (2001). Extremozymes for improving wool properties. *Journal of Biotechnology*, 89(2-3), 281-288.
- Severina, L. O., Usenko, I. A., Plakunov, V. K. (1990). Exopolysaccharide biosynthesis by the extreme halophilic archaebacterium halobacterium-volcanii. *Mikrobiologiya*, 59(3), 437-442.
- Shen, Y., Tu, J. S. (2007). Preparation and ocular pharmacokinetics of ganciclovir liposomes. *Aaps Journal*, 9(3).
- Sinha, J., Das, N., Basu, M. K. (2001). Liposomal antioxidants in combating ischemia-reperfusion injury in rat brain. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 55(5), 264-271.
- Sinico, C., Fadda, A. M. (2009). Vesicular carriers for dermal drug delivery. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 6(8), 813-825.
- Sinico, C., Manconi, M., Peppi, M., Lai, F., Valenti, D., Fadda, A. M. (2005). Liposomes as carriers for denual delivery of tretinoin: In vitro evaluation of drug penneation and vesicle-skin interaction. *Journal of Controlled Release*, 103(1), 123-136.
- Smallbone, B. W., Kates, M. (1981). Structural identification of minor glycolipids in halobacterium-cutirubrum. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 665(3), 551-558.

- Sprott, G. D. (1992). Structures of archaeobacterial membrane-lipids. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 24(6), 555-566.
- Sprott, G. D., Patel, G. B., Krishnan, L. (2003). Archaeobacterial ether lipid liposomes as vaccine adjuvants. *Methods Enzymol*, 373, 155-172.
- Sprott, G. D., Sad, S., Fleming, L. P., Dicaire, C. J., Patel, G. B., Krishnan, L. (2003). Archaeosomes varying in lipid composition differ in receptor-mediated endocytosis and differentially adjuvant immune responses to entrapped antigen. *Archaea*, 1(3), 151-164.
- Sprott, G. D., Tolson, D. L., Patel, G. B. (1997). Archaeosomes as novel antigen delivery systems. *Fems Microbiology Letters*, 154(1), 17-22.
- Storm, G., Crommelin, D. J. A. (1998). Liposomes: Quo vadis? *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(1), 19-31.
- Sugai, A., Uda, I., Itoh, Y. H., Itoh, T. (2004). The core lipid composition of 17 strains of hyperthermophilic archaea, thermococcales. *Journal oleo science*, 53, 41-44.
- Sulkowski, W. W., Pentak, D., Nowak, K., Sulkowska, A. (2005). The influence of temperature, cholesterol content and ph on liposome stability. *Journal of Molecular Structure*, 744, 737-747.
- Taber, H. (1980). Vitamin k metabolism and vitamin k dependent proteins. In M. D. Baltimore (Ed.): University Park Press.
- Tekin, A. R., Dalgic, A. C. (2000). Biogas production from olive pomace. *Resources Conservation and Recycling*, 30(4), 301-313.
- Temple, N. J. (2000). Antioxidants and disease: More questions than answers. *Nutrition Research*, 20(3), 449-459.
- Templeton, N. S., Lasic, D. D. (1999). New directions in liposome gene delivery. *Molecular Biotechnology*, 11(2), 175-180.
- Teow, C. C., Truong, V. D., McFeeters, R. F., Thompson, R. L., Pecota, K. V., Yencho, G. C. (2007). Antioxidant activities, phenolic and beta-carotene contents of sweet potato genotypes with varying flesh colours. *Food Chemistry*, 103(3), 829-838.
- Thompson, R. B., Nogales, R. (1999). Nitrogen and carbon mineralization in soil of vermicomposted and unprocessed dry olive cake ("Orujo seco") produced from two-stage centrifugation for olive oil extraction. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, 34(5), 917-928.
- Thongthai, C., McGenity, T. J., Suntainalert, P., Grant, W. D. (1992). Isolation and characterization of an extremely halophilic archaeobacterium from traditionally fermented thai fish sauce (nam pla). *Letters in Applied Microbiology*, 14(3), 111-114.
- Thongthai, C., Suntainalert, P. (1991). Halophiles in thai fish sauce (nam pla). *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*, 201, 381-388.
- Tindall, B. J. (1990). A comparative-study of the lipid-composition of halobacterium-saccharovorum from various sources. *Systematic and Applied Microbiology*, 13(2), 128-130.
- Tindall, B. J., Wray, V., Huber, R., Collins, M. D. (1991). A novel, fully saturated cyclic menaquinone in the archaeobacterium pyrobaculum-organotrophum. *Systematic and Applied Microbiology*, 14(3), 218-221.

- Tomas-Barberan, F., Espin, J. C. (2001). Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 81(9), 853-876.
- Trincon, A., Nicolaus, B., Lama, L., Derosa, M., Gambacorta, A., Grant, W. D. (1990). The glycolipid of halobacterium-sodomense. *Journal of General Microbiology*, 136, 2327-2331.
- Tuffin, G., Waelti, E., Huwyler, J., Hammer, C., Marti, H. P. (2005). Immunoliposome targeting to mesangial cells: A promising strategy for specific drug delivery to the kidney. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16(11), 3295-3305.
- Uccella, N. (2000). Olive biophenols: Novel ethnic and technological approach. *Trends in Food Science & Technology*, 11(9-10), 328-339.
- van de Vossenberg, J., Driessen, A. J. M., Grant, W. D., Konings, W. N. (1999). Lipid membranes from halophilic and alkali-halophilic archaea have a low h<sup>+</sup> and na<sup>+</sup> permeability at high salt concentration. *Extremophiles*, 3(4), 253-257.
- van de Vossenberg, J. L., Driessen, A. J., Konings, N. (2000). Adaptations of the cell membrane for life in extreme environments. In K. B. Storey, Storey, J. (Ed.), *Environmental stressors and gene response*: Elsevier Science B.V.
- Ventosa, A., Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11(1), 85-94.
- Verma, D. D., Verma, S., Blume, G., Fahr, A. (2003). Particle size of liposomes influences dermal delivery of substances into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 258(1-2), 141-151.
- Villano, D., Fernandez-Pachon, M. S., Moya, M. L., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C. (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards dpph free radical. *Talanta*, 71(1), 230-235.
- Villano, D., Fernandez-Pachon, M. S., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C. (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*, 538(1-2), 391-398.
- Visioli, F., Bellomo, G., Galli, C. (1998). Free radical-scavenging properties of olive oil polyphenols. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(1), 60-64.
- Visioli, F., Galli, C. (2002). Biological properties of olive oil phytochemicals. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 42(3), 209-221.
- Visioli, F., Vinceri, F. F., Galli, C. (1995). Waste-waters from olive oil production are rich in natural antioxidants. [Article]. *Experientia*, 51(1), 32-34.
- Vitolo, S., Petarca, L., Bresci, B. (1999). Treatment of olive oil industry wastes. *Bioresource Technology*, 67(2), 129-137.
- Voorhorst, W. G. B., Rik, I. L., Luesink, E. J., Devos, W. M. (1995). Characterization of the celB gene coding for beta-glucosidase from the hyperthermophilic archaeon pyrococcus-furiosus and its expression and site-directed mutation in escherichia-coli. *Journal of Bacteriology*, 177(24), 7105-7111.
- Woese, C. R., Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of prokaryotic domain - primary kingdoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(11), 5088-5090.

- 
- Woese, C. R., Kandler, O., Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms - proposal for the domains archaea, bacteria, and eucarya. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(12), 4576-4579.
- Woese, C. R., Magrum, L. J., Fox, G. E. (1978). Archaeobacteria. *Journal of Molecular Evolution*, 11(3), 245-252.
- Yamauchi, K., Doi, K., Yoshida, Y., Kinoshita, M. (1993). Archaeobacterial lipids - highly proton-impermeable membranes from 1,2-diphytanyl-sn-glycero-3-phosphocholine. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1146(2), 178-182.
- Yang, Z. W., Yang, M. H., Xiahou, G. L., Peng, J. N., Zhang, J. (2009). Targeted delivery of insulin-modified immunoliposomes in vivo. *Journal of Liposome Research*, 19(2), 116-121.
- Zaslavsky, B. Y., Borovskaya, A. A., Rogozhin, S. V. (1984). Effect of lipid-composition on hydrophobic properties of liposomes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 60(2), 131-136.