

UNIVERSIDAD DE GRANADA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS A PARTIR DE ARQUEAS
HALÓFILAS EXTREMAS Y APLICACIONES EN
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA.

M^a TERESA CUERDA CORREA

GRANADA

CURSO ACADÉMICO 2004-2005

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS A PARTIR DE ARQUEAS HALÓFILAS
EXTREMAS Y APLICACIONES EN TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA.

Memoria presentada para optar al Grado
de Doctor en Farmacia por la Licenciada
M^a Teresa Cuerda Correa

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

Vº Bº LOS DIRECTORES

Mercedes Monteoliva Sánchez

Prof. Titular de Microbiología

Universidad de Granada

Mª del Mar Medina Pérez

Prof. Titular de Farmacia y

Tecnología Farmacéutica

Universidad de Granada

Alberto Ramos Cormenzana

Catedrático de Microbiología

Universidad de Granada

ÍNDICE

1. CONCEPTO DE AMBIENTE EXTREMO.	11
1. 1. Ambientes hipersalinos.	14
1. 1. 1. Aguas hipersalinas.	16
1. 1. 1. 1. <i>Lagos salados.</i>	16
1. 1. 1. 2. <i>Salinas solares.</i>	17
1. 1. 2. Suelos hipersalinos.	18
1. 2. Diversidad microbiana en ambientes salinos.	19
2. HALOFILISMO.	21
3. ARQUEAS.	22
3. 1. Arqueas halófilas extremas.	26
3. 1. 1. Estado actual de la taxonomía de arqueas halófilas extremas.	28
3. 2. Estructura y Fisiología.	30
3. 2. 1. Envoltura celular.	30
3. 2. 2. Ribosoma arqueal: estructura, función y evolución.	33
3. 3. Lípidos arqueobacteriales.	34
3. 3. 1. Lípidos polares de arqueas halófilas extremas.	37
3. 3. 2. Glicolípidos.	38
3. 3. 3. Vías biosintéticas de fosfolípidos y glicolípidos.	40
3. 3. 4. Función de los lípidos.	41
3. 3. 5. Quinonas isoprenoides.	42
3. 4. Metabolismo y enzimología.	43
3. 4. 1. Vías metabólicas y enzimáticas.	43
3. 4. 2. Enzimología molecular.	44
3. 5. Producción de energía y transporte.	45
3. 5. 1. Mecanismos bioenergéticos para la vida en un ambiente de alta salinidad.	45
3. 5. 2. Bacteriorrodopsina y síntesis de ATP.	46
3. 5. 3. Transporte de cloro activado por la luz.	47
3. 5. 4. Sistema de transporte de iones secundarios.	48
3. 5. 5. Transporte de aminoácidos.	49
3. 6. Genética y biología molecular.	50

3. 7. Potencial biotecnológico de las arqueas halófilas extremas.	53
3. 7. 1. Aplicación en alimentación.	53
3. 7. 2. Investigación del cáncer.	54
3. 7. 3. Proteínas retinales.	55
3. 7. 4. Enzimas.	56
3. 7. 5. Degradación de compuestos tóxicos.	57
3. 7. 6. Recuperación del petróleo.	58
3. 7. 7. Polisacáridos.	58
3. 7. 8. Producción de bioplásticos.	59
3. 7. 9. Vesículas de gas.	60
4. LIPOSOMAS.	61
4. 1. Introducción a los sistemas de vectorización de fármacos.	61
4. 2. Generalidades sobre liposomas.	62
4.3. Características y tipos.	64
4. 3. 1. Estructura.	64
4. 3. 2. Composición.	65
A) Fosfolípidos.	65
B) Colesterol.	67
C) Lipoides iónicos.	68
D) Otros componentes.	69
4. 3. 3. Formación del liposoma.	69
4. 3. 4. Estabilidad.	70
4. 3. 5. Clasificación.	72
A) Plurilaminares o pluricompartimentales.	72
B) Unilaminares o unicompartimentales.	73
4. 4. Importancia del tamaño y de la carga iónica de los liposomas.	74
4. 5. Vehículo de sustancias activas.	75
4. 6. Métodos de preparación.	77
4. 6. 1. Liposomas plurilaminares (MLV).	78
4. 6. 2. Liposomas unilaminares microvesiculares (SUV).	80

4. 6. 3. Liposomas unilaminares macrovesiculares (LUV).	80
4. 7. Separación de la fracción no encapsulada.	80
4. 8. Caracterización de los liposomas.	81
4. 9. Aplicaciones terapéuticas de los liposomas.	82
4. 10. Liposomas de administración tópica.	85
4. 10. 1. Estructura de la piel y sus anexos.	86
A) Absorción percutánea.	90
B) Vías de absorción.	91
C) Parámetros implicados en la absorción percutánea.	92
4. 10. 2. Biodisponibilidad cutánea de los principios activos encapsulados en liposomas.	94
A) Absorción percutánea.	94
B) Acumulación cutánea.	95
4. 10. 3. Liposomas de aplicación en dermatología.	97
4. 10. 4. Liposomas de aplicación en cosmética.	99
5. ARQUEOSOMAS.	102
1. MICROORGANISMOS.	119
2. MEDIO DE CULTIVO.	120
3. COMPONENTES DE LOS ARQUEOSOMAS.	122
3. 1. Fase lipídica.	122
3. 1. 1. Extractos lipídicos polares totales.	122
3. 1. 2. Colesterol ($C_{27}H_{46}O$; Mr=386,7).	122
3. 1. 3. Disolvente de la fase lipídica.	123
3. 1. 4. Dipropionato de betametasona ($C_{28}H_{37}FO_7$, Mr=504,59).	123
- Estructura.	125
- Mecanismo de acción.	126
- Perfil biofarmacéutico.	126
- Perfil tecnológico.	129
3. 2. Fase acuosa.	130
3. 2. 1. Disolvente de la fase acuosa.	130
3. 2. 2. Otros componentes.	130
3. 2. 2. 1. Vitamina C o ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$; Mr= 176,13).	131

3. 2. 2. 2. <i>Acetato de tocoferol</i> ($C_{31}H_{52}O_3$; $Mr=472,8$).	131
4. COMPONENTES DE LOS LIPOSOMAS.	132
4. 1. Fase lipídica.	132
4. 1. 1. Fosfolípidos.	132
4. 1. 2. Colesterol ($C_{27}H_{46}O$; $Mr=386,7$).	133
4. 2. Fase acuosa.	133
4. 2. 1. Phenonip® ($C_{27}H_{46}O$; $Mr=386,7$).	133
5. FORMULACIONES DE LOS MLV.	134
5. 1. Arqueosomas vacíos.	134
5. 2. Arqueosomas portadores de dipropionato de betametasona.	134
5. 3. Liposomas portadores de dipropionato de betametasona.	135
1. TÉCNICA DE CULTIVO.	136
2. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES TOTALES.	136
3. ELABORACIÓN DE LOS LIPOSOMAS PLURILAMINARES.	138
3. 1. Optimización de la encapsulación del principio activo.	140
3. 1. 1. Influencia de la proporción “lípidos : dipropionato de betametasona”.	140
3. 1. 2. Influencia del tiempo de agitación.	141
4. MÉTODO DE SEPARACIÓN: CENTRIFUGACIÓN.	142
5. VALORACIÓN DEL FÁRMACO LIBRE: ESPECTROFOTOMETRÍA UV.	143
5. 1. Validación del método analítico.	143
5. 1. 1. Linealidad.	144
5. 1. 2. Exactitud.	144

5. 1. 3. Precisión.	145
5. 2. Porcentajes de principio activo captado por los MLV y libre en el medio.	145
5. 3. Grado de captación.	146
6. CARACTERIZACIÓN.	146
7. ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.	147
1. CAPACIDAD FORMADORA DE LIPOSOMAS POR HALOARQUEAS.	151
1. 1. Géneros de haloarqueas formadores de liposomas.	151
1. 2. Influencia de la concentración lipídica en la formación de arqueosomas.	153
1. 2. 1. Género <i>Haloarcula</i> .	154
1. 2. 1. 1. <i>H. californiae</i> ATCC 33799.	154
1. 2. 1. 2. <i>H. hispanica</i> DSM 4426.	156
1. 2. 1. 3. <i>H. marismortuis</i> DSM 3752.	158
1. 2. 1. 4. <i>H. sinaiensis</i> ATCC 33800.	160
1. 2. 2. Género <i>Halobacterium</i> .	161
1. 2. 2. 1. <i>H. salinarum</i> CECT 396.	162
1. 2. 3. Género <i>Halococcus</i> .	165
1. 2. 3. 1. <i>H. morrhuae</i> DSM 1309.	165
1. 2. 3. 2. <i>H. morrhuae</i> DSM 1310.	165
1. 2. 3. 3. <i>H. morrhuae</i> NCIMB 757.	167
1. 2. 4. Género <i>Halorubrum</i> .	169
1. 2. 4. 1. <i>H. coriense</i> DSM 10284.	169
1. 2. 4. 2. <i>H. saccharovororum</i> DSM 1137.	171
1. 2. 4. 3. <i>H. sodomense</i> DSM 3755.	172
1. 2. 4. 4. <i>H. tebenquichense</i> CECT 5317.	174
1. 2. 4. 5. <i>H. trapanicum</i> CECT 397.	175
2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.	179

2. 1. Linealidad.	179
2. 2. Exactitud.	183
2. 3. Precisión.	185
3. FORMULACIÓN DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS.	187
3. 1. Proporción de “lípidos: dipropionato de betametasona”.	187
3. 1. 1. Arqueosomas.	187
3. 1. 1. 1. <i>Caracterización por microscopía electrónica.</i>	187
3. 1. 1. 2. <i>Análisis del tamaño.</i>	190
3. 1. 2. Liposomas.	191
3. 1. 2. 1. <i>Caracterización por microscopía electrónica.</i>	191
3. 1. 2. 2. <i>Análisis del tamaño.</i>	193
3. 2. Influencia del tiempo de agitación.	194
3. 2. 1. Arqueosomas.	194
3. 2. 1. 1. <i>Caracterización por microscopía electrónica.</i>	194
3. 2. 1. 2. <i>Análisis del tamaño.</i>	196
3. 2. 1. 3. <i>Grado de captación.</i>	197
3. 2. 2. Liposomas.	199
3. 2. 2. 1. <i>Caracterización por microscopía electrónica.</i>	199
3. 2. 2. 2. <i>Análisis del tamaño.</i>	200
3. 2. 2. 3. <i>Grado de captación.</i>	201
4. GRADO DE CAPTACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS.	204
4. 1. Arqueosomas.	204
4. 2. Liposomas.	206
5. CARACTERIZACIÓN DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS.	213
5. 1. Arqueosomas.	213
5. 2. Liposomas.	218

5. 3. Conclusión.	227
6. ESTABILIDAD DE ARQUEOSOMAS.	228
6. 1. Evaluación del porcentaje de principio activo perdido en función del tiempo.	228
6. 1. 1. Fórmula A.	230
6. 1. 2. Fórmula B.	233
6. 1. 3. Fórmula C.	238
6. 1. 4. Fórmula G.	244
6. 2. Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión.	252
6. 2. 2. Fórmula B.	256
6. 2. 3. Fórmula C.	259
6. 2. 4. Fórmula G.	263
7. ESTABILIDAD DE LIPOSOMAS.	269
7. 1. Evaluación del porcentaje de principio activo perdido en función del tiempo.	269
7. 1. 1. Fórmula A.	272
7. 1. 2. Fórmula B.	276
7. 1. 3. Fórmula C.	280
7. 1. 4. Fórmula D.	287
7. 1. 5. Fórmula E.	293
7. 1. 6. Fórmula F.	299
7. 1. 7. Fórmula G.	305
7. 2. Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión.	314
7. 2. 1. Fórmula A.	316
7. 2. 2. Fórmula B.	322
7. 2. 3. Fórmula C.	328
7. 2. 4. Fórmula D.	335
7. 2. 5. Fórmula E.	340
7. 2. 6. Fórmula F.	345
7. 2. 7. Fórmula G.	350

8. COMPARACIÓN DE ESTABILIDAD DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS.	355
8. 1. Fórmula A.	358
8. 2. Fórmula B.	363
8. 3. Fórmula C.	367

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 una perspectiva científica como por su importancia económica y medioambiental.

La definición de ambiente extremo es compleja ya que, para un determinado organismo, un hábitat puede ser ideal y ser letal para otro. Por tanto, es difícil precisar qué es extremo y qué es normal; además, en la naturaleza encontramos un gradiente de condiciones ambientales de “normales” a “extremas” (Brock, 1969). Por este motivo, probablemente no existe una definición totalmente satisfactoria de ambiente extremo.

Algunos autores lo definen como aquel donde las condiciones son tan severas que sólo un grupo limitado de especies son capaces de crecer y desarrollarse. Las condiciones extremas pueden estar determinadas por temperatura, pH, potencial de óxido-reducción, alta radiación, alta concentración de sustancias químicas tóxicas, alta concentración de sal, falta de nutrientes o de combinaciones de éstas.

Según Brock (1969) no es adecuado definir los ambientes extremos desde un punto de vista antropocéntrico. Sería más adecuado enfocar la definición de estos ambientes desde una perspectiva taxonómica como aquellos ambientes en los cuales la diversidad de especies es baja, y algunos grupos taxonómicos están ausentes. La baja diversidad taxonómica es un factor común en todos los ambientes extremos. Usualmente pueden encontrarse gradientes donde la diversidad disminuye

cuando las condiciones llegan a ser más extremas (Rodríguez-Valera, 1988). Se podrían considerar las características comunes de los ambientes definidos como extremos (Kushner, 1980) y definir el ambiente extremo en función de la severidad del estrés que producen sus características.

Se han descrito ambientes extremos con una alta diversidad de especies y otros que presentan una baja diversidad. Sin embargo, también se han hallado amplios grupos taxonómicos en ambientes con menor diversidad. Por ejemplo, en salinas y lagos termales no hay vertebrados ni plantas vasculares, aunque posiblemente sean ricos en microorganismos con poblaciones muy numerosas. En muchos ambientes extremos se encuentran condiciones adecuadas para el cultivo de una sola especie, confiriéndoles gran interés en el campo de la Ecología y evolución de los microorganismos.

Por definición, muchos microorganismos no pueden crecer en condiciones extremas, lo cual nos lleva a reflexionar sobre cómo afectan las condiciones extremas a los organismos que no pueden tolerarlas y cómo superan los organismos adaptados el efecto de tal condición. El predominio de los microorganismos en los ambientes extremos se puede explicar fácilmente ya que sus estructuras son más sencillas y esto les permite crecer en condiciones más extremas que los organismos más complejos.

Los microorganismos extremófilos están adaptados a vivir a temperaturas muy elevadas, a muy bajas temperaturas en los fríos mares polares, a presiones elevadas en las profundidades oceánicas, en

ambientes con pH muy bajo o muy alto o a concentraciones salinas muy elevadas (hasta el 35% M/V). La mayoría de los extremófilos pertenecen al tercer dominio: el dominio *Archaea* (Fujiwara, 2002).

Los organismos llamados extremófilos no sólo toleran sino que prefieren y requieren condiciones extremas para su desarrollo. Cada organismo tiene una condición ambiental óptima, máxima y mínima para la vida. Cuando el rango de crecimiento natural de un organismo se da en un ambiente que difiere de las condiciones preferidas por la mayoría, el organismo llega a ser un extremófilo. La mayoría de los extremófilos son confinados a ambientes extremos porque su proceso de adaptación va usualmente acompañado de la pérdida de la capacidad de crecer en condiciones normales. Las condiciones predominantes sobre la tierra han cambiado a través de la historia: lo que ahora es extremo podría haber sido normal en el pasado y los organismos que evolucionaron podrían prosperar utilizando hábitats de condiciones primitivas que permanecen en el planeta.

Se ha postulado que un grupo de extremófilos, las **arqueas** (Woese, 1977), podrían prosperar utilizando hábitats de condiciones primitivas. Todas las arqueas habitan en ambientes que pueden ser considerados extremos en algunos aspectos: termales, anaeróbicos o hipersalinos, los de mayor interés en este estudio.

Hay cuatro vías por las cuales un organismo puede adaptarse a un ambiente extremo (Kogut y Russell, 1987):

- desarrollar un mecanismo para excluir el factor,
- desarrollar un mecanismo para desviar el factor,

- vivir con él o
- depender de él.

Esta última situación constituye una adaptación: el organismo llega a depender de un factor que para otros organismos es letal. Esta adaptación normalmente va acompañada de la pérdida de la capacidad para crecer en condiciones normales y como consecuencia el organismo queda limitado a la vida exclusivamente en el ambiente extremo. Las arqueas termoacidófilas son un buen ejemplo de la adaptación de los organismos a los ambientes extremos: son capaces de crecer bajo condiciones extremas de temperatura y pH como resultado de la adaptación de la composición de su membrana para sobrevivir a tales condiciones (Jarrell *et al.*, 1998).

1. 1. Ambientes hipersalinos.

El suelo y el agua tienen especial relevancia en el desarrollo de la vida microbiana ya que la concentración iónica es variable y puede llegar a la saturación.

Se consideran suelos salinos a los que presentan más de 0,2% de sales solubles (Kaurichev, 1980), y se localizan con mayor frecuencia en regiones áridas. Las altas temperaturas, frecuentes en estos ambientes, forman costras de sal encima de la superficie del suelo o cristales de sal que pueden encontrarse en las capas superiores mezclados con otros constituyentes del suelo. La alta concentración de sales solubles neutras presente en estos suelos interfiere con la actividad microbiana y la fertilidad del suelo (Sarig *et al.*, 1993).

Los ambientes salinos acuáticos presentan una salinidad superior al 0,3% (De Dekker, 1983), habiéndose originado muchos de ellos por la evaporación de agua de mar. En estos ambientes acuáticos, llamados talasohalinos, la constitución iónica es similar al agua de mar (Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Cl^- , O_4^{2-} , HCO_3^- , Br^- , F^- , H_3BO_3^-), Clorito (55,04%) y sulfato (7,68%) son los aniones predominantes y los cationes más abundantes son Na^+ (30,61%) y Mg^{2+} (3,69%) (Pipkin *et al.*, 1977). Otras aguas hipersalinas derivan de la disolución de sales de origen continental y se caracterizan por presentar una composición iónica diferente al agua de mar, estos ambientes son llamados atalashalinos.

Podemos citar como ejemplo de estos ambientes el Mar Muerto, el Gran Lago Salado, el Wadi Natrum y el Lago Magadi. También existen ambientes salinos artificiales como las salinas solares, las cuales, en algunos puntos, pueden alcanzar concentraciones saturadas de NaCl (Trüper y Galinski, 1986; Ollivier *et al.*, 1994).

Los ecosistemas hipersalinos muestran una gran variabilidad en la concentración de sales totales, composición iónica y pH. En el Gran Lago Salado, la concentración de Na^+ y Cl^- es de 10,5% y 18,2%, respectivamente. En el Mar Muerto el ión Cl^- es el dominante con un 22,5%, con concentraciones equivalentes de Na^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} próximas al 4%, 4,4% y 1,7%, respectivamente. La ausencia de bajas concentraciones de Mg^{2+} y Ca^{2+} se atribuye principalmente a pH elevados en estos ecosistemas hipersalinos (Ollivier *et al.*, 1994). Los sulfatos, importantes aceptores de electrones e involucrados en la mineralización de la materia orgánica, están presentes en bajas concentraciones en aguas

hipersalinas (aproximadamente 0,05% en el Mar Muerto y 0,27% en el Gran Lago Salado), probablemente debido a su precipitación (Ollivier *et al.*, 1994).

Los suelos hipersalinos se caracterizan por presentar un bajo contenido de materia orgánica (Del Moral *et al.*, 1987). Se ha sugerido que la concentración de sales no es el único factor que determina las características del suelo salino, sino también el contenido de materia orgánica. El tipo y densidad de vegetación afecta el contenido de materia orgánica en suelos salinos. En la rizosfera de plantas halofíticas, comunes en estos ambientes, se encuentra una gran cantidad de materia orgánica (Quesada *et al.*, 1982). Por lo tanto, la presencia de bacterias en suelos salinos puede estar afectada por el contenido de materia orgánica.

1. 1. 1. Aguas hipersalinas.

1. 1. 1. 1. Lagos salados.

Los lagos salados se originan debido al abastecimiento por una fuente salada de agua o cuando la evaporación excede la afluencia de agua dulce en una región árida. La sal dominante en los lagos salados es NaCl, seguida de MgCl₂, MgSO₄ y NaHCO₃. Los cambios en la proporción iónica del agua son debidos a la evaporación, determinada por la solubilidad de las sales más abundantes.

En hábitats acuáticos es posible encontrar concentraciones de iones totales variables, desde cero (agua bidestilada) hasta la saturación. Cuando la concentración de iones en el agua aumenta, algunos iones precipitan antes que otros. La mayoría de los cationes Na⁺, K⁺ y Mg²⁺, y de los

aniones Cl^- , SO_4^{2-} y HCO_3^- (o CO_3^{2-} , dependiendo del pH) son solubles. Por lo tanto, estos iones aparecen en grandes cantidades en agua de mar y lagos salinos. Podemos citar como ejemplo el Mar Muerto (Israel) donde la concentración de magnesio supera a la de sodio y es menor que la de sulfato. Los lagos con una alta concentración de bicarbonato-carbonato son llamados lagos alcalinos, debido a su alto pH (valores superiores a 10).

Los lagos salinos presentan altas temperaturas debido a su poca profundidad y a la intensa radiación solar en regiones áridas, explicando probablemente por qué muchos microorganismos aislados de estos hábitats presentan una temperatura óptima relativamente alta, cercana a los 45°C . La elevada salinidad reduce intensamente la solubilidad del O_2 .

1. 1. 1. 2. Salinas solares.

Son un ecosistema creado por el hombre para la producción de NaCl por evaporación solar del agua de mar. Una salina consiste en una serie de estanques poco profundos e interconectados en los que la concentración de NaCl se incrementa al evaporarse el agua de mar (Oren, 2002). Cuando la concentración de cloruro sódico aumenta ligeramente, se permite el paso del agua al siguiente estanque. Por tanto, en las salinas hay una concentración creciente de sales desde un estanque al siguiente y la precipitación fraccionada de sales ocurre en diferentes estanques. Las primeras que precipitan son las sales menos solubles: CaCO_3 y CaSO_4 .

Una serie de transferencias y precipitaciones en los estanques sucesivos y la concentración de las sales por evaporación del agua originan una salmuera que es bombeada hacia cristalizadores donde el cloruro sódico precipita en el fondo. En los últimos estanques se produce la precipitación de sales amargas; $MgCl_2$ y KCl (Larsen, 1980; Davis, 1978; Rodríguez-Valera y Ruiz-Berraquero, 1983). Se localizan principalmente en las costas.

1. 1. 2. Suelos hipersalinos.

Se definen como aquellos que contienen principalmente sales neutras de cloruros y sulfatos de sodio en cantidades excesivas que interfieren con el desarrollo de organismos vivos (Yadav, 1981). De acuerdo con una serie de factores (el pH, la conductividad eléctrica, clase y cantidad de cationes presentes, etc.) se describen dos grupos de suelos salinos: los suelos sódicos o alcalinos y los suelos salinos (Cervantes y Olivares, 1976).

Los suelos salinos se encuentran principalmente en zonas de clima árido o semiárido. En condiciones húmedas las sales solubles, originalmente presentes en los materiales del suelo, son llevadas a las capas inferiores, hacia el agua subterránea y finalmente transportadas a los océanos. Por tanto, no encontraremos suelos salinos en zonas húmedas, excepto cuando el suelo ha estado expuesto al agua de mar (deltas de ríos y otras tierras bajas próximas al mar). En las regiones áridas el lavado es de naturaleza local y las sales solubles no pueden ser transportadas muy lejos. En este proceso también influye la elevada evaporación característica del clima árido, que tiende a concentrar las sales en los suelos y aguas superficiales.

El drenaje restringido es un factor que frecuentemente contribuye a la salinización de los suelos y que puede implicar la presencia de una capa freática poco profunda o una baja permeabilidad del suelo. La escasez de precipitaciones, la elevada evaporación y el ascenso del agua subterránea da origen a la formación de suelos hipersalinos (Allison, 1973).

1. 2. Diversidad microbiana en ambientes salinos.

El recuento de bacterias está normalmente correlacionado en forma negativa con el total de sales solubles de los suelos salinos, pero positivamente con el contenido de carbono orgánico (Zahran *et al.*, 1992).

Las bacterias de suelos salinos no definen un grupo filogenéticamente relacionado de microorganismos, más bien representan una variedad de organismos. El amplio espectro de microorganismos incluye representantes de los géneros: *Halomonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio* y *Actinopolyspora*, además de un amplio rango de cocos y bacilos Gram-positivos de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Salinicoccus* (Trüper *et al.*, 1991). Las bacterias Gram-negativas parecen ser más frecuentes en ambientes salinos (Quesada *et al.*, 1982; Del Moral *et al.*, 1987; Prado, 1987; Prado *et al.*, 1991). Dentro de los Gram-positivos se encuentran los formadores de esporas del género *Bacillus* (Quesada *et al.*, 1982; Weiser y Trüper, 1985; Zahran *et al.*, 1992 y 1995). Estos bacilos formadores de esporas son principalmente moderados o haloalcalófilos extremos. Los cocos Gram-positivos han sido aislados de varios ecosistemas salinos (Quesada *et al.*, 1982; Claus *et al.*, 1983; Del Moral *et al.*, 1987; Zahran *et al.*, 1992). Estas bacterias se incluyeron principalmente en

cinco especies: *Marinococcus halophilus*, *M. albus*, *M. hispanicus* (hoy *Salinicoccus hispanicus*), *Micrococcus halobius* (*Nesterenkonia halobia*) y *Sporosarcina halophila* (hoy *Halobacillus halophilus*) (Márquez *et al.*, 1990).

Los actinomicetos representan sólo una pequeña fracción de la microbiota de los suelos salinos ya que son menos tolerantes a la sal que otros tipos bacterianos. Sin embargo se han descrito dos actinomicetos extremadamente halofílicos: *Actinopolyspora halophila* y *A. mortivallis* (Johnson *et al.*, 1986; Kates *et al.*, 1987; Gochnauer *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1991).

Los bacilos anaerobios formadores de esporas como *Clostridium halophilum* han sido aislados de ambientes salinos, aunque su presencia es menor que la de bacterias aerobias. Recientemente se han descrito con más detalle las siguientes bacterias anaerobias estrictas Gram-negativas, aisladas de distintos ambientes salinos (Cayol *et al.*, 1994; Ollivier *et al.*, 1994): *Halanaerobium praevalens*, *Halobacteroides halobius*, *Haloferoxthermothrix orenii*, *Sporohalobacter lortetii* y *S. marismortui* (hoy *Orenia marismortui*) desde sedimentos y *Halobacteroides acetethylicus* (hoy *Haloanaerobium acetoethylicum*), *Halanaerobacter chitinovorans*, *Halobacteroides lacunaris* (hoy *Halanaerobacter lacunaris*), *Haloicola saccharolyticus* (*Halanaerobium saccharolyticum*), *Acetohalobium arabaticum* y *Halocella cellulolytica* a partir de aguas saturadas y lagos. Además se ha aislado desde un campo de petróleo altamente salino una nueva bacteria anaerobia Gram-negativa, *Haloanaerobium salsuginis* (Bhupathiraju *et al.*, 1994).

En zonas aerobias de aguas hipersalinas cercanas a la saturación predominan las haloarqueas (llamadas anteriormente halobacterias y arqueobacterias). Son un grupo extremadamente halofílico que requiere al menos 1,5 M de NaCl para su crecimiento. Pertenecen al Dominio *Archaeae* (Woese *et al.*, 1990). Se han aislado a partir de diferentes ambientes hipersalinos y actualmente se agrupan en los géneros: *Halobacterium*, *Halococcus*, *Haloarcula*, *Haloferax*, *Halorubrum*, *Halobaculum*, *Natrialba*, *Natronomonas*, *Natronobacterium*, *Natronococcus*, *Halogeometricum*, *Natrinema*, *Haloterrigena*, *Natronorubrum* y *Halorhabdus* (Mc Genity y Grant, 1995; Garrity *et al.* 2004).

2. HALOFILISMO.

Distintos autores han clasificado los microorganismos que habitan ambientes hipersalinos (Larsen, 1962; Gibbons, 1969; Kushner, 1985). El criterio de Kushner y Kamekura (1988) establece los siguientes grupos considerando los márgenes de concentración salina en los que crecen de forma óptima:

- **Microorganismos no halófilos**: se desarrollan en medios que contienen menos de 0,2 M de NaCl (1% m/V). Algunos de ellos pueden tolerar altas concentraciones de sal y se denominan halotolerantes.

- **Microorganismos halófilos débiles** (también llamados bacterias marinas), crecen óptimamente en medios con una concentración comprendida entre 0,2 y 0,5 M de NaCl (1-3% m/V).

- **Microorganismos halófilos moderados**: presentan su crecimiento óptimo entre 0,5 y 2,5 M de NaCl (3-15% m/V). En esta categoría se incluyen a la mayoría de las eubacterias halófilas.

- **Microorganismos halófilos extremos**: muestran un crecimiento óptimo en medios que contienen de 2,5 a 5,2 M de NaCl (15-32% m/V). En este grupo se incluyen a la mayoría de las arqueas halófilas extremas o haloarqueas.

Kushner (1985) también considera la categoría de halófilos extremos débiles con un crecimiento óptimo entre 1,5 y 4,0 M de NaCl (9-23% m/V), pero esta categoría no es aceptada por todos los expertos. En ellos se incluyen ciertos actinomicetos (*Actinopolyspora spp.*), bacterias fotosintéticas (*Ectothiorhodospira spp.*) y la bacteria anaerobia *Haloanaerobium lacusrosei*.

3. ARQUEAS.

El concepto de arqueobacteria propuesto por Woese y Fox (1977) describía las diferencias moleculares, especialmente a nivel del rRNA 16S, entre las bacterias metanogénicas y muchas células procariotas. Otros microorganismos que presentan secuencias de rRNA 16S similares al de las metanogénicas han sido clasificados como arqueobacterias. Esta unidad filogenética tiene dos ramas principales: las metanogénicas

y halófilas extremas en una y las termófilas que metabolizan azufre en otra. Actualmente, se emplea el nombre de arquea para designar a estos microorganismos.

A finales de la década de los 70 se reclasificó a todos los organismos vivos en tres Reinos primarios: *Eucariotas*, *Eubacterias* y *Arqueobacterias* (Woese y Fox, 1977; Woese *et al.*, 1978; Fox *et al.*, 1980), colocando a las arqueas en el mismo nivel taxonómico de las eubacterias y eucariotas. En la década de los 90 se reconstruyó la organización filogenética, estableciendo tres Dominios: *Eukarya*, *Bacteria* y *Archaea* (Holt *et al.*, 1994). Dentro del Dominio *Archaea* se han establecido dos Reinos principales que incluyen a los diferentes grupos de arqueas descritos. El Reino *Crenarchaeota*, incluye principalmente a las arqueas hipertermofílicas y el Reino *Euryarchaeota* que agrupa a las metanogénicas, arqueas halófilas extremas y los géneros *Thermoplasma* y *Archaeoglobus*. En 1996 se propuso un tercer Reino dentro de este Dominio, el Reino *Korarchaeota*, que aún no se ha podido cultivar pero que ha sido posible detectar mediante la amplificación de rRNA 16S, empleando la técnica de la PCR (Forterre *et al.*, 2002), aunque aún no aparece recogido en el Manual Bergey's (Garrity *et al.*, 2004).

Las arqueas siempre han sido consideradas como una bacteria atípica. Antes de su reconocimiento como grupo filogenético (Balch *et al.*, 1979; Woese *et al.*, 1978), sus diferencias individuales se interpretaron como adaptaciones a las condiciones de vida de los ambientes en que se desarrollan. Podemos citar como ejemplo la pared de *Halococcus*, que corresponde a una adaptación a un ambiente extremadamente salino (Larsen, 1973).

Consideradas según su tamaño y complejidad celular, las arqueas son células procariotas; sin embargo, algunas de sus características no son típicas de las eubacterias y ocasionalmente se parecen a las células eucariotas. Debido a su genotipo y fenotipo, las arqueas parecen ser las más diversas de los tres Dominios, lo cual podría deberse a una rápida velocidad de evolución o a una antigüedad mucho mayor que la de los otros Dominios, o quizás el antecesor común fue más primitivo que el antecesor de eubacterias y eucariotas.

Las arqueas son procariotas similares a las bacterias que esconden muchas propiedades genotípicas y fenotípicas exclusivas, probando su peculiar estado evolutivo. Dentro de la biología evolutiva, la evolución de las arqueas es *per se* un campo de gran interés ya que estos microorganismos muestran una amplia variedad de caracteres fenotípicos y genotípicos. Para poder comprender el origen y evolución de tales características sería interesante tener una idea clara de la historia de este Dominio (Forterre *et al.*, 2002).

La metanogénesis es el principal aporte evolutivo del Reino *Euryarchaeota*, que actualmente comparten varios grupos de arqueas. La adaptación a los ambientes aeróbicos no ocurrió de manera simultánea en ambos reinos.

De acuerdo al Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrity *et al.*, 2004), las arqueas se clasifican en las siguientes familias:

- Familia *Thermoproteaceae*,
- Familia *Thermofilaceae*,

- Familia *Caldisphaeraeaceae*,
- Familia *Desulfurococcaceae*,
- Familia *Pyrodictiaceae*,
- Familia *Sulfolobaceae*,
- Familia *Methanobacteriaceae*,
- Familia *Methanothermaceae*,
- Familia *Methanococcaceae*,
- Familia *Methanocaldococcaceae*,
- Familia *Methanomicrobiaceae*,
- Familia *Methanocorpusculaceae*,
- Familia *Methanospirillaceae*,
- Familia *Methanosarcinaceae*,
- Familia *Methanosaetaceae*,
- Familia *Thermoplasmataceae*,
- Familia *Thermococcaceae*,
- Familia *Picrophilaceae*,
- Familia *Ferroplasmataceae*,
- Familia *Archaeoglobaceae*,
- Familia *Methanopyraceae* y
- Familia *Halobacteriaceae*, la cual describiremos detalladamente en el siguiente apartado.

3. 1. Arqueas halófilas extremas.

La palabra halófila deriva de dos palabras griegas, “halos” y “phylus” que significan respectivamente; “sal” y “relacionado con”. Las halófilas extremas, también conocidas como “bacterias halófilas rojas”, halobacterias o haloarqueas, fueron identificadas por su pigmentación característica. Son organismos que requieren ambientes con alta concentración salina, especialmente NaCl. Las pérdidas causadas por estos microorganismos en la industria del pescado salado y en la conservación de alimentos salados motivaron su estudio.

Las arqueas halófilas extremas más estudiadas provienen de lagos salados tales como el Mar Muerto en Israel, (Nissenbaum, 1975), el “Gran Lago Salado” en Estados Unidos, (Post, 1977) y el Wadi Natrum en Egipto, (Imhoff *et al.*, 1979), el Salar de Atacama en Chile (Lizama *et al.*, 2001 y 2002), o salinas marinas (Davis, 1978 y 1974; Del Moral *et al.*, 1987; Rodríguez-Valera *et al.*, 1985), todos ellos con baja diversidad taxonómica (Figura 1.1). En estos hábitats, la composición iónica presenta grandes variaciones cuantitativas si bien las diferencias más importantes son cualitativas.

Las arqueas halófilas extremas son aerobias, quimiorganotróficas y crecen óptimamente a concentraciones de NaCl de 16% m/V. Contienen carotenoides, principalmente bacteriorrubrina, lo que permite identificarlas por su pigmentación roja (Oren y Shilo, 1981). La obtención de energía la realizan metabolizando azúcares y aminoácidos entre otros compuestos. Bajo ciertas condiciones de iluminación y oxigenación, muchas especies pueden comportarse como fototrofas. En este proceso



a)



b)



c)



d)

Figura 1. 1. Hábitats de arqueas halófilas extremas: a) Mar Muerto, Israel; b) Gran Lago Salado, EE.UU. (vista aérea); c) Wadi Natrum, Egipto (vista aérea); d) Salar de Atacama, Chile.

interviene la membrana púrpura, una fracción de membrana que contiene un pigmento proteico único de este grupo de organismos denominado bacteriorrodopsina. Cuando esta proteína se ilumina, crea un potencial de membrana al enviar protones desde el interior al exterior de la célula, y conserva la energía mediante fotofosforilación (Lanyi, 1978). Finalmente, algunas especies de haloarqueas pueden crecer anaeróbicamente en presencia de nitrato por fermentación (Larsen, 1984).

Estos organismos tienen características propias de las arqueas tales como presencia de lípidos polares con uniones éter en los lípidos isopropanil (Langworthy *et al.*, 1982; Langworthy, 1985; Langworthy y Pond, 1986) y carecer de una típica pared celular de mureína (Poxton, 1993; Kandler, 1994).

El estatus filogenético de este grupo en relación al resto de las arqueas, parece claro para la mayoría de los autores, que localizan a las arqueas halófilas extremas en la rama metanogénica cercana a las *Methanomicrobiales* (Woese, 1987).

3. 1. 1. Estado actual de la taxonomía de arqueas halófilas extremas.

Definir taxonómicamente a las arqueas halófilas extremas ha sido un proceso confuso que ha necesitado continuas revisiones para establecer nuevos géneros y especies. Estudios realizados sobre composición de lípidos polares, homología DNA/DNA y rRNA 16S diferenciaron nueve grupos de arqueas halófilas extremas (Ross y Grant, 1985).

Posteriormente, Grant y Larsen (1989) publicaron una lista taxonómica que agrupaba a las halobacterias en una sola familia con seis géneros. Para clasificar a todas las halófilas extremas no alcalófilas se proponen los siguientes géneros: *Halobacterium*, *Haloarcula* y *Haloferax* (Torreblanca *et al.*, 1986) y el género *Halococcus*. Los microorganismos haloalcalófilos se agruparon en los géneros *Natronobacterium* y *Natronococcus*.

Más recientemente se describieron nuevos géneros: *Halorubrum*, *Halobaculum*, *Natrialba*, *Natronomonas*, *Halogeometricum* y *Natrinema*. Actualmente las haloarqueas se agrupan en el orden *Halobacteriales* (Grant y Larsen, 1989) con una sola familia, la *Halobacteriaceae*, dividida en dieciocho géneros (Garrity *et al.*, 2004).

De acuerdo al Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Garrity *et al.*, 2004), en cada género encontramos las siguientes especies:

El género *Halobacterium* está compuesto actualmente por una sola especie: *H. salinarum*. En el género *Haloarcula* se incluyen seis especies: *H. vallismortis*, *H. argentinensis*, *H. hispanica*, *H. japonica*, *H. marismortui* y *H. quadrata*. El género *Halobiforma* recoge dos especies: *H. haloterrestris* y *H. nitratireducens*. Por su parte, el género *Halococcus* incluye a las especies *H. morrhuae*, *H. dombrowskii*, *H. saccharolyticus* y *H. salifodinae*. El género *Haloferax* cuenta con las siguientes especies: *H. volcanii*, *H. alexandricus*, *H. denitrificans*, *H. gibbonsii*, *H. lucentense*, *H. mediterranei*. El género *Halorubrum* comprende las especies *H. saccharovororum*, *H. coriense*, *H. distributum*,

H. lacusprofundi, *H. sodomense*, *H. tebenquichense*, *H. terrestre*, *H. trapanicum* y *H. vacuolatum*. El género *Haloterrigena* está representado por dos especies: *H. turkmenica* y *H. termotolerans*.

Reunidas en el género *Natrialba* encontramos las siguientes especies: *N. asiatica*, *N. aegyptia*, *N. chachannaoensis*, *N. hulunbeirensis*, *N. magadii* y *N. taiwanensis*. El género *Natrinema* está formado por tres especies: *N. pellirubrum*, *N. pallidum* y *N. vermiforme*. Los géneros *Natronococcus* y *Natronorubrum* incluyen dos especies cada uno, que son *N. occultus* y *N. amylolyticus* en el primero y *N. bangense* y *N. tibetense* para el segundo de estos géneros.

Dentro de los siguientes géneros solo se encuentra una especie *Halobaculum* (*H. gomorreense*), *Halogeometricum* (*H. borinquense*), *Halomicrobium* (*H. mukohataei*), *Halorhabdus* (*H. utahensis*), *Halosimplex* (*H. carslbadense*), *Natronobacterium* (*N. gregoryi*), *Natronomonas* (*N. pharaonis*).

3. 2. Estructura y Fisiología.

3. 2. 1. Envoltura celular.

La envoltura celular de las arqueas puede estar constituida por una simple capa superficial no rígida compuesta por proteínas o subunidades de glicoproteínas en ciertas metanógenas, halófilas extremas y termófilas extremas hasta por una rígida pseudomureína análoga a la mureína eubacterial, en las metanógenas del orden *Methanobacteriales* (Kandler y Köning, 1978 y 1985). En la envoltura celular de arqueas no se han

detectado dos de los componentes principales de la pared celular de eubacterias: el ácido murámico y los aminoácidos de configuración D.

La envoltura celular de arqueas puede ser catalogada en tres clases características según sus principales componentes celulares:

- pseudomureína
- capas de proteínas o glicoproteínas
- heteropolisacáridos.

Algunas arqueas contienen complejas envolturas formadas por más de un componente. Los miembros del orden *Methanobacteriales* son las únicas especies de arqueas que poseen una pared celular de pseudomureína análoga a la mureína eubacterial (Kandler, 1982; Kandler y Köning, 1985). Esta pseudomureína difiere de la mureína eubacterial en:

- sustitución del ácido L-talosaminurónico por ácido murámico,
- los constituyentes del polímero de glicano implicado en el entrecruzamiento son secuencias de aminoácidos (L-alanina, ácido glutámico y lisina),
- uniones tipo β (1-3) entre N-acetilglucosamina y N-acetiltalosaminurónico, diferentes de las uniones glicosídicas β (1-4) presentes en la mureína eubacterial (Bullock, 2000).

Un segundo tipo de envoltura celular está formado por capas de subunidades de proteínas y glicoproteínas externas a la membrana celular y podemos encontrarlo en metanógenas, halófilas extremas y algunas especies de termófilas extremas. En muchas especies la capa superficial (capa S) de proteína o glicoproteína puede ser fácilmente interrumpida. La capa S de *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium*

salinarum) está compuesta de un glicopéptido similar en estructura a los glicosaminoglicanos presente en células animales (Wieland *et al.*, 1980 y 1982).

El tercer tipo de pared celular presente en arqueas, formada por heteropolisacáridos, está restringido a los géneros *Halococcus* y *Methanosarcina*. La pared celular de las especies de *Halococcus* es más gruesa y rígida y consiste en un heteropolisacárido sulfatado que contiene N-glicil-D-glucosamina y puentes péptido glicil (Schleifer *et al.*, 1982).

En estudios más recientes se ha comprobado que las metanógenas poseen un pseudopeptidoglicano cuyo esqueleto polisacárido es resistente a las lisozimas debido a sus uniones tipo β (1-3) entre N-acetilglucosamina y ácido N-acetiltalosaminurónico. En cambio otras arqueas presentan gran variedad de estructuras complejas en su envoltura celular formadas por polisacáridos, glicoproteínas o proteínas así como otros componentes de naturaleza inorgánica. Algunas poseen una capa S paracristalina que posiblemente actúa como barrera selectiva para la entrada de solutos (Bullock, 2000).

En las arqueas halófilas como *Halobacterium* la glicoproteína de su pared celular es rica en aminoácidos con carácter ácido (aspartato y glutamato), que se encuentran como sales sódicas (Bullock, 2000). Por otro lado, *Halococcus* incorpora residuos de ácido urónico que aportan grupos sulfato cargados (Bullock, 2000).

3. 2. 2. Ribosoma arqueal: estructura, función y evolución.

Debido a su ubicuidad natural, los ribosomas y sus componentes (el rRNA y las proteínas ribosomales) han proporcionado una excelente prueba filogenética para estudiar la evolución molecular. Existen datos comparativos sobre la estructura de los componentes ribosomales específicos que han permitido identificar regiones conservadas en estas moléculas, posiblemente implicadas en la función ribosomal, concretamente en la síntesis de proteínas celulares.

El ribosoma arqueal 70S y sus subunidades 50S y 30S son similares en tamaño a los ribosomas de eubacterias, pero son menos complejos en tamaño y número de constituyentes moleculares que el ribosoma 80S de eubacterias. Los ribosomas de arqueas presentan tres moléculas de rRNA 23S, 16S, 5S. Sin embargo existen diferencias que permiten establecer dos tipos de ribosomas en las arqueas, como el número de proteínas ribosomales presentes en el ribosoma. Se ha demostrado la existencia de dos tipos de ribosomas de arqueas (Danson *et al.*, 1992). El característico de las halófilas extremas y de la mayoría de metanógenas tiene aproximadamente 54-56 proteínas (similar al ribosoma de bacterias). El segundo grupo incluye a las termófilas extremas y algunas especies del género *Methanococcus*, con 28 proteínas ribosomales adicionales en la subunidad 30S (Schmid y Böck, 1982) y cerca de 43 en la subunidad 50S (Casiano *et al.*, 1990). Las proteínas de este segundo grupo tienen mayor masa molecular. Considerando que estos ribosomas están presentes en termófilas extremas principalmente podrían representar la naturaleza del ribosoma ancestral.

Los ribosomas de eucariotas contienen aproximadamente 75-80 proteínas ribosomales y su masa molecular media es mayor que la de las proteínas ribosomales de bacterias y arqueas (Matheson, 1992).

Al comparar con las proteínas equivalentes en eucariotas y bacterias, las proteínas ribosomales de las arqueas revelan una gran similitud de secuencias y frecuentemente muestran algunos aspectos únicos, lo cual apoyaría el concepto de arquea como un Dominio monofilético. En general, las proteínas ribosomales manifiestan más secuencias similares con sus proteínas equivalentes en eucariotas que en bacterias. En general, el tamaño de las proteínas ribosomales específicas es mayor en eucaria, seguido por las arqueas y menor en bacteria (Matheson, 1992).

3. 3. Lípidos arqueobacteriales.

Uno de los rasgos bioquímicos más característicos de este grupo es la estructura de sus lípidos de membrana, en los cuales los enlaces éster ($-\text{CH}_2\text{-OCOR}$) entre los ácidos grasos y el glicerol normalmente presentes en las membranas son reemplazados por enlaces éter ($-\text{CH}_2\text{OR}$). Esto confiere un incremento en la estabilidad química y las cadenas hidrocarbonadas (R) son fundamentalmente polímeros basados en un monómero de estructura isoprenoide: 2-metilbutil-1,3-dieno (Bullock, 2000).

Los principales componentes de las membranas arqueales son un diacilglicerol diéter C20-C20 (sn-2,3-difitanilglicerol diéter) (Figura 1.2) (Kates, 1978; Bullock, 2000) y su dímero dibifitanil-diglicerol tetraéter (Figura 1.3), formado por la unión covalente de ambas moléculas del diéter

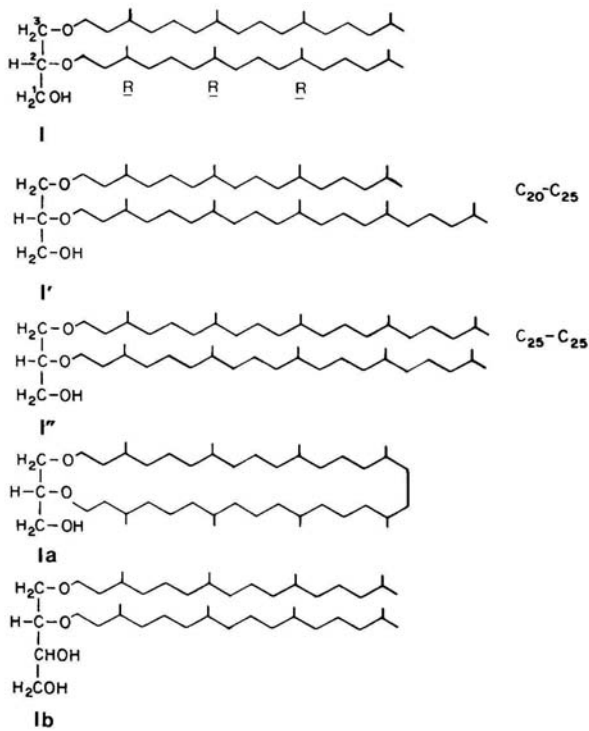


Figura 1. 2. Estructura del difitanilglicerol diéter (I, arqueol) y sus derivados (I', I'', Ia, Ib).

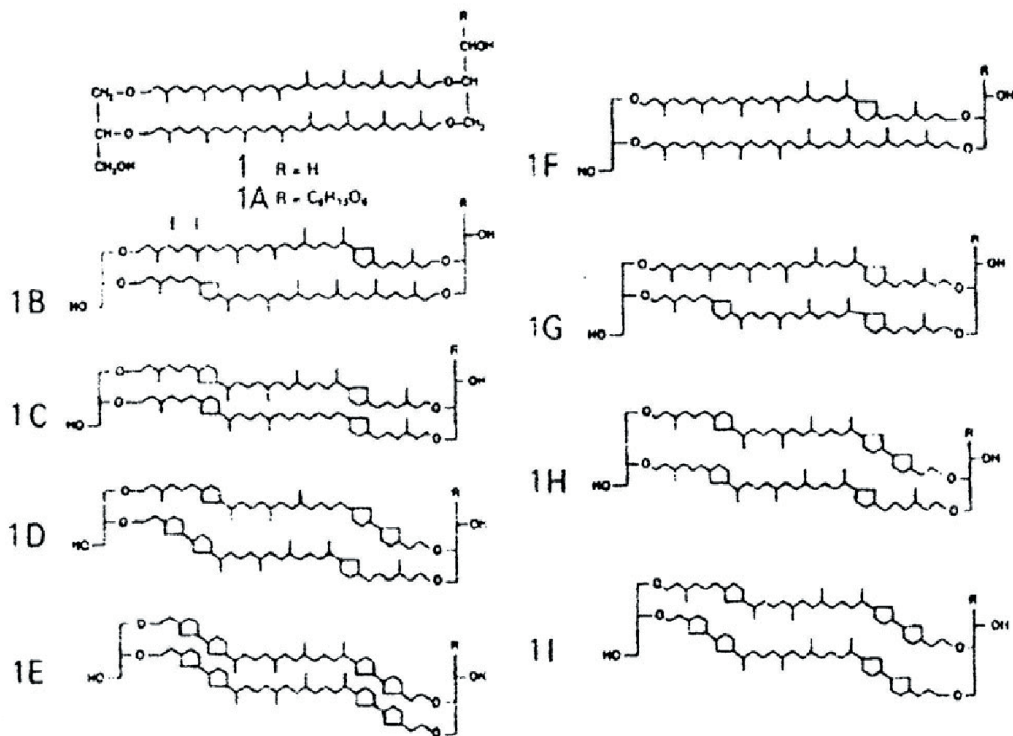


Figura 1. 3. Estructura del dibifitanilglicerol tetraéter (I, caldarqueol), gliceroldialquilnonitol tetraéter (IA, nonitolcaldarqueol) y varios derivados cíclicos (IB-II, caldarqueol y nonitolcaldarqueol cíclico).

(Langworthy, 1985; Bullock, 2000). Ambas estructuras presentan varias configuraciones. Algunas arqueas presentan variantes de las estructuras lipídicas centrales descritas. Un ejemplo lo encontramos en *Halococcus* que muestra un diéter C20-C25 (Moldoveanu *et al.*, 1990). Algunas especies alcalinas de *Natronobacterium* y *Natronococcus* (De Rosa *et al.*, 1982 y 1983) presentan la estructura diéter C20-25 y diéter C25-25. En *Methanococcus jannaschii* (hoy *Methanocaldococcus jannaschii*), una metanógena termofílica, el principal centro lipídico es un macrociclo con estructura diéter C40 (Comita y Gagosian, 1983). Algunas especies de *Methanosarcina* y *Methanosaeta* (antes *Methanothrix*) contienen un centro lipídico 3-hidroxiéter (Sprott *et al.*, 1990; Nishihara *et al.*, 1991). Dentro del género termoacidófilo *Sulfolobus* podemos hallar algunas especies que contienen lípidos derivados de un dibifitanilglicerol nonitol tetraéter, que contiene uno o cuatro anillos ciclopentano en cada grupo de los difitanil de los C40 (De Rosa *et al.*, 1986; Bullock, 2000).

Debido a la compleja nomenclatura dada a estos lípidos (Nishihara *et al.*, 1987) se sugirió denominar genéricamente “arqueol” al difitanilglicerol diéter y sus variantes y emplear los términos “caldarqueol” y “nonitol caldarqueol” respectivamente para el dibifitanilglicerol tetraéter y sus derivados.

Las halófilas extremas contienen sólo lípidos derivados de arqueol, las metanogénicas lípidos derivados de arqueol y caldarqueol, y las termoacidófilas sólo lípidos derivados de caldarqueol y nonitol caldarqueol, lo cual repercute en los modelos hipotéticos de las membranas de estos microorganismos como muestra la figura 1.4 (Itoh *et al.*, 2001).

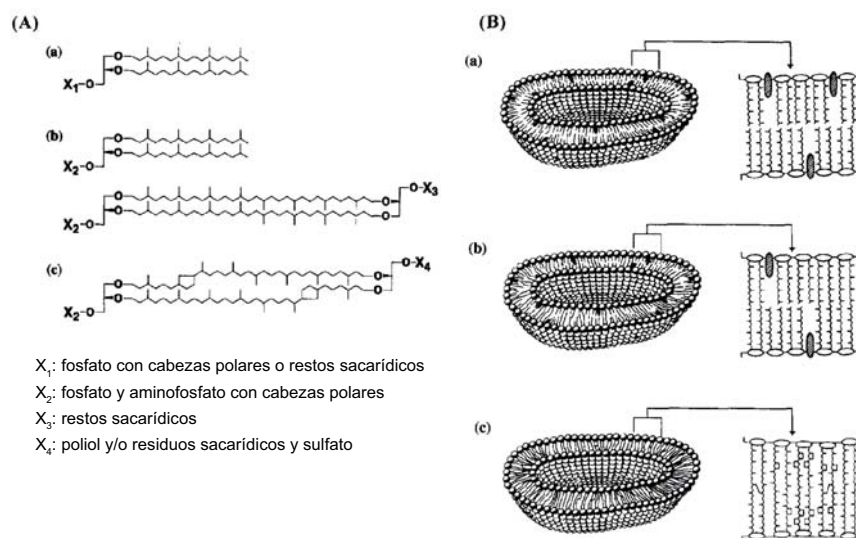


Figura 1. 4. Estructuras típicas de los principales lípidos (A) y esquema de las membranas (B) de los tres grupos de arqueas: (a) arqueas halófilas, (b) arqueas metanógenas y (c) arqueas termófilas.

3. 3. 1. Lípidos polares de arqueas halófilas extremas.

En halófilas extremas se encuentran dos tipos de fosfolípidos ácidos: uno mayoritario y dos minoritarios. El fosfolípido mayoritario es un arqueol análogo al fosfatidilglicerolfosfato (PGP) (Kamekura y Kates, 1988; Kates, 1978; Moldoveanu *et al.*, 1990), aunque estudios más recientes han identificado al derivado monometilado de PGP (PGP-Me) como fosfolípido mayoritario (Fredikson *et al.*, 1989; Kates, 1993; Tsujimoto *et al.*, 1989). Ambos compuestos pueden diferenciarse aplicando diversas técnicas entre las que cabe destacar la cromatografía en capa fina (TLC). Empleando un sistema de solvente alcalino en el desarrollo del cromatograma se retarda significativamente la movilidad de PGP sin modificar la de PGP-Me (Kates, 1993).

Como fosfolípidos minoritarios se han identificado los arqueoles análogos de fosfatidilglicerol (PG), fosfatidilglicerolsulfato (PGS) y ácido fosfatídico (PA) (De Rosa *et al.*, 1991; Kamekura y Kates, 1988; Kates, 1978; Moldoveanu *et al.*, 1990).

PGP y PA están presentes probablemente como intermediarios biosintéticos (Kates, 1993; Moldoveanu y Kates, 1988 y 1989). Otro fosfolípido menor que ha sido identificado en *Natronococcus occultus* es la forma cíclica de PGP (Lanzotti *et al.*, 1989). Es posible que este componente también corresponda a un intermediario biosintético en la formación de PGP-Me.

Estereoquímicamente, las estructuras del análogo de PG, PGP, PGP-Me y PGS son inusuales ya que ambos grupos glicerol tienen la configuración opuesta a su correspondiente forma diacilglicerol de PG y PGP hallada en eubacterias y eucariotas (Kates, 1978).

3. 3. 2. Glicolípidos.

Los glicolípidos de las haloarqueas incluyen un triglicósil arqueol sulfatado más abundante, el galactosil-3-sulfato-manosil-glicosil-arqueol (S-TGA-1) (Kates, 1978) y varios glicolípidos en cantidades menores (Smallbone y Kates, 1981), tales como el desulfatado TGA-1; un tetraglicósil arqueol sulfatado (S-TeGA) y su producto desulfatado TeGA.

El triglicosil arqueol mayoritario en las especies de *Haloarcula* es el glucosil-manosil-glucosil-arqueol (TGA-2), y presentan también un diglicosil arqueol (manosil-glucosil arqueol, DGA-2) de estructura no identificada.

Las especies de *Haloferax* presentan un diglicosil arqueol sulfato, manosil-6-sulfato-glicosil-arqueol (S-DGA-1) (Kushwaha *et al.*, 1982) y su producto desulfatado DGA-1. *Halorubrum saccharovorum* (Lanzotti *et al.*, 1982; Torreblanca *et al.*, 1986) y algunas cepas del género *Halococcus*, presentan el glicolípido S-DGA-1, típico del género *Haloferax*.

Las estructuras de los glicolípidos parecen derivarse de una forma básica de diglicosil arqueol, manosil-glucosil-arqueol (DGA-1) por sustitución de azúcares o grupos sulfato en las posiciones 3 ó 6 de los residuos de manosa (Kushwaha *et al.*, 1982; Matsubara *et al.*, 1994). Sin embargo, tales relaciones estructurales entre los glicolípidos halofílicos conocidos no explican la estructura de algunos nuevos glicolípidos descritos, como:

- el S-DGA-2 de *Natrialba asiatica*, (Kamekura y Kates, 1988; Kamekura *et al.*, 1995), que parece ser un manosil-2,6-disulfato-(1-2)-glucosil arqueol;
- el manosil-2-sulfato-(1-2)-glucosil-arqueol (S-DGA-5) de *Halorubrum trapanicum* (Trincone *et al.*, 1993);
- el manosil-2-sulfato-(1-4)-glucosil-arqueol: S-DGA-3 de *Halorubrum sodomense* (Trincone *et al.*, 1990) y

- un glucopiranosil-1,6-glucopiranosil-arqueol no sulfatado (DGA-4) de una cepa del género *Natronobacterium* aislada en una salina de India (Upasani *et al.*, 1993) y también presente en otras cepas de *Natronobacterium*.

3. 3. 3. Vías biosintéticas de fosfolípidos y glicolípidos.

La biosíntesis de los análogos de arqueol de fosfolípidos y glicolípidos en halófilas extremas se realiza en un sistema multienzimático unido a la membrana y absolutamente independiente de la concentración salina (4M) (Kamekura y Kates, 1988; Kates, 1990 y 1993).

La síntesis de las cadenas isoprenoides C20 se realiza por una vía modificada del mevalonato, la cual se inicia desde acetato e involucra lisina para proporcionar la rama metil y carbonos por un mecanismo desconocido (Ekiel *et al.*, 1986) y produce la formación de geranilgeranil-PP o una reducción parcial de isoprenoide C20 (Kamekura y Kates, 1988). Este último se utiliza posteriormente para la alquilación de un glicerol adecuado derivando a una forma de digeranilgeranil o de di-C20-isoprenil glicerol éter (prediéter), seguida de la incorporación de los grupos de cabeza polar para formar los prefosfolípidos o preglicolípidos y la reducción de las cadenas de geranilgeranil o cadenas isoprenil a cadenas fitanil como el paso final en la síntesis individual de los fosfolípidos y glicolípidos (Moldoveanu y Kates, 1988 y 1989).

3. 3. 4. Función de los lípidos.

El hecho de que todas las membranas de arqueas estén formadas por lípidos derivados de difitanilglicerol diéter o su dímero dibifitanildiglicerol tetraéter sugiere que estos peculiares lípidos tienen funciones que son comunes a todas las arqueas (Langworthy, 1977; Kates, 1990; De Rosa *et al.*, 1991). Así, la estructura alquiléter ofrecería una mayor estabilidad a los lípidos sobre el amplio intervalo de pH encontrado en estos microorganismos; las cadenas alquílicas saturadas proporcionarían estabilidad para la degradación oxidativa, particularmente en las halófilas extremas que están expuestas al aire y la luz solar; el radical isopropanil de la estructura del arqueol y caldarqueol mantiene el estado de cristal líquido de la membrana lipídica, a temperatura ambiente; y las uniones covalentes junto con la introducción de anillos pentacíclicos mantendría constante la fluidez aunque se produjera un aumento de la temperatura (De Rosa *et al.*, 1986; Langworthy *et al.*, 1982). Además, la configuración sn-1 en la base del glicerol base impartiría resistencia al ataque de fosfolipasas liberadas por otros organismos.

En halófilas extremas, el triglicósil arqueol sulfatado S-TGA-1 está asociado exclusivamente con la membrana púrpura de las haloarqueas, y se localiza en la superficie exterior de la membrana (Henderson *et al.*, 1978; Kates, 1990). Este glicolípido junto con el fosfolípido mayor PGP-Me (Kates, 1990 y 1993) pueden participar en las vías de transporte de protones (Teissie *et al.*, 1990), gracias a sus respectivos grupos sulfato y fosfato.

Las membranas de los géneros *Halobacterium*, *Haloarcula* y *Haloferax* se caracterizan por la alta concentración de lípidos ácidos

y la alta densidad de superficie cargada negativamente (Kamekura y Kates, 1988). La alta concentración de ión Na^+ (4M) neutraliza la carga negativa de la membrana, previniendo una ruptura de la bicapa lipídica que originaría la repulsión entre cargas negativas. Esta propiedad de la membrana de las halófilas extremas parece una adaptación para sobrevivir en medios hipersalinos.

En vesículas de la membrana púrpura que contienen S-TGA-1, este glicolípido parece implicado en el bombeo de protones de la bacteriorrodopsina, ya que se ha demostrado que la reconstitución de la bacteriorrodopsina en dichas vesículas aumenta la velocidad de bombeo de protones (Lind *et al.*, 1981).

3.3.5. Quinonas isoprenoides.

Las quinonas, componentes de la fracción de lípidos neutros, juegan un papel muy importante en el transporte de electrones, la fosforilación oxidativa y el transporte activo (Readfearn, 1966; Taber, 1980).

En arqueas se encuentran dos grupos estructurales mayores de quinonas isoprenoides: las naftoquinonas y las benzotiofenquinonas.

Las naftoquinonas son menaquinonas tipo MK o termoplasmaquinonas (Collins, 1985). En las arqueas halófilas se ha encontrado la quinona no saturada MK-8 junto a su correspondiente forma dihidrogenada MK-7 y MK-7 (H₂), componentes minoritarios del grupo (Collins *et al.*, 1981; Tindall, 1990).

3. 4. Metabolismo y enzimología.

3. 4. 1. Vías metabólicas y enzimáticas.

Las arqueas halófilas extremas son aerobias organotrofas y poseen un completo ciclo oxidativo del ácido cítrico (Danson *et al.*, 1992), el cual sirve para la generación de energía y es la llave de inicio para la biosíntesis de materiales, permitiendo además el crecimiento sobre aminoácidos y otros compuestos nitrogenados. Filogenéticamente relacionadas con las halófilas están *Thermoplasma acidophilum* y *Thermoplasma volcanium*, organotrofas facultativas. Cuando crecen aeróbicamente poseen también un completo ciclo del ácido cítrico para la generación de energía (Seegerer *et al.*, 1988).

En arqueas halófilas y termófilas existen modificaciones en la vía de Entner-Doudoroff, mientras secuencias de la vía de Embden-Meyerhof son usadas por halófilas y metanógenas para la gluconeogénesis.

En arqueas y eubacterias anaerobias se ha determinado la existencia de la enzima piruvato oxidorreductasa, que actúa en la conversión de piruvato en acetil- coenzima A. Se ha apuntado que la existencia de este enzima sea anterior a la divergencia en tres Dominios, mientras que el complejo piruvato deshidrogenasa, hallado únicamente en el metabolismo respiratorio de eubacterias y eucariotas, habría surgido después del desarrollo de la fosforilación oxidativa (Kerscher *et al.*, 1982). Del mismo modo, se cree que la dihidrolipoamida deshidrogenasa podría ser una antigua enzima (Danson, 1988) encontrada en arqueas, secuestrada en la respiración de eubacterias y eucariotas para funcionar como un componente integral del complejo deshidrogenasa-2- oxoácido.

Finalmente, con respecto al ciclo del ácido cítrico se ha planteado que la conversión reductiva de oxalacetato en succinato quizás ha evolucionado en relación con el metabolismo anaerobio de las hexosas para generar NAD^+ (Gest, 1987). Con la otra mitad del ciclo, donde se sintetiza 2-oxoglutarato desde acetil- coenzima A y oxalacetato vía citrato, quizás una primitiva célula anaeróbica pudo tener estas dos ramas del ciclo (Schleifer, 1985).

3. 4. 2. Enzimología molecular.

Se ha observado que algunas enzimas de halófilas extremas son sensibles al frío (Shafer *et al*, 1986) y estables a altas concentraciones de Na^+ o KCl (4M). Sin embargo, algunas enzimas son más activas en presencia de K^+ que de Na^+ (Daniels y Zeikus, 1978).

La purificación de las enzimas se realiza mediante procedimientos a los que no afecte la elevada concentración de sal (filtración, cromatografía con hidroxapatito, hidrofóbica y mediada por sulfato) o procedimientos que tengan lugar a baja concentración de sal (cromatografía de intercambio iónico). Este último es efectivo si la inactivación puede ser revertida o la purificación realizada en presencia de agentes que estabilicen la enzima.

Debido a la posición metabólica y la disponibilidad de datos estructurales y funcionales de sus análogas en eucariotas y eubacterias se han purificado y caracterizado algunas enzimas de arqueas, tales como: la glucosa deshidrogenasa (primera enzima de la vía de Entner-Doudoroff), la dihidrolipoamida deshidrogenasa (descubierta en arqueas

mientras se investigaba la conversión de piruvato en acetil-coenzima A) y la citrato sintasa (enzima inicial de ciclo del ácido cítrico) (Danson y Hough, 1992).

3. 5. Producción de energía y transporte.

3. 5. 1. Mecanismos bioenergéticos para la vida en un ambiente de alta salinidad.

Los microorganismos que habitan ambientes de salinidad extrema deben superar dos problemas fundamentales: el primero es la pérdida de agua desde las células al medio hasta alcanzar un equilibrio entre ambos. Como consecuencia de una insuficiente cantidad de agente osmóticamente activo en el citoplasma, la célula se plasmoliza porque no hay suficiente agua para la hidratación de las proteínas y difusión de metabolitos. Las haloarqueas han superado este problema manteniendo una alta concentración interna de sales para equilibrar la alta presión osmótica del medio. El segundo estrés es el efecto citotóxico del NaCl, el cual causa la inactivación y agregación de proteínas y estructuras internas, tales como ribosomas (Lanyi, 1974). Las haloarqueas han solucionado este efecto excluyendo Na⁺ y acumulando K⁺, de forma que la sal interna más abundante no es NaCl sino KCl.

Sin embargo, desde un punto de vista bioenergético, el problema es el intercambio citoplasmático de Na⁺ por K⁺ en contra del gradiente de concentración y la retención y acumulación de KCl para ganar agua por la elongación del espacio intracelular durante el crecimiento. Además, el bajo contenido intracelular debe mantenerse aún durante períodos de inanición.

La conversión de energía primaria está acompañada por el bombeo de protones (bacteriorrodopsina y sistema respiratorio) y por una bomba de cloruro (halorrodopsina). La circulación de protones está acoplada a un efectivo sistema antiportador de Na^+/H^+ . Este bombeo junto con la generación de una diferencia mínima de pH a través de la membrana genera también un alto potencial eléctrico, el cual conduce al menos parte del K^+ asimilado en las células. La retención y ganancia de Cl^- en el interior celular en contra del potencial eléctrico negativo se acompaña de un sistema que conduce Cl^- a través del movimiento de protones y de la halorrodopsina. Durante el crecimiento, la ganancia neta de catión (K^+ acumulado menos Na^+ perdido) debe ser igual al Cl^- asimilado (Mehlhorn *et al*, 1985) para asegurar la neutralidad eléctrica y la ganancia de KCl con un incremento del espacio intracelular y el contenido de agua.

3. 5. 2. Bacteriorrodopsina y síntesis de ATP.

Las haloarqueas contienen una proteína retinal única que sirve en las funciones fotosensoriales y de transporte. Las bacteriorrodopsinas son proteínas púrpuras que funcionan como bombas electrogénicas de protones activadas por la luz. El peso molecular de la bacteriorrodopsina de *Halobacterium* es 26 KDa y está localizada en dos dimensiones en la membrana plasmática (membrana púrpura). El espectro de la bacteriorrodopsina se mueve desde 380 nm de absorción máxima de retinal libre a 570 nm como resultado de la interacción proteína – retinal.

Desde su descubrimiento y caracterización (Oesterhelt y Stoeckenius, 1971), la bacteriorrodopsina ha sido objeto de intensos estudios, ya que el transporte de protones activado por la luz representa un tipo alternativo

de fotosíntesis y permite el crecimiento fototrópico bajo condiciones de depresión de oxígeno (Oesterhelt, 1975).

Después de la excitación, la bacteriorrodopsina viaja a través del motociclo durante el cual han sido identificados varios intermediarios (Oesterhelt y Hess, 1973; Mathies *et al.*, 1991). El ciclo se completa en aproximadamente 10 milisegundos con el restablecimiento del estado original de la bacteriorrodopsina. Durante cada movimiento un protón es transportado a través de la membrana celular. Se ha observado que bajo irradiación permanente (estado adaptado a la luz de la bacteriorrodopsina) predomina en un 100% la forma *trans* de los cromóforos. En cambio, las incubación en oscuridad conduce a un equilibrio entre la forma *trans* y su isómero 13-*cis*, en aproximadamente 40-60%, con una vida media de formación de 20 minutos (a temperatura ambiente) (Bickel-Sandkötter *et al.*, 1996).

3. 5. 3. Transporte de cloro activado por la luz.

La halorrodopsina es una proteína integral de membrana que presenta su máxima absorción a una longitud de onda de 578 nm. Es cien veces más abundante que los pigmentos sensoriales. Al igual que la bacteriorrodopsina, la halorrodopsina contiene retinal, al cual se une Cl^- en lugar del protón unido en el caso de la bacteriorrodopsina. Así tiene lugar el transporte a través de la membrana desde el exterior al interior. La especificidad iónica varía con la especie en la cual la halorrodopsina se encuentra: en *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) presenta preferencia hacia el Cl^- y Br^- en relación al NO_3^- (Shobert y Lanyi, 1982; Bamberg *et al.*, 1984; Hazemoto *et al.*, 1984; Duschl *et al.*, 1990), mientras que el pigmento presente en *Natronobacterium*

pharaonis (hoy *Natromonas pharaonis*) transporta todos estos aniones de la misma forma (Duschl *et al.*, 1990). No obstante, ya que en el medio ambiente de las haloarqueas siempre existe mayor cantidad de cloro que de otros iones, se deduce que este ión es el sustrato fisiológico para la halorrodopsina.

Siguiendo con la demanda de electroneutralidad, la concentración de K^+ se mantiene alta dentro de la célula durante el transporte iónico, jugando un importante papel en el almacenamiento de energía (Wagner *et al.*, 1978). De manera similar a los pigmentos sensoriales, la halorrodopsina también funciona de manera cíclica, pero con mucha más eficacia y con reacciones cinéticas más rápidas.

La halorrodopsina y bacteriorrodopsina, al contrario que los pigmentos fotosensoriales, actúan como bombas iónicas activadas por luz bajo condiciones fisiológicas. Se ha identificado, sin embargo, la capacidad de inducción de fototaxis por la bacteriorrodopsina (Bibikov *et al.*, 1993).

3. 5. 4. Sistema de transporte de iones secundarios.

Durante la fotofosforilación o por la oxidación de sustratos reducidos en la cadena respiratoria, los iones Na^+ son excluidos en contra de su gradiente electroquímico. Indirectamente, se ha observado un movimiento de protones al interior de la célula. La eliminación de Na^+ produce una disminución en la diferencia de pH, ya que el potencial eléctrico es mayor que el observado en vesículas vacías de Na^+ .

En haloarqueas existe un sistema de captura independiente de la halorrodopsina, el cual se activa por la respiración o transporte de protones por medio de la bacteriorrodopsina. Estudios de iluminación de células deficientes en halorrodopsinas y células que respiran en la oscuridad han revelado una asimilación activa de Cl^- no relacionada con el contenido de ATP, sino con el grado de potencial eléctrico creado (Duschl y Wagner, 1986).

3. 5. 5. Transporte de aminoácidos.

Todos los datos de transporte conocidos han sido identificados en envolturas de vesículas celulares. Ya que las envolturas no generan ATP bajo las condiciones usadas, todo el transporte activo de aminoácidos detectado ha sido condicionado por el gradiente iónico. En células intactas quizás exista otro sistema de transporte, posiblemente basado en la hidrólisis de ATP.

En vesículas de membrana de *Halobacterium halobium* las actividades de iluminación o respiración producen la acumulación de aminoácidos, marcados radiactivamente: la L-leucina es un ejemplo típico (MacDonald y Lanyi, 1975). Cuando el NaCl es la única sal presente, la acumulación es significativa pero no muy abundante. En cambio, si se agrega KCl la acumulación de aminoácidos aumenta significativamente. Cuando las envolturas se cargan con KCl y se suspenden en NaCl, la asimilación de leucina y otros aminoácidos continúan aún en la oscuridad y en ausencia de sustratos respiratorios (MacDonald *et al.*, 1977 y Lanyi y Mc Donald 1976). Así, un gradiente de Na^+ es suficiente como fuerza conductora para la asimilación de aminoácidos.

3. 6. Genética y biología molecular.

La genética y la biología molecular de las arqueas halófilas ha motivado el trabajo de muchos científicos en los últimos años, ya que se piensa que puede existir similitud en sus procesos bioquímicos y genéticos con el antecesor común primordial por considerarse un grupo de microorganismos ancestrales. Con la aplicación de técnicas bioquímicas y moleculares se han dilucidado, a nivel molecular, algunos aspectos inusuales de estos microorganismos, proporcionando nueva información relativa al origen y relaciones evolutivas con eubacterias y eucariotas. En la década de los 90 se iniciaba la investigación en tres áreas específicas:

- el mapeo total, clonación y organización del DNA genómico,
- definición de un sistema natural de intercambio genético y
- el desarrollo de un sistema de clonación (Dennis, 1993).

El genoma total de *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) consiste en, al menos, cuatro especies de DNA con diferencias en su G+C, su complejidad y su localización. Presenta una fracción cromosomal mayor (FI), con 68% de G+C y una fracción (FII) con un porcentaje menor de G+C (58% mol), que contiene tres tipos diferentes de DNA:

- segmentos o islas, de las cuales dos están insertadas en FI,
- DNA circular menor (MCD) que representa una colección heterogénea de moléculas de DNA circular covalentemente cerradas, que pueden derivar de secuencias cromosomales,

- el plásmido pHH1 de 150 kb, también considerado como DNA circular mayor, aparece en varias copias en *Halobacterium halobium* NRC 817 (hoy *Halobacterium salinarum*). Sus copias llevan la mayoría de los elementos de inserción caracterizados (ISH), los cuales son, al menos en parte, responsables de la alta variabilidad genética de este microorganismo.

Entre algunas de las haloarqueas aisladas se han encontrado diferencias en su especie de FII, mostrando que las que no llevan secuencias del plásmido pHH1 son genéticamente más estables.

Se han analizado las secuencias de DNA circular covalentemente cerrado (cccDNA) en mutantes fenotípicas de *Halobacterium halobium* NRC 817 (hoy *Halobacterium salinarum*) y los resultados indican que estas mutaciones corresponden a inserciones, deleciones y reordenamientos en pHH1, la especie principal de cccDNA en esta cepa (Pfeifer *et al.*, 1981a y b).

De acuerdo a los estudios de Pfeifer *et al.* (1981a y b) y de Ebert y Goebel (1985), se puede deducir que los plásmidos mayores de *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) y de las cepas relacionadas presentan una alta homología, pero difieren entre ellos en inserciones, deleciones y reordenamientos de su DNA.

A partir de los estudios de mutación realizados en *H. halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) se deduce que esta cepa posee un genoma extremadamente dinámico capaz de reordenar su DNA a altas frecuencias. Se han detectado también cambios estructurales en el genoma del fago ϕ

H de *H. halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) debido a inserciones, deleciones o inversiones (Schnabel *et al.*, 1984).

Se han analizado un gran número de mutantes espontáneas para la membrana púrpura (Pum), intentando esclarecer los procesos moleculares involucrados en la mutación. Aproximadamente el 50% de los mutantes se deben a una deficiencia retinal. Las mutaciones en el gen de la bacteriorrodopsina, gen *bop*, son resultado de elementos de inserción integrados en o cerca del gen *bop* (Betlach *et al.*, 1983). Estos elementos de inserción han sido aislados y caracterizados. Se ha aislado un segundo gen (*brp*) cuyo producto está posiblemente involucrado en la expresión del gen de la bacteriorrodopsina (Betlach *et al.*, 1984).

Se han aislado diferentes elementos de inserción (ISH) desde el gen *bop* para la bacteriorrodopsina en mutantes Bop de *H. halobium* (Betlach *et al.*, 1983; Pfeifer *et al.*, 1985). Además se han obtenido elementos de inserción a partir de DNA circular (ISH 50) y del fago ϕ H (ISH8) (Xu y Doolittle, 1983; Schnabel *et al.*, 1984). La mayoría de estos elementos están presentes exclusivamente en *H. halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) y las cepas cercanamente relacionadas. La transposición y la recombinación homóloga mediada por estos elementos ocurren frecuentemente. En el caso de las mutantes espontáneas de bacteriorrodopsina, la mutagénesis por transposón es el mecanismo predominante en *H. halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*). Incluso las mutantes Bop obtenidas por cultivos mutagenizados son causadas por elementos de inserción, lo cual indica que la frecuencia de transposición es tan alta como la de las mutaciones puntuales (Betlach *et al.*, 1983).

3. 7. Potencial biotecnológico de las arqueas halófilas extremas.

En los años 80 se vislumbraba ya el gran potencial biotecnológico de los microorganismos halófilos. La producción de enzimas y polímeros ha permitido desarrollar aplicaciones en la industria farmacéutica y en la alimentaria, como modificadores de la respuesta biológica, también se ha utilizado en la recuperación del petróleo y en biotecnología ambiental (Ramos-Cormenzana, 1989; 1991; 1993 y 2000). Además las arqueas halófilas extremas son fáciles de cultivar y muy raramente se contaminan debido a la alta concentración salina presente en el medio de cultivo. A continuación se detallan algunas de las principales aplicaciones de las haloarqueas.

Al final de este capítulo se tratará más ampliamente el aspecto de los **arqueosomas** por ser el tema central de esta memoria.

3. 7. 1. Aplicación en alimentación.

El primer interés científico despertado por las haloarqueas derivó de su indeseable crecimiento sobre alimentos salados, principalmente pescado. Actualmente, en algunos casos el crecimiento de microorganismos en los alimentos quizás pueda considerarse beneficioso. En el Sudeste de Asia se utiliza un condimento de salsa de pescado llamado “Nam Pla” (en Tailandia) que parece ser el resultado de la actividad proteolítica de haloarqueas sobre proteínas de peces (Thongthai y Suntinanalert, 1991). Recientes estudios sobre las haloarqueas del “Nam Pla” utilizando análisis

de lípidos polares y técnicas de hibridación de DNA han demostrado la presencia mayoritaria de *Halobacterium salinarum* (Thongthai *et al.*, 1992).

3. 7. 2. Investigación del cáncer.

Se ha detectado que algunas haloarqueas comparten patrones de sensibilidad con al menos dos de los principales blancos de fármacos citostáticos de las células eucariotas: la DNA topoisomerasa II y con los componentes del citoesqueleto (actina y tubulina) (Sioud *et al.*, 1987).

Existen evidencias de ultraestructuras intracelulares en arqueas halófilas extremas, generalmente asociadas con la membrana plasmática, que consisten en empaquetamientos de tubos huecos que podrían corresponder a proteínas similares a la actina (Robertson *et al.*, 1982; Forterre *et al.*, 1984), posiblemente relacionadas con la división celular. Otros componentes implicados en este proceso, tales como la DNA polimerasa, también han mostrado un patrón de sensibilidad similar a las polimerasas de eucariotas (Forterre *et al.*, 1984).

Para el diagnóstico de ciertos tipos de cáncer es importante destacar la similitud entre el producto del gen *c-myc* y una proteína de 84 KDa aislada de extractos celulares de *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*). Esta proteína reacciona con anticuerpos producidos contra el producto del gen humano *c-myc* y puede ser utilizada para pruebas de detección de este anticuerpo en suero de pacientes (Ben- Mahrez *et al.*, 1988).

Se ha demostrado que la DNA polimerasa haloarqueal reacciona con anticuerpos frente al producto oncogénico *v-myc* indicando una posible relación entre la proteína myc y esta enzima (Sorokine *et al.*, 1991).

La cepa *Halobacterium* GRB-1 aloja un plásmido, pGRB-1 (Ebert *et al.*, 1984), que puede ser utilizado en la búsqueda de nuevos antibióticos y fármacos antitumorales que afecten a la DNA topoisomerasa tipo II eucariota (epipodofilotoxinas), así como fármacos con estructura de quinolonas, que actúan sobre la DNA girasa. “*In vivo*” estos fármacos causan la relajación y división del DNA de pequeños plásmidos de arqueas halófilas (Sioud *et al.*, 1987), por lo tanto actúan sobre arqueas como lo harían sobre bacterias y eucariotas.

Otros fármacos antitumorales como la antraciclina y daunorubicina pueden detectarse con el mismo sistema debido al cambio que producen en la movilidad electroforética del plásmido, permitiendo una rápida evaluación del grado o tipo de actividad (Forterre *et al.*, 1984).

3. 7. 3. Proteínas retinales.

Alguna de las posibles aplicaciones de las proteínas retinales es la utilización de la bacteriorrodopsina como material de registro óptico y como elemento molecular computacional.

Esta proteína podría emplearse también como membrana artificial capaz de convertir la luz solar en electricidad (Prentis, 1981; Rodríguez-Valera, 1992). Así, la bacteriorrodopsina puede actuar de una forma similar a la película fotográfica clásica. La membrana púrpura de *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) contiene bacteriorrodopsina y se está produciendo comercialmente desde GmbH

(Consortium für Electrochemische Industrie) en Alemania y empleándose en el procesamiento de datos ópticos (Ventosa y Nieto, 1995).

En el campo de la informática hallamos otra posible aplicación de la bacteriorrodopsina, como elemento computacional. Los microchips basados en silicón alcanzan rápidamente un límite en miniaturización y velocidad debido a sus limitaciones físicas (Moses y Cape, 1991). Los “biochips” se caracterizan porque los elementos computacionales son proteínas u otras biomoléculas y han sido propuestos como alternativa al chip electrónico (Moses y Cape, 1991).

La bacteriorrodopsina es un material muy interesante con el cual desarrollar un ordenador óptico biomolecular donde los dos estados alternativos del motociclo actúan como un interruptor óptico análogo al estado conductivo/no conductivo en un semiconductor (Rodríguez-Valera, 1992).

3. 7. 4. Enzimas.

Las exoenzimas que degradan polímeros son de gran interés comercial. Hay varias enzimas de este tipo producidas por haloarqueas. Presentan su actividad óptima en condiciones de alta salinidad y, por tanto, podrían utilizarse en muchos procesos industriales donde la concentración salina inhibe muchas conversiones enzimáticas. La concentración intracelular de sal, principalmente de KCl, para las haloarqueas es superior de 3,5 M (Kushner, 1985). Por lo tanto sus enzimas están adaptadas a funcionar con un bajo potencial de agua y además son termotolerantes (Oren, 1983a), permaneciendo estables a temperatura ambiente por períodos prolongados de tiempo.

Las exoenzimas descritas incluyen la producción de amilasas por *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) (Good y Hartman, 1970) y *Halorubrum sodomense* (Oren, 1983b), proteasas de *Halobacterium salinarum* (Norberg y Hofsten, 1969) y *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) (Isotova *et al.*, 1983) y lipasas de varias haloarqueas (González y Gutiérrez, 1970).

También se ha encontrado en *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) y otras haloarqueas una actividad endonucleasa específica (Schinzel y Burger, 1986).

Igualmente, están disponibles a nivel comercial otras restrictasas aisladas a partir de *Halorubrum cutirubrum* (hoy *Halobacterium salinarum*) (HcuI), *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) (HhII) y *Halobacterium salinarum* (HsaI). La utilización de arqueas halófilas extremas para la búsqueda de nuevas restrictasas y otras enzimas para biología molecular parece ser una de las aplicaciones más prometedoras (Ventosa y Nieto, 1995).

3. 7. 5. Degradación de compuestos tóxicos.

Frecuentemente los ambientes hipersalinos se contaminan con compuestos tóxicos. Encontrar microorganismos capaces de degradar estos compuestos para aplicarlos en el tratamiento biológico de efluentes industriales altamente salinos es otra potencial aplicación de estos microorganismos. La haloarquea EH4, aislada desde un pantano salino en el sur de Francia, ha demostrado capacidad de degradar alcanos (tetradecano, hexadecano, heneicosano y pristano) e hidrocarburos

aromáticos (acenafteno, fenantreno, antraceno y 9-metilantraceno) (Bertrand *et al.*, 1990). En estos estudios, el mejor porcentaje de degradación (62%) se obtuvo sobre eicosano, en medios preparados con agua tomada del pantano (3,5M de NaCl). Los compuestos aromáticos se degradaron al menos entre un 19 y 24%. Otras cepas pertenecientes al género *Haloferax* han demostrado poseer una alta capacidad degradativa.

3. 7. 6. Recuperación del petróleo.

El petróleo residual en campos de petróleo naturales pueden ser extraídos por inyección de agua a presión hacia un nuevo pozo. El agua desplaza el petróleo y lo empuja a la superficie a través de uno de los pozos originales. La eficiencia de este proceso puede maximizarse incrementando la viscosidad y disminuyendo la tensión superficial del agua utilizada. Los polímeros bacterianos pueden ser aplicados en este proceso debido a sus propiedades biosuperficiales y emulsificantes (Cooper, 1986). Los lípidos de membrana de arqueas presentan muchas propiedades relevantes: los lípidos con unión éter poseen muy bajo punto de fusión, son resistentes a la degradación por ácidos, álcalis y calor y tienen capacidad emulsificante con un adecuado balance hidrófilo-lipófilo, lo cual produce una buena emulsión entre agua y petróleo (Post y Collins, 1982).

3. 7. 7. Polisacáridos.

Algunas arqueas también producen exopolisacáridos, *Haloferax mediterranei* produce un heteropolisacárido ácido y altamente sulfatado que contiene manosa como componente principal (Anton *et al.*, 1988).

Este polímero combina excelentes propiedades reológicas con una notable resistencia a condiciones extremas de salinidad, temperatura y pH (Anton *et al.*, 1989). Por tanto tiene un gran potencial, por ejemplo, como agente emulsificante y controlador de movilidad en la limpieza de vertidos y en los procesos de recuperación del petróleo.

3. 7. 8. Producción de bioplásticos.

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son una heterogénea familia de poliésteres utilizados para almacenar reservas de carbono que pueden emplearse como termoplásticos.

Entre las ventajas de los PHAs destacan su biodegradabilidad y biocompatibilidad. Esta puede ser útil en aplicaciones químicas y farmacéuticas, desde retrasar la liberación de los fármacos (Fraser *et al.*, 1989) a la reposición de huesos y suturas quirúrgicas (Danson *et al.*, 1992b).

Algunas especies de haloarqueas acumulan cantidades significativas de PHA (Danson *et al.*, 1992b). *Haloferax mediterranei* tiene numerosas ventajas como productor cuando se compara con *Alcaligenes eutrophus* (hoy *Ralstonia eutrophus*). Las cantidades de PHA acumulado en relación a la fuente de carbono son similares, pero *H. mediterranei* puede usar almidón como fuente de carbono, sustrato mucho más barato que la glucosa (Keeler, 1991).

Especies del género *Haloferax* también presentan un rápido crecimiento y gran versatilidad fisiológica (Rodríguez-Valera y Ruiz Berraquero, 1983), permitiendo un cultivo con poco riesgo de contaminación. Otra

consideración importante sobre las haloarqueas es que poseen una alta estabilidad genómica, lo cual es un pre-requisito para los procesos industriales (Lillo y Rodríguez-Valera, 1990; Rodríguez-Valera y Lillo, 1992).

3. 7. 9. Vesículas de gas.

Las vacuolas o vesículas de gas producidas por algunas arqueas halófilas extremas proporcionan flotabilidad a estos microorganismos (Walsky, 1994). Las colonias rosas opacas son típicas de las cepas vacuoladas (vac+), mientras que las mutantes (vac-) forman colonias naranjas o translúcidas. Se ha determinado la localización genómica de los genes de las vesículas de gas en *Halobacterium halobium* (hoy *Halobacterium salinarum*) y otras haloarqueas (DasSarma *et al.*, 1987; Pfeifer y Englert, 1992). Se ha sugerido que la síntesis de las vesículas de gas se realiza a través de una compleja vía que involucra 13 ó 14 genes. Conocer el mecanismo de regulación, ensamblaje y estructura posibilitaría la introducción de esta característica mediante técnicas de ingeniería genética. El potencial biotecnológico de este proceso reside en que permitiría resolver el problema de sedimentación de los microorganismos en los fermentadores y, por tanto, disminuir la agitación (Ventosa y Nieto, 1995).

4. LIPOSOMAS.

4. 1. Introducción a los sistemas de vectorización de fármacos.

Se define vectorización como la forma de conseguir la máxima eficacia de un fármaco, al aumentar en lo posible su liberación en la zona donde se encuentran sus receptores farmacológicos, disminuyendo al mínimo su concentración en otras zonas del organismo, con lo que se reducen los efectos adversos (Torrado y Cadórniga, 1989).

Los sistemas de vectorización de fármacos se clasifican en base a su magnitud estructural, considerándose dos grandes grupos: vectores macromoleculares y vectores de tamaño de partícula.

Los vectores macromoleculares pueden ser moléculas de origen natural (Holgado *et al.*, 1990) como ácidos nucleicos (DNA), inmunoglobulinas específicas, anticuerpos específicos, eritrocitos resellados, hormonas peptídicas, dextrano y polisacáridos entre otros. También pueden ser moléculas sintéticas como los polímeros del alcohol vinílico y sus derivados o polipéptidos de alanina, tiroxina o lisina. Estos transportadores presentan la ventaja de ser biodegradables y, generalmente, endocitables. De este modo ha sido posible asociar ciertos citostáticos a inmunoglobulina G o DNA, permitiendo reducir la toxicidad intrínseca de la sustancia activa. Las limitaciones más importantes de estos vectores son su capacidad de unión limitada a un número reducido de agentes y que la afinidad de la

molécula transportadora por ciertos receptores celulares puede quedar atenuada cuando este vector está ligado a un fármaco (Puisieux, 1978; Mezei, 1985).

Dentro de los sistemas de tamaño de partícula se establecen dos grupos: vectores microparticulares, donde se incluyen las microesferas, microcápsulas y partículas de látex, y vectores nanoparticulares, integrados por nanocápsulas, nanoesferas, niosomas y liposomas (Puisieux, 1985).

4. 2. Generalidades sobre liposomas.

Los liposomas son vesículas microscópicas constituidas por bicapas fosfolípídicas concéntricas alternando con compartimentos acuosos. En las bicapas, los fosfolípidos se disponen orientados con las cadenas hidrófobas situadas paralelamente entre sí (lo cual constituye una capa) y enfrentadas a las cadenas hidrófobas de la otra capa. Todas las cabezas polares se hallan en ambos lados, lo cual forma una estructura concéntrica, alternando esta zona hidrófoba con compartimentos acuosos. Esta distribución resulta similar a las micelas originadas por la ordenación de las moléculas tensioactivas en medio acuoso con una importante diferencia: las micelas conforman una esfera cuya cavidad interna puede contener lípidos (por estar en contacto con las cadenas hidrófobas), mientras que la cavidad interna de los liposomas sólo contiene agua o una solución acuosa de un principio activo (Maierhofer, 1988; Gregoriadis, 1990).

Su forma, estructura y tamaño son diversos, aunque sus dimensiones suelen oscilar entre 0.01 μm y 10 μm . La observación de estos vectores mediante microscopía electrónica de transmisión (Figura 1.5) pone de

manifiesto una morfología esferoide, revelando la presencia de una serie de zonas claras y oscuras, debido a la alternancia entre capas lipídicas y acuosas. Dada su constitución, tienen la capacidad de captar una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas (Puisieux *et al.*, 1982).

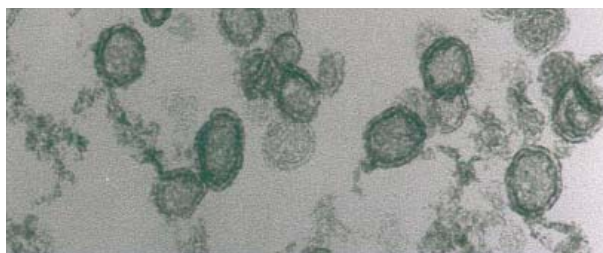


Figura 1. 5. Liposomas visualizados por microscopía electrónica.

La estructura de los liposomas favorece la captación de una amplia gama de agentes activos, mediante un mecanismo relativamente específico. Esto proporciona una vía de transporte del fármaco al lugar de actuación, a concentraciones adecuadas, con objeto de obtener la respuesta farmacológica deseada en condiciones óptimas de eficacia y seguridad. Asimismo, la posibilidad de determinar el lugar de actuación de los liposomas por modificación de sus características superficiales, permite optimizar la disposición de las moléculas administradas a receptores específicos restringiendo su área de difusión en el organismo y evitando una distribución innecesaria de las mismas (Gregoriadis, 1976). Además, aíslan el fármaco del medio durante su paso por el organismo, protegiendo simultáneamente al principio activo de acciones enzimáticas y al organismo frente a los efectos tóxicos derivados de la actuación de ciertos agentes terapéuticos (Giomini *et al.*, 1979; Davis, 1981). Todas estas características proporcionan a los liposomas una capacidad potencial para el transporte de agentes quimioterapéuticos (Sharata y Katz, 1996).

4.3. Características y tipos.

4.3.1. Estructura.

Como características más relevantes de los liposomas destacan (Puisieux, 1978):

- su pared, formada por moléculas fosfolipídicas que originan una doble capa (Figura 1.6);

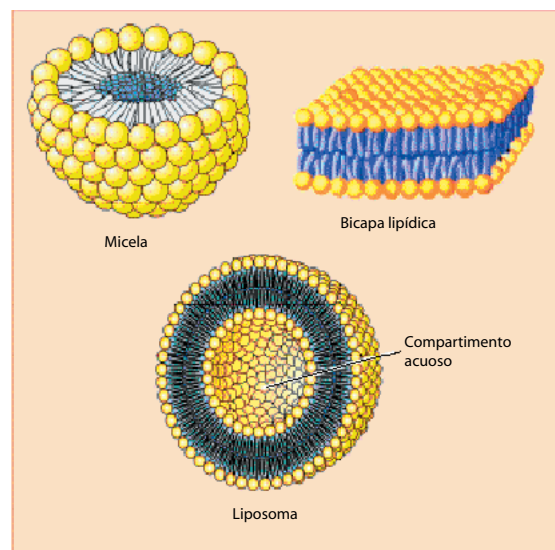


Figura 1. 6. Esquema de una micela, una bicapa lipídica y un liposoma.

- la orientación de los fosfolípidos es tal que el polo hidrófilo se dispone hacia el medio acuoso y el polo lipófilo se sitúa hacia el interior de la bicapa;

- el medio acuoso y cualquier otra sustancia hidrófila ocupan el compartimento central del liposoma, mientras que las sustancias lipófilas se sitúan entre los fosfolípidos de la pared y las anfífilas se unen por el resto lipófilo a las bicapas lipídicas.

4.3.2. Composición.

Los componentes que pueden participar en la formación de los liposomas son fosfolípidos, colesterol, lípidos iónicos (aniónicos o catiónicos) y otros como glicolípidos, esteroides, etc.

A) Fosfolípidos.

Los fosfolípidos o lípidos anfipáticos son ésteres de ácidos grasos cuyo componente alcohólico contiene un grupo fosfato (Figura 1.7). Están formados por dos cadenas de ácidos grasos esterificadas con los grupos hidroxilo 1 y 2 de una molécula de glicerina. El hidroxilo 3 de esta glicerina está esterificado a su vez con una molécula de ácido fosfórico, cuya carga ácida está salificada con una base. Las bases más frecuentes son la colina y la etanolamina que originan, respectivamente, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina o bien moléculas del tipo serina e inositol, formándose la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol.

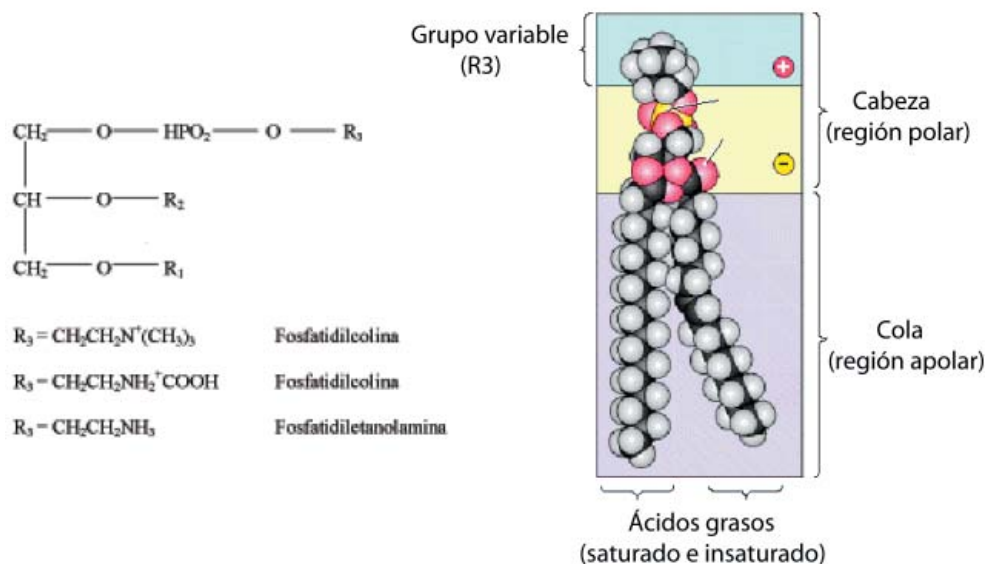


Figura 1.7. Esquema y fórmula estructural de los fosfolípidos.

Los fosfolípidos poseen, por tanto, dos colas hidrófobas y un grupo polar o “cabeza” unido a ambas cadenas. Estas últimas suelen ser un ácido graso saturado (palmítico o esteárico) y un ácido graso insaturado (oléico, linoléico o araquidónico) (Maierhofer, 1988; Dufourc, 1985).

También existen y se emplean fosfolípidos semisintéticos cuya composición se conoce exactamente como son la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (Fang *et al.*, 1999), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC) (Hanin y Pepeu, 1990). Tiene especial interés estos productos obtenidos tras la purificación de lecitinas hidrogenadas con lo que se reduce el número de factores que influyen en la encapsulación (Kulkarni y Vargha-Butler, 1995).

La principal fuente de fosfolípidos es la lecitina, sustancia natural obtenida de las habas de soja o de la yema de huevo. La composición de la lecitina y sus propiedades físicas pueden variar enormemente según la fuente de obtención y el grado de purificación. La lecitina de huevo suele contener un 69% de fosfatidilcolina y un 24% de fosfatidietanolamina y la lecitina de soja con un 21% de fosfatidilcolina, un 22% de fosfatidiletanolamina y un 19% de fosfatidilinositol (Ash y Ash, 1995).

La consistencia de las lecitinas varía ampliamente según el contenido en ácidos grasos libres desde líquidos viscosos hasta sólidos pulverulentos, pasando por masas ceras. El color puede oscilar del blanco al amarillo o marrón. Los fosfolípidos no presentan olor, aunque las lecitinas vegetales tienen un olor y gusto similar al del aceite de cacahuete (Wade y Weller, 1994).

Los fosfolípidos son prácticamente insolubles en aceites fríos, disolventes polares y agua. Son solubles en hidrocarburos alifáticos y aromáticos, hidrocarburos halogenados (cloroformo), aceites minerales, ácidos grasos, éter y éter de petróleo (Lehninger, 1988)

Al dispersarlos en agua, los fosfolípidos adquieren distintas formas de agregación según el pH, temperatura, fuerza iónica, presencia de sustancias cargadas y colesterol; así se origina espontáneamente una estructura de capa bimolecular debido al carácter anfipático de los fosfolípidos (De Gier *et al.*, 1969).

Para la formación de liposomas es necesario que los fosfolípidos superen su temperatura de transición crítica (T_c), a la cual las cadenas acílicas grasas de los fosfolípidos son líquidas. Esta temperatura es característica de las bicapas lipídicas y está asociada al paso del estado de gel (estado ordenado de las cadenas grasas de los fosfolípidos) al estado cristal-líquido (más desordenado debido a la fusión de las cadenas). La temperatura de transición crítica depende de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas, aumentando constantemente cuando estas crecen de C_{10} a C_{18} (Gómez Fernández y Goñi, 1983).

B) Colesterol.

Un factor que condiciona la permeabilidad y fluidez de las bicapas lipídicas y así como, la estabilidad de los liposomas es la presencia de colesterol en éstas. Los fosfolípidos pueden incorporarlo hasta una concentración molar del 50%. Por encima de este valor los liposomas son metaestables (entre gel y cristal-líquido) y las vesículas tienden a agregarse y precipitar; además se forman cristales de colesterol y

disminuye la razón molar colesterol/fosfolípidos. Las modificaciones por la adición de colesterol sobre las características de la membrana liposomal dependen de su estado inicial (Figura 1.8), es decir, cuando se trata de la fase de cristal líquido (temperatura $> T_c$) el colesterol se inserta en las cadenas lipídicas y aumenta el empaquetamiento entre los fosfolípidos y la permeabilidad disminuye. En el estado de gel (temperatura $< T_c$) el colesterol se inserta junto a las cabezas polares, de este modo la fluidez de las cadenas y la permeabilidad se ve aumentada (Yatvin y Lelkes, 1982).

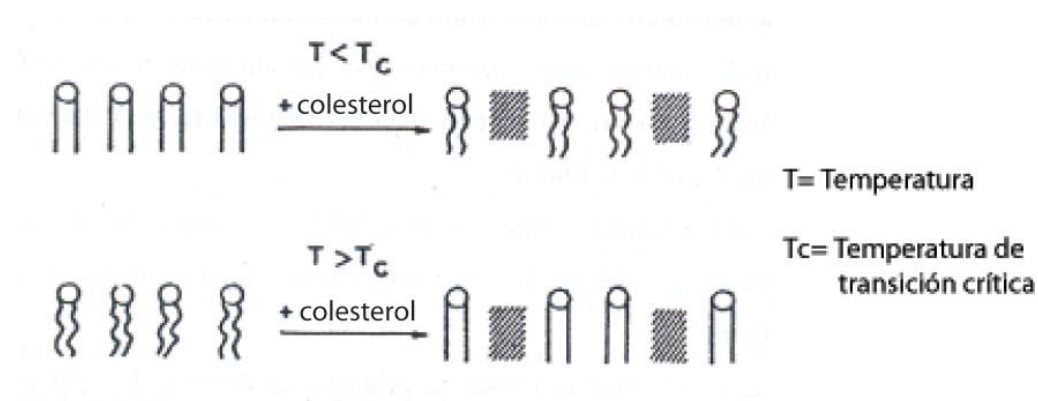


Figura 1. 8. Modificación de las membranas liposomiales por adición de colesterol.

C) Lipoides iónicos.

La adición de compuestos iónicos confiere a los liposomas una carga positiva o negativa, lo que implica una repulsión electrostática entre las diferentes bicapas de la vesícula. Como resultado aumenta el espacio interlaminar para la captación de sustancias hidrófilas (Puisieux, 1985).

Los utilizados pueden ser:

- aniónicos: ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, diacetilfosfato.
- catiónicos: esfingomiélin.

D) Otros componentes.

Se están utilizando polímeros como los polietilenglicoles para incrementar la vida media plasmática de los liposomas y reducir su acumulación en el sistema retículo endotelial (SRE) (Lasic, 1993; Laverman *et al.*, 2000). Se han obtenido resultados similares con otros polímeros sintéticos como la polietiloxazolina (Zalipsky *et al.*, 1996).

4.3.3. Formación del liposoma.

La formación de bicapas a partir de fosfolípidos se da de manera rápida y espontánea en el agua a causa de:

- las interacciones hidrofóbicas, que son las fuerzas dirigentes principales,
- la interacción de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas,
- la interacción electrostática entre el grupo polar y el agua (Giomini *et al.*, 1979) (Figura 1.9).

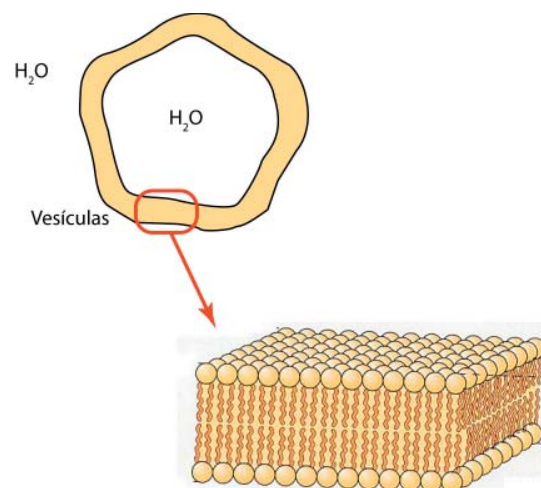


Figura 1.9. Formación del liposoma.

Las moléculas de agua son liberadas de las colas hidrocarbonadas a medida que quedan secuestradas en el interior apolar de la bicapa; esta liberación da como resultado un gran aumento en la entropía. Los fosfolípidos se agregan para formar liposomas debido a la tendencia del medio acuoso circundante a adquirir el estado de máxima entropía en el que las moléculas lipídicas se disponen de forma que reducen al mínimo el número de cadenas hidrocarbonadas expuestas al agua. De esta forma, las bicapas lipídicas tienden a cerrarse en sí mismas, de tal manera que no existan extremos con cadenas expuestas, lo que da como resultado la formación de un compartimento central acuoso. La cabeza polar del fosfolípido se orienta hacia la fase acuosa, en tanto que la región hidrófoba se sitúa fuera del contacto del agua (Stryer, 1976).

4. 3. 4. Estabilidad.

Los liposomas poseen una estructura estable ya que en ellos los fosfolípidos en agua se encuentran en el estado más estable termodinámicamente. No obstante, su conservación es un fenómeno complejo.

Químicamente es posible la autooxidación de los fosfolípidos de los liposomas, especialmente de los que contienen ácidos grasos con dobles enlaces. Este proceso puede verse favorecido por la presencia de metales, luz y pH elevado e inhibido por agentes quelantes (EDTA) (Uster, 1997) y antioxidantes (α -tocoferol y ácido ascórbico) (Hunt y Tsang, 1981; Medina *et al.*, 1986; Maierhofer, 1988; Gal *et al.*, 2003). Otro factor relevante en este aspecto es la hidrólisis de los ácidos grasos que depende del tiempo, la temperatura y el pH y se minimiza a pH = 6,5 (Frokjaer *et al.*, 1982).

Físicamente, el principal problema consiste en la agregación de los liposomas, modificándose las características de permeabilidad de la pared lipídica con la consiguiente liberación del principio activo captado. Este factor puede controlarse aportando carga eléctrica negativa al liposoma mediante la adición de pequeñas cantidades de lípidos aniónicos. El empleo de lípidos catiónicos como la estearilamina confiere carga positiva al liposoma aunque su toxicidad limita su uso.

Una de las posibles soluciones a este problema sería la liofilización, que permitiría asegurar la conservación durante 18 meses (Szoka y Papahadjopoulos, 1978; Gordon *et al.*, 1982; Michelland-Henry *et al.*, 1983).

También se ha propuesto la congelación como método de conservación combinada con el empleo de crioprotectores (glicerol, lactosa, manitol, dimetilsulfóxido) a bajas concentraciones (Gordon *et al.*, 1982; Crommelin *et al.*, 1983; Puisieux *et al.*, 1982; Medina *et al.*, 1986).

Respecto a la liberación prematura del principio activo, depende fundamentalmente de su naturaleza, tamaño molecular y solubilidad, así como de la temperatura.

Para mejorar la estabilidad del sistema suele incorporarse colesterol a la bicapa lipídica, detectándose un descenso en la permeabilidad de la membrana liposomal (Kunikazu, 2000; Fang *et al.*, 1997; Virtanen *et al.*, 1995). Este efecto se manifiesta con mayor intensidad cuanto más larga es la cadena de carbonos del o de los lípidos constituyentes de las

bicapas. La presencia de compuestos cargados o proteínas en el medio aumenta la permeabilidad e inestabilidad (Maierhofer, 1988).

Entre las innovaciones realizadas en la formulación de liposomas destinados a la aplicación por vía tópica para mejorar su estabilidad destaca el empleo de esfingolípidos y otras sustancias de carácter anfifílico (Seijo *et al.*, 1992).

4. 3. 5. Clasificación.

Se establece la clasificación de los liposomas en función de su tamaño, modo de obtención y número de compartimentos (Puisieux, 1978; Puisieux *et al.*, 1982; Dousset y Douste-Blazy, 1985):

A) Plurilaminares o pluricompartimentales.

También denominados vesículas multilaminares (MLV), poseen varios compartimentos acuosos concéntricos (Figura 1.10). El diámetro de estas vesículas oscila entre 0,1- 10 μm , influyendo las condiciones de obtención. La distancia entre las capas lipídicas es función de la

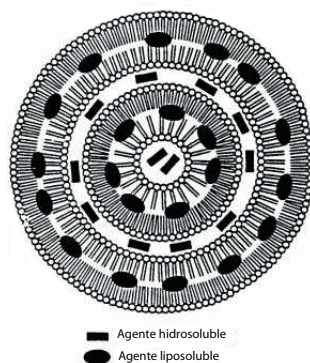


Figura 1. 10. Estructura de los liposomas plurilaminares.

naturaleza de la pared y condiciona el volumen de las capas acuosas. Su formación se produce cuando se dispersan los fosfolípidos en un exceso de solución acuosa donde es sometido a agitación (Bangham *et al.*, 1965). Recientemente han sido utilizados por Vemuri y Rhodes, 1995; Yu y Liao, 1996; Schramlova *et al.*, 1997.

A partir de liposomas MLV se pueden obtener liposomas plurilaminares multivesiculares (PML) sometiendo a los primeros a un proceso de microfluidificación. La estructura característica de estas vesículas podría definirse como la de un liposoma multilaminar que engloba en su interior otros liposomas multilaminares. Su tamaño oscila entre 150-250 nm (Marti *et al.*, 1998).

B) Unilaminares o unicompartmentales.

Sólo poseen un compartimento central acuoso y una bicapa lipídica (Figura 1.11). Según su tamaño se dividen en:

- **microvesiculares o vesículas unilaminares de pequeñas dimensiones** (SUV), cuyo diámetro es unas 40 veces menor que el de los plurilaminares y que suelen obtenerse mediante tratamiento con ultrasonidos de una suspensión de MLV (Giomini *et al.*, 1979) o mediante tecnología Deshidratación Rehidratación Vesicular (DRV) (Kirby, 1984).



Figura 1. 11. Esquema de un liposoma unilaminar.

- **macrovesiculares o vesículas unilaminares de grandes dimensiones** (LUV), que destacan por su capacidad para vehicular una cantidad algo superior de agua y de principio activo hidrosoluble. Su diámetro oscila entre 0,2- 1 μm y su capacidad de encapsulación es 10 veces mayor que los plurilaminares y 40 veces superior a la de los microvesiculares.

4. 4. Importancia del tamaño y de la carga iónica de los liposomas.

Se ha demostrado que existe una disminución en el porcentaje de encapsulación al aumentar el tamaño de los liposomas (Fang *et al.*, 1997), por lo cual tiene gran importancia el tamaño de las vesículas formadas así como su homogeneidad. Ambos parámetros influyen en la velocidad y mecanismo de eliminación, generándose una eliminación en dos fases si hay heterogeneidad de tamaños. La fracción de menor diámetro se elimina más lentamente (Schneider, 1978; Santos y Guerrero, 1994). Sobre la liberación de la sustancia vehiculizada en los liposomas también interviene el tamaño de los mismos: la liberación de solutos hidrosolubles es más lenta en los liposomas de mayor tamaño (Suárez *et al.*, 1998).

En la práctica es importante determinar si el método de preparación permite obtener un tamaño de liposomas compatible con la acción terapéutica deseada. En este sentido se realizaron estudios “in vitro” sobre la influencia del tamaño de los liposomas observando su fagocitosis por células macrófagas peritoneales de ratón (Mattenberger-Kreber *et al.*, 1976) sólo en vesículas mayores de 100 nm.

También es importante considerar la influencia que tiene la carga iónica de las vesículas liposómicas en su permeación cutánea. La aplicación tópica de liposomas cargados positivamente duplica la cantidad de lípidos depositados en las capas más profundas de la piel en comparación con los liposomas cargados negativamente. Sin embargo también debe tenerse en cuenta que la aplicación de formulaciones que poseen una carga neta positiva sobre la piel puede inducir un marcado grado de irritación cutánea.

4. 5. Vehículo de sustancias activas.

Se considera que un vehículo ideal de sustancias activas debe poseer las siguientes cualidades: ser biodegradable y atóxico, tanto el como sus metabolitos. Debe poseer la forma y tamaño más convenientes para la incorporación del principio activo y su absorción por las células del receptor. También debe conferir protección y aislamiento a las sustancias activas desde el lugar de administración hasta la biofase. Debe estar dotado de cierto tropismo por la célula “diana”. En definitiva, el vehículo ideal sería aquel cuyo destino fuera fácilmente modificable en función de la molécula administrada y del lugar de acción (Puisieux, 1978).

Los liposomas tienen una tendencia natural a ligarse a determinados tipos de tejidos y células, lo cual permite incrementar al máximo la eficacia terapéutica del fármaco administrado y reducir al mínimo los efectos sistémicos no deseados. Constituyen un medio útil para proteger productos lábiles biológicamente activos y las dosis eficaces de un fármaco se pueden reducir de forma espectacular cuando se administra en un preparado liposomal (Maierhofer, 1988).

La eficacia en la encapsulación es función de diversos factores, entre los que cabe destacar el tipo de vesícula, la composición de la pared lipídica, concentración de los fosfolípidos directamente proporcional a la cantidad de fármaco encapsulado (Fang *et al.*, 1997), la carga del liposoma, así como la naturaleza del material a transportar (Dousset y Douste-Blazy, 1985). En este aspecto se ha apreciado que la capacidad de encapsulación en liposomas multilaminares de distintos esteroides se ve influenciada por su hidrofobicidad, solubilidad acuosa, peso molecular y concentración inicial (Kulkarni y Vargha-Butler, 1995).

Las moléculas altamente polares y relativamente pequeñas son atrapadas en el compartimento acuoso siempre que no interfieran en la formación de los liposomas y su tamaño sea compatible con las dimensiones de los espacios acuosos, entre los planos de las cabezas de los grupos hidrófilos (Gregoriadis, 1976). Las moléculas no polares son intercaladas entre las bicapas, mientras que las anfifílicas se fijan a la vesícula por su resto lipófilo (Figura 1.12). La extensión y lugar de unión dependen, fundamentalmente, de las interacciones electrostáticas e hidrófobas (Puisieux, 1978).

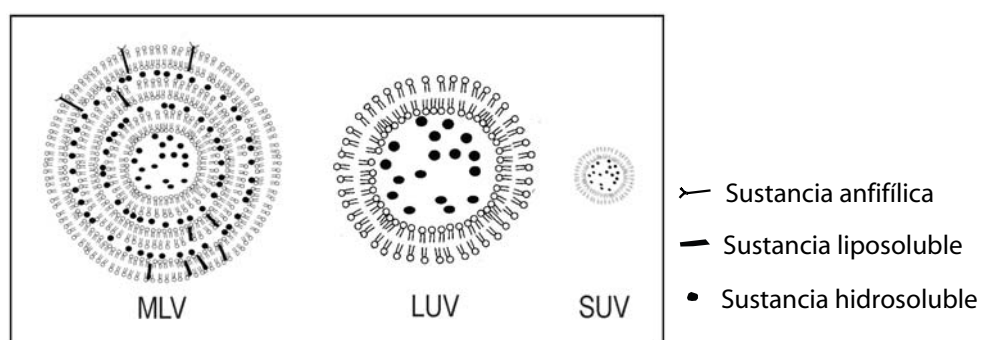


Figura 1. 12. Incorporación de moléculas de distinta naturaleza en liposomas plurilaminares (MLV) y unilaminares grandes (LUV) y pequeños (SUV).

Algunos inconvenientes limitan la utilización de los liposomas (Betageri *et al.*, 1993). Además de los problemas de estabilidad, los liposomas presentan una débil capacidad de encapsulación y poder protector limitado. Asimismo, estudios de distribución tisular demuestran su acumulación casi exclusiva a nivel hepático y esplénico, lo cual reduce la disponibilidad del vector para otros órganos.

Para conseguir dirigir adecuadamente a los liposomas se utilizan diversos sistemas (Longer y Robinson, 1987), como la fijación de anticuerpos a la superficie del liposoma (Klegerman *et al.*, 2002) o el uso de determinantes hidrocarbonados (glucoproteínas o glucolípidos de la superficie celular) como sitios de reconocimiento (Shao y Ma, 1997).

En este mismo sentido se está intentando aumentar la afinidad de los liposomas por un tejido determinado mediante la modificación de su carga eléctrica (Gregoriadis, 1995) ya que la unión de liposomas a algunas superficies puede ser mediada por interacciones electrostáticas.

4. 6. Métodos de preparación.

Ante todo el método de preparación debería ser sencillo, estandarizado, reproducible y con una buena relación entre coste y eficacia. Existen variables que permiten obtener liposomas de distintos tipos (Dousset y Douste-Blazy, 1985), no sólo en lo que se refiere a su tamaño o laminaridad sino también en cuanto a sus características superficiales o su capacidad para incorporar ingredientes activos.

Al seleccionar los componentes y el método de elaboración más adecuado para obtener liposomas con unas determinadas propiedades,

debe considerarse que:

1) A mayor concentración de lípidos, mayor será la capacidad de encapsulación de fase acuosa.

2) Se produce un aumento de la vida media del liposoma al emplear una concentración lipídica superior.

3) El índice de encapsulación se eleva cuanto más lenta sea la hidratación del lípido.

4) Se puede aumentar la distancia entre las membranas lipídicas mediante la adición de fosfolípidos cargados.

5) Se ha estudiado la formación de liposomas con lípidos cuya temperatura de transición es fácilmente alcanzable ya que hay métodos físicos que elevan la temperatura de una determinada zona corporal, favoreciendo la liberación del principio activo en esa zona de forma selectiva y evitando los efectos colaterales en otras zonas (Pons Gimier y Parra, 1995).

Por tanto el procedimiento de fabricación deberá elegirse, en cada caso concreto, teniendo en cuenta sobre todo la composición, el tipo de vesícula y la naturaleza del principio activo que se pretenda incluir en el sistema.

4. 6. 1. Liposomas plurilaminares (MLV).

En 1974, Bangham *et al.* propusieron un método para la obtención de este tipo de vesículas. Podemos resumir de la siguiente forma las etapas de las que consta el método (Figura 1.13):

1) El fosfolípido o la mezcla de fosfolípidos y el resto de los componentes de la pared lipídica se solubilizan en un disolvente orgánico volátil.

2) Por evaporación a vacío del disolvente, se forma sobre las paredes del matraz una película lipídica.

3) Se vierte una solución acuosa, normalmente tamponada, para hidratar los lípidos con una ligera agitación y a una temperatura ligeramente superior a la de transición del lípido o, en el caso de las mezclas de fosfolípidos, a la mayor temperatura de transición de la mezcla lipídica. Así se logra la formación de una suspensión de liposomas en el exceso de solución acuosa.

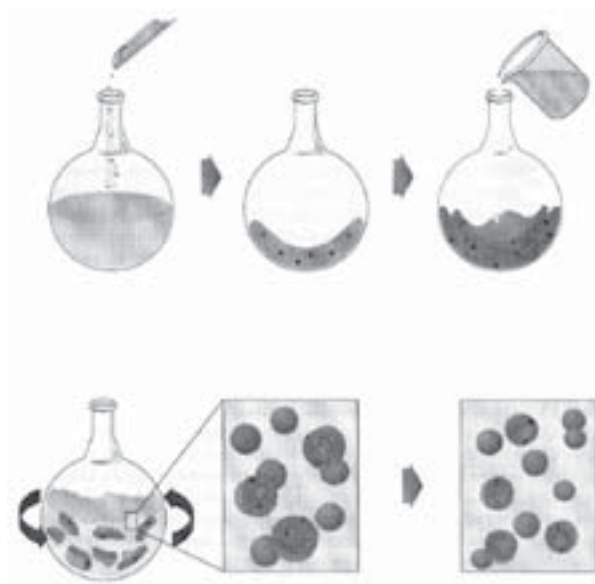


Figura 1. 13. Fases del método de Bangham para la obtención de MLV.

La incorporación del agente a encapsular se realiza en función de la naturaleza del mismo: las sustancias hidrófilas se incorporan en la fase acuosa; cuando se trata de un principio activo lipófilo se añade al inicio, en la solución orgánica. La facilidad de preparación y una aceptable eficacia en la encapsulación son, probablemente, las principales razones de que su empleo esté muy extendido. El principal inconveniente de este método reside en la heterogeneidad del tamaño de los liposomas

obtenidos (Olson *et al.*, 1984) aunque pueden presionarse a través de filtros para mejorar la distribución de tamaños.

4. 6. 2. Liposomas unilaminares microvesiculares (SUV).

Para su obtención se emplean fundamentalmente los siguientes métodos:

- irradiación con ultrasonidos,
- inyección de una solución etanólica,
- eliminación del detergente y
- extrusión a alta presión (Puissieux y Delattre, 1985).

4. 6. 3. Liposomas unilaminares macrovesiculares (LUV).

Los métodos de preparación utilizados son, entre otros, los citados a continuación:

- infusión en éter,
- fusión inducida por calcio,
- evaporación en fase reversa,
- microfluidificación e
- inyección coaxial turbulenta.

4. 7. Separación de la fracción no encapsulada.

Como ya hemos referido anteriormente, la capacidad de encapsulación de los liposomas es limitada y, por consiguiente, siempre quedara una parte de fármaco no incorporada en las vesículas lipídicas. La separación de la fracción no captada puede llevarse a cabo por cromatografía en gel, HPLC (Fang *et al.*, 1997), centrifugación, diálisis o ultrafiltración (Puissieux, 1978).

En la filtración a través de los geles aparecen dos picos bien diferenciados: uno correspondiente a los liposomas y el otro al principio activo sin encapsular. Los inconvenientes de esta técnica se deben a que, durante la separación, se produce una dilución de la dispersión liposomal y a la posibilidad de que se produzcan fenómenos de adsorción lipídica en el lecho filtrante (Medina *et al.*, 1984).

Las condiciones óptimas de la centrifugación dependen del tamaño de los liposomas. En el caso de MLV, una centrifugación a 700 g durante 10 minutos es suficiente para separarlos del medio acuoso externo. La sedimentación de dispersiones unilaminares requiere velocidades y tiempos superiores (Frokjaer *et al.*, 1982; Puissieux y Delattre, 1985). Más recientemente se ha constatado una separación por simple lavado con solución salina (Vemuri y Rhodes, 1995).

4. 8. Caracterización de los liposomas.

La caracterización de suspensiones liposomiales tiene por objeto, fundamentalmente, conocer con precisión el tipo de estructura obtenido, su composición, tamaño, homogeneidad, estabilidad, volumen de encapsulación (Bangham *et al.*, 1965) y rendimiento final de la técnica de elaboración. Existen distintos métodos para esta caracterización:

- Microscopía electrónica de transmisión, incorporando a la muestra diversas soluciones de sales de metales pesados (ácido fosfotúngstico y ósmico, molibdato amónico, acetato de uranilo, etc.) para aumentar así el grado de dispersión electrónica (tinción negativa) (Hinkle *et al.*, 1978; Lasic *et al.*, 1980; Medina *et al.*, 1984 y 1986; Bula y Ghaly, 1995).

- Técnicas espectroscópicas de dispersión láser, para el análisis de forma y tamaño (Fairbrother, 1979).

- Espectroscopia de resonancia electroparamagnética, usando liposomas spin para evaluar las características de las bicapas lipídicas y su influencia en los enzimas vinculados a las membranas (Pecar, 1980).

- Resonancia magnética nuclear, para el estudio de las funciones dependientes de la estructura y dinámica de la fase lipídica, así como diversas interacciones (Kidric, 1980; Lasic, 1980).

- Modelos matemáticos para el cálculo del área superficial total, porcentaje de encapsulación, volumen específico parcial de los lípidos integrantes y frecuencia de distribución de la población (Pidgeon y Hunt, 1981).

- Técnicas de fluorescencia, para dilucidar la localización de los principios activos en la estructura del liposoma (Kunikazu *et al.*, 2000).

- Microscopía de fuerzas, que ofrece numerosas ventajas en cuanto a la caracterización morfológica (Oliva *et al.*, 2003).

4. 9. Aplicaciones terapéuticas de los liposomas.

Sobre este tema podemos encontrar una amplísima bibliografía ya que se viene tratando la cuestión desde hace más de 30 años. Sólo citaremos algunos aspectos que nos parecen más significativos. Los liposomas pueden destinarse al transporte y liberación de fármacos, colaborando

a la solución de algunos problemas derivados de su utilización. Las aplicaciones médicas más prometedoras son:

- dirigir inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario,
- liberación controlada de fármacos frente a infecciones sistémicas,
- reducir los efectos indeseables de algunos fármacos,
- sustitutivos de la sangre,
- “in vitro” se han realizado pruebas con liposomas y cultivos celulares que demuestran la capacidad de los liposomas para mejorar la sensibilidad de los estudios de diagnóstico médico,
- también se utilizan para diagnóstico “in vivo”, con un contraste, facilitando la detección de metástasis hepáticas mínimas.

Como sistemas de transporte y liberación de fármacos se han investigado casi todas las vías de administración (Maierhofer, 1988), entre las cuales destacamos:

- Intravenosa:

El destino y eliminación (Longer y Robinson, 1987) de los liposomas inyectados intravenosamente depende de sus propiedades físicas, como tamaño, fluidez y carga superficial. Pueden persistir en los tejidos durante horas o días según su composición. La vida media en sangre está comprendida entre minutos y varias horas. Los MLV y LUV son captados rápidamente por células fagocitarias del sistema retículo endotelial. Se acumulan en zonas donde existe inflamación e infección y en algunos tumores sólidos (Ostro y Cullis, 1989). Uno de los múltiples

estudios que ratifican esta idea refleja la mejora de las características farmacocinéticas de la carbamazepina tras su administración liposomal intravenosa (Jia *et al.*, 2002).

Tras la fagocitosis de los liposomas por las células del sistema retículo endotelial se produce la digestión de las bicapas por los lisosomas y la liberación del principio activo dentro del macrófago. El primer blanco de estos macrófagos son las propias células retículo-endoteliales que, cuando sufran una infección o parasitosis, podrán ser tratadas con una gran selectividad (Alving, 1986).

-Intraperitoneal:

Esta vía se emplea con éxito en el tratamiento de animales, si bien no se utiliza en seres humanos (Sadzuka *et al.*, 2002). El mecanismo por el cual acceden los liposomas al torrente circulatorio no está aún dilucidado, aunque no parecen existir diferencias debidas al tamaño de los liposomas. Entre las aplicaciones, destaca la administración intraperitoneal de interleucinas, lográndose eficacia en el tratamiento de ciertos tipos de linfomas (Wang *et al.*, 2000).

-Oral:

La aplicación de los liposomas por vía oral parece difícil debido al largo trayecto, y las diversas condiciones durante el mismo, que deben recorrer los liposomas hasta llegar al lugar de absorción (Seijo, 1990). Posiblemente algunas dificultades puedan superarse cuando los liposomas se introduzcan en cápsulas de gelatina. Se desconoce el mecanismo de

captación en el intestino delgado y si los liposomas poseen la capacidad de atravesar la pared intestinal sin perder la integridad (Moufti *et al.*, 1989).

- Oftálmica:

Se ha comprobado que la carga de superficie influye en la penetración a través del epitelio corneal (Seijo, 1990). Cuando los liposomas presentan carga positiva penetran mejor, como se ha visto con diversos sistemas liposómicos de aciclovir (Law *et al.*, 2000). La mayor afinidad de los liposomas cargados positivamente por los tejidos oculares se ha atribuido a que la superficie corneal esta cargada negativamente (Ding, 1998)

- Tópica:

Se ha propuesto la utilización de los liposomas como vehículo para la aplicación tópica sobre la superficie cutánea y en mucosas, tanto de fármacos como de productos cosméticos. El objetivo de la inclusión de fármacos de uso tópico en liposomas es incrementar su efectividad biológica en el tratamiento de diferentes enfermedades de la piel, por ejemplo, en el tratamiento de procesos inflamatorios con formulaciones de acetónido de triamcinolona (López-García *et al.*, 1993).

4. 10. Liposomas de administración tópica.

El objetivo de la inclusión de fármacos de uso tópico en liposomas es incrementar su efectividad biológica en el tratamiento de diferentes enfermedades de la piel, cuya estructura y funcionamiento no estudiaremos con detalle ya que no es motivo de esta memoria. También veremos,

de forma superficial, la absorción cutánea, la biodisponibilidad de los fármacos encapsulados, el comportamiento tópico de los liposomas y concluiremos este apartado con las principales aplicaciones en dermatología y cosmética.

4. 10. 1. Estructura de la piel y sus anexos.

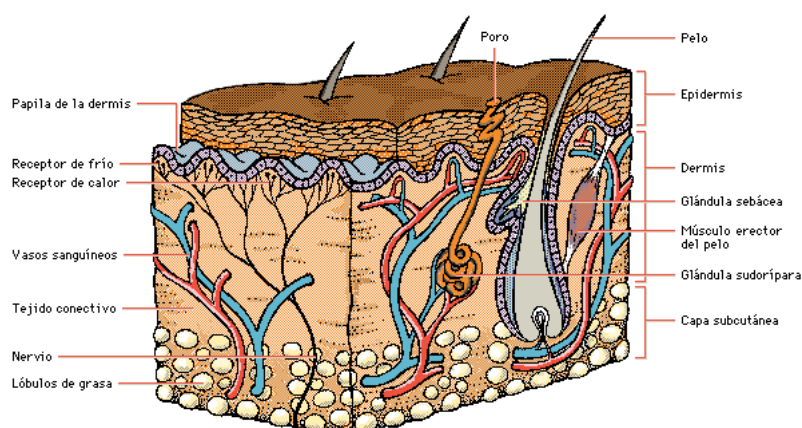


Figura 1. 14. Estructura de la piel.

La piel está constituida por cuatro capas bien caracterizadas y muy distintas en cuanto a sus funciones: capa superficial, epidermis, dermis e hipodermis. La primera está en contacto con el medio externo y la última separa la piel de los tejidos subyacentes. Además la piel está atravesada por el folículo pilosebáceo y las glándulas sudoríparas (Montagna, 1961) (Figura 1.14).

La capa superficial es una cutícula sin estructura aparente que recubre la superficie de la piel y que está constituida por una mezcla de secreciones lipídicas (sebo) y acuosas (sudor) procedente de las glándulas sebáceas y sudoríparas; engloba además células descamadas, bacterias y cierta cantidad de suciedad sólida y líquida procedente del exterior. Es irregular y discontinua, de espesor comprendido entre 0,4 y 10 micras,

miscible con el agua y de pH ácido, aunque este aumenta cuando existen afecciones cutáneas. Desde el punto de vista de la penetración, su papel es prácticamente nulo, ya que es englobada o desplazada por los excipientes.

La epidermis es una capa epitelial estratificada y avascular. Las células que la componen sufren modificaciones químicas importantes a medida que progresan hacia el exterior enriqueciéndose progresivamente en queratina. Es un estrato fundamental para la penetración de fármacos (Hadgraft, 1987). Está formada por células que nacen de una capa basal interna o capa germinativa, que constituye la zona de separación entre la epidermis y la dermis y se prolongan hacia el exterior dando origen primero a la llamada capa espinosa y luego a la capa granulosa, que enlaza con el estrato corneo. Las células de la capa basal germinativa están en continuo crecimiento; a medida que crecen van cambiando de células metabólicamente activas a células muertas que darán origen finalmente al estrato córneo, constituido por numerosas capas de células queratinizadas de forma aplanada y muy compactas cuya función es muy importante desde el punto de vista fisiológico. La queratina es un producto final de transformación de las células epidérmicas, pero su formación no debe considerarse de ningún modo como un proceso degenerativo sino que está orientado a la función que el estrato córneo debe desarrollar, que es triple:

- protección frente al medio externo,
- conservación del agua corporal, impidiendo la excesiva evaporación de agua interna y
- emuntorio terminal de muchos productos del metabolismo epidérmico.

Su espacio intercelular es muy importante. Es en esta capa donde se forman los lípidos. Atraviesan el aparato de Golgi, donde están rodeados por una membrana, y se les denomina corpúsculos laminares. Estos corpúsculos migran hacia el límite de la célula y vierten su contenido lipídico en láminas dentro del espacio intercelular. Así la capa córnea forma una estructura semejante a un muro de ladrillos, donde las células queratinizadas (escasamente hidrófilas) serían los ladrillos y las capas lipídicas (mayoritariamente hidrófilas) el cemento de unión. Estas lamelas tienen siempre la misma constitución que la membrana celular, es decir una capa de lípidos incluida en un medio acuoso. Consecuentemente, por una parte, estas barreras lipídicas representan la barrera epitelial y por otra contiene agua necesaria para la piel. En las capas inferiores de la epidermis se encuentran muchos fosfolípidos, mientras que la capa córnea, debido a las acciones enzimáticas y de síntesis, contiene mayoritariamente esfingolípidos, glucoceramidas, ácidos grasos y colesterol. El colesterol es capaz de retener cierta cantidad de agua de forma emulsionada y puede transmitir estas cualidades a otros lípidos; posee una misión importante para el funcionamiento de la barrera cutánea (Schafer-Korting *et al.*, 1989). De hecho, el estrato córneo es la barrera fundamental que ofrece el organismo a la penetración de los tóxicos y microorganismos, debido a la naturaleza altamente impermeable de sus constituyentes. Pese a ello, si se dan las condiciones adecuadas, puede ser un camino de penetración de fármacos (Wertz y Downing, 1989; Scheuplein, 1972).

La dermis, situada por debajo de la capa basal germinativa, está formada por un parénquima de células conjuntivas entre las que se

encuentran vasos y nervios. Es pues un tejido sensible y ricamente irrigado; los fármacos pasan a la circulación sistémica a través de los capilares sanguíneos de la dermis.

La hipodermis constituye la zona de separación entre la dermis y los tejidos subyacentes y varía en su constitución según la región del cuerpo. Contiene células adiposas que se agrupan en panículos. En cuanto a la penetración de formas tópicas carece de importancia práctica. Es la base de sustentación de los folículos pilosebáceos y de las glándulas sudoríparas.

En la hipodermis o en la dermis nace el folículo piloso que tiene forma de botella y posee una vaina de células epiteliales. Atraviesa la epidermis y desemboca en la superficie de la piel (Figura 1.15). En su base los folículos están constituidos por células conjuntivas de gran vitalidad y muy bien irrigadas. Estas células se dividen rápidamente y a medida que crecen desplazan a las ya existentes, que por una parte dan origen a la cutícula que envuelve el pelo y por otra se queratinizan y forman el pelo propiamente dicho. La queratinización no es tan rápida como en el estrato córneo, de modo que el núcleo de la célula se va haciendo denso y picnótico gradualmente hasta que desaparece englobado por la queratina.

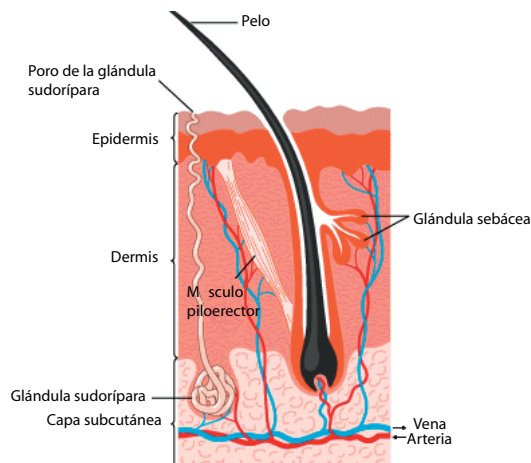


Figura 1. 15. Estructura del folículo pilosebáceo.

Hacia el primer tercio de la longitud del folículo piloso, este se conecta con las glándulas sebáceas. El alveolo sebáceo consiste en una masa de células epiteliales especiales rodeadas por una membrana basal que se confunde con la cutícula del pelo. Dichas células proliferan y desplazan a las preexistentes, por el interior del folículo, hacia arriba que van acumulando lípidos en su interior en tal proporción que, finalmente, se rompen y la secreción se vierte al exterior por la abertura del folículo.

Las glándulas sudoríparas son estructuras independientes que nacen en la hipodermis y se continúan en forma de conducto rectilíneo o espiral (túbulo) hasta la superficie de la piel, donde desembocan vertiendo su secreción (sudor), de naturaleza fundamentalmente acuosa, cuya evaporación desempeña un importante papel termorregulador.

A) Absorción percutánea.

El fármaco, tras su aplicación tópica para lograr su objetivo terapéutico, sufre una serie de procesos que se resumen a continuación (Doménech *et al.*, 1998):

- **Liberación:** se favorece cuando el principio activo está en forma muy dispersa.

- **Adsorción:** es el proceso por el cual el fármaco queda retenido en la superficie de la piel, generalmente por uniones físico-químicas, a componentes cutáneos de elevado peso molecular (queratina, melanina, etc.).

- **Penetración:** depende de la afinidad del principio activo por la capa córnea y puede ser favorecida por productos que la mejoren y por propiedades oclusivas de los excipientes.

- **Permeación:** consiste en el paso del fármaco a través de la piel por difusión desde una capa histológica a otra estructuralmente distinta.

- **Absorción:** es el proceso que sufre el fármaco, tras su aplicación sobre la piel, para acceder a la circulación sistémica.

B) Vías de absorción.

Una vez que el medicamento difunde a través de las glándulas sebáceas y alcanza la capa superficial de la piel, las moléculas de fármaco disponen de dos caminos para su penetración (Doménech *et al.*, 1998):

- **Vía transpendicular**, dividida a su vez en transfolicular (cuando la penetración es a través de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas) y transudorípara (caso de que lo haga a través de los conductos y glándulas sudoríparas).

- **Vía transepidérmica**, la penetración se hace a través del estrato córneo.

De forma general puede decirse que las vías de paso de los fármacos a través de la piel pueden ser la transepidérmica y transfolicular, con predominio de la primera; mientras que la vía transudorípara tiene un papel bastante menos relevante.

El paso de los fármacos se desarrolla en dos estadios: tras su administración se establece, en primer lugar, un gradiente de concentración de fármaco desde las distintas vías de entrada del mismo. En un segundo estadio, el fármaco pasa a través de la piel por difusión pasiva, consiguiéndose un flujo del mismo normalmente constante a lo largo de todo el espesor de la piel.

Ambas vías de penetración están implicadas en la permeación de un fármaco disuelto. En la práctica, los fármacos pasarán a través de la piel por las dos vías, prevaleciendo una u otra en función de las características fisicoquímicas de aquellos.

C) Parámetros implicados en la absorción percutánea.

Se pueden clasificar en dos grandes grupos: **biológicos** y **fisicoquímicos**. A continuación describiremos brevemente ambos tipos de factores.

Dentro de los parámetros de tipo **biológico** encontramos las variaciones en las características de la piel con la edad (Behl *et al.*, 1987) y según la zona anatómica del organismo (Wester *et al.*, 1984), que pueden influir en la permeabilidad de la misma. Sin embargo los principales factores a tener en cuenta son:

- **el estado de la piel**, ya que la absorción de los fármacos es mucho más rápida en piel descamada (Maibach, 1976) o en alteraciones de la piel causadas por enfermedad debido a la escasez de capa córnea (Turpeinen, 1988).

- **la hidratación de la piel** (Pots, 1986): es un factor relevante que afecta a la velocidad y extensión de la absorción percutánea. El estrato córneo puede retener por adsorción una cantidad de agua que puede ser superior a su propio peso. El agua retenida orienta sus moléculas y hace a la zona más polar, aumentando la absorción de muchos fármacos entre ellos los corticoides (Figura 1.16). También se previene la evaporación superficial del agua endógena mediante mecanismos de oclusión, con lo cual se incrementa la absorción.

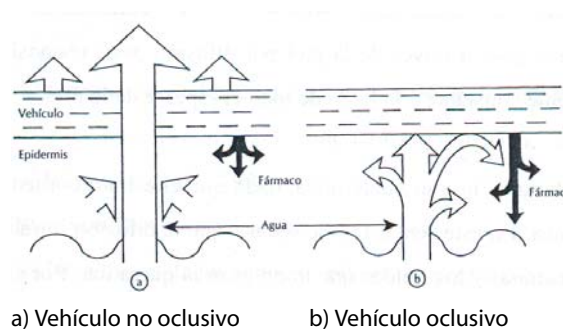


Figura 1. 16. Influencia del vehículo sobre la hidratación de la piel y su posible participación en la absorción percutánea.

Los factores **fisicoquímicos** pueden ser dependientes del:

- **vehículo**: interacciones vehículo- piel, interacciones vehículo-fármaco.

- **fármaco**: peso molecular, tamaño molecular, punto de fusión y coeficiente de reparto. En general, cuanto menores son el peso, tamaño y punto de fusión más fácil el paso del fármaco a través de la piel. Los fármacos con un coeficiente de reparto inferior a 0,1 no se adecuan a la administración por vía transdérmica.

4. 10. 2. Biodisponibilidad cutánea de los principios activos encapsulados en liposomas.

Como ya se ha comentado, en los espacios intercelulares del estrato córneo se localiza una bicapa lipídica que se encuentra principalmente en estado de gel y que constituye una barrera limitante para el paso de moléculas a la piel (Elias, 1991). Los espacios intercelulares son muy estrechos aunque suficientes para dejar pasar partículas de un diámetro importante como el de los liposomas. Sin embargo, en razón de su composición, los liposomas pueden modificar la permeabilidad de la bicapa lipídica y por consiguiente la penetración cutánea de las moléculas activas.

En este sentido cabe destacar la estructura natural de los ácidos grasos insaturados, que modifica la fluidez lipídica subcutánea facilitando la absorción de fármacos en la piel. Los ácidos grasos insaturados presentes en fosfolípidos como la fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol, tensioactivos biológicos presentes en las lecitinas de huevo y soja, son los responsables de una mayor absorción del principio activo (Valenta *et al.*, 2000).

A) Absorción percutánea.

Existe un gran número de trabajos en los que se demuestra una mejora de la biodisponibilidad para los principios activos vehiculizados por liposomas.

Jacobs y Martin (1988) midieron la biodisponibilidad cutánea de cuatro corticoides en liposomas de fosfatidilcolina, demostrando en todos los casos un paso percutáneo superior en presencia de liposomas. Del mismo modo, el papel promotor en la absorción de los fosfolípidos ha sido evidenciado por Kato *et al.* (1987), así como por Nishihata *et al.* (1987). También se mostró como un sistema disperso que contiene fosfatidilcolina y glicosilceramida favorece la absorción percutánea del ácido flufenámico (Kimura *et al.*, 1989).

Se han descrito unos liposomas fácilmente deformables, denominados “transfersomas”, compuestos de sales biliares y fosfolípidos, capaces de difundir más fácil y profundamente en la piel (Cevc y Blume, 1992). Asimismo, la actividad biológica antiedema de corticosteroides en transfersomas es mayor con respecto a los productos comerciales (Cevc *et al.*, 1996).

Finalmente cabe indicar que se ha creado un nuevo sistema para incrementar la penetración en la piel: los “ethosomas”, compuestos por fosfatidilcolina, etanol y agua. Las medidas de fluorescencia son mayores en cantidad y profundidad respecto a liposomas con sustancias activas como minoxidilo y testosterona (Touitou *et al.*, 2000).

B) Acumulación cutánea.

En general todos los trabajos realizados tienden a demostrar que los liposomas son capaces de aumentar la concentración de los principios activos a nivel del estrato córneo y disminuir la absorción percutánea (Mezei y Gulasekharam, 1982; Patel, 1985; Wolhrab *et al.*, 1989 y Masini, 1993). En ciertos casos parece que los liposomas concentran las

moléculas a nivel del estrato córneo para favorecer así su paso percutáneo (Mezei, 1993).

Por otro lado se ha constatado que los liposomas cuya composición se asemeja a la del estrato córneo permiten concentrar la inulina en las capas más profundas de la piel (Egbaria *et al.*, 1990). En este mismo estudio se mostró que los liposomas permiten obtener una mejor acumulación del interferón a nivel cutáneo.

Teniendo en cuenta la estructura de la piel, lugar de aplicación de los fármacos de acción tópica, así como el importante papel de barrera que esta ejerce, para conseguir una efectividad es preciso diseñar un vehículo que posibilite la penetración cutánea del agente transportado (Schreier y Bouwstra, 1994). En este sentido, el diseño de una formulación de liposomas eficaz requiere un conocimiento profundo de lo que podríamos denominar comportamiento tópico de los liposomas (Seijo *et al.*, 1992).

Respecto al comportamiento tópico de los liposomas se han formulado diversas teorías (Foldvari *et al.*, 1990; Mezei, 1985; Schindler, 1979 y Nishihata *et al.*, 1987) y las investigaciones realizadas en el campo de los liposomas de aplicación tópica permiten concluir que:

- la unión de liposomas a ciertas superficies cutáneas puede ser mediada por interacciones electrostáticas;

- la aplicación tópica de liposomas puede fomentar la concentración de los principios activos a nivel cutáneo, reduciendo su absorción sistémica;

- la liberación transdérmica de moléculas lipofílicas se ve favorecida tras su incorporación a liposomas, mientras que en el caso de fármacos

hidrofílicos no varia;

- la vehiculización liposómica en el interior del estrato córneo posibilita la existencia de un efecto reservorio sustancial.

4. 10. 3. Liposomas de aplicación en dermatología.

Entre las principales aplicaciones dermatológicas de formulaciones liposomiales destacan los esteroides. Mezei y Gulasekharam (1981 y 1982) obtuvieron concentraciones de acetónido de triamcinolona cinco veces superiores en epidermis y tres veces superiores en dermis cuando el principio activo se administraba en una formulación liposomal respecto a una forma convencional, asimismo se reducía la concentración en orina. Se obtuvieron resultados semejantes con hidrocortisona, observándose una acumulación en tejidos cutáneos considerablemente superior a la detectada bajo forma libre (cuatro veces mayor en la epidermis y catorce en la dermis) (Wohlrab y Lasch, 1987).

En el caso de corticosteroides, la liberación dérmica controlada mediante liposomas posibilitó un incremento de los efectos farmacológicos, mientras que los secundarios resultaron cinco veces menores que con formulaciones convencionales (Cevc *et al.*, 1997).

También se ha trabajado con antiinflamatorios no esteroídicos como ibuprofeno (Stoye *et al.*, 1998) o piroxicam (Canto *et al.*, 1999).

Diferentes antibióticos encapsulados en liposomas e incluidos en una matriz tipo esponja han sido utilizados en heridas superficiales contaminadas para disminuir el contenido microbiano. Esta aplicación clínica se puede extender a tratamientos de heridas postoperatorias con

antimicrobianos para prevenir las infecciones (Juliano, 1989). Por ejemplo la absorción subcutánea de enoxacina, una quinolona fluorada, fue mucho mayor en su forma liposomal que en su forma libre (Fang *et al.*, 1999).

El tratamiento de diferentes infecciones dermatológicas de origen micótico también se ha abordado con el objetivo de resolver los problemas de biodisponibilidad que presentan algunos fármacos antifúngicos en forma tópica convencional (Sud *et al.*, 1979): Entre los agentes de este tipo que han sido formulados en forma liposómica se encuentran: miconazol, ketoconazol y econazol entre otros (Galiano *et al.*, 1990).

Los anestésicos locales constituyen una familia de agentes activos que se caracterizan por tener un periodo de vida media corto en el organismo. La mayoría poseen escasa penetración en la piel y en general se consideran poco efectivos por vía tópica. Se ha comprobado que la encapsulación de este tipo de fármacos (por ejemplo clorhidrato de tetracaína) en liposomas puede favorecer la penetración y mejorar la acción (Mezei, 1988 y Foldvari *et al.*, 1990).

Debido a la existencia de múltiples limitaciones propias de los retinoides, empleados en el tratamiento de ciertos tipos de acné y algunas dermatosis, surge su encapsulación en liposomas y los resultados obtenidos a partir de estudios experimentales han revelado algunas ventajas como el aumento de su poder comedolítico (Recasens *et al.*, 1998), menor tiempo de tratamiento, no recurrencia de los síntomas al terminar el tratamiento y mayor aceptabilidad cosmética (Masini *et al.*, 1993; Quigley y Bucks, 1998; Fresno *et al.*, 2001).

4. 10. 4. Liposomas de aplicación en cosmética.

La cosmética está utilizando liposomas debido a sus posibilidades resolutorias a nivel de los estratos epidérmicos más superficiales. Desde una perspectiva ideal se puede decir que tras la aplicación de un preparado cosmético sobre la piel, todos los coadyuvantes presentes en el mismo (fragancias, agentes tensioactivos,...) deberían permanecer en la superficie, siendo sólo los ingredientes activos los que tuvieran capacidad para atravesar la barrera cutánea. Los liposomas pueden contribuir en gran medida a lograr este objetivo. Así, se ha comprobado que muchos ingredientes activos encapsulados en liposomas son mucho más eficaces que si se incorporan simplemente en una base cosmética. A ello contribuye también la enorme afinidad por la piel que poseen los propios fosfolípidos que constituyen las vesículas, así como su excelente capacidad humectante (Striasne, 1978; Marti *et al.*, 1998).

Algunos de los principios activos encapsulados en liposomas y comercializados son: alantoína, aloe vera, urea, levaduras, mucopolisacáridos, germen de trigo, colágeno, elastina, etc.

La función protectora del estrato córneo depende de su elasticidad, la cual a su vez es función de su contenido lipídico, de la presencia de sales inorgánicas así como de su estado de hidratación. Un aumento de la humedad de la piel favorece su elasticidad. La humedad cutánea está regulada principalmente por los lípidos existentes en el estrato córneo. La composición lipídica de una formulación liposómica podría afectar al grado de hidratación de la piel.

En lo que se refiere a la cosmética, tanto los procedimientos de fabricación como las distintas aplicaciones han sido objeto de patente. Actualmente se pueden encontrar en el mercado múltiples preparados que contiene liposomas, adecuados para usos muy diversos.

Uno de los más extendidos es el denominado “cuidado de la piel” (“skin care preparations”), en los cuales los liposomas pueden incorporar o no agentes hidratantes. Estos preparados reducen la pérdida de agua transdérmica, por lo que resultan convenientes para el tratamiento de la piel seca (Lautenschiager, 1990).

Por medio de los liposomas se han obtenido lociones limpiadoras que a la vez presentan un efecto protector ya que penetran fácilmente en un entorno lipofílico sin producir ninguno de los efectos agresivos que normalmente se asocian a la presencia de tensioactivos (Lautenschiager, 1990) Asimismo, la inclusión de liposomas en lociones capilares puede producir un efecto paralelo sobre el cuello y el pelo como resultado de la asociación de los fosfolípidos y la queratina (Strauss, 1989). En la actualidad una solución liposomada de coaltar corrige la seborrea y los procesos descamativos.

En el campo de la fotoprotección se ha comprobado que la vehiculización de palmitato de vitamina A en liposomas a igual concentración produce un efecto fotorreparador superior que cuando se utiliza incorporado en la crema convencional (Recasens *et al.*, 1998).

También mencionaremos el papel de los liposomas como protectores de la piel: además de la descamación natural de la capa córnea, con una cierta pérdida de lípidos, la barrera cutánea es deteriorada por multitud de agentes; estos disminuyen la hidratación de la piel y también se ve deteriorada la evaporación transepidérmica. Se piensa que los liposomas penetran en el estrato córneo aportando apreciables cantidades de agua (Suzuki y Sakon, 1990). Los liposomas extraídos de cerebro de buey contienen una serie de lípidos que están presentes en la epidermis y en los espacios intercelulares de la capa córnea, desempeñando un importante papel en la retención hídrica de este estrato. Su acción contribuye a la rápida regeneración de una barrera de permeabilidad dañada y estimula la reconstrucción de las membranas lipídicas en los espacios intercelulares del estrato córneo. Estos liposomas pueden cargarse de principios activos como ácido hialurónico u otros que serán transportados por los liposomas a las capas de la epidermis, en donde podrán actuar localmente (Haller, 1987).

Hemos de citar la gran variedad de principios activos de origen vegetal, también encapsulados en liposomas: cola de caballo, mucus, ginseng, árnica, extractos de azahar, nogal, caléndula, papaya, hiedra, romero, hamamelis, manzanilla y jalea real entre otros.

5. ARQUEOSOMAS.

Los arqueosomas se definen como los liposomas preparados a partir de los lípidos polares de las membranas de las arqueas que, como se comentó anteriormente, son característicos de estos organismos. Estos lípidos, debido a su naturaleza química, poseen unas propiedades que los hacen más estables y esto repercute del mismo modo en la estabilidad de los arqueosomas (Sprott *et al.*, 1997).

En 1986 Ring *et al.* realizaron unos estudios iniciales sobre la permeabilidad y estabilidad de los liposomas obtenidos a partir de los lípidos tetraéter de la arquea termoacidófila *Thermoplasma acidophilum*. Se elaboraron liposomas uni y plurilaminares que, independientemente del método de obtención, presentaron unos diámetros inusualmente grandes. Se estudió también el comportamiento de estos liposomas como osmómetros y el efecto de diversos factores sobre la permeabilidad. En cuanto a la estabilidad de estas vesículas, se evaluó la capacidad de retener carboxifluoresceína (CF) como marcador intraliposomal y la influencia del tiempo y la temperatura sobre la liberación de CF, observando que la liberación era menor, bajo cualquiera de las condiciones experimentales, para los liposomas obtenidos con los lípidos arqueobacteriales que en aquellos obtenidos con derivados de lecitinas. Cinéticamente se observó una liberación de CF en dos fases debido posiblemente a la heterogeneidad de los liposomas. Respecto a la resistencia a los alcoholes se comprobó que los liposomas preparados con lípidos de *Thermoplasma acidophilum* son más estables que los liposomas éster. Para la resistencia

a los detergentes se obtuvieron los mismos resultados excepto con SDS (dodecilsulfato sódico) con el cual se produjo la desintegración total de los liposomas arqueales.

En 1992, Choquet *et al.* utilizaron los lípidos polares totales de distintas arqueas metanógenas para obtener liposomas unilaminares. Las arqueas metanógenas empleadas para la elaboración de los liposomas fueron:

- *Methanococcus voltae*,
- *Methanococcus jannaschii* (hoy *Methanocaldococcus jannaschii*),
- *Methanosarcina mazei*,
- *Methanospirillum hungatei* y
- *Methanosaeta concilii*,

cuyas composiciones lipídicas son muy diferentes entre sí. La distribución de tamaños y forma de los liposomas fue homogénea con todos los extractos lipídicos excepto el de *M. hungatei*, cuyos lípidos originaron algunas vesículas bastante grandes, multilaminares y conectadas por finos túbulos.

También se ha descrito la formación y estabilidad de los liposomas obtenidos a partir de los lípidos polares totales extraídos de diversas arqueas (Choquet *et al.*, 1994):

- *Methanospirillum hungatei*
- *Methanosaeta concilii*
- *Methanococcus jannaschii* (hoy *Methanocaldococcus jannaschii*),
- *Methanococcus voltae*,
- *Methanosarcina mazei*,
- *Methanobrevibacter smithii*,

- *Methanosphaera stadtmanae*,
- *Methanobacterium espanolae*,
- *Natronobacterium magadii*,
- *Halobacterium cutirubrum* (hoy *Halobacterium salinarum*),
- *Thermoplasma acidophilum* y
- *Sulfolobus acidocaldarius*.

Para la obtención de los liposomas se empleó el método de extrusión a alta presión a través de filtros de distintos tamaños de poro. No se detectaron liposomas a partir de los lípidos de *S. acidocaldarius*. En general las vesículas formadas eran unilaminares a excepción de las preparadas con lípidos de *T. acidophilum*, donde un porcentaje relativamente elevado de los liposomas resultaron ser oligolamelares. Tras 10-18 meses de almacenamiento de los liposomas a 4 ó 25°C y a distintos valores de pH, los diámetros medios de la mayoría de los liposomas éter permanecían esencialmente constantes; la mayor variación se observó en el diámetro de los liposomas obtenidos a partir de los lípidos polares totales de *M. espanolae*. Todos los liposomas éter mostraron resistencia a la hidrólisis por fosfolipasas A₂ y B así como por la lipasa pancreática. En comparación con los liposomas éster, la estabilidad de los liposomas éter frente a temperaturas elevadas fue superior y dentro de estos proporcional a la cantidad de lípidos tetraéter. Respecto a la estabilidad comparada de los liposomas éter frente a la de los liposomas éster en distintas condiciones de pH, la estabilidad de los liposomas éter fue notablemente superior a los liposomas éster excepto en el caso de *N. magadii*. Los liposomas éter preparados con lípidos tetraéter (principalmente *M. hungatei* y

T. acidophilum) fueron mucho más estables que los demás liposomas arqueobacteriales o los preparados con lípidos éster en presencia de proteínas séricas (Choquet *et al.*, 1994).

Con los lípidos tetraéter bipolares de la arquea termoacidófila *Sulfolobus acidocaldarius* se han preparado liposomas empleando la técnica de extrusión a alta presión y se ha estudiado su estabilidad frente a altas temperaturas, para lo cual se encapsuló en las vesículas CF, evaluándose la liberación de CF al someter los liposomas a altas temperaturas. Se elaboraron liposomas éster para emplearlos como referencia en este estudio. Ambos tipos de vesículas se sometieron a incubaciones prolongadas a altas temperaturas (40-80°C). Tanto a 40 como 60°C se observó una pérdida de CF mayor y más rápida en los liposomas éster que en los éter. Esta pérdida era próxima al 4% al incubar los liposomas obtenidos con los lípidos polares totales de *S. acidocaldarius* a 80°C durante 3 horas. Estos resultados mostraron una alta estabilidad de estos liposomas éter frente a las temperaturas elevadas (Chang, 1994).

El grupo canadiense de Patel y Sprott (Choquet *et al.*, 1996) ha analizado la estabilidad de los liposomas arqueales cuando son sometidos a la esterilización por calor, para lo cual examinaron la resistencia a la agregación de las vesículas y su capacidad para retener un compuesto marcado y estable al calor durante el proceso de autoclavado a 121°C. Las arqueas empleadas para la obtención de los extractos lipídicos fueron:

- *Methanobacterium espanolae*,
- *Methanosarcina mazei*,
- *Methanococcus voltae*,

- *Methanococcus jannaschii* (hoy *Methanocaldococcus jannaschii*),
- *Methanosphaera stadtmanae*,
- *Methanobrevibacter smithii*,
- *Methanospirillum hungatei* y
- *Thermoplasma acidophilum*.

Tras el proceso de esterilización en autoclave no se observaron diferencias en el diámetro medio de los liposomas. El mayor contenido de lípidos tetraéter lo presentaron los liposomas preparados con los extractos de *T. acidophilum* y resultaron muy estables tras la esterilización por calor. En general los liposomas menos estables al autoclavado fueron los obtenidos con lípidos tetraéter carentes de mezcla de lípidos (*M.mazei*) o de arqueas con bajo contenido en lípidos tetraéter como *M. stadtmanae*. La relativa estabilidad térmica de los liposomas de *M. voltae*, los cuales no contienen lípidos tetraéter, podría relacionarse con la relativamente baja proporción de fosfolípidos cargados negativamente y la alta proporción de glicolípidos presentes en estos extractos. Un alto contenido de colesterol protege parcialmente a los liposomas contra los cambios de permeabilidad durante el autoclavado (Choquet *et al.*, 1996).

Recientemente este mismo grupo ha ensayado “*in vitro*” la estabilidad de los arqueosomas para desarrollar sistemas de transporte de fármacos por vía oral (Patel *et al.*, 2000). Para este estudio han empleado los extractos lipídicos de las siguientes arqueas:

- *Methanosarcina mazei*,
- *Methanobacterium espanolae* y
- *Thermoplasma acidophilum*.

Con los liposomas elaborados se ha analizado la estabilidad frente a:

- pH ácido (mediante encapsulación de sacarosa marcada),
- lipasas y bilis humana simulada (por pérdida de CF encapsulada) y
- taurocolato sódico (evaluando la pérdida de CF).

A pH ácido las vesículas multilaminares preparadas con lípidos de *Thermoplasma acidophilum* fueron las más estables, perdiendo menor cantidad de sacarosa marcada que los liposomas elaborados con los lípidos de las otras dos arqueas, donde los liposomas menos estables resultaron los de *M. mazei*. Los LUV fueron en todos los casos menos estables que los MLV correspondientes. La lipasa pancreática tuvo un efecto relativamente menor sobre la estabilidad de los arqueosomas. En bilis humana simulada (pH=6,2) los MLV obtenidos con los lípidos de *M. mazei* perdieron toda la CF encapsulada tras la incubación a 37°C durante 90 minutos, mientras que la pérdida del marcador en los liposomas de las otras dos cepas se situó en torno al 85%. La lipasa pancreática y la bilis humana simulada no revelaron efectos sinérgicos en la liberación de CF por los MLV o LUV de ninguna de las muestras elaboradas. Estos resultados pueden alentar el desarrollo de aplicaciones de los arqueosomas como sistemas de transporte de fármacos para vía oral ya que muestran propiedades de estabilidad favorables para el desarrollo de tales vehículos (Patel *et al.*, 2000).

El primer estudio realizado “*in vivo*” sobre la posible actividad transportadora de antígenos por los arqueosomas mostró que la composición de estos últimos confería una potenciación de la respuesta

inmune, muy superior a la observada en los liposomas convencionales (Sprott *et al.*, 1997). En este estudio los arqueosomas se elaboraron a partir de los TPL de:

- *Methanospirillum hungatei*,
- *Methanoscoccus voltae*,
- *Methanosarcina mazei*,
- *Methanosaeta concilii*,
- *Methanobrevibacter smithii*,
- *Methanobacterium espanolae* y
- *Thermoplasma acidophilum*

por el método de extrusión a alta presión. Se comparó la respuesta inmune humoral producida en ratones BALB/c contra albúmina de suero bovino o la subunidad B de la toxina colérica cuando se asociaban los antígenos a liposomas éter o éster. Los títulos de anticuerpos en los sueros de los ratones inmunizados intraperitonealmente se elevaron hasta niveles comparables a los alcanzados con el adyuvante de Freund mediante la encapsulación de la albúmina de suero bovino en arqueosomas de unos 200 nm de diámetro. Al comparar entre seis composiciones de arqueosomas y tres de liposomas éster, se estableció que, en general, la potenciación de la respuesta inmune era mucho mayor con los arqueosomas. Además en la mayoría solo eran necesarias dos inmunizaciones con arqueosomas para alcanzar el título máximo de anticuerpos. Con los arqueosomas preparados con los TPL de *Methanobrevibacter smithii* se obtuvo una respuesta positiva similar para la presentación de la proteína más inmunogénica de la subunidad B de la toxina colérica al sistema inmune de los ratones. Fue necesaria la encapsulación del antígeno en los arqueosomas para lograr una respuesta inmune completa.

La acumulación celular, distribución tisular y el efecto adyuvante de la inmunidad por el coenzima Q₁₀ liposomal fue evaluada por Makabi-Panzu *et al.* (1998) en formulaciones de liposomas convencionales y arqueosomas elaborados a partir de los TPL de *Methanosarcina mazei*. La obtención de los liposomas se realizó por la técnica de evaporación en fase reversa. Tras la infección intraperitoneal de los ratones se observó una mayor acumulación de los arqueosomas en hígado y bazo con respecto a los liposomas.

La comparación estructural de los TPL de las arqueas *Methanobrevibacter smithii* y *Methanosphaera stadtmanae* demostró que la actividad adyuvante de los arqueosomas podría modificarse con la composición lipídica de las vesículas ya que entre ambas cepas se observan diferencias en la misma y en la actividad adyuvante de los arqueosomas obtenidos con los TPL de una y otra cepa (Spratt *et al.*, 1999).

A partir de los glicolípidos éter de diferentes arqueas se han preparado liposomas (arqueosomas) y se ha comprobado que presentan grandes propiedades adyuvantes de la inmunidad (Krishnan *et al.*, 2000a; Krishnan *et al.*, 2000b y Krishnan *et al.*, 2001). Conlan *et al.* (2001) estudian la capacidad de estos nuevos liposomas para actuar como vehículos de vacunas con antígenos lipopeptídicos, comprobando la capacidad de captación del antígeno y provocar una reacción inmune específica contra el patógeno intracelular empleado como sistema modelo de la infección de los ratones, *Listeria monocytogenes*.

En los últimos años, se han orientado las investigaciones con arqueosomas hacia el campo de la inmunología (Krishnan *et al.*, 2003; Sprott *et al.*, 2003 y Sprott *et al.*, 2004). Todos ellos señalan que los arqueosomas inducen respuestas inmunes potenciadas. Se ha observado que la composición lipídica afecta al mecanismo de endocitosis de los arqueosomas y también permite modular diferencialmente la activación de las células dendríticas y la liberación del antígeno (Sprott *et al.*, 2003).

La capacidad exclusiva de los arqueosomas de mantener la inmunidad celular de los linfocitos T con especificidad antigénica podría atribuirse a la presencia del núcleo 2,3- difitnilglicerol del lípido arqueol (Sprott *et al.*, 2004).

II. Objeto y plan de trabajo.

Las arqueas halófilas extremas poseen un elevado potencial biotecnológico así como ciertas ventajas en su cultivo ya que raramente se contaminan. Entre sus aplicaciones más importantes se encuentran las de la industria farmacéutica: investigación del cáncer y producción de liposomas.

Como sistema de vectorización de fármacos, los liposomas presentan múltiples aplicaciones como muestra la intensa investigación que se desarrolla actualmente en este campo.

Los liposomas constituyen una forma farmacéutica especial que posee la capacidad de reconocer determinados tipos celulares, optimizando los resultados terapéuticos a dosis bajas del medicamento y reduciendo los efectos adversos derivados de su administración. De este modo se logra mejorar las condiciones de eficacia y seguridad en la administración de medicamentos.

Los arqueosomas son aquellos liposomas obtenidos a partir de los lípidos polares totales de las arqueas, por cuyas propiedades exclusivas, son más estables que los liposomas como revelan distintas investigaciones.

El principio activo, el dipropionato de betametasona, es un antiinflamatorio esteroideo de amplio espectro. Por su naturaleza liposoluble se une a las bicapas lipídicas de los liposomas. Las

reacciones adversas que puede originar este fármaco y el amplio uso de los antiinflamatorios esteroideos justifican la elección de este fármaco para su encapsulación en estos vectores con el fin de intentar mejorar su biodisponibilidad.

De acuerdo a lo expuesto anteriormente se han abordado diferentes aspectos de este tema que nos han permitido plantear los siguientes objetivos en el presente trabajo:

1.- Estudiar la capacidad de formar liposomas a partir de los lípidos de membrana de diferentes cepas de colección de haloarqueas y evaluar las propiedades de estos arqueosomas, seleccionando la cepa que produzca mejores resultados.

2.- Elaborar y validar un método de valoración del principio activo que posteriormente se encapsulará en los arqueosomas y liposomas.

3.- Diseñar la formulación de arqueosomas y liposomas que permita optimizar las propiedades de los liposomas éter y éster, así como la captación del fármaco.

4.- Estudiar la influencia de la composición de los arqueosomas y liposomas en la captación del corticosteroide y en las propiedades morfológicas de dichos vectores.

5.- Evaluar la estabilidad de las distintas formulaciones elaboradas con ambos tipos de lípidos (arqueales y fosfatidilcolina) a temperatura ambiente y a 4-8°C, mediante el estudio de la disminución de principio

activo encapsulado en función del tiempo. Los resultados obtenidos se compararán al objeto de dilucidar la formulación más adecuada para futuras investigaciones.

III. Material y métodos.

MATERIALES

1. MICROORGANISMOS.

En el presente estudio se han utilizado cepas de las siguientes colecciones de cultivo: CCM (Czechoslovak Collection of Microorganisms, Checoslovaquia), NCIMB (National Collection of Industrial and Marine Bacteria, Aberdeenn, Escocia), ATCC (American Type Culture Collection, EE.UU.), CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) y DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Las cepas utilizadas fueron las siguientes:

- *Haloarcula californiae* ATCC 33799,
- *Haloarcula hispanica* DSM 4426,
- *Haloarcula marismortui* DSM 3752,
- *Haloarcula sinaiensis* ATCC 33800,
- *Halobacterium salinarum* CECT 396,
- *Halobacterium salinarum* DSM 668,
- *Halobacterium salinarum* DSM 3754,
- *Halococcus morrhuae* CCM 537,
- *Halococcus morrhuae* DSM 1309,
- *Halococcus morrhuae* DSM 1310,
- *Halococcus morrhuae* NCIMB 787,
- *Haloferax volcanii* DSM 3759,
- *Halorubrum coriense* DSM 10284,
- *Halorubrum lacusprofundi* DSM 5036,
- *Halorubrum saccharovororum* DSM 1137,
- *Halorubrum sodomense* DSM 3755,

- *Halorubrum tebenquichense* CECT 5317,
- *Halorubrum trapanicum* CECT 397.

2. MEDIO DE CULTIVO.

El medio de cultivo empleado para el cultivo de las cepas utilizadas en este estudio fue el MH al 25 % (m/V) de sales totales (Ventosa *et al.*, 1982). La solución de sales se preparó siguiendo las proporciones dadas por Subov (1931) para la sal de agua de mar artificial. Estas proporciones se recogen en los siguientes cuadros:

Tabla 3. 1. Composición del stock de sales de Subov al 30%.

NaCl	234 g
MgSO ₄ 7H ₂ O	60 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	42 g
KCl	6,0 g
CaCl ₂ 2 H ₂ O	1,1 g
NaHCO ₃	0,2 g
NaBr	0,7
FeCl ₃ (solución acuosa 0,5%)	IX
Agua destilada	1000 mL

Tabla 3. 2. Proporción de solución de Subov al 30% según la concentración salina deseada en el medio de cultivo.

% (m/V) de sales	Volumen de solución de sales de Subov (mL)	Volumen de agua destilada (mL)
0,5	1,6	98,4
3	10,0	90,0
5	16,6	83,4
7,5	25,0	75,0
10	33,3	66,7
15	50,0	50,0
20	66,7	33,3
25	83,4	16,6
30	100,0	0

La composición del medio MH (para 1000 mL), cuyo pH se ajustó a 7 con NaOH 4N, es la siguiente:

Tabla 3. 3. Composición del medio MH.

Glucosa	1 g
Proteosa de peptona	5 g
Extracto de levadura	10 g

3. COMPONENTES DE LOS ARQUEOSOMAS.

3. 1. Fase lipídica.

Constituida por los siguientes elementos:

3. 1. 1. Extractos lipídicos polares totales.

Son el componente fundamental de la bicapa lipídica de los arqueosomas. Están formados por fosfolípidos caracterizados por las uniones de tipo éter del difitanilglicerol diéter y sus derivados, denominados genéricamente arqueoles. La mayoría de las cepas ensayadas en este estudio presentan como lípido mayoritario un diéter C_{20} - C_{20} , sin embargo se ha descrito que *Halococcus* posee un C_{20} - C_{25} diéter (Moldoveanu *et al.*, 1990). El fosfolípido mayoritario en las arqueas halófilas extremas es un arqueol análogo del fosfatidilglicerolfosfato que se encuentra monometilado (Fredikson *et al.*, 1989). Sin embargo, no se procedió a la identificación y cuantificación de los perfiles lipídicos de las cepas estudiadas por no ser objeto del presente trabajo.

3. 1. 2. Colesterol ($C_{27}H_{46}O$; Mr=386,7).

El colesterol fue suministrado por Acofar[®]. Se ha comprobado que el colesterol actúa proporcionando una estructura más compacta, menos porosa y menos permeable a la bicapa lipídica. Su efecto es modulador, funciona como un “buffer de fluidez” suprimiendo el cambio brusco que se produce en la fase de transición de las membranas liposómicas desde un estado de gel al estado fluido de cristal líquido (Juliano, 1980).

También se ha comprobado que desarrolla un efecto antioxidante (Filipek *et al.*, 2001) posiblemente debido a la separación lateral de las cadenas de ácidos grasos poliinsaturados tras la inserción del colesterol entre ellas y al creciente empaquetamiento entre las regiones polar e hidrófoba por disminución en la hidratación de la bicapa.

En la incorporación de colesterol a los arqueosomas fue necesario determinar la cantidad óptima del mismo, para lo cual se ensayaron cantidades decrecientes desde 9 mg/mL a 2 mg/mL hasta optimizar la formulación de las fórmulas que lo contenían.

3. 1. 3. Disolvente de la fase lipídica.

Todos los componentes de esta fase se solubilizaron en un disolvente orgánico volátil, el seleccionado en este trabajo ha sido el cloroformo.

3. 1. 4. Dipropionato de betametasona (C₂₈H₃₇FO₇, Mr=504,59).

El dipropionato de betametasona es un glucocorticoide con actividad antiinflamatoria, antialérgica y antipruriginosa de potencia alta y vida media larga. En la actualidad es ampliamente empleado en terapéutica gracias a su probada eficacia frente a procesos tales como la dermatitis de contacto, dermatitis atópica, dermatitis seborreica, dermatitis inflamatoria, dishidrosis, granuloma anular, erupciones liqueniformes, lupus eritematoso discoide, miliaria, neurodermatitis localizada, prurito anal, sequedad de piel, psoriasis y picaduras de insectos, siendo el tratamiento de elección para todas estas afecciones excepto para la dermatitis de contacto (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2004).

Actualmente el dipropionato de betametasona se utiliza exclusivamente por vía tópica, por lo cual en tratamientos prolongados presenta los inconvenientes de la corticoterapia (alteraciones atróficas de la piel, pérdida de colágeno, estrías dérmicas, hipertrichosis, telangiectasia y desórdenes pigmentarios), que pueden llegar a ser sistémicos con el empleo de vendajes oclusivos.

El dipropionato de betametasona es un corticosteroide ampliamente usado en el tratamiento farmacológico de enfermedades de la piel. Desafortunadamente, el uso de los corticoides en general es limitado debido a los frecuentes efectos secundarios que producen tanto a nivel tópico como sistémico.

El tratamiento farmacológico de distintas enfermedades dermatológicas muestra ciertas dificultades, particularmente cuando la capa superficial del estrato córneo no es el lugar de acción y se necesita la penetración del fármaco a capas más internas de la piel. Un adecuado sistema de transporte podría optimizar la concentración del principio activo en el lugar de acción, minimizando simultáneamente la absorción sistémica y, como consecuencia, los posibles efectos adversos. Este aspecto tiene gran interés en la aplicación tópica crónica de fármacos como los corticoides. Así el sistema de transporte liposomal puede mejorar la efectividad terapéutica del corticoide, en nuestro caso dipropionato de betametasona, reduciendo los efectos adversos sistémicos.

- Estructura.

Químicamente es el: 17,21-dipropionato de 9-fluoro-16 β -metil-11 β ,17,21-trihidroxipregna-1,4-dien-3,20-diona (Real Farmacopea Española, 2002).

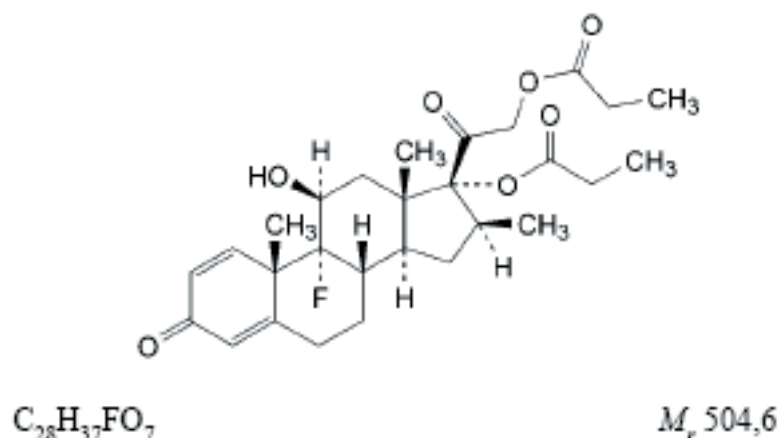


Figura 3. 1. Estructura química del dipropionato de betametasona.

Su actividad antiinflamatoria resulta veinticinco veces superior a la manifestada por la hidrocortisona, gracias a las modificaciones estructurales introducidas en la molécula respecto al cortisol. Este aumento de la actividad antiinflamatoria se debe a la asociación de la presencia del doble enlace entre C1- C2, la fluoración en el C9 y la metilación en C16, que elimina casi de manera total la actividad mineralcorticoide. Las esterificaciones de los hidroxilos de los carbonos 17 y 21 con los grupos propionato aumentan la relación entre la potencia por vía tópica y vía sistémica, lo cual justifica el empleo exclusivo del dipropionato de betametasona por vía tópica (Lorenzo *et al.*, 2004 y Goodman y Gilman, 2001).

- *Mecanismo de acción.*

El fármaco penetra en la célula mediante un proceso de difusión. Una vez en el interior, interacciona con un receptor glucocorticoideo que es una proteína específica. El complejo “receptor- esteroide” alcanza el núcleo celular donde interactúa con el DNA promoviendo la síntesis de ciertas proteínas específicas mediadoras (lipocortina), que son las responsables de la acción corticoide. Todo el conjunto de acciones antiinflamatorias y antialérgicas derivan del bloqueo de la síntesis de los mediadores químicos de la inflamación (prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos y ácidos hidroxieicosatrienóicos), todos ellos sintetizados a partir del ácido araquidónico y cuya liberación está catalizada por la enzima fosfolipasa A que será inhibida por la lipocortina. Como resultado de esta acción se producen los efectos antiinflamatorios (retardo de la migración de leucocitos polimorfonucleares, descenso de la fibrinogénesis, disminución de la elaboración de la proteína C reactiva, supresión de la desgranulación de los mastocitos) e inmunosupresores (supresión de los procesos de fagocitosis y descenso del número de eosinófilos y linfocitos). A nivel tópico se produce una vasoconstricción y descenso de la extravasación de suero en la piel así como una supresión de la permeabilidad de la membrana de los lisosomas (Florez *et al.*, 1993).

- *Perfil biofarmacéutico.*

La administración local por vía tópica del dipropionato de betametasona permite una baja absorción aunque es posible que exista cierto grado de absorción y que se generen estos efectos sistémicos no deseados y la supresión del eje hipotálamo-hipofiso-suprarrenal. Por

este motivo, se han diseñado fármacos con sustituciones en C21, como el dipropionato de betametasona, que se inactivan por las esterasas de la dermis (Lorenzo *et al.*, 2004).

En condiciones normales la unión a proteínas plasmáticas es elevada y solo el porcentaje de fármaco que circula libre puede abandonar el compartimento plasmático y entrar en las células, activando el receptor.

El metabolismo de los glucocorticoides conlleva su inactivación ya que sufren cambios que los hacen irreconocibles por el receptor. Estos cambios ocurren fundamentalmente a nivel hepático y consisten en la reducción de los grupos cetónicos a hidroxilos y la reducción del doble enlace entre C4 y C5, aunque esta modificación metabólica también puede ocurrir en otros lugares. El metabolismo de este fármaco puede verse alterado por diversas enfermedades, fármacos u hormonas. Intrínseco a su estructura, el metabolismo de la betametasona es más lento que de otros corticosteroides debido al doble enlace en C1 y C2 y al retraso añadido por este en la inactivación del átomo de fluor presente en C9 (Lorenzo *et al.*, 2004).

Tras el metabolismo del fármaco se incrementa su solubilidad en agua lo cual facilita la excreción a través de la orina, que constituye la principal vía de eliminación y representa el 90% del total mientras que el resto se excreta por el aparato gastrointestinal (Lorenzo *et al.*, 2004).

No se conocen interacciones de este fármaco por vía tópica (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2004).

Está contraindicado en pacientes con alergia a corticoides, infecciones virales del tipo de la varicela, herpes simple y herpes zoster en la zona de tratamiento. También está contraindicado en caso de tuberculosis cutánea en la zona de aplicación tópica del dipropionato de betametasona (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2004).

Deben considerarse ciertas precauciones en su administración. No debe aplicarse en terapia ocular ni en zonas próximas a los ojos así como tampoco está recomendado el uso de vendajes oclusivos en zonas muy extensas de la piel ya que podría absorberse de forma sistémica con riesgo de toxicidad. Durante el embarazo debe evitarse su aplicación en grandes dosis, zonas extensas o tratamientos prolongados. Al igual que con el resto de corticoides, es recomendable la supresión gradual en tratamientos prolongados. En niños es preferible el uso de preparados menos potentes, ante el riesgo de supresión adrenal y retraso en el crecimiento tras la absorción sistémica. No obstante, en caso de aplicarse el dipropionato de betametasona en niños, debe evitarse la administración de dosis elevadas en áreas extensas de la piel (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2004).

Las posibles reacciones adversas debidas a la aplicación tópica de este fármaco en tratamientos prolongados son alteraciones atróficas de la piel, pérdida de colágeno, estrías dérmicas, hipertrichosis, telangiectasia, desórdenes pigmentarios, sensación de ardor, prurito, erupción acneiforme, irritación, sequedad, foliculitis, dermatitis perioral, dermatitis alérgica de contacto, maceración de la piel, infecciones secundarias y miliaria.

En tratamientos con vendaje oclusivo es posible la aparición de efectos secundarios sistémicos (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2004).

La dosis diaria de dipropionato de betametasona habitual es del 0,05% en forma de crema, ungüento y soluciones dérmicas. Se realizan 1-2 aplicaciones al día en adultos, mientras que en niños debe emplearse con precaución y sólo una vez al día (Catálogo de Especialidades Farmacéuticas, 2004).

- *Perfil tecnológico.*

Características fisicoquímicas:

El dipropionato de betametasona se presenta como un polvo cristalino blanco o casi blanco, prácticamente insoluble en agua, soluble en acetona y cloruro de metileno y bastante soluble en alcohol (Real Farmacopea Española, 2002).

Identificación (Clarke, 1986 y Real Farmacopea Española, 2002):

- Espectrofotometría de absorción en el infrarrojo.
- Cromatografía en capa fina.
- Intervalo de fusión: 170-179°C.

Valoración (Real Farmacopea Española, 2002):

- Espectrofotometría de absorción ultravioleta a la longitud de onda del máximo de absorción (240 nm cuando el disolvente es etanol).
- Rotación óptica específica, comprendida entre +63 y +70.

3. 2. Fase acuosa.

3. 2. 1. Disolvente de la fase acuosa.

El principal componente de esta fase es la solución reguladora de Soerensen obtenida por el procedimiento descrito en Documenta Geigy Tablas científica 5ª edición (1958) y cuyo pH se comprobó tras el enfriamiento de la solución reguladora.

La preparación de la solución reguladora de Soerensen descrita en las citadas Tablas parte de dos soluciones de base:

- Solución A: KH_2PO_4 (9,078 g/L)
- Solución B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (11,876 g/L)

La composición de la mezcla para obtener el pH deseado (7,2 en el presente trabajo) es $A + B = 100$ mL, donde A y B son los mililitros de cada solución. Para obtener dicho pH se mezclaron 72 mL de la solución B y se completó hasta 100 mL con el volumen necesario de solución A.

3. 2. 2. Otros componentes.

Se han diseñado algunas formulaciones de arqueosomas que incorporan vitamina C y acetato de tocoferol, con el fin de evaluar su posible influencia sobre la estabilidad de estas vesículas. Ambos componentes se adicionan a la fase acuosa, antes de la elaboración.

3. 2. 2. 1. *Vitamina C o ácido ascórbico* ($C_6H_8O_6$; $Mr= 176,13$).

Fue proporcionada por Acofarma®. Se adicionó en algunas formulaciones al 0,1% (m/m) como antioxidante, actividad ampliamente descrita en la bibliografía para el ácido ascórbico.

3. 2. 2. 2. *Acetato de tocoferol* ($C_{31}H_{52}O_3$; $Mr= 472,8$).

Existen varios compuestos con actividad de vitamina E, pero el más activo es el α -tocoferol y sus ésteres. En la presente investigación se ha utilizado el acetato de α -tocoferol presentado como una solución acuosa coloidal (Ephynal®, Roche) con capacidad antioxidante y se ha incorporado a una de las formulaciones en una concentración 3mM.

La vitamina E impide la peroxidación lipídica, actuando especialmente sobre las membranas liposomiales estabilizándolas. Por tanto, la vitamina E contribuye a mantener la resistencia y asegurar la estabilidad de la pared del liposoma.

La adición de la vitamina E en esta formulación liposomal pretende evaluar el posible efecto sinérgico de la asociación de este antioxidante y del ácido ascórbico.

Debe tenerse en cuenta que los distintos tipos de vesículas (multilaminares o unilaminares) poseen diferente estabilidad frente al ataque oxidativo, así como el grado de oxidación de los ácidos grasos, siendo en los no saturados donde se observa una acción antioxidante del α -tocoferol más pronunciada (Rangelnova *et al.*, 1990).

4. COMPONENTES DE LOS LIPOSOMAS.

Sólo se comentan en este apartado las diferencias en la composición de los liposomas respecto a la descrita anteriormente para los arqueosomas.

4. 1. Fase lipídica.

4. 1. 1. Fosfolípidos.

Son los componentes fundamentales de la bicapa lipídica de los liposomas. El fosfolípido empleado en este trabajo corresponde a la L- α -fosfatidilcolina (PC) de yema de huevo seco, tipo IX-E, suministrada por Sigma- Aldrich. Se presenta como sólido con un contenido mínimo de fosfatidilcolina del 60%. Su conservación se llevó a cabo en recipientes color topacio herméticamente cerrados y a una temperatura de -20 °C.

La molécula de fosfatidilcolina es el componente más frecuente e importante de la inmensa mayoría de liposomas ensayados. Por eso se han realizado numerosos estudios destinados a investigar su comportamiento. Así se ha comprobado que la fosfatidilcolina natural posee un índice de inhibición de la peroxidación lipídica del 50% en presencia de vitamina E, mayor que las lecitinas semisintéticas (Berrocal *et al.*, 1998).

Como ya se ha comentado, de manera general, el grado de interacción entre las vesículas lipídicas y la piel depende de las propiedades fisicoquímicas de los fosfolípidos que las componen. La fosfatidilcolina parece interactuar mejor con la piel que otros fosfolípidos como el fosfatidilinositol (Juninger *et al.*, 1991).

4. 1. 2. Colesterol (C₂₇H₄₆O; Mr=386,7).

En la incorporación de colesterol a los liposomas no fue necesario determinar la cantidad óptima del mismo como se hizo para los arqueosomas, sino que se empleó la concentración molar habitual respecto a los fosfolípidos de la membrana liposomal, es decir, 0,5. Dicha concentración es la que proporciona mejores propiedades, de acuerdo a la bibliografía consultada y con los resultados obtenidos por el grupo de investigación en trabajos anteriores (Pedrajas y Medina, 2003).

4. 2. Fase acuosa.

4. 2. 1. Phenonip® (C₂₇H₄₆O; Mr=386,7).

Es un conservador constituido por una mezcla de metil y propil paraben en fenoxietanol que se presenta como un líquido viscoso no volátil con débil olor aromático. Es soluble en etanol, propilenglicol, disolventes orgánicos y tensioactivos; es poco soluble en agua.

Posee un amplio espectro de actividad frente a bacterias, hongos y levaduras, siendo estable a cambios de temperatura y pH (3-8), gracias a la adecuada mezcla de los parabenes y el fenoxietanol. Además su toxicidad es baja.

En soluciones acuosas se emplea a concentraciones del 0,1 al 0,3%. En cambio para las formulaciones de liposomas, la concentración recomendada es del 0,5% (Marti *et al.*, 1998) ya que el conservante puede ser atrapado y encapsulado por estas vesículas.

5. FORMULACIONES DE LOS MLV.

5. 1. Arqueosomas vacíos.

Con los extractos lipídicos de las cepas de colección de arqueas halófilas extremas referidas anteriormente, se procedió a la elaboración de arqueosomas empleando 15; 22,5 y 30 mg de estos lípidos por cada mL de muestra.

Este ensayo se realizó para poder evaluar la capacidad formadora de liposomas de cada una de las cepas así como las características de los mismos, en función de las cuales se seleccionaron las cepas que producían los arqueosomas con mejores propiedades y la concentración lipídica más adecuada para la obtención de arqueosomas con cada cepa.

5. 2. Arqueosomas portadores de dipropionato de betametasona.

En todas las formulaciones se trabajó con una cantidad fija de principio activo: 1mg de dipropionato de betametasona por cada mililitro de muestra. La siguiente tabla resume las distintas formulaciones elaboradas con los extractos lipídicos de la cepa que presentó los arqueosomas más idóneos para el estudio.

Ninguna de las formulaciones elaboradas contenía el conservador debido a la interacción de este con los demás componentes de las mismas.

Tabla 3. 4. Composición de las distintas formulaciones de arqueosomas portadores de principio activo.

FORMULACIÓN	TPL (mg/mL)	CHOL (mg/mL)	BTMdp (mg/mL)	VITAMINA C (% m/m)	VITAMINA E (Ephynal®) (Conc. mM)
A	15		1		
B	15	2	1		
C	15	2	1	0,1	
G	15	2	1	0,1	3

5. 3. Liposomas portadores de dipropionato de betametasona.

Al igual que en las formulaciones de arqueosomas se trabajó con una cantidad fija de principio activo: 1mg de dipropionato de betametasona por cada mililitro de muestra. Las formulaciones elaboradas con fosfatidilcolina son siete y se describen en la siguiente tabla.

Las proporciones molares correspondientes a las fases lipídicas de los liposomas son PC : BTMdp (1:0,039) para la fórmula A y PC : CHOL : BTMdp (1:0,5:0,039) para las restantes fórmulas ensayadas.

Tabla 3. 5. Composición de las distintas formulaciones de liposomas

FORMULACIÓN	PC (mg/mL)	CHOL (mg/mL)	BTMdp (mg/mL)	VITAMINA C (% m/m)	PHENONIP (% m/m)	VITAMINA E (mM)
A	40		1			
B	40	9,826	1			
C	40	9,826	1	0,1		
D	40	9,826	1		0,5	
E	40	9,826	1	0,1	0,5	
F	40	9,826	1	0,1	0,5	3
G	40	9,826	1	0,1		3

MÉTODOS

1. TÉCNICA DE CULTIVO.

A partir de un cultivo joven en placa se preparó una suspensión densa, en NaCl 4M, de la cual se tomó 0,5 mL para inocular un matraz de 500mL con 250 mL de medio MH al 25% (M/V) de stock de sales de Subov. Los matraces inoculados se llevaron a un incubador orbital a 40°C y 110 r.p.m., manteniendo la incubación durante 7 días.

La biomasa se recogió por centrifugación en frío (entre 0 y 4°C) a 9.000 r.p.m. durante 20 minutos en una centrífuga Sorvall RC 5B. La conservación de la biomasa obtenida se realizó a -20°C.

2. TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS POLARES TOTALES.

Este 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:

En un frasco de centrífuga se pesaron 4 g de pasta celular húmeda y se resuspendieron en 10 mL de Na Cl 4M. Se añadieron a la suspensión 37,5 mL de MeOH/Cl₃CH (2:1V/V). Se agitó la mezcla para homogeneizarla y se mantuvo a temperatura ambiente 2-4 horas con agitación intermitente.

Tras este tiempo de extracción se centrifugó a 3.500 r.p.m. durante 15 minutos en una centrífuga Sorvall RC 5B. Se extrajo el sobrenadante y fue decantado en otro bote de centrífuga. Se resuspendió el residuo en 47,5 mL de MeOH/Cl₃CH/H₂O (2:1:0.8 V/V), se homogenizó la mezcla por agitación y se centrifugó en las mismas condiciones citadas anteriormente. Este segundo sobrenadante se recogió y mezcló con el primero. A esta combinación de sobrenadantes se le añadió 25 mL de Cl₃CH y 25 mL de H₂O, se agitó y centrifugó. La fase clorofórmica inferior (50 mL) contenía la fracción lipídica total y fue recogida para la precipitación de los lípidos polares totales. Este protocolo de extracción se describe aumentado diez veces con respecto al descrito por Kates (1986).

Para recuperar los lípidos polares totales se agregaron 25 mL de MeOH a la fracción lipídica total, obteniéndose de esta forma la disolución de los lípidos en una mezcla de Cl₃CH/ MeOH (2:1 V/V). Los lípidos polares totales se precipitaron con 20 volúmenes de acetona fría, recogiendo los precipitados por centrifugación. Este proceso de precipitación se realizó tres veces (Choquet *et al.*, 1992).

Finalmente, para cuantificar los lípidos extraídos, se disolvieron los lípidos precipitados y centrifugados en cloroformo y se secaron en rotavapor a una temperatura entre 30 y 35 °C. Tras el secado se pesó y cuantificó la cantidad de lípidos por diferencia de pesada e inmediatamente se disolvieron en un volumen conocido de cloroformo.

3. ELABORACIÓN DE LOS LIPOSOMAS PLURILAMINARES.

Los liposomas MLV poseen varias bicapas lipídicas, siendo especialmente idóneos para la encapsulación de esteroides dado el carácter lipofílico de éstos (Kulkarni y Vargha- Butler, 1995).

La utilidad de estas vesículas multilaminares en su aplicación tópica ya ha sido probada, concretamente para los liposomas neutros transportadores de fármacos lipofílicos (Katahira *et al.*, 1998), siendo estos más estables que los unilaminares LUV (Suzuki y Sakon, 1990).

Tanto los arqueosomas como los liposomas han sido elaborados por el método de Bangham *et al.* (1974), previamente normalizado por Medina *et al.* (1984 y 1986).

Este método, específico para la preparación de liposomas plurilaminares, consta de diferentes fases. La primera fase consiste fundamentalmente en la solubilización de todos los componentes de la pared lipídica. El disolvente empleado debe ser volátil, a fin de permitir su eliminación durante la segunda fase del método. Como disolvente orgánico se eligió el cloroformo en cantidad suficiente para la total disolución de los lípidos. Como resultado se obtenía una solución clorofórmica de los lípidos y del resto de componentes de la fase lipídica. En el caso de encapsular el dipropionato de betametasona en liposomas y arqueosomas, el fármaco era incorporado en esta primera etapa a la solución orgánica.

En la segunda fase del proceso se añadía al matraz del rotavapor (adecuado al volumen de muestra preparado) cloroformo puro hasta aproximadamente la mitad del volumen del matraz, para asegurar la uniformidad en la superficie ocupada por la película lipídica y en el espesor de la misma tras la evaporación del disolvente, efectuada en un rotavapor Büchi (modelo R-110), operando a vacío y a la máxima velocidad de giro del aparato, prolongándose el proceso el tiempo necesario para la total desecación de los lípidos y formación de una delgada película lipídica adherida a las paredes del matraz. Las condiciones de trabajo permanecen constantes en todos los casos, siendo la temperatura del baño termostático 37°C (Puisieux, 1978 y Medina *et al.*, 1984).

La tercera etapa conduce a la obtención de suspensiones liposomiales, para lo cual es necesaria la adición de la fase acuosa, formada por la solución reguladora de Soerensen y otros componentes hidrosolubles en función de la fórmula elaborada. Por agitación continua a una temperatura superior a la temperatura de transición de fase de gel a cristal líquido de los fosfolípidos (37°C), se produce la hidratación de la película lipídica que se desprende de las paredes del matraz y la formación de una suspensión de liposomas en el exceso de solución acuosa.

El periodo de agitación mecánica es de 30 minutos a 300 r.p.m. y el volumen de fase acuosa de 4 mL para los arqueosomas vacíos y de 14 mL para arqueosomas y liposomas cargados con el principio activo. Para evaluar la capacidad formadora de arqueosomas de cada cepa de colección se realizaron tres réplicas. En el caso de los estudios de estabilidad sólo se realizó una réplica debido a la limitación que supone

la costosa obtención de los extractos lipídicos de las arqueas por su lento crecimiento.

Posteriormente, las suspensiones resultantes se repartieron en alícuotas de 1mL y se dejaron estabilizar durante 24 horas a 4°C, con el fin de favorecer el crecimiento y formación de las vesículas (Medina *et al.*, 1986). En las suspensiones liposomiales con dipropionato de betametasona, este se localiza en la matriz lipídica de las vesículas elaboradas debido a sus características de solubilidad.

3. 1. Optimización de la encapsulación del principio activo.

Con el fin de lograr el máximo rendimiento en la encapsulación de dipropionato de betametasona tanto en los arqueosomas como en los liposomas se ensayaron distintas condiciones de elaboración. Se analizó la influencia en la encapsulación de la relación entre los lípidos y el fármaco así como la influencia del tiempo de agitación en el grado de captación del principio activo por ambos tipos de vesículas. En estos estudios se trabajó exclusivamente con la fórmula A de liposomas y arqueosomas. A continuación se detallan los procedimientos seguidos para evaluar las condiciones que permitían optimizar la encapsulación y las propiedades de las vesículas formadas.

3. 1. 1. Influencia de la proporción “lípidos : dipropionato de betametasona”.

Para valorar la influencia de la cantidad de lípidos empleada en la obtención de los arqueosomas con mejores resultados de encapsulación del principio activo se ensayaron tres proporciones diferentes para cada tipo de vesículas. Para los arqueosomas se emplearon las mismas

concentraciones que se utilizaron inicialmente con los arqueosomas vacíos: 15; 22,5 y 30 mg/mL y una cantidad fija de fármaco: 1 mg/mL. Una vez obtenidas las distintas muestras se cuantificó el principio activo encapsulado en cada caso y se analizó la morfología y diámetro de los arqueosomas.

Con los liposomas se siguió un procedimiento análogo al anteriormente descrito, pero a diferencia de los arqueosomas, se cambió la cantidad de fármaco en las diversas muestras dejando fija la cantidad de fosfatidilcolina (40 mg/mL). Las cantidades de dipropionato de betametasona empleadas en este ensayo fueron 1, 2 y 3 mg /mL. Al igual que con los arqueosomas, se realizaron los análisis de captación del fármaco y de la morfología de los liposomas obtenidos en cada caso.

3. 1. 2. Influencia del tiempo de agitación.

Tras determinar la proporción de lípidos con la cual se obtenía mejor resultado en la captación del principio activo por los arqueosomas y liposomas, se procedió a evaluar la influencia que, sobre la encapsulación del fármaco, ejercía el tiempo de agitación. Para ello se elaboraron muestras de liposomas y arqueosomas con las proporciones de “lípidos : fármaco” que mayor porcentaje de encapsulación del principio activo permitieron obtener y se sometieron a agitación durante un tiempo total de 6 horas. Durante este tiempo se tomaron muestras al iniciarse la formación de la suspensión liposómica y posteriormente a las 3 y 6 horas de agitación. Estas muestras se repartieron en alícuotas y posteriormente se realizaron los correspondientes estudios de captación del fármaco y de morfología y diámetro de las vesículas.

4. MÉTODO DE SEPARACIÓN: CENTRIFUGACIÓN.

Una vez obtenidas las suspensiones de liposomas portadores de dipropionato de betametasona fue necesario proceder a la separación del principio activo encapsulado del resto de sustancia activa libre, situada en la fase acuosa externa que rodea a los liposomas. Esta separación se realizó ya que la capacidad de encapsulación por parte de los liposomas es limitada, es decir, que los rendimientos obtenidos en la práctica nunca alcanzan el 100% como consecuencia de esta limitación.

El volumen total preparado de cada muestra se dividió en alícuotas de 1mL, procediendo en cada caso a su separación y valoración. La separación de las fracciones correspondientes a agente captado y libre se realizó mediante centrifugación durante 12 minutos a 1300 r.p.m. en una centrífuga Beckmann modelo GS-15R. Transcurrido este tiempo se observó en el sobrenadante del tubo de centrifugación una fracción acuosa prácticamente transparente, correspondiente al principio activo libre dispersado en la fase acuosa y un sedimento que correspondía a los liposomas que contenían dipropionato de betametasona.

Para la valoración se tomaron 35,7 μ L del sobrenadante y se disolvieron en 464,3 μ L de alcohol de 96°, diluyendo posteriormente este volumen en 4,5mL de etanol de 90° con el fin de obtener una solución hidroalcohólica de 90°. Finalmente se determinó la absorbancia por espectrofotometría ultravioleta.

5. VALORACIÓN DEL FÁRMACO LIBRE: ESPECTROFOTOMETRÍA UV.

A fin de establecer la formulación de liposomas más idónea así como los porcentajes de dipropionato de betametasona encapsulado por dichos vectores y libre en el medio y su grado de captación se ha utilizado como técnica de valoración cuantitativa el método espectrofotométrico.

La valoración se realiza en un espectrofotómetro Perkin-Elmer Hitachi 124 empleando como blanco etanol de 90°. Los valores de absorbancia determinados para cada fracción así como el factor de dilución de las mismas permiten calcular las concentraciones de agente no encapsulado (C libre), expresadas en molaridad, por extrapolación en la curva patrón de calibrado obtenida tras la validación del método de valoración.

5. 1. Validación del método analítico.

Para validar el método de valoración del dipropionato de betametasona se determinó la longitud de onda del máximo de absorción mediante la realización de barridos de escala (entre 190-300nm) a disoluciones del fármaco en etanol de 90°. Las concentraciones de fármaco en las disoluciones preparadas con este fin fueron 19,818 μM , 29,727 μM , 39,636 μM y 49,545 μM . Se realizaron 6 réplicas.

A continuación se procedió a realizar la recta de calibración. Para ello se prepararon disoluciones del principio activo estudiado en etanol de 90°. La concentración máxima de las disoluciones etanólicas de dipropionato de betametasona preparadas fue 198,181 μM . A partir de estas disoluciones se prepararon diluciones para obtener nuevas

disoluciones del fármaco con concentraciones decrecientes en intervalos de 1,486 μM . También se midió la absorbancia del disolvente puro, es decir del etanol de 90°. El número de réplicas realizadas fue seis.

Con la validación del método analítico se pretendía demostrar, de forma empírica, que dicho método es fiable dentro de unos intervalos definidos. El método utilizado en esta memoria para medir y cuantificar la cantidad de dipropionato de betametasona presente en las distintas muestras fue la espectrofotometría. Por tanto, procedimos a su validación para la longitud de onda utilizada, 239,6 nm, en etanol de 90°.

Los criterios considerados son: linealidad, exactitud y precisión (Caraballo *et al.*, 1998).

5. 1. 1. Linealidad.

Se puede definir como la proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta en el intervalo de concentraciones de producto utilizadas para las cuales el método es satisfactorio. A la hora de realizar los ajustes lineales, hemos recurrido al método de los mínimos cuadrados, de acuerdo con el cual obtenemos rectas de la forma: $y = a + b x$.

5. 1. 2. Exactitud.

Es el error sistemático e indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor real. Se calcula a partir del error relativo y del coeficiente de variación para cada una de las concentraciones de las rectas.

5. 1. 3. Precisión.

Es la medida del grado de reproducibilidad de un método analítico o, dicho de otro modo, el grado de dispersión de los datos de los distintos replicados. Por consiguiente, se puede considerar como el error aleatorio y se determina a partir del coeficiente de variación de cada una de las concentraciones de las rectas de calibrado, aceptándose entre un 5-10%.

5. 2. Porcentajes de principio activo captado por los MLV y libre en el medio.

A partir de la concentración inicial de principio activo ($C_{inicial}$) (1) y la concentración de fármaco libre (C_{libre}) (2) se ha determinado el porcentaje de fármaco retenido (3) por ambos tipos de vesículas. El porcentaje de fármaco libre en medio externo se ha calculado por diferencia con el porcentaje de fármaco retenido.

$$(1) \quad C_{inicial} = \frac{Mp.a.(g) / Mrp.a.}{V(L)} \times \frac{1}{140,056}$$

$$(2) \quad C_{libre} = \frac{Absorbancia}{\epsilon} \quad \text{donde } \epsilon = 15247$$

$$(3) \quad \%retenido = \frac{C_{inic} - C_{libre}}{C_{inic}} \times 100$$

$$(4) \quad \%libre = 100 - \%retenido$$

5. 3. Grado de captación.

El grado de captación quedó determinado por la cantidad de principio activo retenido por los liposomas, expresada en microgramos, por cada miligramo de lípido. A partir del valor del porcentaje de dipropionato de betametasona captado, la expresión matemática del grado de captación sería:

$$\text{Grado de captación} = \frac{\%captado \times p.a.total}{100 \times FLtotales} \times 1000$$

6. CARACTERIZACIÓN.

Los liposomas se han caracterizado por tinción negativa de las preparaciones y posterior visualización por microscopía de transmisión electrónica. Se ha observado la estructura y se han evaluado las dimensiones de las distintas formulaciones de liposomas objeto de estudio, anteriormente descritas. Para la caracterización se toman liposomas elaborados en las 24 horas precedentes. En función del tiempo, se han caracterizado los liposomas preparados en las 24 horas anteriores, a los 15, 45, 75 y 90 días desde su elaboración, con el fin de apreciar la incidencia del paso del tiempo sobre la estructura, dimensiones y grado de agregación de las vesículas lipídicas. También analizaremos la posible repercusión en la estabilidad de los agentes antioxidantes y el conservador en las distintas formulaciones diseñadas.

Para la observación al microscopio electrónico de transmisión de los liposomas se ha seguido una técnica de tinción negativa, empleando acetato de uranilo como colorante. El protocolo efectuado para la tinción

negativa de los liposomas, realizada en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada, fue el siguiente:

- Incubación de las rejillas de cobre cubiertas de una lámina de formvar (Ernest F. Fullam, Inc.) con la suspensión de liposomas durante 4 minutos.

- Lavado de las rejillas con agua ultrapura: dos lavados de un minuto cada uno.

- Tinción con acetato de uranilo al 2% en solución acuosa durante un minuto.

- Secado de las muestras en estufa a 37°C.

Por último se procedió a la observación microscópica de las muestras empleando un microscopio de transmisión electrónica TEM Zeiss 902. Para la visualización de los liposomas se utilizaron aumentos entre 3.000 y 80.000.

7. ESTUDIO DE ESTABILIDAD EN FUNCIÓN DEL TIEMPO.

Para evaluar la estabilidad de las vesículas a lo largo del tiempo se elaboraron las formulaciones descritas anteriormente para los arqueosomas y los liposomas. El objetivo perseguido con el diseño de estas formulaciones para el estudio de su estabilidad era observar posibles diferencias en la misma debido a la presencia de los distintos componentes.

Cada una de estas formulaciones se estudio bajo diferentes condiciones de temperatura: ambiente (20-25°C) y a temperatura de refrigeración (4-6°C). En ambos casos las muestras se protegieron de la acción de la luz.

El periodo de estudio fue de 90 días, determinándose la liberación o pérdida de fármaco captado por parte de los liposomas y arqueosomas a los 0, 15, 45, 75 y 90 días de la elaboración. Para ello se empleó la técnica de separación descrita en el apartado anterior y se valoró la fracción libre por espectrofotometría.

En función de los resultados obtenidos y conocida la concentración inicial de fármaco se calculó el porcentaje de fármaco retenido en cada caso. Por diferencia entre el porcentaje captado el día 0 (momento de la elaboración) y los obtenidos posteriormente, se determinó la pérdida de dipropionato de betametasona encapsulado en función del tiempo.

IV. Resultados y Discusión.

1. CAPACIDAD FORMADORA DE LIPOSOMAS POR HALOARQUEAS.

1. 1. Géneros de haloarqueas formadores de liposomas.

Para el estudio sobre la capacidad formadora de liposomas por haloarqueas de diferentes géneros se han utilizado 18 cepas de colección. La Tabla 4.1 recoge la proporción de cepas de cada género que han sido capaces de formar arqueosomas en las condiciones de trabajo establecidas para el desarrollo de esta investigación.

Tabla 4. 1. Porcentaje de cepas formadoras de liposomas en los distintos géneros de haloarqueas.

	Nº de cepas ensayadas	Nº de cepas formadoras	% de cepas formadoras
<i>G. Haloarcula</i>	4	4	100
<i>G. Halobacterium</i>	3	2	66,66
<i>G. Halococcus</i>	4	3	75
<i>G. Haloferax</i>	1	0	0
<i>G. Halorubrum</i>	6	5	83,33

Las cepas de colección ensayadas que no formaron liposomas han sido las siguientes:

- *Halobacterium salinarum* DSM 3754,
- *Halococcus morrhuae* CCM537,

- *Haloferax volcanii* DSM 3757 y
- *Halorubrum lacusprofundii* DSM 5036.

Los mejores resultados respecto a la capacidad formadora de arqueosomas se obtuvieron con las cepas ensayadas del género *Haloarcula*, ya que todas ellas dieron positiva la formación de liposomas.

Los resultados negativos aportados por el género *Haloferax* no serían del todo concluyentes al ensayarse solo una cepa. Por tanto, y con objeto de establecer una posible relación entre la ausencia de formación de liposomas y la composición lipídica característica de este género, sería preciso utilizar otras cepas.

Algunas cepas de los géneros *Halobacterium*, *Halococcus* y *Halorubrum* no fueron capaces de formar vesículas en las condiciones de trabajo establecidas. Ello podría deberse a una evaporación e hidratación del material lipídico no adecuada que derivaría en la formación de acúmulos lipídicos en la pared del matraz. Se propone para subsanar este problema cambiar la temperatura de preparación de los arqueosomas al ser éste un punto crítico del método ya que es necesario alcanzar la temperatura de transición de los lípidos para que se puedan originar los liposomas. No obstante no se realizaron pruebas en otras condiciones de trabajo puesto que no se planteó como objeto de este estudio la optimización de las condiciones de preparación de arqueosomas con cada una de las cepas.

1. 2. Influencia de la concentración lipídica en la formación de arqueosomas.

La caracterización de los arqueosomas obtenidos se realizó mediante técnicas de microscopía electrónica de transmisión, empleando la tinción negativa para visualizar las vesículas suspendidas en la solución reguladora de Soerensen (pH= 7,2). Para cada una de las cepas incluidas en el estudio de formación de liposomas se ensayaron tres concentraciones lipídicas: 15 mg/mL; 22,5 mg/mL y 30 mg/mL.

Además de evaluar las características estructurales de los arqueosomas obtenidos, se midieron los diámetros de las vesículas lipídicas, estableciéndose tres intervalos de tamaños (expresados en μm) que permitan efectuar comparaciones (Tabla 4. 2):

Tabla 4. 2. Categorías de tamaño establecidas para los arqueosomas.

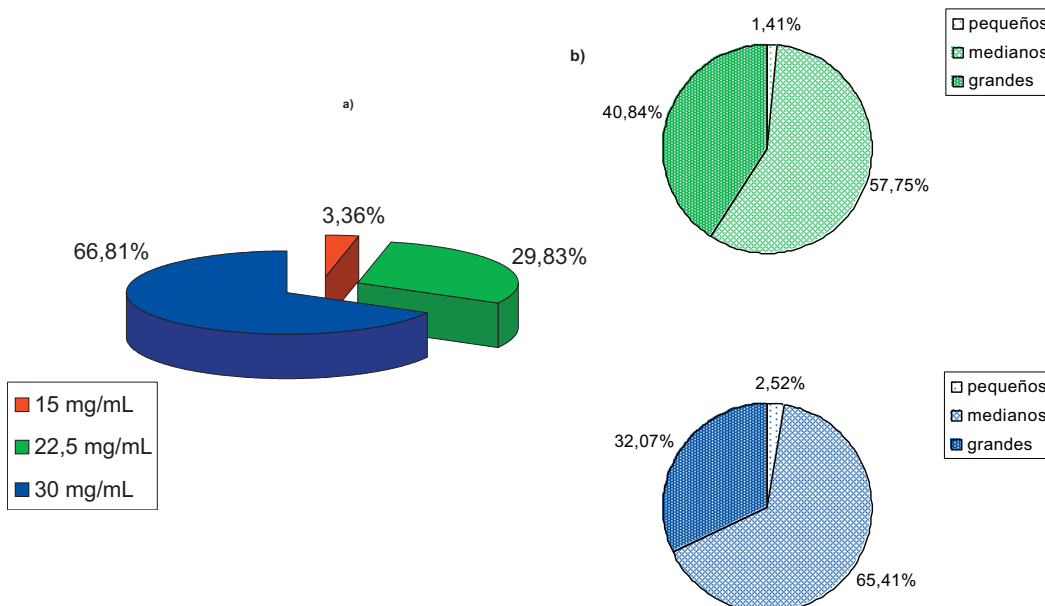
Arqueosomas (denominación)	Intervalo de tamaños (μm)
“Pequeños”	<0,4
“Medianos”	0,4-0,8
“Grandes”	>0,8

Se ha observado que la concentración de lípidos empleada en la formulación de los arqueosomas influye en la capacidad de formación de vesículas y también en la distribución de diámetro de los liposomas formados. Por este motivo se analizan a continuación los resultados obtenidos con cada una de las cepas estudiadas con objeto de seleccionar las más idóneas para los posteriores ensayos de encapsulación y de estabilidad.

1. 2. 1. Género *Haloarcula*.

1. 2. 1. 1. *H. californiae* ATCC 33799.

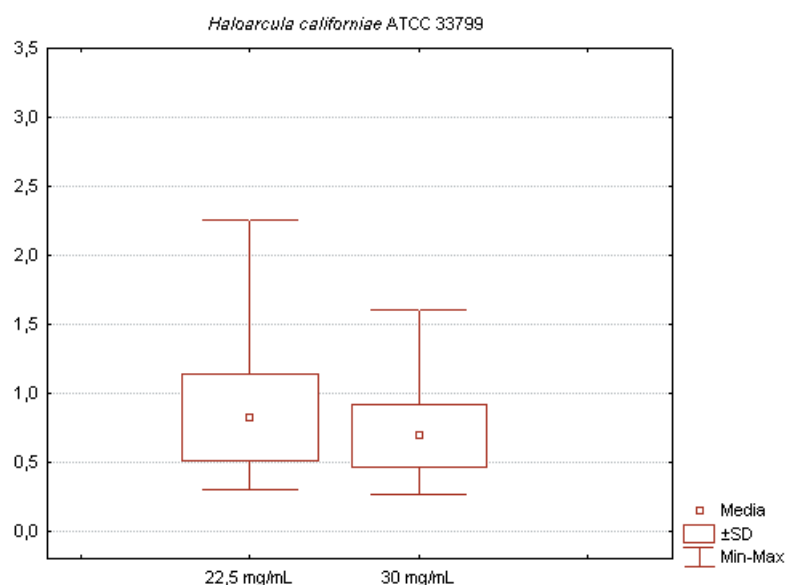
En esta cepa se ha detectado una relación de proporcionalidad entre la capacidad formadora de liposomas y la concentración, ya que al incrementar la cantidad de lípidos utilizada en el ensayo se produce una mayor obtención de liposomas. A 15 mg/mL la formación es baja puesto que el porcentaje de medidas correspondientes a esta muestra es inferior al límite establecido del 10% respecto al total de las realizadas para todas las concentraciones ensayadas. Por este motivo la muestra no es estadísticamente significativa y se excluye del correspondiente análisis estadístico.



Gráfica 4. 1. *Haloarcula californiae* ATCC 33799: a) Capacidad de formación de liposomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (22,5 mg/mL, verde; 30 mg/mL, azul).

Por otra parte, al aumentar la concentración de lípidos se produce un cambio en la distribución de los diámetros observados: como muestra la Gráfica 4. 1, al emplear 22,5 mg/mL o 30 mg/mL encontramos fundamentalmente vesículas “medianas” y “grandes”, pero hay un pequeño porcentaje de los liposomas de diámetro menor. Este reparto puede considerarse un inconveniente ya que afectaría a la cinética de eliminación de este vehículo y de la sustancia encapsulada por él. Sería conveniente separar la fracción de liposomas menores, con lo cual obtendríamos sólo dos tipos de liposomas.

A la vista del análisis estadístico (Gráfica 4. 2), parece más adecuado el uso de la concentración de 30 mg/mL, puesto que la distribución de tamaños en este caso queda desplazada hacia los tamaños inferiores con una menor desviación estándar, lo que indica que se produce una menor dispersión en los diámetros de los liposomas.



Gráfica 4. 2. *Haloarcula californiae* ATCC 33799: Análisis estadístico básico de los resultados obtenidos.

Por otro lado, al comparar las microfotografías (Figura 4. 1) de cada una de las concentraciones, se observa claramente la mayor capacidad formadora a 30 mg/mL, lo cual apoya lo dicho anteriormente.

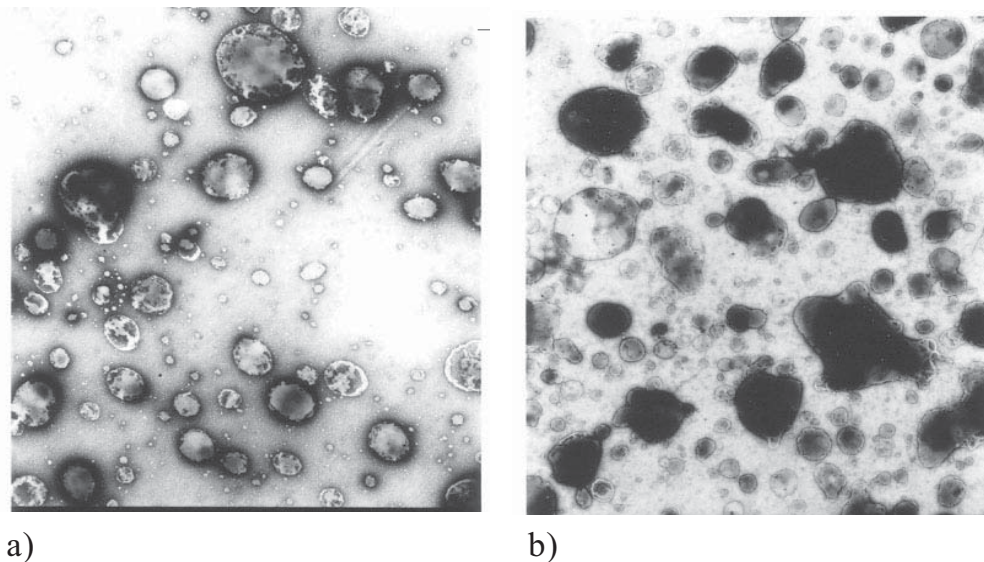
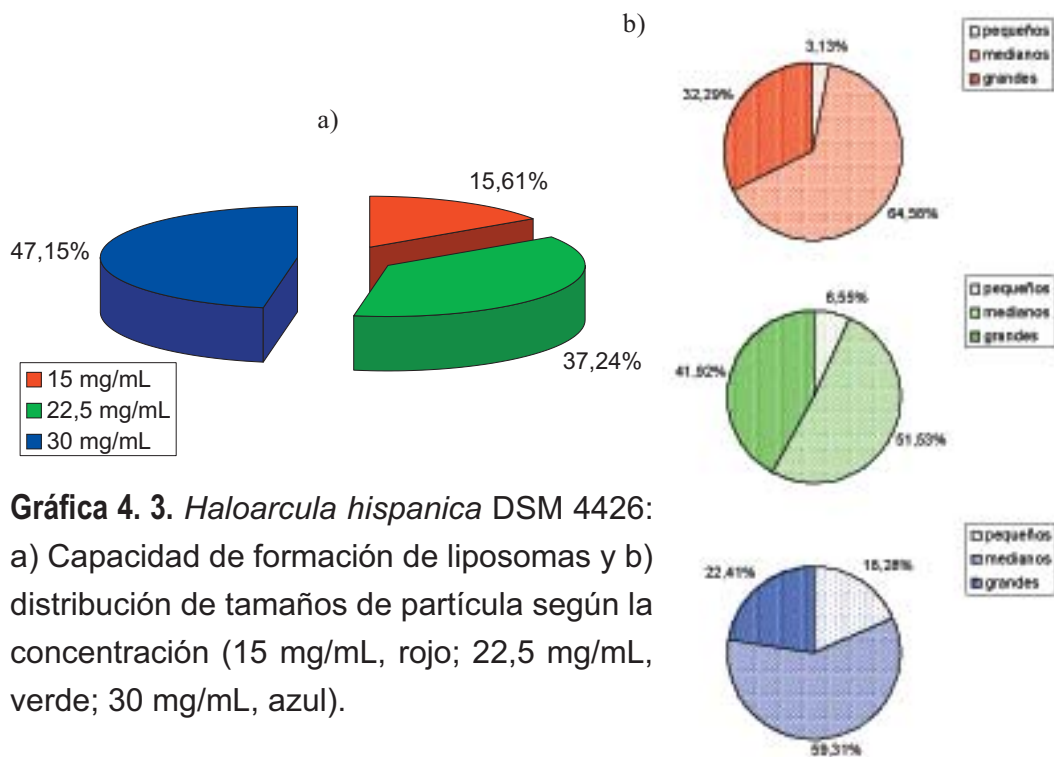


Figura 4. 1. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con 22,5 y 30 mg/mL respectivamente.

1. 2. 1. 2. *H. hispanica* DSM 4426.

En la Gráfica 4. 3 se observa la misma correlación entre la concentración y la capacidad de formación que en *H. californiae* ATCC 33799, aunque la formación con 15 mg/mL es superior a la de la cepa anterior y están más igualados los porcentajes de formación obtenidos con las otras dos concentraciones.

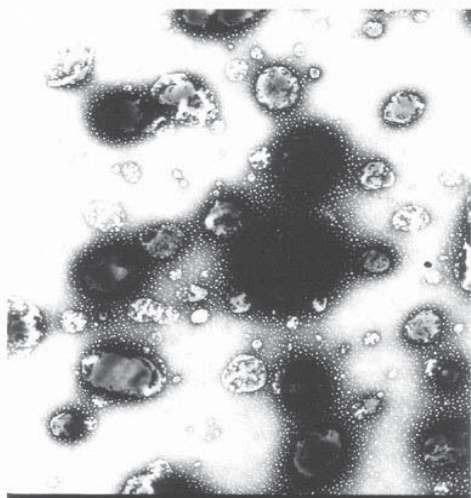
En cualquiera de las concentraciones lipídicas empleadas, aparece una distribución donde predominan los liposomas “medianos”, pero encontramos también vesículas pertenecientes a los otros dos grupos. Coincide que los arqueosomas “pequeños” son menos abundantes, si bien con 30 mg/mL están prácticamente en la misma proporción que los “grandes”.



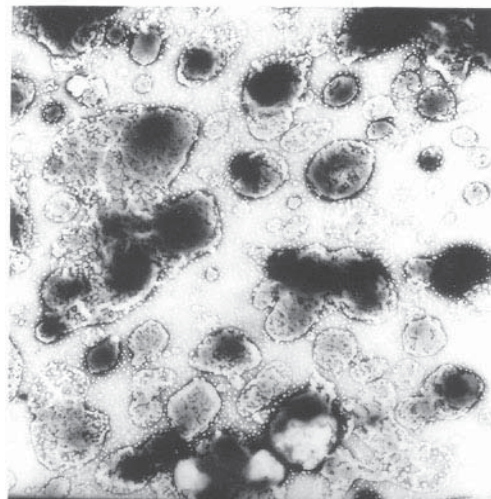
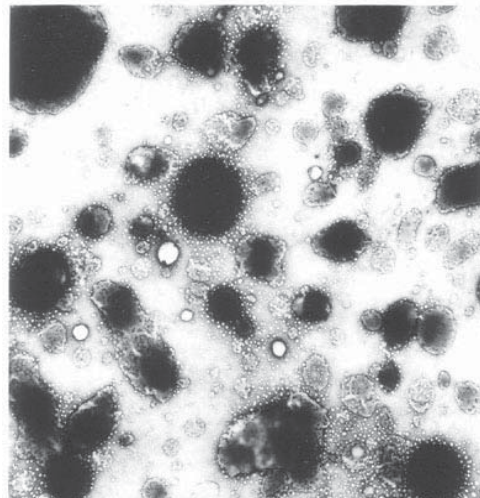
En general, los liposomas formados a partir de los lípidos de esta haloarquea poseen un diámetro mayor que los obtenidos con *H. californiae* ATCC 33799. Este aspecto tiene como ventaja que las vesículas poseen un mayor número de bicapas lipídicas, y esto aumenta la capacidad de encapsulación de productos de naturaleza lipídica como es el agente objeto de estudio.

Puesto que la capacidad formadora es superior cuando se emplea la mayor cantidad de lípidos (47,15%), ésta debería ser la seleccionada. Sin embargo, las fotografías tomadas al microscopio electrónico (Figura 4. 2) revelan que los arqueosomas formados con los lípidos de esta halobacteria tienden a fusionarse, originando un grave problema a la hora de su aplicación biotecnológica.

a)



b)

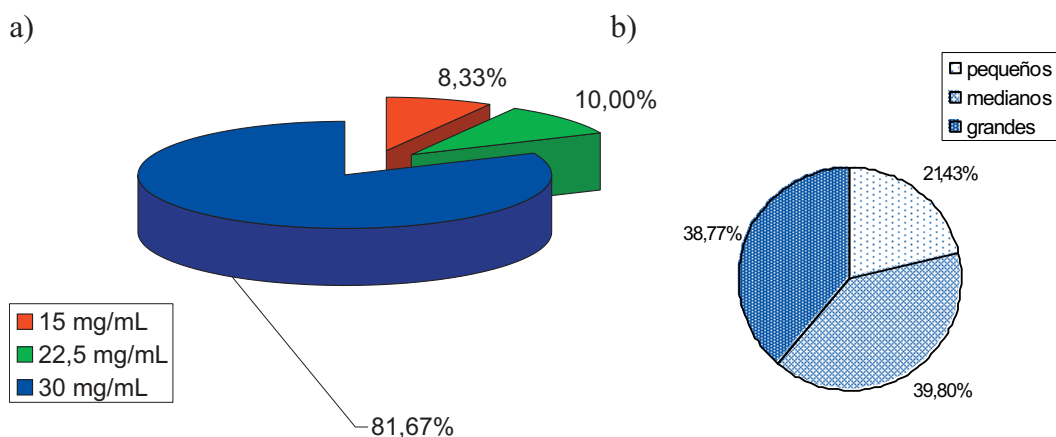


c)

Figura 4. 2. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con: a) 15 mg/mL, b) 22,5 mg/mL y c) 30 mg/mL.

1. 2. 1. 3. *H. marismortuis* DSM 3752.

En esta arquea halófila extrema, la capacidad para formar liposomas es mucho más elevada (superior al 80%) cuando se emplea la concentración máxima, mientras que para las otras dos. Esto queda reflejado en la Gráfica 4. 4.



Gráfica 4. 4. *Haloarcula marismortuis* DSM 3752: a) Capacidad de formación de liposomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (30 mg/mL, azul).

También se ha apreciado para la concentración de 30 mg/mL una heterogeneidad en el tamaño de las vesículas obtenidas. Las fotografías realizadas con el microscopio electrónico de transmisión a dichas preparaciones (Figura 4. 3) ponen de manifiesto que las vesículas formadas poseen unas características estructurales deficientes (fusión, heterogeneidad, forma irregular) en comparación con los arqueosomas producidos por *H. californiae* ATCC 33799.

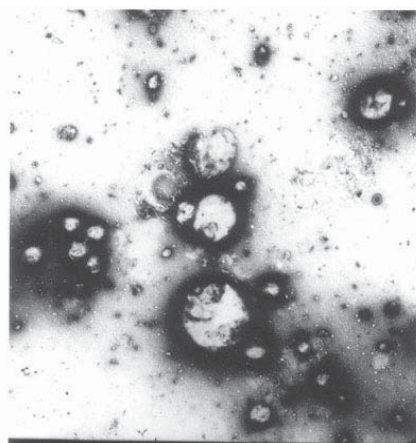
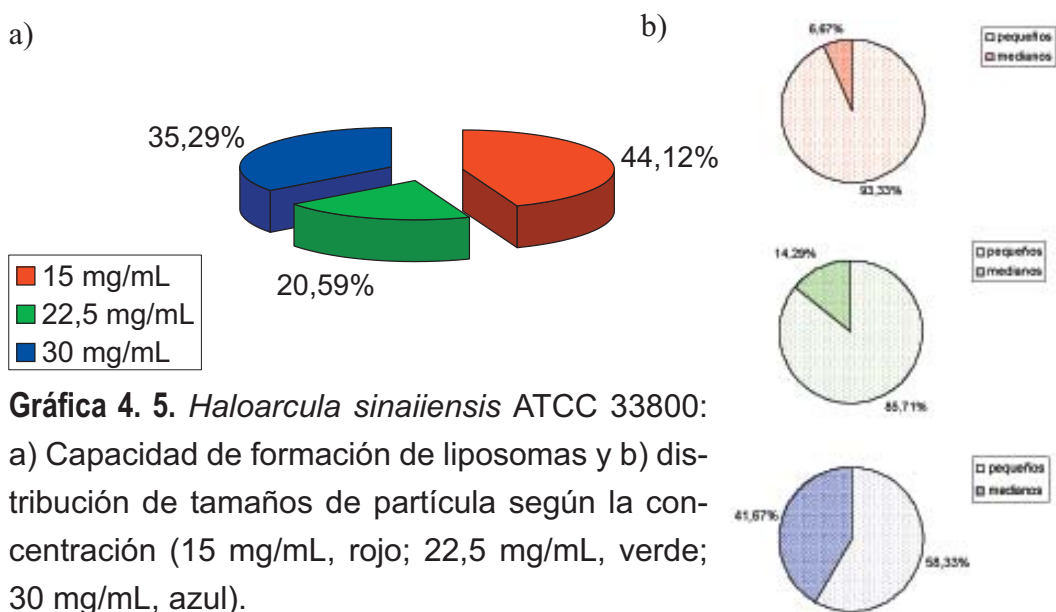


Figura 4. 3. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con 30 mg/mL.

1. 2. 1. 4. *H. sinaiensis* ATCC 33800.

No se ha detectado una correlación directa entre la capacidad de formación de liposomas por el extracto lipídico polar total de esta halobacteria y la concentración usada del mismo: el máximo porcentaje de formación ha sido obtenido para la menor concentración y la mínima capacidad para la concentración intermedia.

No obstante sí se aprecia una correlación en la distribución de tamaños: el porcentaje de liposomas “medianos” aumenta en relación directa con la concentración lipídica, hasta casi igualarse los porcentajes de “pequeños” y “medianos” a 30 mg/mL (Gráfica 4. 5). Con esta distribución, parece que lo más útil sería trabajar con la concentración más baja ya que aumentaría el rendimiento de los lípidos extraídos, pero las microfotografías de que se dispone (Figura 4. 4) permiten observar que, a pesar de ser máxima la formación de liposomas a 15 mg/mL, el número de vesículas es insuficiente para hacer viable la aplicación biotecnológica de estos arqueosomas.



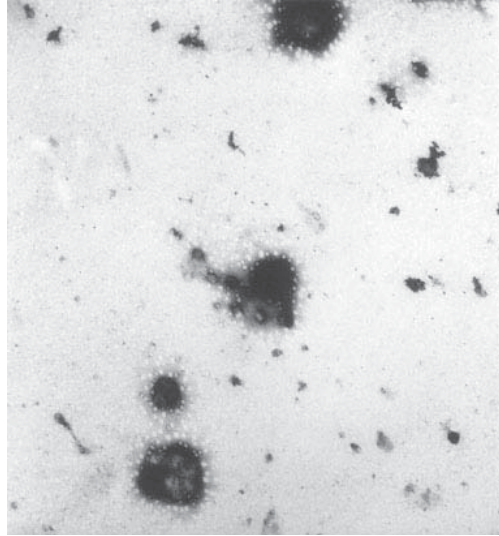


Figura 4. 4. Microfotografía de los arqueosomas obtenidos con 30 mg/mL.

Los resultados aportados por las cuatro cepas del genero *Haloarcula* investigadas permiten realizar una primera selección, optando por la cepa *Haloarcula californiae* ATCC 33799 como la más indicada para estudios posteriores. La concentración más adecuada sería la de 30 mg de lípidos/mL al existir mayor homogeneidad en el tamaño de las vesículas obtenidas y una elevada capacidad formadora de arqueosomas en comparación con el resto de concentraciones ensayadas.

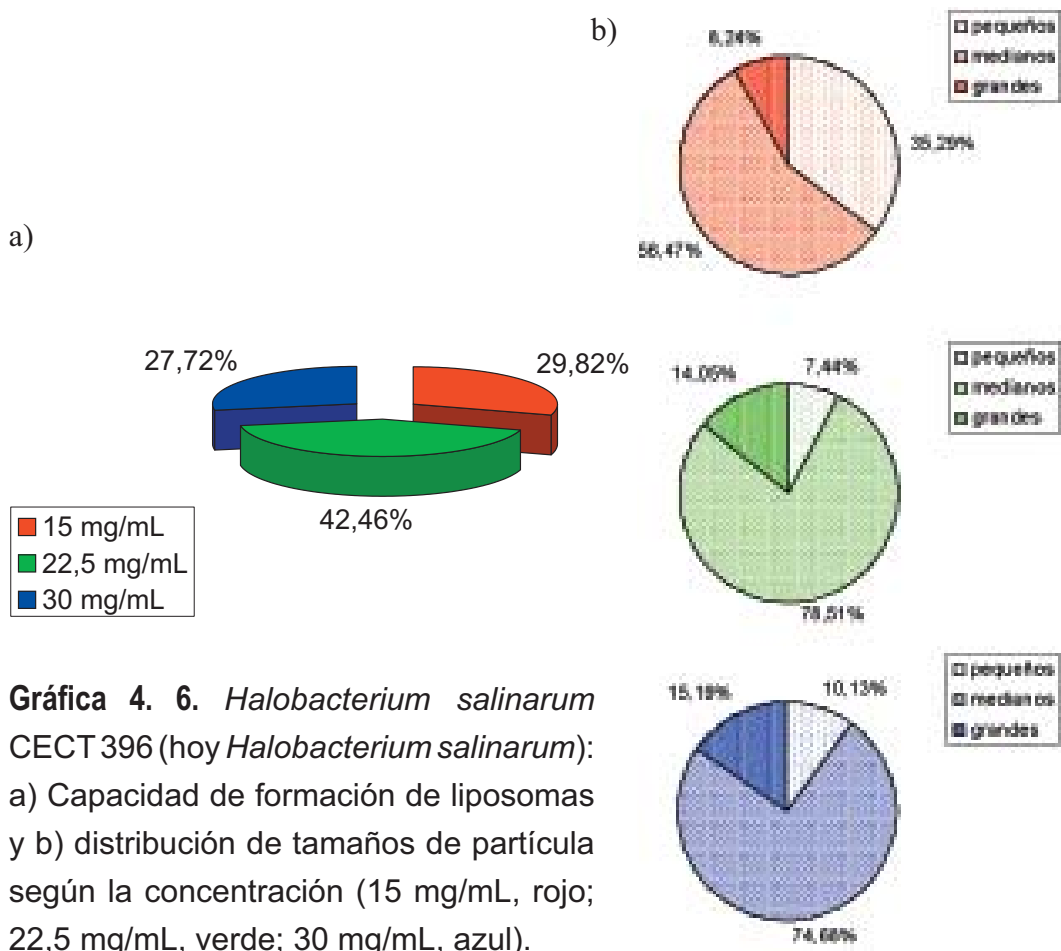
1. 2. 2. Género *Halobacterium*.

En este caso, una de las tres cepas incluidas en el estudio no formó liposomas a ninguna de las tres concentraciones ensayadas (*Halobacterium salinarum* DSM 3754). Es posible que, para esta cepa en particular, fuese insuficiente la concentración o bien, como dijimos con anterioridad, que fuese necesario cambiar las condiciones de elaboración de las vesículas.

Otra de las cepas (*Halobacterium salinarum* DSM 668) tuvo resultado positivo de formación de MLV con las dos concentraciones más elevadas (22,5 y 30 mg/mL), pero en ambos casos la formación fue escasa y no permitió realizar análisis posteriores de distribución de tamaños y de tipo estadístico.

1. 2. 2. 1. *H. salinarum* CECT 396.

En el caso de *Halobacterium salinarum* CECT 396, la Gráfica 4. 6 muestra que no es posible establecer una relación lineal entre la capacidad formadora de liposomas y la concentración debido a que ésta es máxima con 22,5 mg/mL y mínima a 30 mg/mL.



Gráfica 4. 6. *Halobacterium salinarum* CECT 396 (hoy *Halobacterium salinarum*): a) Capacidad de formación de liposomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (15 mg/mL, rojo; 22,5 mg/mL, verde; 30 mg/mL, azul).

Observando dicha gráfica podemos determinar que esta cepa forma mayoritariamente liposomas “medianos”, aunque la proporción de vesículas de diámetro “pequeño” y “grande” varía según la concentración:

- a 22,5 mg/mL, los arqueosomas “grandes” representan aproximadamente el doble de los “pequeños”,
- a 30 mg/mL, los porcentajes de arqueosomas de uno y otro tamaño (“pequeño” y “mediano”) casi se igualan.

Por tanto y en base a lo anterior se considera como más idónea la concentración intermedia (22,5 mg/mL): a esta concentración la formación de liposomas es la máxima (42,46 %) y se reduce la proporción de vesículas que no pertenecen al intervalo de diámetro mayoritario. Posiblemente sería necesario separar las fracciones de liposomas de diámetro mayor y menor que los predominantes.

Las microfotografías obtenidas (Figura 4. 5) corroboran la elección de 22,5 mg/mL como la concentración lipídica óptima para posteriores investigaciones sobre el grado de encapsulación y la estabilidad de arqueosomas de esta cepa del género *Halobacterium*. Es destacable la extraordinaria homogeneidad entre las distribuciones de frecuencias (Gráfica 4. 7) de las tres concentraciones, que pone de manifiesto la fiabilidad de este género para la formación de liposomas.

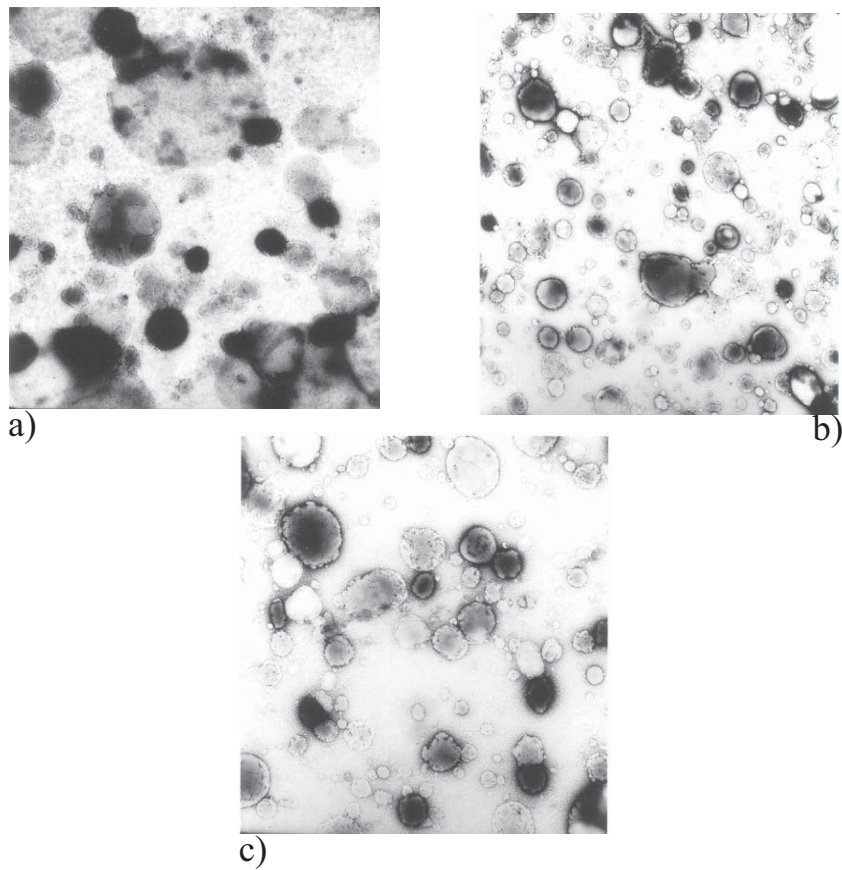
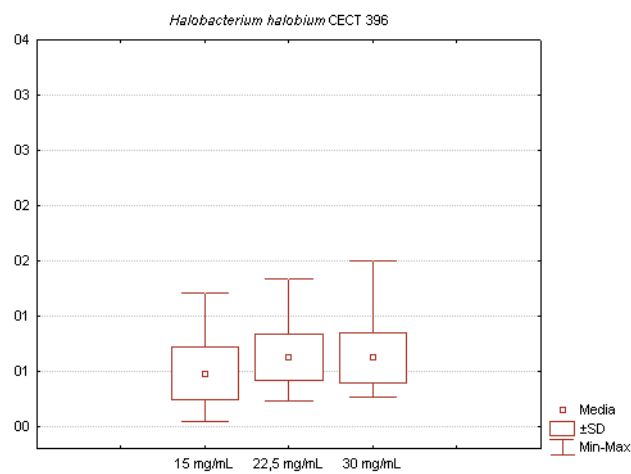


Figura 4. 5. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con 15, 22,5 y 30 mg/mL respectivamente.



Gráfica 4. 7. *Halobacterium halobium* CECT 396 (hoy *Halobacterium salinarum*): Análisis estadístico básico de los resultados obtenidos.

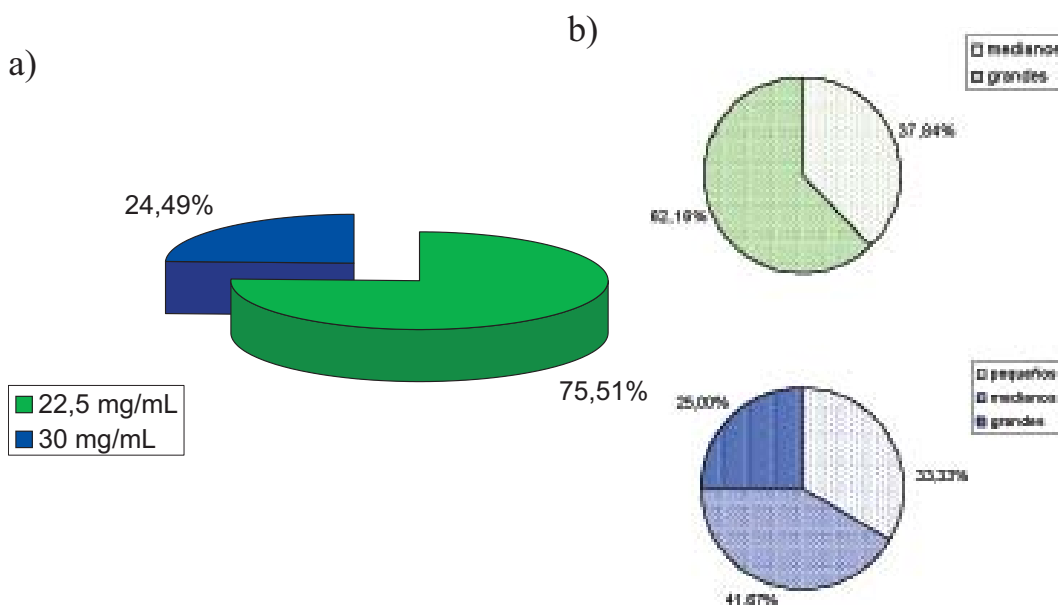
1. 2. 3. Género *Halococcus*.

1. 2. 3. 1. *H. morrhuae* DSM 1309.

Sólo obtuvimos liposomas al ensayar con 30 mg/mL y se formaron mayoritariamente vesículas “grandes” y “medianas” en menor cuantía. Tal vez se deberían ensayar otras concentraciones superiores para analizar la influencia de la concentración en la formación de los liposomas con estos lípidos, pero ese aspecto no estaba contemplado en el presente estudio y por tanto no se ha llevado a cabo.

1. 2. 3. 2. *H. morrhuae* DSM 1310.

La capacidad de formación de liposomas sigue, en las pruebas efectuadas, una relación inversa a la concentración de lípidos polares totales usada durante el estudio de selección de cepas (Gráfica 4. 8).



Gráfica 4. 8. *Halococcus morrhuae* DSM 1310: a) Capacidad de formación de liposomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (22,5 mg/mL, verde; 30 mg/mL, azul).

A 22,5 mg/mL, la distribución de tamaños es semejante a la obtenida con *H. morrhuae* DSM 1309, mientras que con 30 mg/mL también aparecen arqueosomas de diámetro “pequeño” y se reduce notablemente el porcentaje de liposomas “grandes”, a la vez que aumenta ligeramente el porcentaje de las vesículas “medianas”. Debido a esta distribución de tamaños, la concentración lipídica óptima para trabajar sería 22,5 mg/mL, ya que se maximiza el rendimiento del material extraído y se logra la mejor distribución de diámetros, con solo dos tipos de liposomas.

A pesar de la gran capacidad de formación de la cepa a 22,5 mg/mL, en la microfotografía (Figura 4. 6) se observan vesículas de morfología muy irregular y un exceso de lípido que no ha formado liposomas y que contamina la muestra. Por tanto, los resultados obtenidos no resultan totalmente satisfactorios por lo que no se selecciona esta cepa para estudios posteriores.

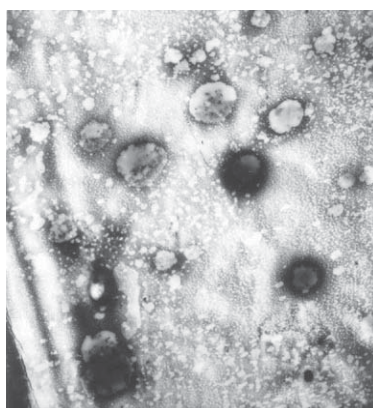
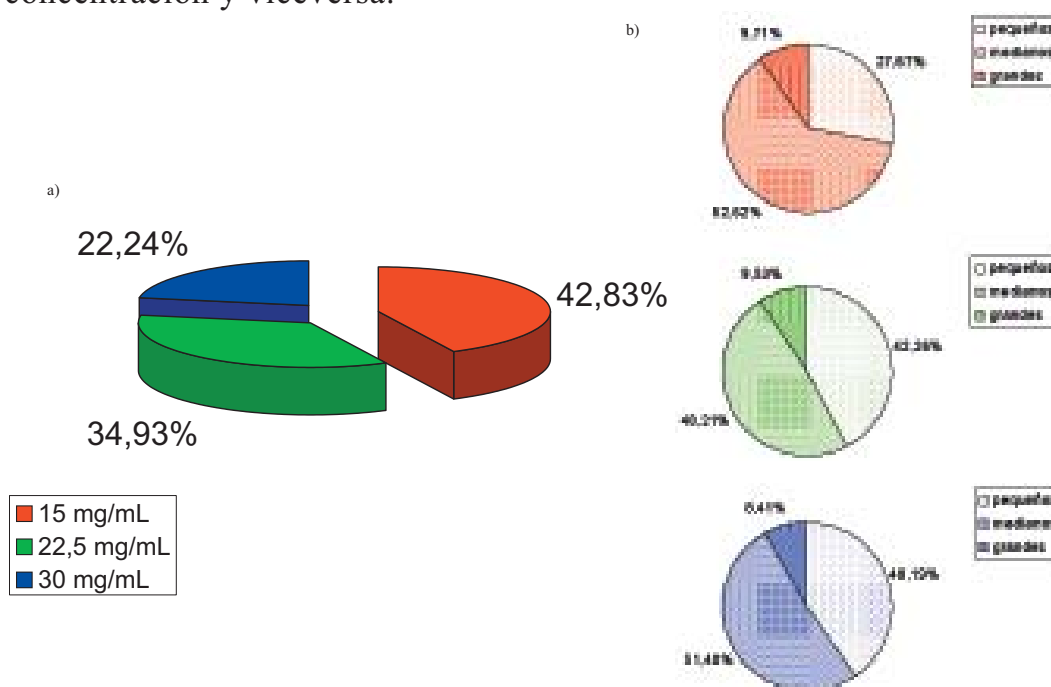


Figura 4. 6. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con 22,5 mg/mL.

1. 2. 3. 3. *H. morrhuae* NCIMB 757.

La formación de liposomas mantiene una relación inversa a la concentración lipídica utilizada: en la Gráfica 4. 9 se aprecia como la mayor proporción de liposomas formados se alcanza con la mínima concentración y viceversa.

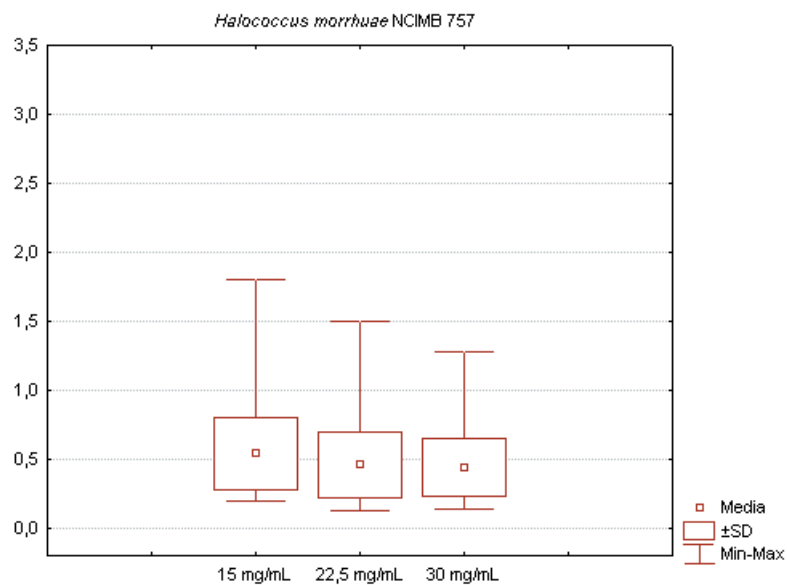


Gráfica 4. 9. *Halococcus morrhuae* NCMB 757: a) Capacidad de formación de arqueosomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (15 mg/mL, rojo; 22,5 mg/mL, verde; 30 mg/mL, azul).

En cuanto a la distribución de tamaños que muestran los diagramas en función de la concentración lipídica (Gráfica 4. 9), ésta indica que las medidas realizadas de los diámetros de los liposomas formados con 15 mg/mL mostraron una mayor presencia de liposomas “medianos”, pero también aparecen vesículas “pequeñas” y algunas “grandes”. Cuando se realizaron las medidas en las muestras de 22,5 mg/mL y 30 mg/mL se encontró un porcentaje de vesículas “grandes” muy próximo

al de la muestra de menor concentración. Pero en estas dos muestras se reduce el porcentaje de liposomas “medianos” y se eleva el de liposomas “pequeños”.

Por tanto, y en base a los resultados obtenidos, se podría seleccionar para trabajos posteriores la concentración de 30 mg/mL. A este valor, la formación de liposomas “grandes” es mínima. Asimismo, el análisis estadístico denota una menor dispersión y desviación estándar (Gráfica 4. 10). Finalmente la caracterización microscópica de las muestras (Figura 4. 7) pone de manifiesto una elevada uniformidad de tamaño en los arqueosomas obtenidos para esta cepa a la concentración de 30 mg/mL. Dicha cepa y concentración se considerarían las más adecuadas en esta etapa de selección.



Gráfica 4. 10. *Halococcus morrhuae* NCMB 757: Análisis estadístico básico de los resultados obtenidos.

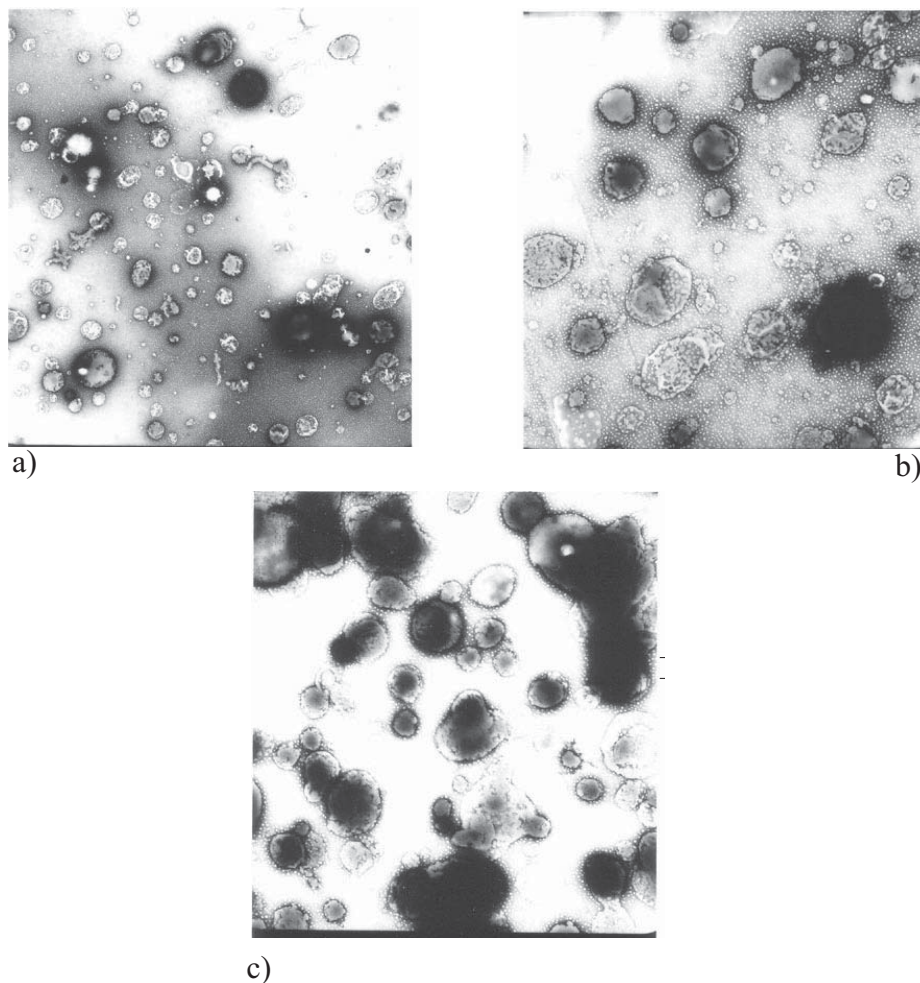
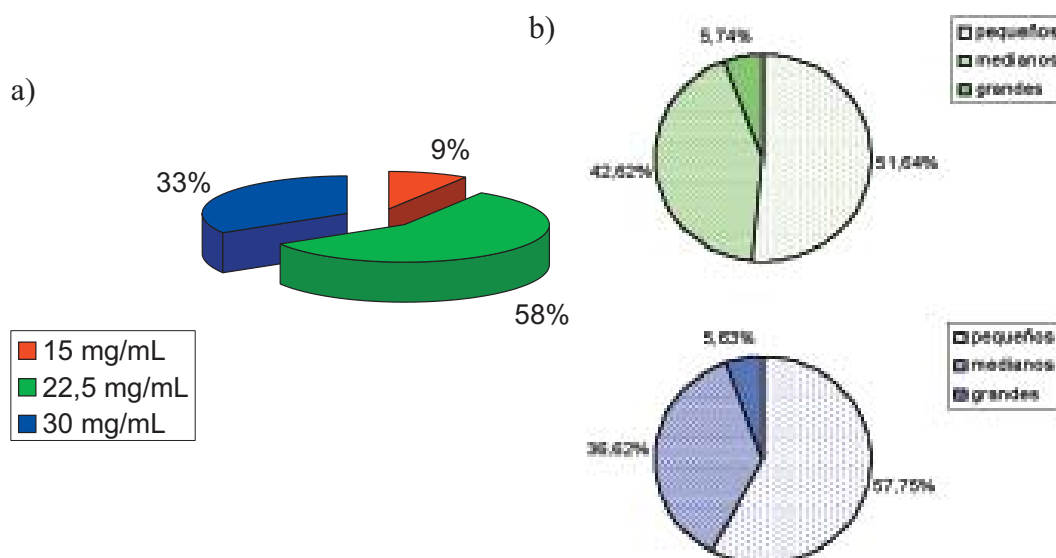


Figura 4. 7. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con: a) 15 mg/mL, b) 22,5 mg/mL y c) 30 mg/mL.

1. 2. 4. Género *Halorubrum*.

1. 2. 4. 1. *H. coriense* DSM 10284.

La máxima capacidad de formar liposomas con los lípidos de esta cepa se observa al trabajar con 22,5 mg/mL y la menor, cuando la concentración es mínima, considerándose de baja formación por ser inferior al 10% del total de las medidas. En cambio, al estudiar la distribución de los diámetros de los liposomas, la concentración con mejor distribución es la de 30 mg/mL, con una fracción de arqueosomas “grandes” menor que la obtenida a 22,5 mg/mL. Esto queda reflejado en la Gráfica 4. 11:



Gráfica 4. 11. *Halorubrum coriense* DSM 10284: a) Capacidad de formación de liposomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (22,5 mg/mL, verde y 30 mg/mL, azul).

Las siguientes microfotografías (Figura 4. 8) muestran imágenes de las preparaciones a 22,5 y 30 mg/mL, donde se observa la tendencia a fusionarse de las vesículas formadas empleando la concentración superior. En cambio, a 22,5 mg/mL se pueden apreciar cómo las vesículas están aisladas y son uniformes.

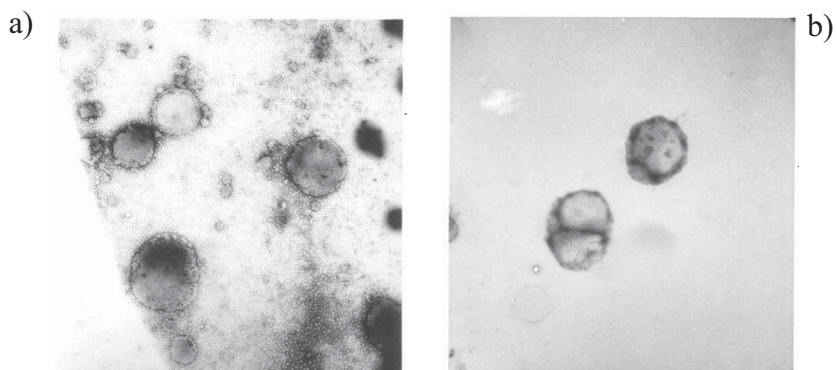
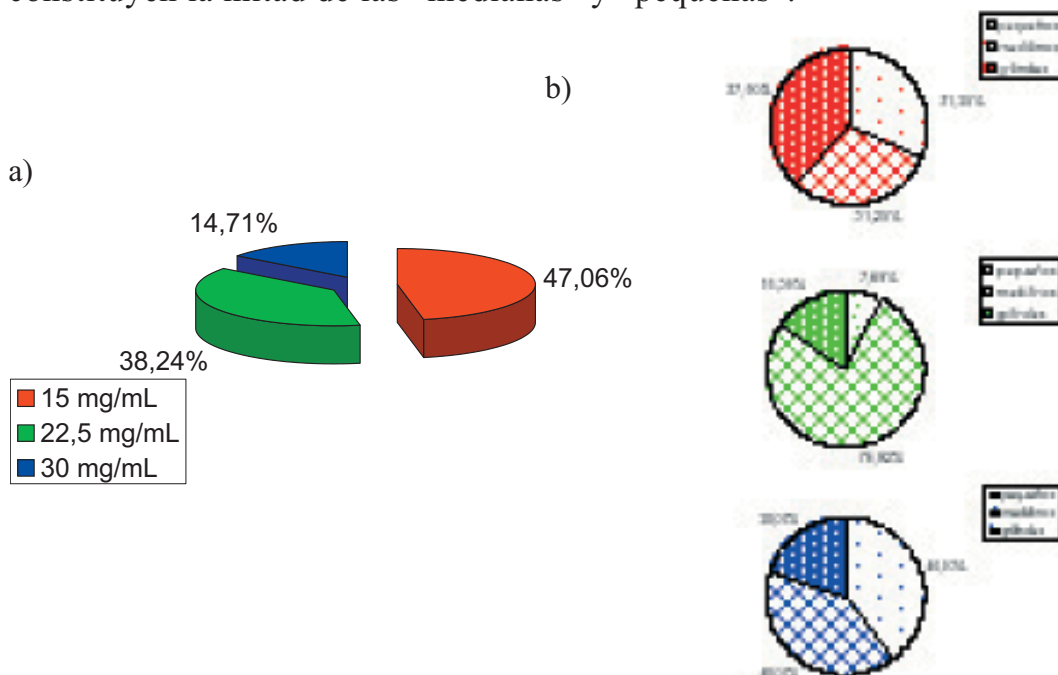


Figura 4. 8. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con: a) 22,5 mg/mL y b) 30 mg/mL.

1. 2. 4. 2. *H. saccharovorum* DSM 1137.

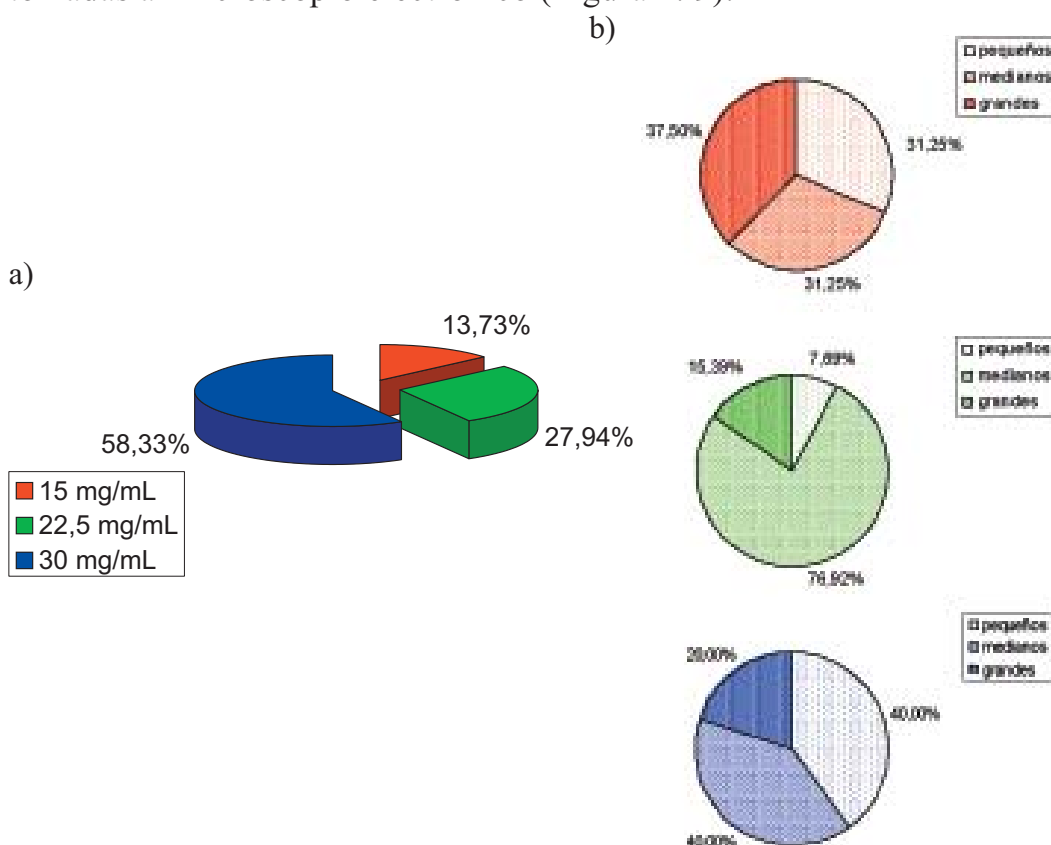
Se ha percibido una relación inversa a la concentración en la capacidad de formación de liposomas con los lípidos de esta arquea. Además, no parece factible establecer una dependencia entre la concentración y la distribución de diámetros de los liposomas obtenidos, puesto que con 15 mg/mL predominan los liposomas “grandes” y encontramos proporciones iguales de los “medianos” y los “pequeños” (Gráfica 4. 12). En cambio, cuando se estudia la distribución de los diámetros en la muestra de concentración intermedia, hay mayoritariamente arqueosomas “medianos” y los de diámetro “pequeño” son los menos abundantes. Al analizar los diámetros de los liposomas medidos en las muestras de 30 mg/mL, las vesículas menos abundantes son de diámetro “grande” y constituyen la mitad de las “medianas” y “pequeñas”.



Gráfica 4. 12. *Halorubrum saccharovorum* DSM 1137: a) Capacidad de formación de liposomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (15 mg/mL, rojo; 22,5 mg/mL, verde y 30 mg/mL, azul).

1. 2. 4. 3. *H. sodomense* DSM 3755.

La capacidad de formación de *H. sodomense* DSM 3755 mantiene una relación directa a la concentración. De esta forma, en la Gráfica 4. 13 puede observarse este hecho, así como en las fotografías adjuntas tomadas al microscopio electrónico (Figura 4. 9).



Gráfica 4. 13. *Halorubrum sodomense* DSM 3755: a) Capacidad de formación de liposomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (22,5 mg/mL, verde y 30 mg/mL, azul).

Respecto a la distribución de diámetros en los liposomas formados con los lípidos de esta haloarquea, se forman fundamentalmente arqueosomas “medianos”, y su porcentaje va disminuyendo al aumentar la concentración lipídica, permitiendo que aumente el porcentaje de los liposomas “grandes”.

Los liposomas “pequeños” son, en todas las muestras, los menos abundantes y, al igual que los “medianos” disminuyen porcentualmente al aumentar la concentración lipídica empleada en la preparación de las muestras.

El análisis estadístico realizado a los datos obtenidos señala que tanto la desviación estándar como la dispersión de los datos son mínimas con 15 mg/mL.

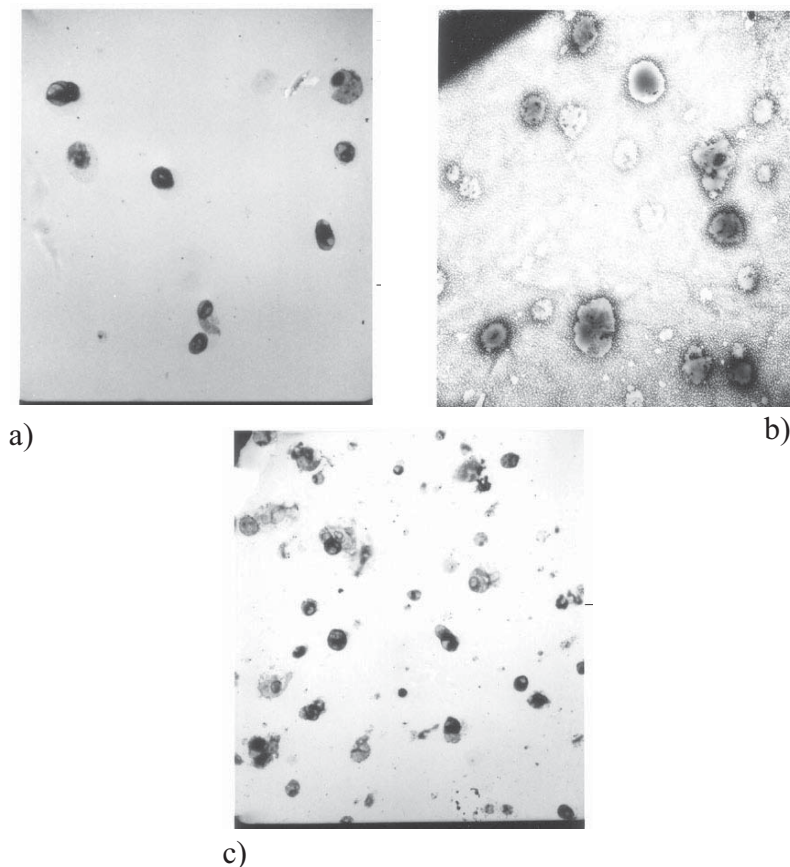
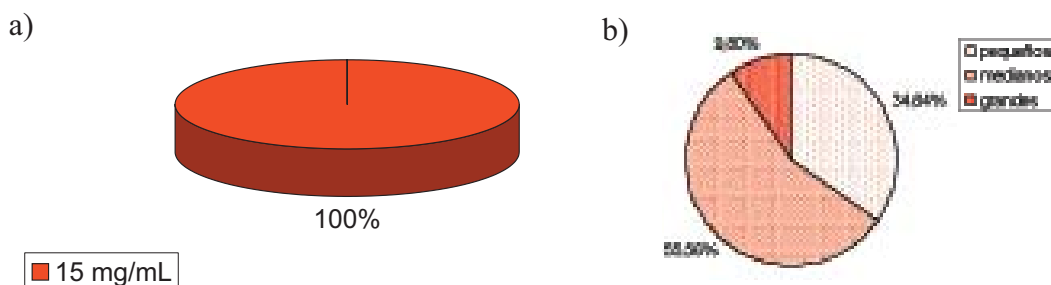


Figura 4. 9. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con: a) 15 mg/mL, b) 22,5 mg/mL y c) 30 mg/mL.

Como resumen de estas observaciones, podemos decir que la optimización de los lípidos extraídos y de los arqueosomas formados se alcanzaría empleando la mínima concentración de las tres ensayadas.

1. 2. 4. 4. *H. tebenquichense* CECT 5317.

Sólo se obtuvieron liposomas al ensayar con 15 mg/mL. Se formaron principalmente vesículas “medianas” y la proporción menor fue la de arqueosomas “grandes” (Gráfica 4. 14). La presencia de tres fracciones podría dificultar el trabajo con esta cepa.



Gráfica 4. 14. *Halorubrum tebenquichense* CECT 5317: a) Capacidad de formación de liposomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (15 mg/mL, rojo).

La caracterización al microscopio electrónico de las muestras preparadas con *H. tebenquichense* CECT 5317 (Figura 4. 10) revelan una muy elevada formación de vesículas, junto con su fusión, lo cual representa un aspecto negativo para realizar los ensayos de encapsulación y estabilidad con esta cepa, por lo cual quedaría descartada.

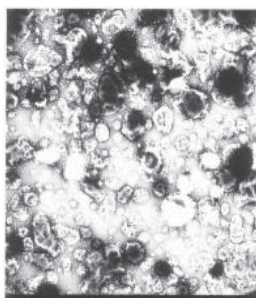
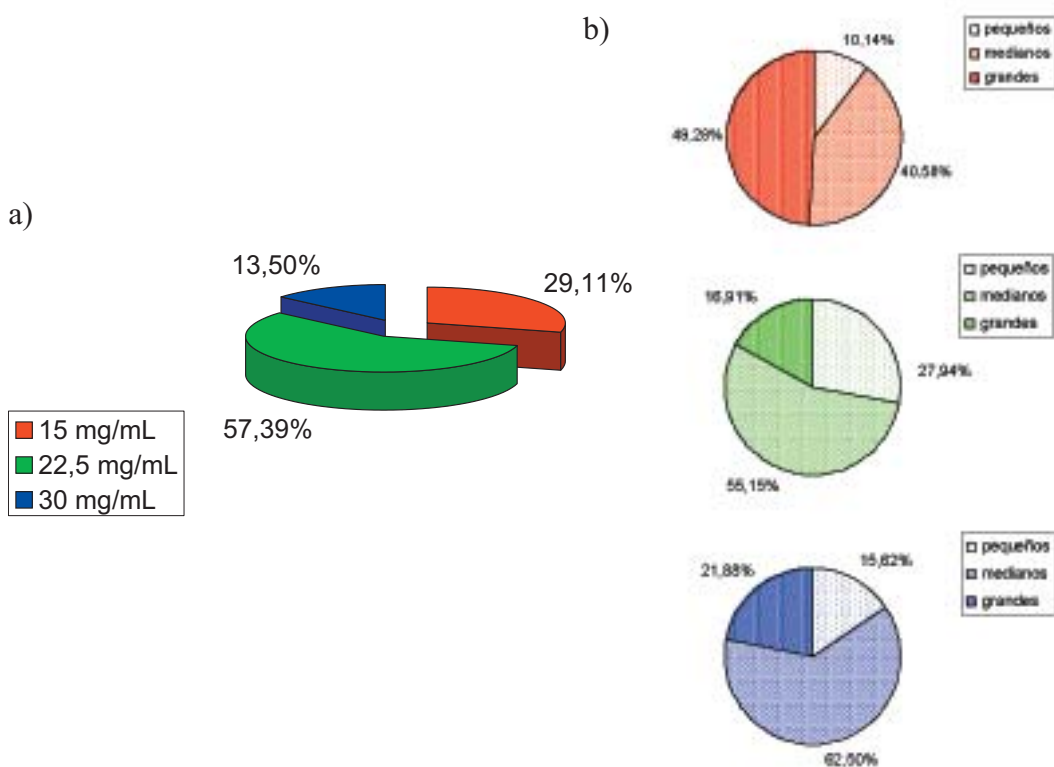


Figura 4. 10. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con 15 mg/mL.

1. 2. 4. 5. *H. trapanicum* CECT 397.

No se puede establecer relación entre la capacidad de formar liposomas y la concentración de lípidos utilizada en la elaboración de los arqueosomas.

En cuanto a la distribución de tamaño de las vesículas obtenidas se observa en la Gráfica 4.15 un incremento de los liposomas de tamaño “mediano” al aumentar la concentración lipídica usada, pero las vesículas formadas con diámetro “pequeño” y “grande” varían sin seguir una posible correspondencia con la concentración de lípidos.



Gráfica 4. 15. *Halorubrum trapanicum* CECT 397: a) Capacidad de formación de liposomas y b) distribución de tamaños de partícula según la concentración (15 mg/mL, rojo; 22,5 mg/mL, verde y 30 mg/mL, azul).

Las microfotografías de los arqueosomas obtenidos con estos lípidos (Figura 4. 11) muestran que las vesículas formadas son escasas con 15 mg/mL. Al aumentar la concentración a 22,5 mg/mL, se observa un elevado grado de fusión de las vesículas en las que, además, se observa una bicapa lipídica externa más fina e irregular que en los liposomas obtenidos con los lípidos de otras cepas. Esto sugiere excluir esta cepa en las próximas etapas del estudio.

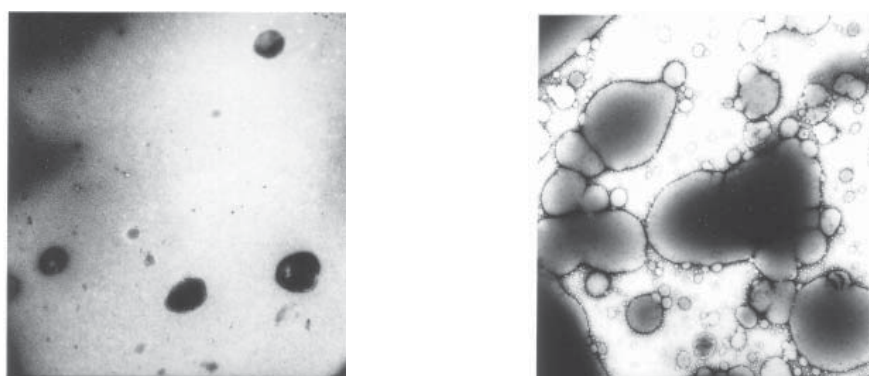


Figura 4. 11. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con: a) 15 mg/mL y b) 22,5 mg/mL.

Los datos experimentales aportados por el género *Halorubrum*, del que se ensayaron seis cepas, indican que, aunque se ha detectado formación en cinco de las cepas analizadas, únicamente *H. coriense* DSM 10284 proporciona resultados lo suficientemente adecuados para su empleo posterior en estudios de encapsulación de principios activos. Dicha cepa a la concentración de 22,5 mg/mL manifiesta una capacidad elevada para formar liposomas (58%), siendo estos de tamaño bastante uniforme y que conservan su individualidad, frente a frecuentes estados de agregación observados en las otras cepas y concentraciones investigadas.

CONCLUSIÓN:

El estudio de la capacidad formadora de arqueosomas por arqueas halófilas extremas ha permitido preseleccionar como más adecuadas, para estudios posteriores de encapsulación de fármacos y de estabilidad en el tiempo, a las siguientes cepas en las concentraciones lipídicas indicadas (Tabla 4. 3):

Tabla 4. 3. Cepas preseleccionadas para la obtención de arqueosomas.

Género	Cepa seleccionada	Concentración lipídica más adecuada (mg/mL)
<i>Haloarcula</i>	<i>H.californiae</i> ATCC 33799	30
<i>Halobacterium</i>	<i>H. salinarum</i> CECT 396	22,5
<i>Halococcus</i>	<i>H. morrhuae</i> NCMB 757	30
<i>Halorubrum</i>	<i>H. coriense</i> DSM 10824	22,5

Diferentes investigadores también han evaluado la capacidad para formar liposomas a partir de lípidos de distintas arqueas. Ring *et al.* (1983) elaboraron liposomas uni y plurilaminares utilizando lípidos tetraéter de la arquea termoacidófila *Thermoplasma acidophilum*, obteniendo vesículas de diámetros inusualmente grandes. Investigaciones similares se han realizado con diferentes arqueas metanógenas (Choquet *et al.*, 1992). En este caso se formaron liposomas unilaminares de tamaños variados, pero bastante grandes, a partir de lípidos tetraéter.

Tras esta primera fase de preselección, se abordaron otros aspectos al objeto de seleccionar una única cepa para desarrollar con ella los estudios de encapsulación del corticoide elegido.

Se han tenido en cuenta las características estructurales de los arqueosomas obtenidos (forma, individualidad, agregación) y su homogeneidad de tamaño. También se ha considerado la facilidad o no de crecimiento de las cepas, aspecto de especial interés con vistas a aplicaciones futuras.

De las cuatro cepas preseleccionadas, se ha elegido *H. salinarum* CECT 396. Esta cepa posee mejor crecimiento en comparación con las otras tres. Asimismo, los resultados indican una elevada homogeneidad en el tamaño de los liposomas obtenidos (un 74-78% de las vesículas poseen un diámetro comprendido entre 0,4 y 0,8 μm , a las concentraciones de 22,5 y 30 mg/mL) (Gráfica 4. 6).

Las microfotografías obtenidas (Figura 4. 4) muestran la presencia de liposomas mayoritariamente “medianos”, de forma definida y con bajo grado de agregación, aspectos positivos para su uso como vectores de fármacos.

2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO.

Con la validación del método analítico se pretende demostrar, de forma empírica, que dicho método es fiable dentro de unos intervalos definidos. El método utilizado en esta memoria para medir y cuantificar la cantidad de dipropionato de betametasona presente en las distintas muestras es la espectrofotometría ultravioleta-visible. Por tanto, se ha procedido a su validación para la longitud de onda utilizada, 239,6 nm, en etanol de 90°.

Los criterios considerados son: linealidad, exactitud y precisión (Caraballo *et al.*, 1998).

2. 1. Linealidad.

Se puede definir como la proporcionalidad entre la concentración de analito y la respuesta en el intervalo de concentraciones de producto utilizadas para las cuales el método es satisfactorio.

A la hora de realizar los ajustes lineales, se ha recurrido al método de los mínimos cuadrados, de acuerdo con el cual se obtienen rectas de la forma: $y = a + b x$. Se ha forzado la ecuación de la recta a pasar por el origen de ordenadas, es decir, se ha hecho nulo el valor de **a**, puesto que correspondería a la absorbancia del blanco empleado. El coeficiente de extinción molar está representado en el ajuste lineal por **b**, puesto que el espesor de la cubeta empleada es de 1 cm.

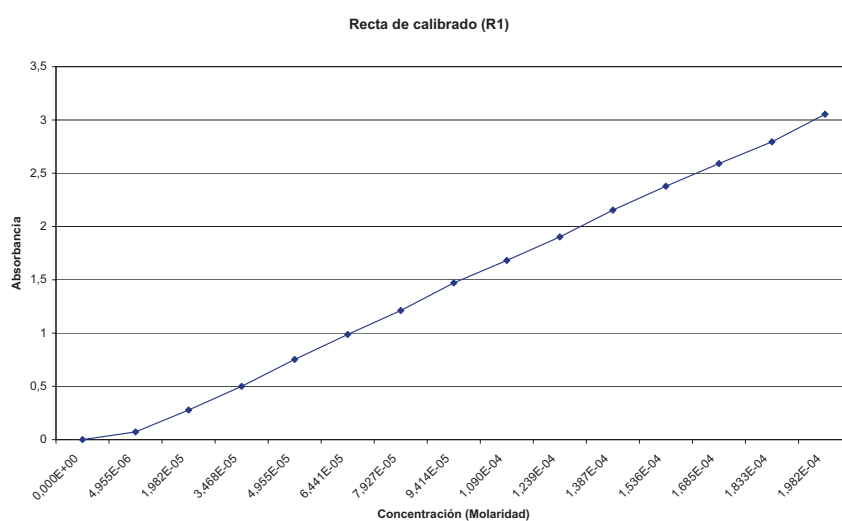
Teniendo en cuenta los datos obtenidos (Tablas 4. 4 y 4. 5), podemos decir que el resultado del estudio de linealidad es $y = (15247 \pm 110) x$, $r = (0,9992 \pm 0,0010)$ para el alcohol de 90°. En consecuencia, puede considerarse lineal (Gráfica 4. 16).

Tabla 4. 4. Representa los valores de la ordenada en el origen (a), la pendiente (b) y el coeficiente de correlación lineal (r) para las seis rectas de calibrado en alcohol de 90°.

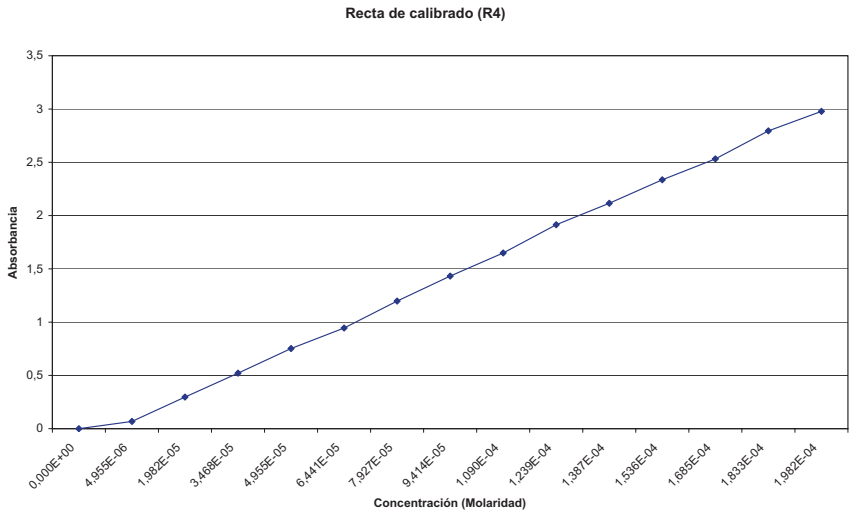
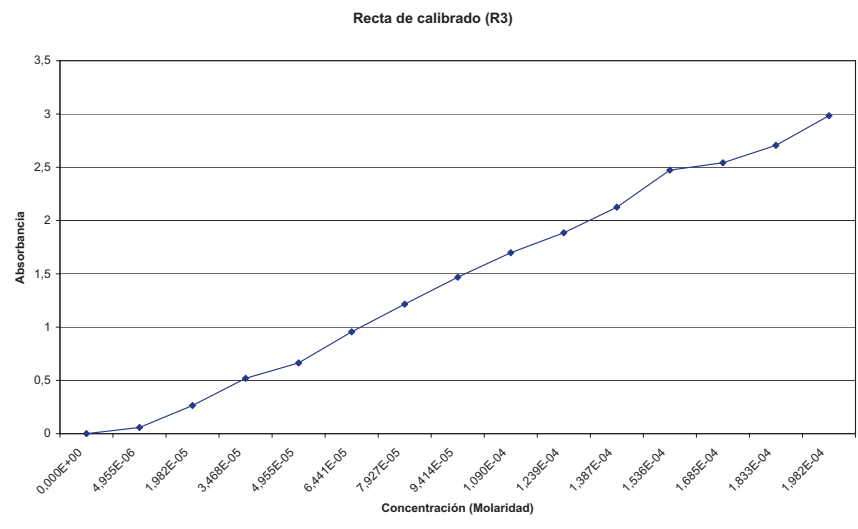
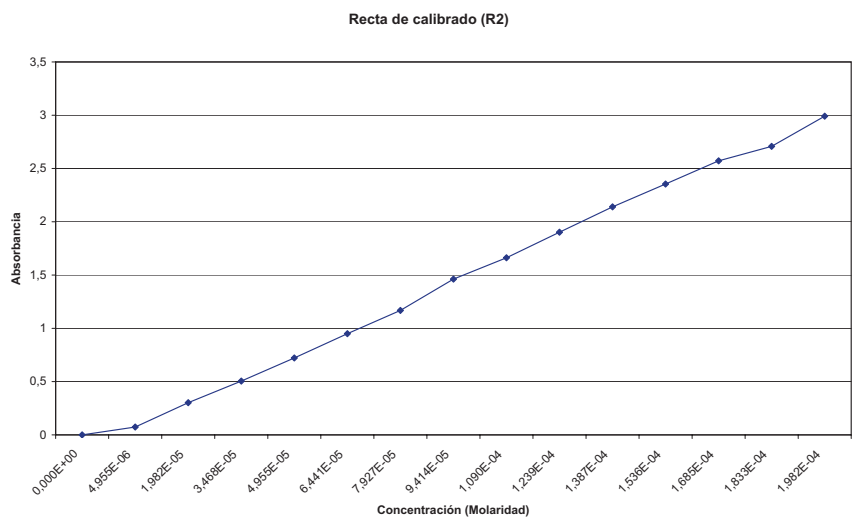
	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6
a	0	0	0	0	0	0
b	15387	15146	15211	15155	15201	15384
r	0,9997	0,9991	0,9971	0,9997	0,9997	0,9996

Tabla 4. 5. Representa la media y la desviación estándar de la ordenada en el origen (a), la pendiente (b) y el coeficiente de correlación lineal (r) para las seis rectas de calibrado en solución reguladora de fosfatos de Soerensen, pH= 7,2.

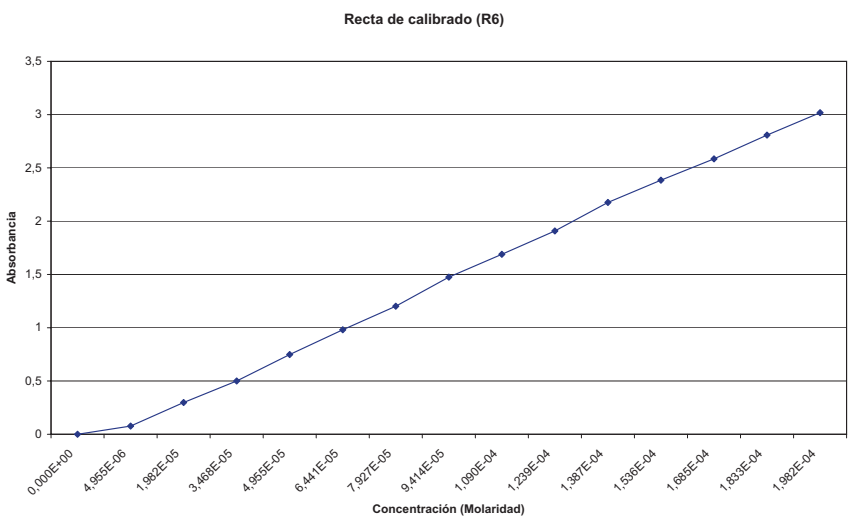
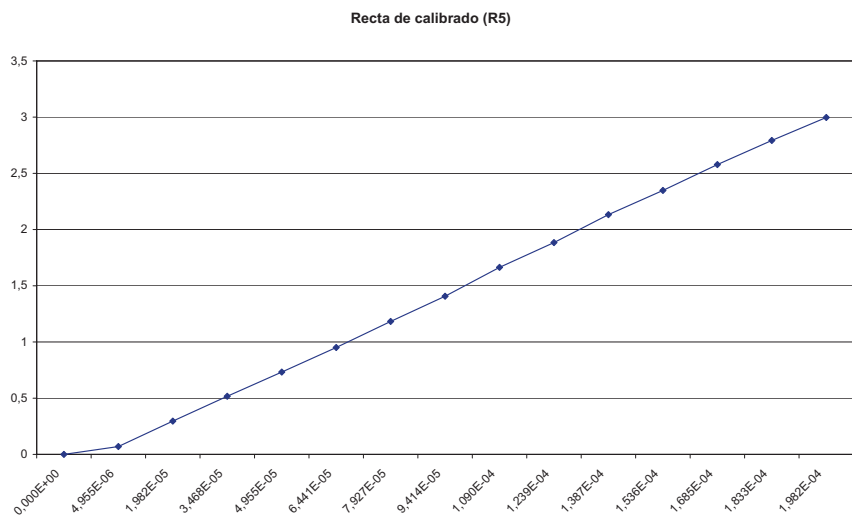
	Media	Desv. Est.
a	0,0000	0,0000
b	15247	110
r	0,9992	0,0010



Gráfica 4. 16. Rectas de calibrado del método analítico.



Gráfica 4. 16. Rectas de calibrado del método analítico.



Gráfica 4. 16. Rectas de calibrado del método analítico.

2. 2. Exactitud.

Es el error sistemático e indica la capacidad del método analítico para dar resultados lo más próximos posible al valor real. Se calcula a partir del error relativo y del coeficiente de variación para cada una de las concentraciones de las rectas.

El error relativo y el coeficiente de variación, expresados en porcentaje (Tablas 4. 6 y 4. 7), no superan en ningún caso el 10%. Por tanto, este método es **exacto** en el medio ensayado.

Tabla 4. 6. Representa las concentraciones teóricas frente a las concentraciones experimentales de las seis rectas de calibrado en alcohol de 90°.

Conc. teórica (M)	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$4,955 \times 10^{-6}$	$4,679 \times 10^{-6}$	$4,886 \times 10^{-6}$	$3,813 \times 10^{-6}$	$4,487 \times 10^{-6}$	$4,605 \times 10^{-6}$	$5,005 \times 10^{-6}$
$1,982 \times 10^{-5}$	$1,807 \times 10^{-5}$	$1,994 \times 10^{-5}$	$1,736 \times 10^{-5}$	$1,960 \times 10^{-5}$	$1,947 \times 10^{-5}$	$1,937 \times 10^{-5}$
$3,468 \times 10^{-5}$	$3,249 \times 10^{-5}$	$3,334 \times 10^{-5}$	$3,412 \times 10^{-5}$	$3,438 \times 10^{-5}$	$3,401 \times 10^{-5}$	$3,250 \times 10^{-5}$
$4,955 \times 10^{-5}$	$4,887 \times 10^{-5}$	$4,767 \times 10^{-5}$	$4,365 \times 10^{-5}$	$4,962 \times 10^{-5}$	$4,815 \times 10^{-5}$	$4,862 \times 10^{-5}$
$6,441 \times 10^{-5}$	$6,415 \times 10^{-5}$	$6,272 \times 10^{-5}$	$6,285 \times 10^{-5}$	$6,236 \times 10^{-5}$	$6,256 \times 10^{-5}$	$6,377 \times 10^{-5}$
$7,927 \times 10^{-5}$	$7,870 \times 10^{-5}$	$7,712 \times 10^{-5}$	$7,988 \times 10^{-5}$	$7,905 \times 10^{-5}$	$7,782 \times 10^{-5}$	$7,813 \times 10^{-5}$
$9,414 \times 10^{-5}$	$9,560 \times 10^{-5}$	$9,653 \times 10^{-5}$	$9,651 \times 10^{-5}$	$9,449 \times 10^{-5}$	$9,256 \times 10^{-5}$	$9,588 \times 10^{-5}$
$1,090 \times 10^{-4}$	$1,093 \times 10^{-4}$	$1,097 \times 10^{-4}$	$1,116 \times 10^{-4}$	$1,088 \times 10^{-4}$	$1,095 \times 10^{-4}$	$1,098 \times 10^{-4}$
$1,239 \times 10^{-4}$	$1,236 \times 10^{-4}$	$1,256 \times 10^{-4}$	$1,239 \times 10^{-4}$	$1,263 \times 10^{-4}$	$1,239 \times 10^{-4}$	$1,240 \times 10^{-4}$
$1,387 \times 10^{-4}$	$1,400 \times 10^{-4}$	$1,413 \times 10^{-4}$	$1,397 \times 10^{-4}$	$1,396 \times 10^{-4}$	$1,403 \times 10^{-4}$	$1,414 \times 10^{-4}$
$1,536 \times 10^{-4}$	$1,545 \times 10^{-4}$	$1,554 \times 10^{-4}$	$1,626 \times 10^{-4}$	$1,541 \times 10^{-4}$	$1,545 \times 10^{-4}$	$1,550 \times 10^{-4}$
$1,685 \times 10^{-4}$	$1,684 \times 10^{-4}$	$1,698 \times 10^{-4}$	$1,671 \times 10^{-4}$	$1,671 \times 10^{-4}$	$1,696 \times 10^{-4}$	$1,680 \times 10^{-4}$
$1,833 \times 10^{-4}$	$1,816 \times 10^{-4}$	$1,788 \times 10^{-4}$	$1,779 \times 10^{-4}$	$1,844 \times 10^{-4}$	$1,837 \times 10^{-4}$	$1,825 \times 10^{-4}$
$1,982 \times 10^{-4}$	$1,985 \times 10^{-4}$	$1,975 \times 10^{-4}$	$1,962 \times 10^{-4}$	$1,965 \times 10^{-4}$	$1,972 \times 10^{-4}$	$1,962 \times 10^{-4}$

Tabla 4. 7. Representa las concentraciones teóricas frente al error relativo y el coeficiente de variación de las concentraciones experimentales de las seis rectas de calibrado en etanol de 90°.

Conc. Teórica (M)	Error relativo (%)	C.V. (%)
0,000	0,00	0,00
$4,955 \times 10^{-6}$	7,58	9,17
$1,982 \times 10^{-5}$	4,29	5,36
$3,468 \times 10^{-5}$	3,48	2,48
$4,955 \times 10^{-5}$	3,59	4,44
$6,441 \times 10^{-5}$	2,08	1,14
$7,927 \times 10^{-5}$	1,04	1,24
$9,414 \times 10^{-5}$	-1,20	1,60
$1,090 \times 10^{-5}$	-0,73	0,88
$1,239 \times 10^{-4}$	-0,56	0,88
$1,387 \times 10^{-4}$	-1,20	0,574
$1,536 \times 10^{-4}$	-1,59	2,08
$1,685 \times 10^{-4}$	0,07	0,70
$1,833 \times 10^{-4}$	0,99	1,46
$1,982 \times 10^{-4}$	0,60	0,46

2. 3. Precisión.

Es la medida del grado de reproducibilidad de un método analítico o, dicho de otro modo, el grado de dispersión de los datos de los distintos replicados. Por consiguiente, se puede considerar como el error aleatorio y se determina a partir del coeficiente de variación de cada una de las concentraciones de las rectas de calibrado, aceptándose entre un 5-10%.

Tabla 4. 8. Representa las concentraciones teóricas frente a las absorbancias de las seis rectas de calibrado en etanol de 90°.

Conc. Teórica (M)	R1	R2	R3	R4	R5	R6
0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
$4,955 \times 10^{-6}$	0,072	0,074	0,058	0,068	0,070	0,077
$1,982 \times 10^{-5}$	0,278	0,302	0,264	0,297	0,296	0,298
$3,468 \times 10^{-5}$	0,500	0,505	0,519	0,521	0,517	0,500
$4,955 \times 10^{-5}$	0,752	0,722	0,664	0,752	0,732	0,748
$6,441 \times 10^{-5}$	0,987	0,950	0,956	0,945	0,951	0,981
$7,927 \times 10^{-5}$	1,211	1,168	1,215	1,198	1,183	1,202
$9,414 \times 10^{-5}$	1,471	1,462	1,468	1,432	1,407	1,475
$1,090 \times 10^{-5}$	1,682	1,662	1,698	1,649	1,664	1,689
$1,239 \times 10^{-4}$	1,902	1,902	1,885	1,914	1,884	1,908
$1,387 \times 10^{-4}$	2,154	2,140	2,125	2,116	2,133	2,176
$1,536 \times 10^{-4}$	2,378	2,354	2,473	2,336	2,348	2,385
$1,685 \times 10^{-4}$	2,591	2,572	2,542	2,532	2,578	2,585
$1,833 \times 10^{-4}$	2,795	2,708	2,706	2,795	2,793	2,808
$1,982 \times 10^{-4}$	3,054	2,991	2,984	2,978	2,997	3,018

El coeficiente de variación de las absorbancias de las rectas de calibrado (Tablas 4. 8 y 4. 9) para todas las concentraciones es, en todos los casos, menor al 10%; por tanto, podemos decir que este método es **preciso**.

Tabla 4. 9. Representa las concentraciones teóricas frente a la media, desviación estándar y coeficiente de variación de las absorbancias de las seis rectas de calibrado en etanol de 90°.

Conc. Teórica (M)	Media	Desv. Est.	C. V. (%)
0,000	0,000	0,000	0,00
$4,955 \times 10^{-6}$	$4,579 \times 10^{-6}$	$4,199 \times 10^{-7}$	9,17
$1,982 \times 10^{-5}$	$1,897 \times 10^{-5}$	$1,017 \times 10^{-6}$	5,36
$3,468 \times 10^{-5}$	$3,347 \times 10^{-5}$	$8,301 \times 10^{-7}$	2,48
$4,955 \times 10^{-5}$	$4,777 \times 10^{-5}$	$2,120 \times 10^{-6}$	4,44
$6,441 \times 10^{-5}$	$6,307 \times 10^{-5}$	$7,184 \times 10^{-7}$	1,14
$7,927 \times 10^{-5}$	$7,845 \times 10^{-5}$	$9,726 \times 10^{-7}$	1,24
$9,414 \times 10^{-5}$	$9,526 \times 10^{-5}$	$1,520 \times 10^{-6}$	1,60
$1,090 \times 10^{-5}$	$1,098 \times 10^{-5}$	$9,677 \times 10^{-7}$	0,88
$1,239 \times 10^{-4}$	$1,246 \times 10^{-5}$	$1,098 \times 10^{-6}$	0,88
$1,387 \times 10^{-4}$	$1,404 \times 10^{-4}$	$7,942 \times 10^{-7}$	0,57
$1,536 \times 10^{-4}$	$1,560 \times 10^{-4}$	$3,240 \times 10^{-6}$	2,08
$1,685 \times 10^{-4}$	$1,683 \times 10^{-4}$	$1,179 \times 10^{-6}$	0,70
$1,833 \times 10^{-4}$	$1,815 \times 10^{-4}$	$2,644 \times 10^{-6}$	1,46
$1,982 \times 10^{-4}$	$1,970 \times 10^{-4}$	$8,997 \times 10^{-7}$	0,46

CONCLUSIÓN: Se trata de un método lineal, preciso y exacto en el rango de concentraciones estudiadas.

3. FORMULACIÓN DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS.

En fase previa al estudio de encapsulación del dipropionato de betametasona en arqueosomas y liposomas, se ha investigado la incidencia sobre las características estructurales y tamaño de estos vectores de los siguientes factores:

- Cantidad de lípidos empleada en la elaboración (proporción lípidos: principio activo).

- Tiempo de agitación empleado en la obtención (método de Bangham, previamente normalizado en investigaciones anteriores).

3. 1. Proporción de “lípidos: dipropionato de betametasona”.

3. 1. 1. Arqueosomas.

3. 1. 1. 1. Caracterización por microscopía electrónica.

Los arqueosomas objeto de estudio se han elaborado con lípidos procedentes de la cepa *Halobacterium salinarum* CECT 396 . Al ser la única cepa seleccionada, y aunque los mejores resultados fueron aportados por la concentración lipídica de 22,5 mg/mL, se ha estimado oportuno realizar esta investigación con las concentraciones de 15, 22,5 y 30 mg/mL, con el fin de completar y reforzar los resultados previamente

obtenidos. En la elaboración, se ha incorporado a todas las muestras una concentración constante de dipropionato de betametasona (1mg/mL). (Fórmula A)

Los arqueosomas preparados con cada una de las proporciones se caracterizaron mediante microscopía electrónica de transmisión, lo cual permitió estudiar la estructura de las vesículas formadas en cada caso.

Los arqueosomas originados con 15 mg de lípidos polares totales presentaron una estructura homogénea con paredes lipídicas bien definidas y lisas. Se observaron zonas claras correspondientes a las membranas lipídicas hidrófobas y zonas electrodensas y oscuras correspondientes a las capas polares de los compartimentos acuosos y que revelaron la estructura multilaminar de las vesículas formadas.

En comparación con los liposomas obtenidos con fosfatidilcolina de yema de huevo (lípidos éster), presentaron un diámetro mayor y elevada variabilidad en el tamaño. Las microfotografías ponen de manifiesto una pared lipídica externa más rugosa en el caso de los arqueosomas ensayados (Figura 4. 12 a)).

Mayor fue la heterogeneidad de diámetros observada en las imágenes de los arqueosomas formados empleando 22,5 mg de los lípidos polares totales de la haloarquea seleccionada para este estudio. Su morfología era más irregular que en las muestras de liposomas éster (fosfatidilcolina) en general y de arqueosomas elaborados con menor cantidad de lípidos. Al igual que en los casos anteriores fue posible observar la alternancia entre

las bicapas lipídicas y los compartimentos acuosos concéntricos (Figura 4. 12 b)).

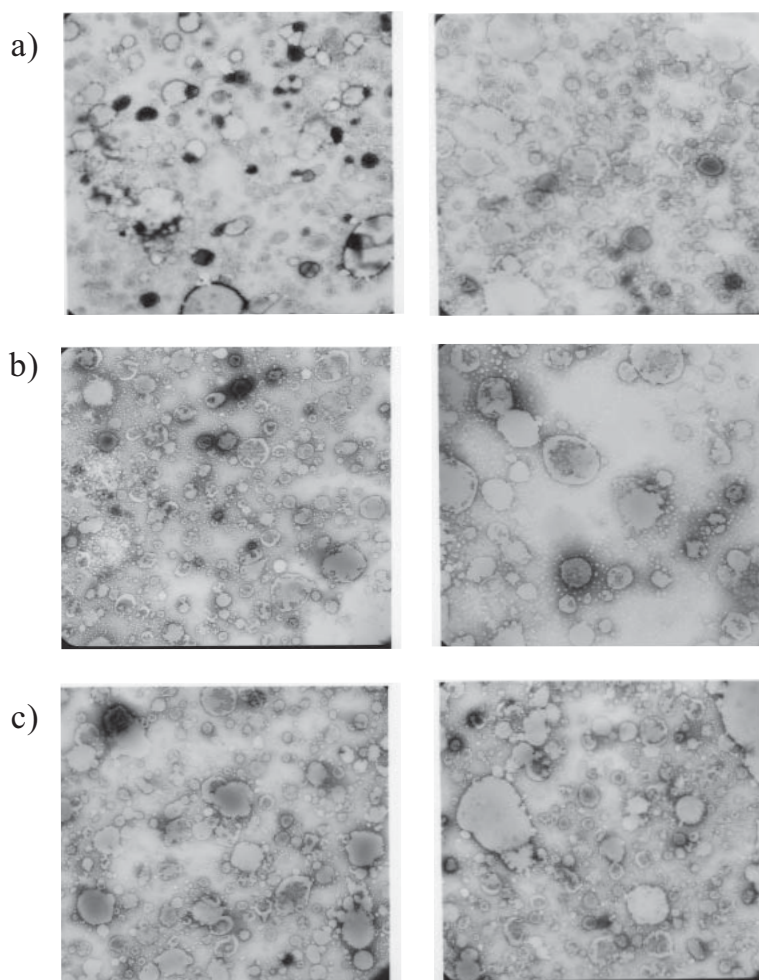


Figura 4. 12. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con distintas proporciones de “lípidos:p.a”:

Proporción (lípidos:p.a)	Concentración (mg/mL)
a)	15:1
b)	22,5:1
c)	30:1

mg/mL.

Los ensayos realizados empleando 30 mg de lípidos polares totales originaron liposomas con gran similitud a los obtenidos con 22,5 mg del extracto lipídico de *Halobacterium salinarum* CECT 396. Su diámetro medio coincidió con el de estos y fue superior al obtenido para los arqueosomas preparados con 15 mg de lípidos por cada miligramo del principio activo. Al igual que las vesículas elaboradas con 22,5 mg de los

lípidos eran más rugosos que los de 15 mg aunque a diferencia de aquellos la variabilidad en el diámetro fue algo menor como puede observarse en las microfotografías realizadas a las muestras (Figura 4. 12 c)).

3. 1. 1. 2. Análisis del tamaño.

La tabla 4. 10 resume los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de las medidas de diámetro de los arqueosomas elaborados con diferentes proporciones de lípidos y principio activo.

Tabla 4. 10. Análisis estadístico de los diámetros de los arqueosomas.

Diámetro medio \pm desviación estándar (μm)		
15:1	22,5:1	30:1
0,427 \pm 0,186	0,438 \pm 0,232	0,438 \pm 0,195

Al emplear 15 mg de extracto lipídico polar por miligramo de dipropionato de betametasona se obtuvieron los arqueosomas con menor diámetro medio (0,427 \pm 0,186 μm) y también con la mayor homogeneidad de tamaño. No obstante, los arqueosomas presentaron mayor dispersión en las medidas de diámetro que los liposomas elaborados con fosfatidilcolina.

Al aumentar la concentración lipídica los arqueosomas obtenidos presentaron igual diámetro medio en los dos casos (0,438 μm) pero también una distribución de tamaño más heterogénea. Cabe destacar que los liposomas elaborados con lípidos éster manifestaron mejores propiedades al incrementar la cantidad de fosfolípido respecto a la del fármaco, mientras que con los arqueosomas, elaborados con fosfolípidos

éter, revelaron mejores características al emplear menor cantidad del extracto lipídico polar total de *Halobacterium halobium* CECT 396 (menor tamaño y mayor homogeneidad).

3. 1. 2. Liposomas.

3. 1. 2. 1. Caracterización por microscopía electrónica.

Para realizar esta investigación, se elaboraron tres formulaciones de liposomas con 40 mg de fosfatidilcolina de yema de huevo y diferentes cantidades de betametasona (1, 2 y 3 mg).

Para esta primera fase de la investigación se ha utilizado una cantidad de fosfolípidos similar a la empleada por otros investigadores (Fresta *et al.*, 1997) en la encapsulación de diversos corticosteroides (betametasona y acetónido de triamcinolona).

Al estudiar las microfotografías realizadas a las muestras preparadas con cada una de estas proporciones de fosfolípido y principio activo se observaron diferentes características en los liposomas originados que detallaremos a continuación.

Se observó una alta homogeneidad en el tamaño de las vesículas formadas con 40 mg de fosfatidilcolina de yema de huevo por miligramo del corticoide. Respecto a la estructura de los liposomas obtenidos destaca la regularidad de las membranas liposomales que aparecen lisas en las microfotografías. También es posible observar zonas claras correspondientes a las bicapas lipídicas en las cuales se integró el

dipropionato de betametasona y zonas oscuras polares correspondientes a los compartimentos acuosos (Figura 4. 13 a)).

Los liposomas obtenidos con 40 mg de fosfatidilcolina y 2 mg de dipropionato de betametasona fueron más irregulares en cuanto se refiere a la distribución de tamaño de partícula posiblemente correspondiente a una distribución normal pero con gran desviación estándar. La dispersión en el tamaño de estas vesículas se puede observar también en las microfotografías tomadas en la visualización de la preparación, donde se obtuvieron imágenes a 7.000X y hasta 50.000X. También se pudieron observar vesículas con una membrana irregular y bordes rugosos (Figura 4. 13 b)).

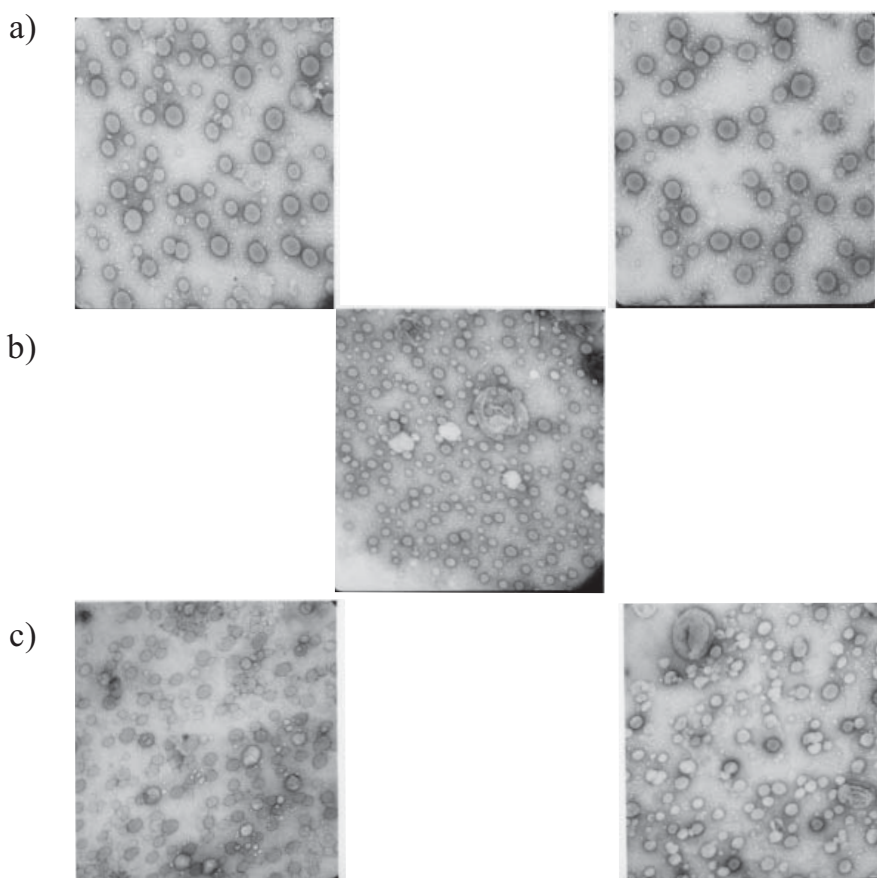


Figura 4. 13. Microfotografías de los liposomas obtenidos con distintas proporciones de "PC:p.a": a) 40:1 mg/mL, b) 40:2 mg/mL y c) 40: 3 mg/mL.

Por último, los liposomas elaborados con la mayor cantidad de principio activo respecto a la cantidad de fosfolípido (40 mg de fosfatidilcolina y 3 mg de dipropionato de betametasona) resultaron más homogéneos en el tamaño, aunque de menor diámetro que en los casos anteriores. Las imágenes captadas en las fotografías realizadas con el microscopio de transmisión electrónica pusieron de manifiesto que las vesículas presentaban una morfología más irregular que las obtenidas con mayor proporción de lípido respecto al principio activo (Figura 4. 13 c)).

3. 1. 2. 2. Análisis del tamaño.

La tabla 4. 11 resume los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de las medidas de diámetro de los liposomas elaborados con diferentes proporciones de lípidos y principio activo.

Tabla 4. 11. Análisis estadístico de los diámetros de los liposomas.

Diámetro medio \pm desviación estándar (μm)		
40:1	40:2	40:3
0,168 \pm 0,045	0,172 \pm 0,199	0,108 \pm 0,092

Los datos anteriores indican que las vesículas formadas con 40 mg de fosfatidilcolina por cada miligramo del principio activo presentan un diámetro medio de 0,168 μm y una desviación estándar muy baja (0,045 μm), es decir, una gran homogeneidad en el tamaño de partícula de los liposomas obtenidos. Por el contrario al aumentar la cantidad de principio activo, la dispersión en el tamaño de los liposomas es mayor. Por tanto, a la vista de estos resultados, la proporción entre fosfatidilcolina y dipropionato de betametasona más adecuada para la obtención de los liposomas era la primera (40:1).

3. 2. Influencia del tiempo de agitación.

Se ha investigado la influencia del tiempo de agitación, empleando durante la elaboración de estos vectores, en las características estructurales de los mismos y en el grado de encapsulación del principio activo objeto de estudio.

Para ello, las preparaciones se han sometido a diferentes tiempos de agitación (0, 3 y 6 h), caracterizándose por microscopía electrónica y determinándose su tamaño de partícula y grado de homogeneidad. Igualmente se ha evaluado el grado de encapsulación. Los tiempos de agitación seleccionados se han determinado en base a la bibliografía consultada (Nagarsenker *et al.*, 1999).

3. 2. 1. Arqueosomas.

3. 2. 1. 1. Caracterización por microscopía electrónica.

Se han preparado muestras utilizando 15 mg/mL de lípidos procedentes de *Halobacterium salinarum* CECT 396, por cada miligramo de dipropionato de betametasona. La concentración lipídica empleada fue la que proporcionó los mejores resultados en el estudio anterior (apartado 3. 1. 1.)

Las imágenes obtenidas mediante microscopía de transmisión electrónica para los arqueosomas con menor tiempo de agitación (Figura 4. 14 a)) mostraron una gran formación de vesículas lipídicas con una distribución de tamaños similar a la observada en las muestras preparadas

con 15 mg de lípidos polares totales por cada miligramo de principio activo. Respecto a la estructura, cabe destacar la alta homogeneidad que presentó la morfología de estos arqueosomas y la alternancia de zonas polares y apolares en las vesículas. Asimismo, las paredes lipídicas estaban bien definidas.

Los arqueosomas obtenidos después de una hidratación del film lipídico de tres horas presentaron mayor heterogeneidad en los diámetros de las vesículas, observable al estudiar las microfotografías realizadas a

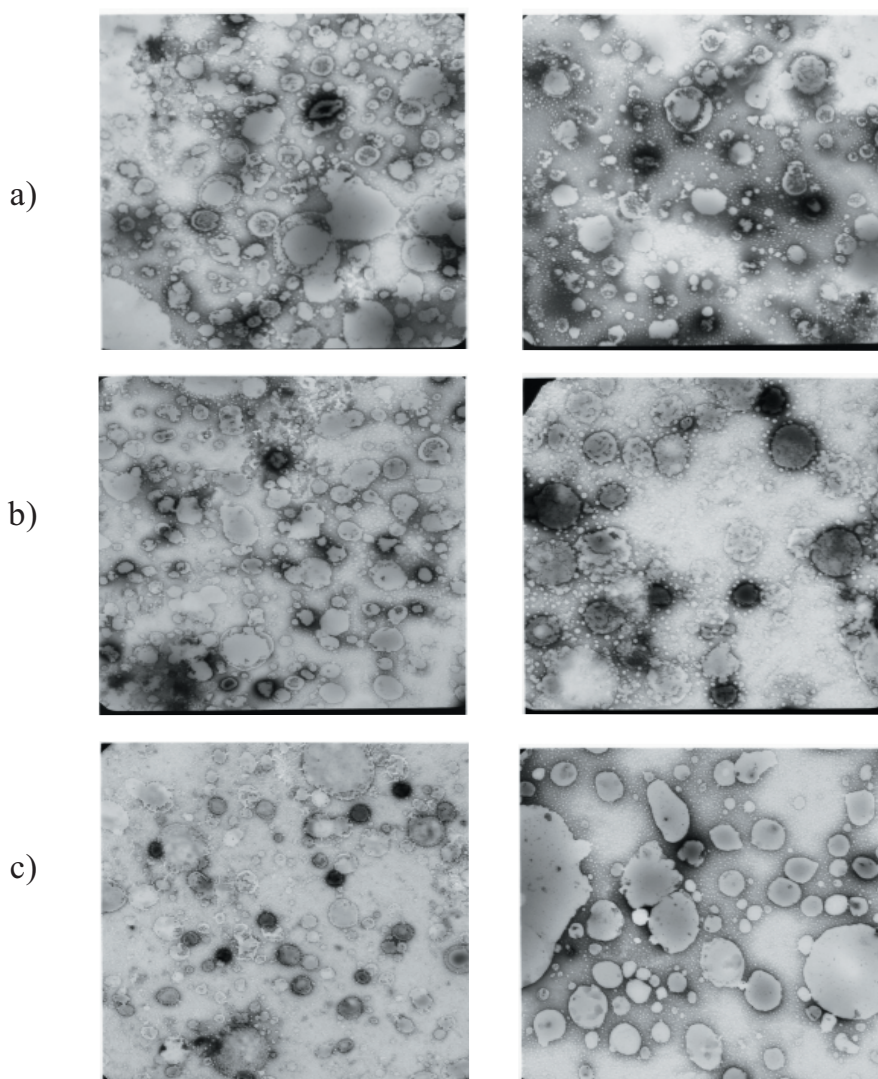


Figura 4. 14. Microfotografías de los arqueosomas obtenidos con distintos tiempos de agitación: a) 0h, b) 3h y c) 6h.

las muestras elaboradas en estas condiciones (Figura 4. 14 b)). También se detectó una cierta diversidad en la morfología, algunos liposomas presentaban formas relativamente irregulares, desviadas de su típica forma esférica y las membranas lipídicas de los mismos estaban peor definidas y más irregulares que cuando la muestra se tomaba al inicio de la hidratación.

En estas mismas condiciones, algunos arqueosomas tendían a fusionarse, lo cual supone un inconveniente para la captación del fármaco ya que, al fusionarse las vesículas, podía liberarse el principio activo que contenían.

Mediante la tinción negativa se pudieron observar las capas concéntricas hidrófobas en alternancia con los compartimentos acuosos.

Por último, en el tamaño de los arqueosomas obtenidos tras seis horas de agitación e hidratación del material lipídico se detectó una mayor heterogeneidad (Figura 4. 14 c)). Se observó también una clara diferenciación de las capas hidrófobas y los compartimentos acuosos en estas vesículas. Las membranas de estos liposomas éter fueron algo más irregulares que en los obtenidos con la agitación más breve, aunque su morfología resultó más homogénea. La gran variabilidad en el tamaño de estas vesículas supone un importante inconveniente para el empleo de estos arqueosomas en las siguientes etapas del trabajo.

3. 2. 1. 2. Análisis del tamaño.

La tabla 4. 12 resume los resultados obtenidos tras el análisis estadístico de las medidas de diámetro de los arqueosomas elaborados con 15 mg de

los extractos lipídicos polares totales de *Halobacterium salinarum* CECT 396 por cada miligramo de dipropionato de betametasona y diferentes tiempos de agitación.

Tabla 4. 12. Análisis estadístico de los diámetros de los arqueosomas.

Diámetro medio \pm desviación estándar (μm)		
0h	3h	6h
0,428 \pm 0,179	0,400 \pm 0,218	0,521 \pm 0,337

Aunque no fue posible establecer una correlación entre el tamaño de los arqueosomas y el tiempo de hidratación de las muestras, sí fue posible confirmar la creciente dispersión en las medidas de diámetro de las vesículas formadas, lo cual queda reflejado en los valores de desviación estándar para cada caso. Esta heterogeneidad en el tamaño de los arqueosomas hace más adecuadas las características de los obtenidos con el menor tiempo de agitación e hidratación.

3. 2. 1. 3. Grado de captación.

Se ha analizado la influencia del tiempo de agitación e hidratación de la película lipídica en la capacidad de captación del fármaco objeto de estudio.

Para ello, se tomaron muestras de las preparaciones al comienzo de la hidratación ($t = 0\text{h}$) y a las 3 y 6 horas de agitación, valorándose por espectrofotometría UV.

En la tabla 4. 13, se resumen los resultados de encapsulación (% de captación) proporcionados por los arqueosomas elaborados con 15 mg de lípidos polares de *H. salinarum* por mg de dipropionato de betametasona y mL de muestra.

Tabla 4. 13. Porcentajes de fármaco captados en función del tiempo de

Tiempo	% de captación (media±desviación estándar)
0 h	50,931±18,404
3 h	47,207±19,022
6 h	*41,122±18,809

* Diferencias significativas estadísticamente (nivel de confianza = 95%).

Se realizó un ANOVA de un factor y se obtuvo como resultado la existencia de diferencias entre alguno de los tres grupos establecidos según el tiempo de agitación. Con objeto de dilucidar entre qué grupos se daban estas diferencias, se efectuó una prueba de tipo “*post hoc*” (test de Student-Newman-Keuls). Dichos cálculos manifestaron la existencia de diferencias significativas entre el tercer grupo (tiempo de agitación de 6 h) y los dos restantes. Igualmente, la encapsulación de principio activo resultó inferior en este caso (41,122%). Como las diferencias en el grado de captación evaluadas al tiempo 0 de agitación y tras 3 horas de la misma no resultaron significativas, se ha optado por operar en sucesivas fases de la investigación con el menor tiempo de agitación, que aporta resultados satisfactorios en cuanto a captación (50,931%) y determina un menor gasto energético durante la técnica de elaboración.

Lo anterior supone una ventaja de tipo económico, con vistas a su posible aplicación tecnológica en la elaboración de vectores de fármacos.

3. 2. 2. Liposomas.

3. 2. 2. 1. Caracterización por microscopía electrónica.

Los liposomas formados a las 0 horas de agitación presentaron una alta homogeneidad en su diámetro y unas paredes lipídicas con un borde liso y regular. Las microfotografías también permitieron observar las zonas claras y oscuras de los liposomas multilaminares (Figura 4. 15 a)).

Las microfotografías de las preparaciones cuya hidratación se prolongó durante 3 horas (Figura 4. 15 b)) mostraron una alta heterogeneidad de los liposomas. Asimismo, las características morfológicas de estas vesículas fueron más irregulares que en el caso anterior: se produjo la agregación de los liposomas y sus paredes lipídicas se observaron rugosas.

Los liposomas formados tras seis horas de agitación presentaron una alta irregularidad en la estructura y en la distribución de tamaños que pudo observarse en las microfotografías realizadas (Figura 4.15 c)). Las vesículas parecen fusionarse y alterarse por efecto del prolongado tiempo de agitación.

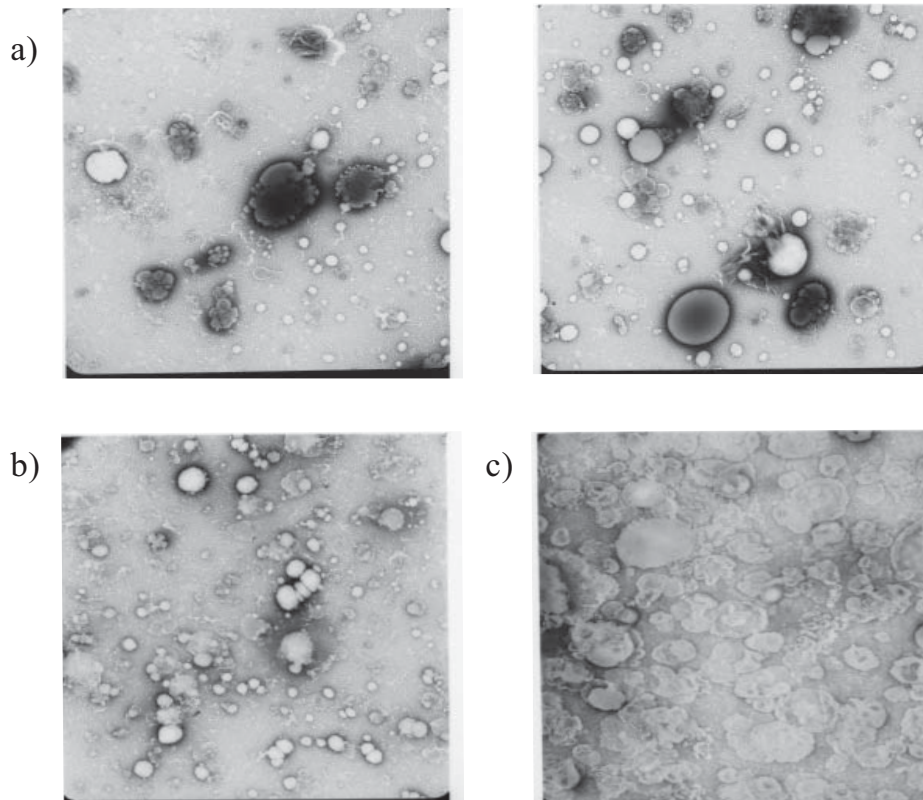


Figura 4. 15. Microfotografías de los liposomas obtenidos con distintos tiempos de agitación: a) 0h, b) 3h y c) 6h.

3. 2. 2. 2. Análisis del tamaño.

La siguiente tabla (Tabla 4. 14) resume el análisis estadístico de los diámetros medidos en las muestras tomadas a diferentes tiempos de agitación, es decir, de hidratación del film lipídico.

Se pudo observar un incremento del diámetro medio de los liposomas éster al aumentar el tiempo de agitación. La dispersión, cuantificada como la desviación estándar, en las medidas de los diámetros también aumentó con el tiempo de hidratación de la muestras. Teniendo en cuenta la importancia del tamaño de los liposomas en el mecanismo

de eliminación de los mismos, parece más adecuada la distribución de tamaños que presentan los liposomas obtenidos con el menor tiempo de hidratación.

Tabla 4. 14. Análisis estadístico de los liposomas obtenidos a diferentes tiempos de agitación.

Diámetro medio \pm desviación estándar (μm)		
0h	3h	6h
0,171 \pm 0,080	0,310 \pm 0,216	0,442 \pm 0,310

3. 2. 2. 3. Grado de captación.

Al igual que en el caso de los arqueosomas, se evaluó la incidencia sobre el grado de captación del tiempo de agitación e hidratación de la película lipídica utilizada en la técnica de elaboración. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente (Tabla 4. 15)

Tabla 4. 15. Porcentajes de fármaco captados en función del tiempo de agitación e hidratación.

Tiempo	% de captación (media \pm desviación estándar)
0 h	81,979 \pm 13,438
3 h	47,336 \pm 13,812
6 h	*30,005 \pm 13,045

* Diferencias significativas estadísticamente (nivel de confianza = 95%).

El test de ANOVA de un factor indicó la existencia de diferencias significativas y la prueba de Student- Newman- Keuls reveló que dichas diferencias permitían establecer tres subconjuntos homogéneos correspondientes a cada uno de los tiempos de agitación, siendo la captación inversamente proporcional al tiempo de agitación.

Estos resultados difieren de los obtenidos por Nagarsenker *et al.* (1999) que desarrollaron un estudio similar obteniendo mayor captación al aumentar el tiempo de agitación. En este caso el principio activo encapsulado fue la tropicamida.

No obstante, tanto el estudio anterior como el efectuado en esta Tesis Doctoral ponen de manifiesto la incidencia del tiempo de hidratación y las condiciones de agitación en el proceso de captación de los principios activos.

Teniendo en cuenta los resultados de captación evaluados (Tabla 4. 15), resulta evidente que las condiciones más idóneas serían las de menor tiempo de agitación, ya que proporciona la encapsulación más elevada (81,979%) en comparación con las otras obtenidas (3h: 47,336% y 6h: 30,005%). Estas condiciones serán las seleccionadas para las fases sucesivas de la investigación.

El comportamiento de la encapsulación en función del tiempo es similar en arqueosomas y liposomas (disminuye con un mayor tiempo de agitación). En cambio es más homogénea en los arqueosomas y esto puede suponer un beneficio para la aplicación de los arqueosomas ya que no existe gran influencia del tiempo de agitación como ocurre en los liposomas.

4. GRADO DE CAPTACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS.

4. 1. Arqueosomas.

Para analizar la influencia de la composición del arqueosoma en el grado de captación del dipropionato de betametasona se han elaborado muestras de las diferentes formulaciones y se han valorado espectrofotométricamente, obteniendo los resultados resumidos en la siguiente tabla (Tabla 4. 16) expresados en porcentaje de captación. También se incluye el porcentaje de principio activo libre en el medio.

Tabla 4. 16. Formulaciones de arqueosomas portadores de dipropionato de betametasona.

Formulación	Composición (mg/mL)	% Captación (Media ± DE)	% Libre (Media ± DE)
A	TPL: P.A. (15:1)	59,544 ± 7,104	40,456 ± 7,104
B	TPL:CH:P.A. (15:2:1)	58,979 ± 7,523	41,021 ± 7,523
C	TPL:CH:P.A.:Vit.C (15:2:1:0,1%)	45,031 ± 7,525	54,969 ± 7,525
G	TPL:CH:P.A.:Vit.C:Vit.E (15:2:1:0,1%:3mM)	80,315 ± 7,429	19,685 ± 7,429

Se realizó un análisis de la varianza mediante un test de ANOVA de un factor que puso de manifiesto la existencia de diferencias significativas entre el porcentaje de captación de las distintas fórmulas que fueron discriminadas con el desarrollo de un test de Student-Newman-Keuls para un nivel de confianza del 95%. Las diferencias en el porcentaje captado permitieron establecer tres grupos. Al primero de ellos pertenecía exclusivamente la formulación C, con la menor captación (45,031%). En otro de los subgrupos se incluyeron las fórmulas A y B cuya captación del fármaco se situó próxima al 59% y cuyas composiciones difieren únicamente en la ausencia o presencia de colesterol en la formulación. Por último, el tercer grupo contenía la formulación G, con un grado de captación notablemente superior al resto de las formulaciones de arqueosomas (80,315%).

Tabla 4. 17. Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

Formulación	Diferencia % captación medio
A, B	0,565
A, C	*14,513
A, G	*20,771
B, C	*13,948
B, G	*21,336
C, G	*31,284

* Diferencias significativas estadísticamente (nivel de confianza = 95%).

Estos análisis estadísticos permitieron observar diferencias en la captación del fármaco debidas a la composición de las distintas formulaciones de arqueosomas (Tabla 4. 17). Se puede decir que las fórmulas A y B son homogéneas en este aspecto y que la incorporación de la vitamina C empleada como antioxidante produce una reducción en el grado de captación del dipropionato de betametasona. Por el contrario, la incorporación de los antioxidantes asociados incrementa notablemente la captación del principio activo.

4. 2. Liposomas.

Al igual que en el caso de los arqueosomas, se realizó un estudio de la influencia de la composición de los liposomas en el grado de captación del fármaco tras la valoración espectrofotométrica de las muestras de las diferentes fórmulas. Los resultados obtenidos para cada una de las fórmulas se resumieron en la siguiente tabla (Tabla 4. 18):

Tabla 4. 18. Formulaciones de liposomas portadores de dipropionato de betametasona.

Formulación	Composición (mg/mL)	% Captación (Media ± DE)	% Libre (Media ± DE)
A	PC:P.A. (40:1)	66,029 ± 7,709	33,971 ± 7,709
B	PC:CH:P.A. (40:9,826:1)	59,308 ± 7,677	40,692 ± 7,677
C	PC:CH:P.A.:Vit C (40:9,826:1:0,1%)	61,084 ± 7,601	38,916 ± 7,601
D	PC:CH:P.A.:Phenonip (40:9,826:1:0,5%)	63,672 ± 7,672	36,328 ± 7,672
E	PC:CH:P.A.:Vit C:Phenonip (40:9,826:1:0,1%:0,5%)	66,492 ± 7,674	33,508 ± 7,674
F	PC:CH:P.A.:Vit C:Phenonip:Vit E (40:9,826:1:0,1%:0,5%:3mM)	42,619 ± 7,688	57,381 ± 7,688

Para determinar la existencia de diferencias significativas se desarrolló un test ANOVA de un factor y una prueba de tipo “*post hoc*”, el test de Student-Newman-Keuls, para establecer entre qué grupos hay diferencias significativas. Estos análisis originaron cuatro conjuntos homogéneos. En el primero de ellos sólo encontramos la fórmula F (que contiene todos los componentes ensayados) con el menor porcentaje de captación, mientras que en el último de los grupos se sitúa la formulación G, con el más elevado grado de captación del dipropionato de betametasona.

La tabla 4. 19 representa las diferencias existentes entre el grado de captación de cada fórmula e indica si estas diferencias son significativas.

Todos los datos aportados por este estudio denotan la elevada capacidad de incorporación de dipropionato de betametasona por parte de los liposomas ensayados. Este hecho sería, probablemente, consecuencia de la gran variedad de ácidos grasos insaturados presentes en la composición de la fosfatidilcolina de yema de huevo, fosfolípido seleccionado para la elaboración, así como de su baja temperatura de transición. Por ello, los lípidos se encontrarían en estado fluido (cristal-líquido) a la temperatura de trabajo (37°C) (Dufourc, 1985). En general, y en base a la bibliografía consultada, la encapsulación de sustancias activas lipofílicas (como es el agente objeto de estudio) se ve favorecida cuando las bicapas lipídicas presentan cierta fluidez, como es este caso (Vasson *et al.*, 1981 y Dufourc, 1985).

Igualmente, estas investigaciones previas han mostrado cómo la adición de colesterol a los liposomas elaborados exclusivamente por fosfolípidos (formulación B respecto a A) provoca una reducción media significativa del 6,722% en la captación ($59,308 \pm 7,677\%$). Este descenso podría ser consecuencia de la orientación de dicho esteroles en la zona hidrofóbica de la matriz liposomal, lugar de localización del agente estudiado. Aunque el modo de interacción con la bicapa lipídica no está

Tabla 4. 19. Resultados del análisis de varianza (ANOVA).

Formulación	Diferencia % captación medio
A, B	*6,722
A, C	4,945
A, D	2,357
A, E	0,463
A, F	*23,410
A, G	*12,669
B, C	1,776
B, D	4,364
B, E	*7,184
B, F	*16,689
B, G	*19,390
C, D	2,588
C, E	5,408
C, F	*18,465
C, G	*17,614
D, E	2,820
D, F	*21,053
D, G	*15,026
E, F	*23,873
E, G	*12,206
F, G	*36,079

* Diferencias significativas estadísticamente (nivel de confianza = 95%).

del todo aclarado, el colesterol se alinea paralelamente a las cadenas grasas del fosfolípido con el grupo hidroxilo del anillo esteroídico orientado hacia el lado interior de la bicapa. La disposición espacial del OH en posición 3 parece ser decisiva en la interacción.

Este descenso en la cantidad de agente encapsulado determinado por la presencia de colesterol, no se manifiesta en los arqueosomas elaborados con lípidos y dicho esteroide (Tabla 4. 16, fórmulas A y B). Tampoco se apreciaron diferencias significativas entre la formulación base de liposomas (A) y las integradas por colesterol, vitamina C y/o Phenonip® (formulaciones C, D y E).

No obstante, resulta relevante destacar un acusado descenso en la captación tras la incorporación conjunta a los liposomas de antioxidantes y conservador (formulación F), donde el porcentaje medio tan sólo alcanzó un 42,619%. La formulación análoga de los arqueosomas no permitió formar vesículas. Estos resultados hacen pensar en la existencia de alguna interacción entre los componentes de dicha formulación ya que en el caso de los liposomas se produjo un considerable descenso en la captación mientras que las repetidas pruebas realizadas para la elaboración de arqueosomas con esta composición no dieron resultado positivo en ningún caso.

Asimismo, es interesante comentar que, al igual que en el caso de los arqueosomas, la presencia conjunta de dos antioxidantes asociados (vitamina C y vitamina E) en la elaboración de los liposomas determina un ascenso considerable en el porcentaje de captación (fórmula G: 78,698%). Este hecho resulta relevante con fines a su posterior utilización.

Finalmente, sería oportuno destacar que los resultados aportados por este estudio previo de encapsulación del dipropionato de betametasona han sido bastante satisfactorios, tanto para las muestras elaboradas con lípidos de arqueas (arqueosomas) como para las elaborados con fosfolípidos naturales (liposomas). Los porcentajes de captación medios han oscilado entre un mínimo del 42,619% (formulación F de liposomas) y un máximo del 80,315% (formulación G de arqueosomas).

5. CARACTERIZACIÓN DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS.

5. 1. Arqueosomas.

Los arqueosomas objeto de estudio se han caracterizado mediante microscopía electrónica de transmisión transcurridas 24 horas desde su elaboración. Para la visualización de las preparaciones se ha empleado una técnica de tinción negativa con acetato de uranilo. Esta caracterización se ha realizado con el fin de conocer su estructura y tamaño y posteriormente poder estudiar la influencia del tiempo en la estabilidad de arqueosomas y liposomas.

Las figuras 4. 16 a 4. 20 son un ejemplo representativo de dicha caracterización y corresponden a arqueosomas de diferente composición portadores de dipropionato de betametasona.

La tabla 4. 20 resume los valores medios de tamaño de partícula (μm) de los arqueosomas y sus correspondientes desviaciones estándar para cada una de las formulaciones elaboradas. El número de medidas realizadas ha sido de 100 por fórmula. Todas las muestras se han conservado protegidas de la luz hasta su caracterización.

Tabla 4. 20. Diámetros medios y desviaciones estándar de los arqueosomas de las distintas formulaciones.

Formulación	Diámetro medio \pm DE
A	0,368 \pm 0,185
B	0,465 \pm 0,327
C	0,694 \pm 0,344
G	0,630 \pm 0,443

La caracterización de los arqueosomas obtenidos ha permitido observar una alta formación de vesículas lipídicas en las condiciones de trabajo seleccionadas anteriormente, poniendo de manifiesto la eficacia del método de elaboración empleado. De este modo ha sido posible analizar la formación y las características morfológicas y estructurales de los arqueosomas cargados de dipropionato de betametasona.

La formulación más sencilla de los arqueosomas, la fórmula A, contiene únicamente lípidos polares totales de *Halobacterium salinarum* y principio activo. Las vesículas originadas son las más pequeñas y las más homogéneas en cuanto a la distribución del tamaño de partícula (0,368 \pm 0,185 μ m).

Estructuralmente, las microfotografías tomadas en estas primeras horas tras la elaboración permiten observar la estructura multilaminar de los arqueosomas y las características paredes lipídicas de los mismos, con bordes regulares y bien definidos (fórmula A) (Figura 4. 16).

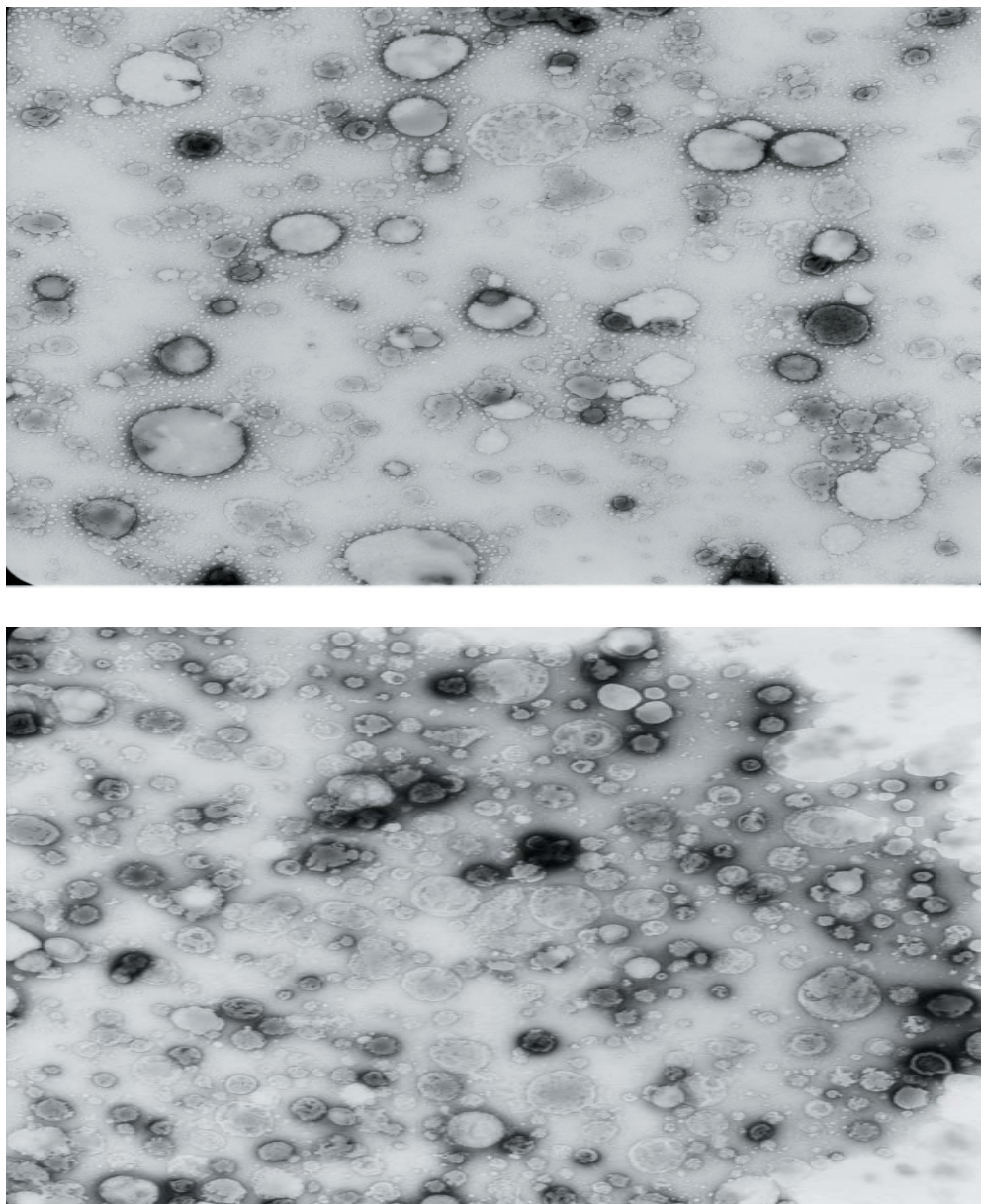


Figura 4. 16. Microfotografías de los arqueosomas de la fórmula A.

Respecto a la formulación B de los arqueosomas, en cuya composición se adicionaron 2 mg de colesterol por mg del fármaco y mL de muestra, se observó un incremento en el tamaño de partícula de los arqueosomas, así como en la dispersión de sus tamaños ($0,465\pm 0,327\ \mu\text{m}$).

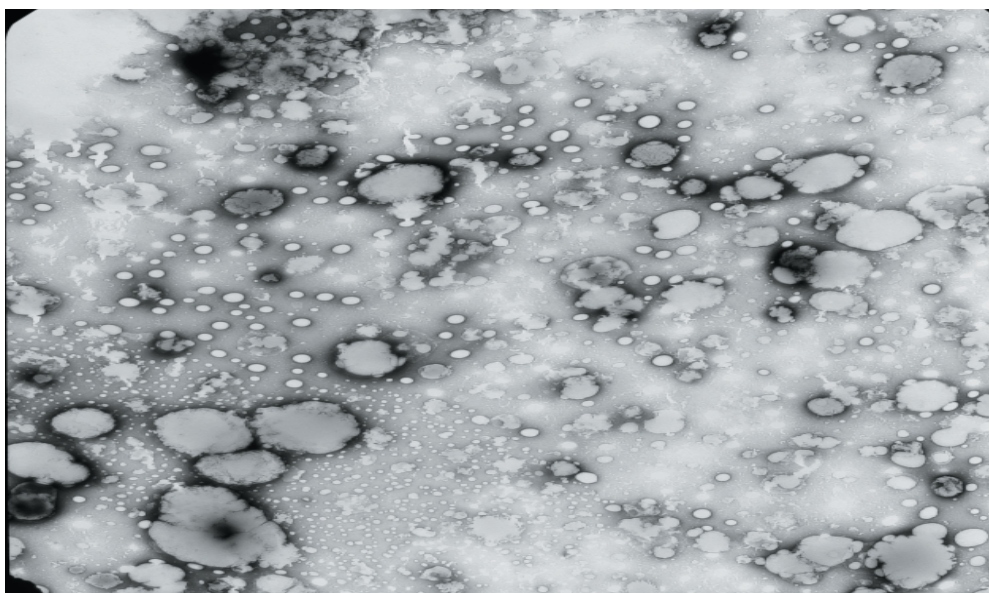


Figura 4. 17. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula B.

Las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de transmisión (Figuras 4. 17 y 4. 18) revelaron cierta heterogeneidad en su diámetro y morfología. Se observó la alternancia de compartimentos acuosos (zonas oscuras) y bicapas fosfolípicas (zonas claras, transparentes al bombardeo electrónico), estructura característica de estos vectores de fármacos.

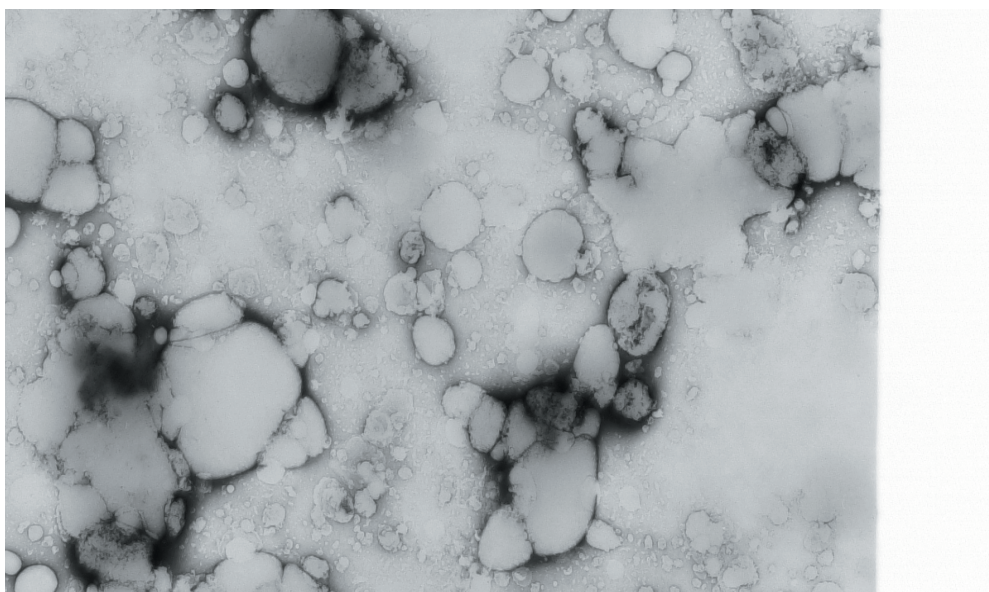


Figura 4. 18. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula B.

Los arqueosomas en cuya formulación se incorporó ácido ascórbico como antioxidante (fórmula C) originaron gran cantidad de vesículas que en algún caso se observaron agregadas, como muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica (Figura 4. 19). Su tamaño de partícula medio es mayor al observado en las otras dos formulaciones, lo cual podría deberse a la incorporación del antioxidante en la capa acuosa ($0,694\pm 0,344 \mu\text{m}$).

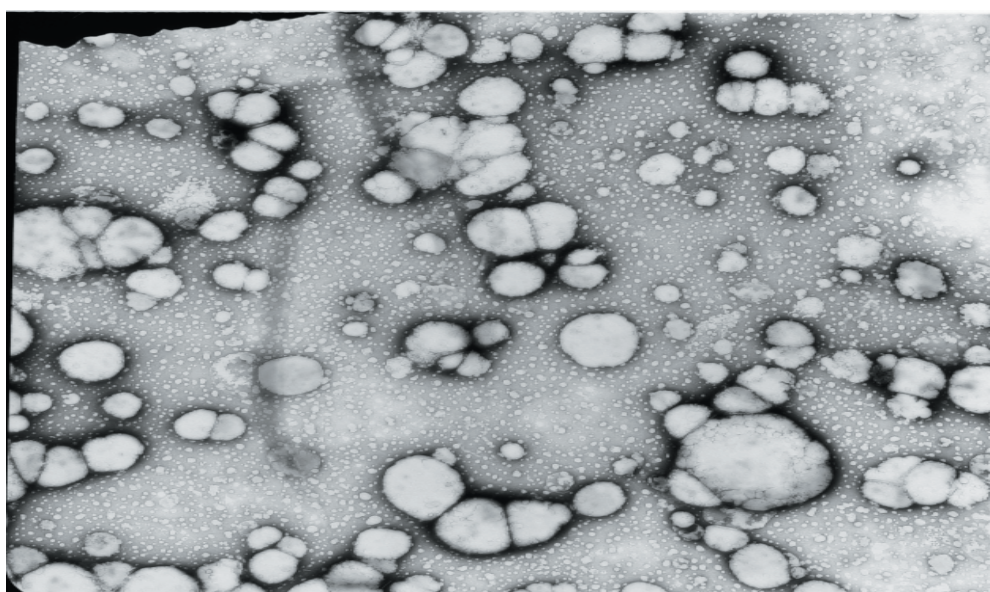


Figura 4. 19. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C.

Los arqueosomas correspondientes a la fórmula G contienen la combinación de los dos antioxidantes (ácidos ascórbico y acetato de α -tocoferol). Las vesículas elaboradas con esta composición presentaron la estructura multilaminar característica del método de elaboración. Las microfotografías (Figura 4. 20) ponen de manifiesto una relativa heterogeneidad en el tamaño de los arqueosomas. Las membranas lipídicas estaban bien definidas. El análisis del diámetro de los liposomas confirmó la heterogeneidad en la distribución de tamaños dados los resultados obtenidos ($0,630\pm 0,448 \mu\text{m}$).

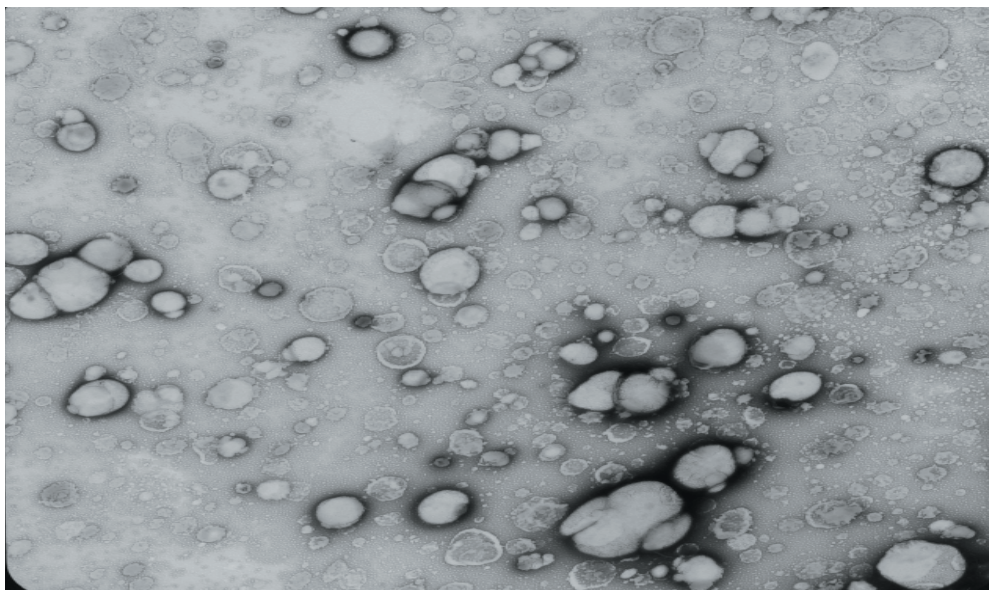


Figura 4. 20. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G.

5. 2. Liposomas.

Al igual que con los arqueosomas, se realizó una caracterización inicial de los liposomas formados con las diversas formulaciones en las que, con respecto a la fórmula más sencilla (A) se incorporaba colesterol (fórmula B), un antioxidante solo (fórmula C), un conservador solo (fórmula D), ambos asociados (fórmula E), dos antioxidantes solos (fórmula G) o en asociación con el conservador (fórmula F).

Los resultados obtenidos mediante tinción negativa y la visualización por microscopía electrónica de transmisión han sido muy satisfactorios puesto que han permitido realizar un análisis del tamaño de partícula de estos vectores de dipropionato de betametasona así como de la estructura y morfología de los mismos. En la siguiente tabla se han resumido los resultados de tamaño de partícula de los liposomas de estas fórmulas

elaboradas con fosfatidilcolina de yema de huevo. El número de medidas realizadas por formulación también ha sido de 100. Se incluyen los diámetros medios expresados en μm y sus correspondientes desviaciones estándar (Tabla 4. 21).

Tabla 4. 21. Diámetros medios y desviaciones estándar de los liposomas

Formulación	Diámetro medio \pm DE
A	0,534 \pm 0,390
B	0,553 \pm 0,352
C	0,505 \pm 0,352
D	0,635 \pm 0,421
E	0,653 \pm 0,393
F	0,333 \pm 0,209
G	0,650 \pm 0,489

Los liposomas elaborados con fosfatidilcolina y fármaco (fórmula A) presentaron la característica estructura multilaminar correspondiente al método de elaboración empleado. Sus membranas fueron regulares y los liposomas se hallaban perfectamente definidos y sin agregación. Su tamaño de partícula es relativamente homogéneo. Estos aspectos quedan corroborados al observar las microfotografías (Figura 4. 21).

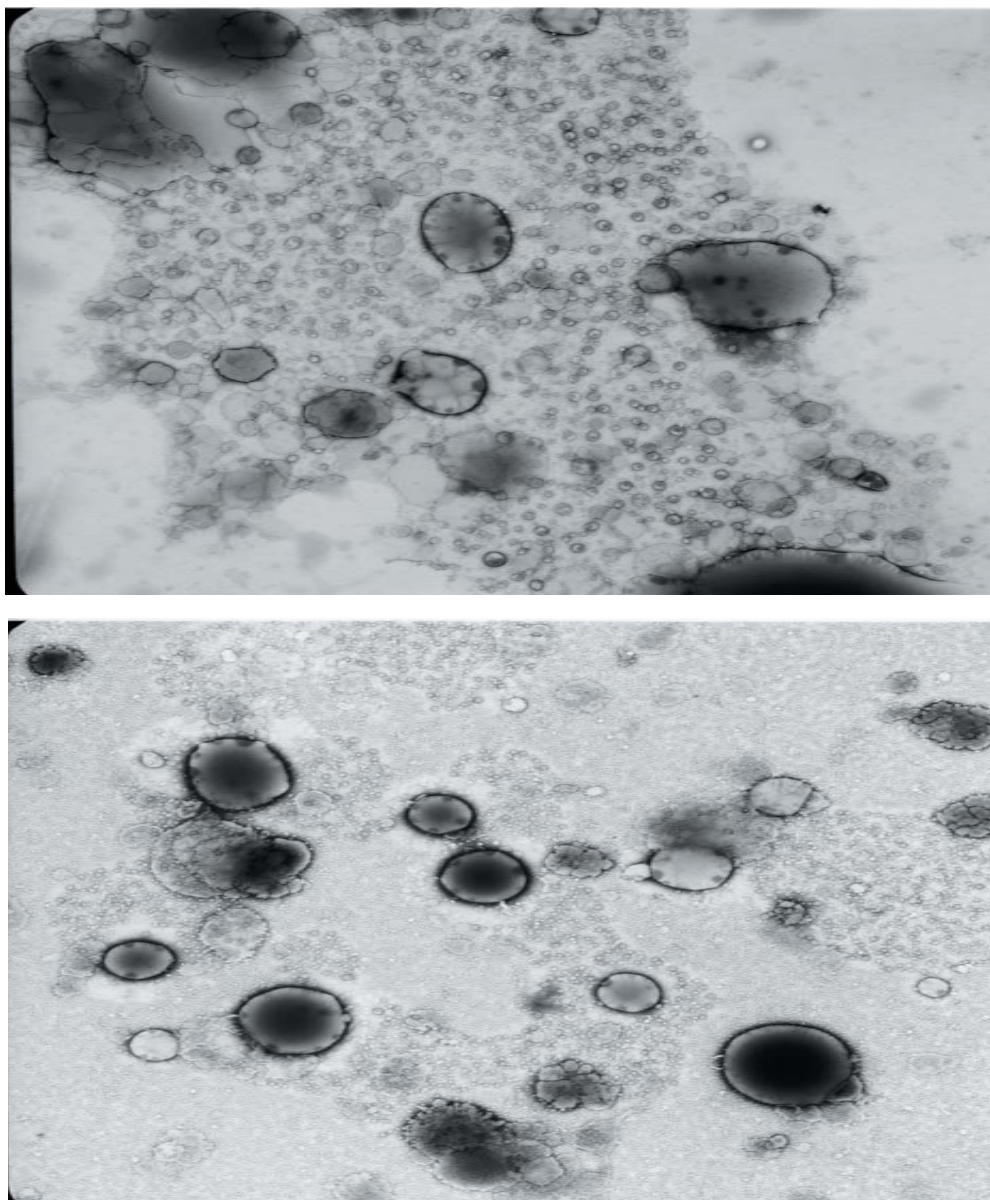


Figura 4. 21. Microfotografías de los liposomas de la fórmula A.

La adición de colesterol a esta primera fórmula dio lugar a vesículas con una distribución de tamaños de partícula similar a la determinada para la fórmula A. La visualización de estas muestras al microscopio de transmisión electrónica (Figura 4. 22) puso de manifiesto la presencia en estos liposomas de membranas lisas y bien definidas, lo cual podría deberse a la incorporación del colesterol a la misma, ya que este es capaz de modificar la fluidez de las membranas (Juliano, 1989).

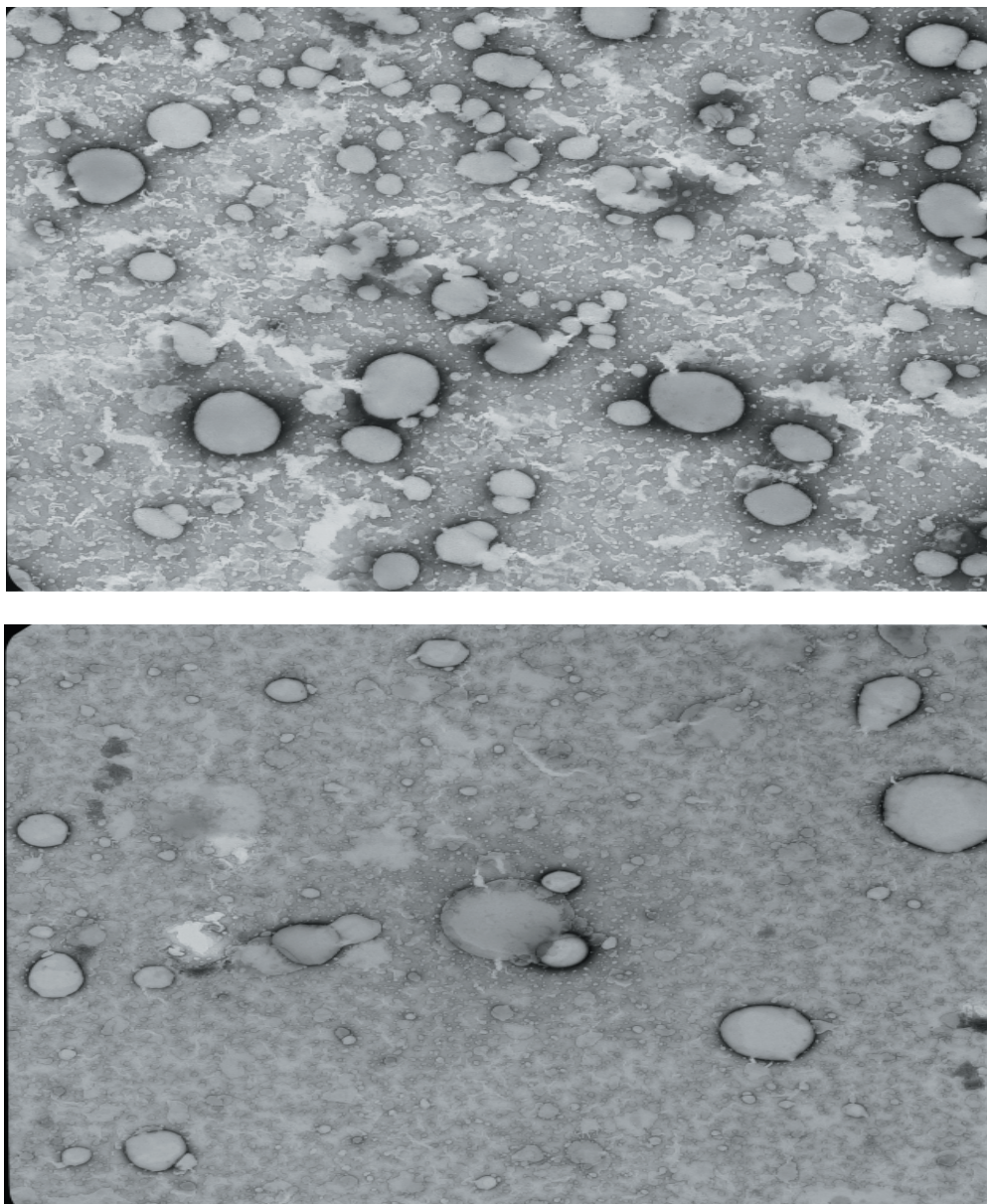


Figura 4. 22. Microfotografías de los arqueosomas de la fórmula B.

Los liposomas elaborados con fosfatidilcolina, colesterol y vitamina C como antioxidante (formulación C) presentaron un tamaño medio y un grado de dispersión similar a las dos formulaciones anteriores de liposomas ($0,505\pm 0,352\ \mu\text{m}$). Las microfotografías denotaron la formación de vesículas multilaminares de estructura definida y bajo grado de agregación (Figura 4. 23).

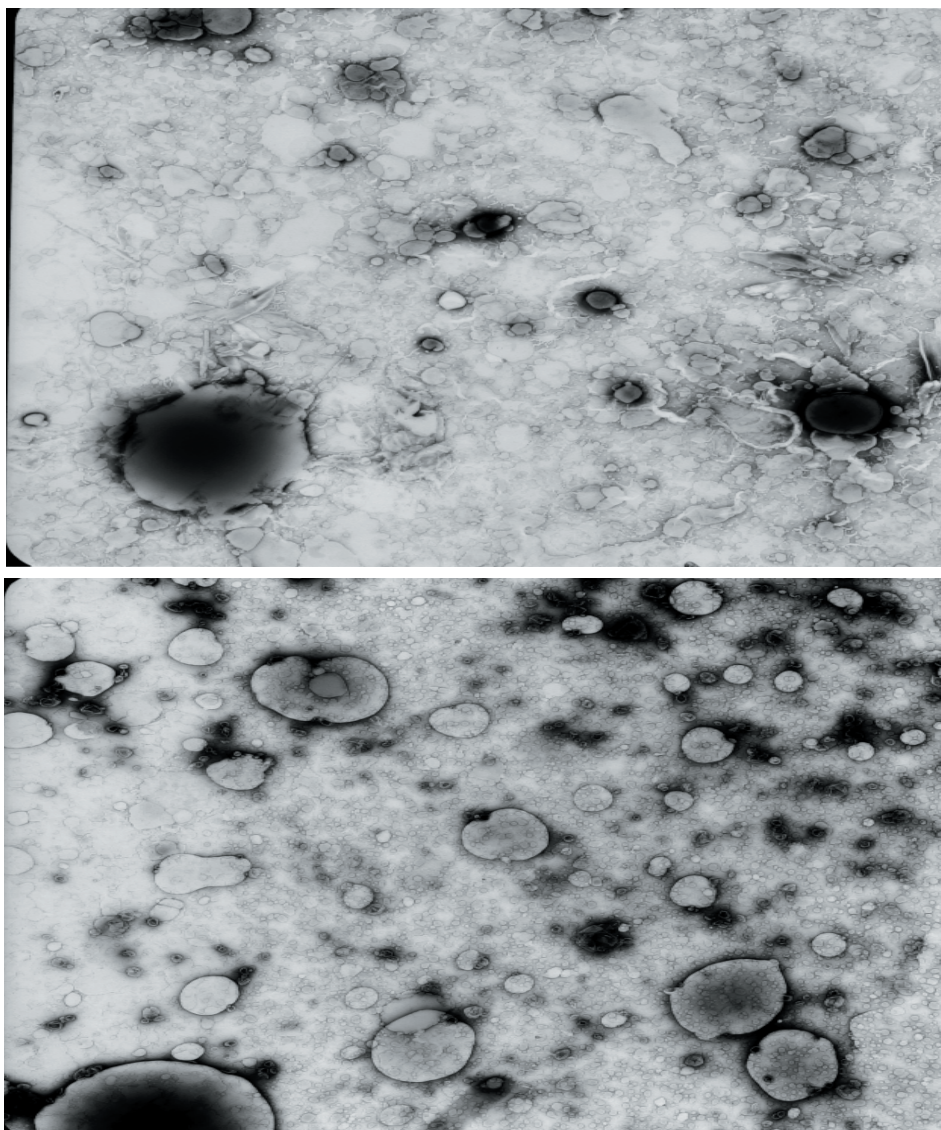


Figura 4. 23. Microfotografías de los arqueosomas de la fórmula C.

Los liposomas en cuya formulación se adicionó el conservador (Phenonip®) (fórmula D) presentaron cierta diferencia en el tamaño de partícula de los mismos con respecto al diámetro medio de los obtenidos con anteriores formulaciones, siendo mayores los diámetros y la desviación estándar con esta última formulación ($0,635 \pm 0,421 \mu\text{m}$). Cabe destacar la presencia de estructuras vesiculares muy definidas. Estructuralmente, son similares a las otras fórmulas como muestran las microfotografías (Figura 4. 24).

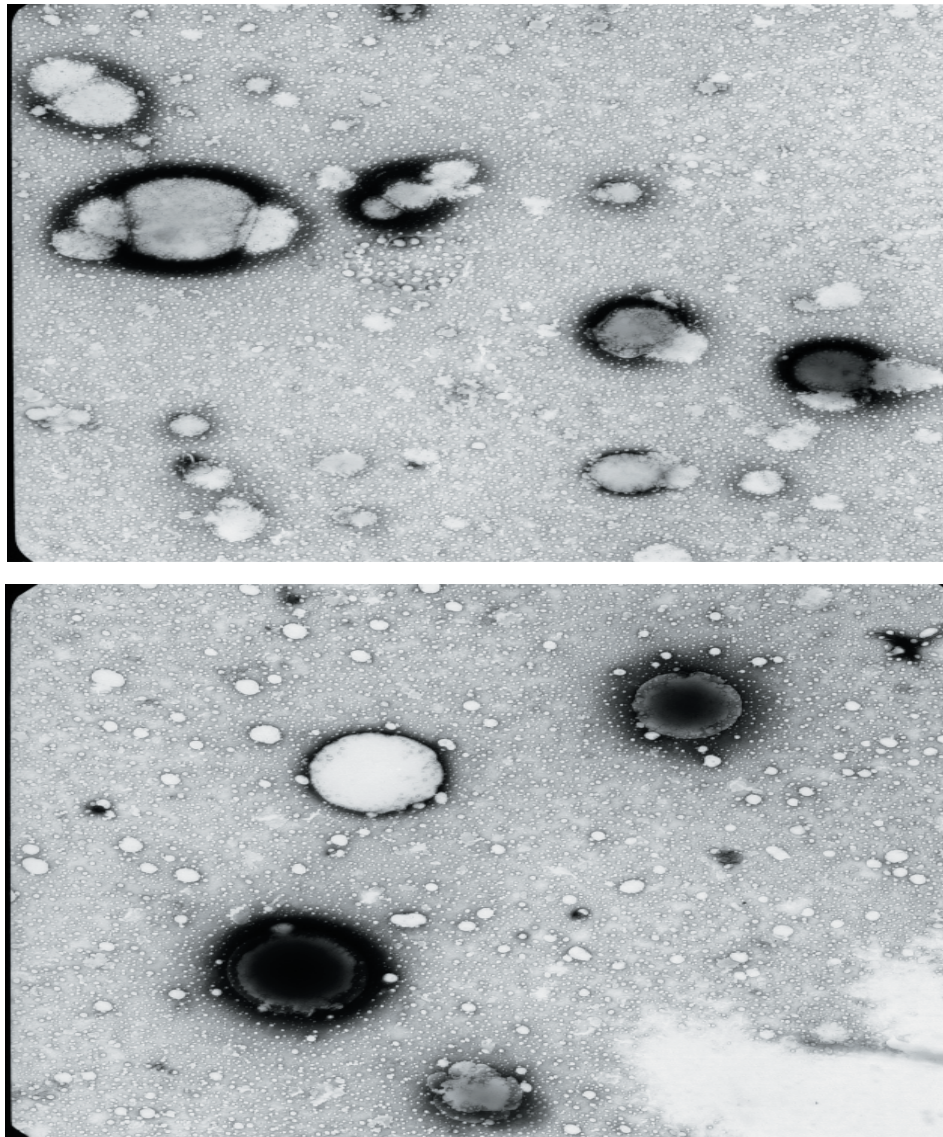


Figura 4. 24. Microfotografías de los arqueosomas de la fórmula D.

El análisis de la estructura y tamaño de las vesículas pertenecientes a la fórmula E reveló un mayor tamaño en los liposomas obtenidos. Esto se puede observar al estudiar las microfotografías de estas muestras (Figura 4. 25). También se aprecia la existencia de estructuras menos definidas que en los casos anteriores. Los datos aportados por el estudio otorgan un tamaño medio de $0,653 \pm 0,393 \mu\text{m}$ a estas vesículas que incorporan junto al fosfolípido y esterol un antioxidante (vitamina C) y un conservador (Phenonip®).

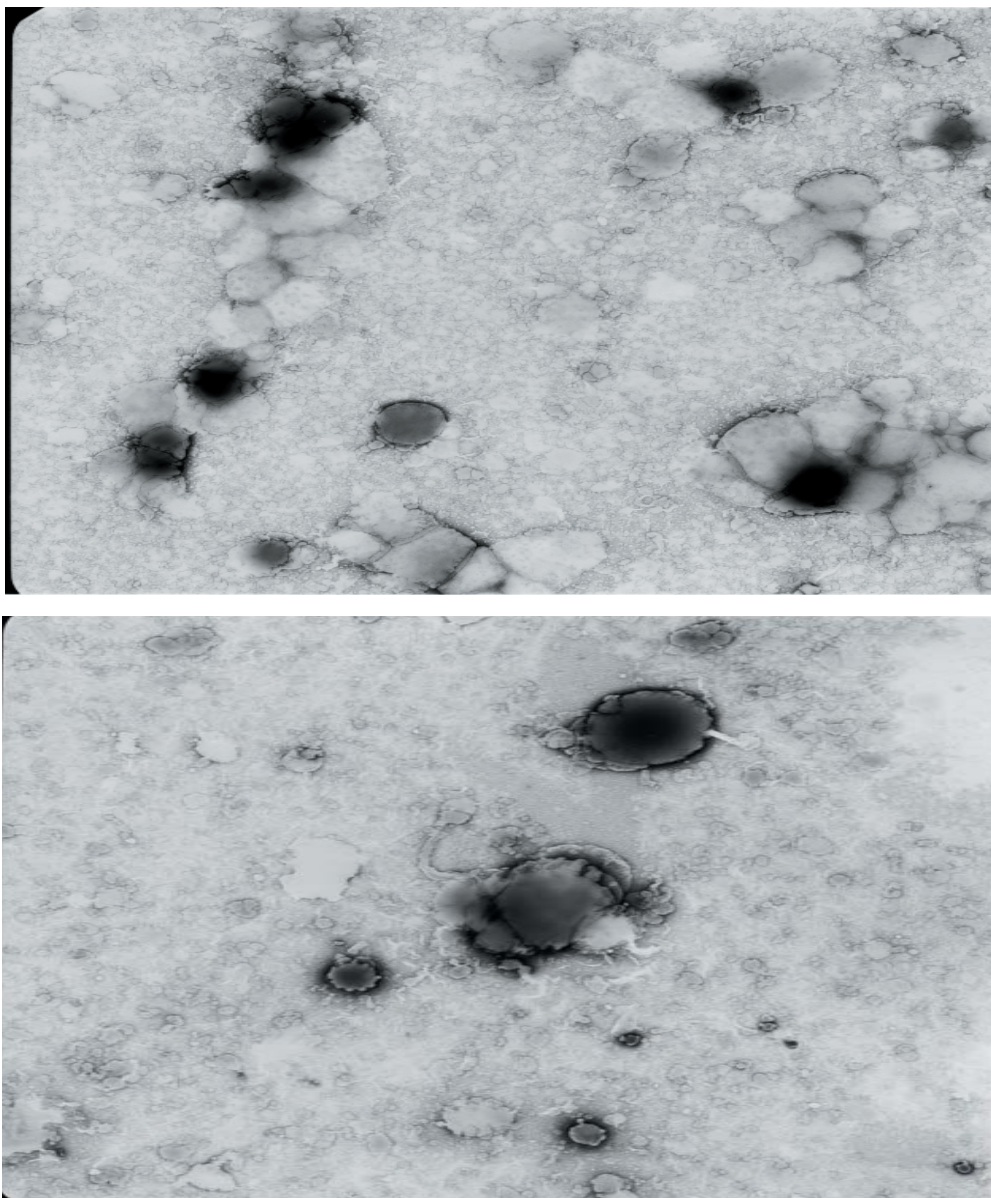


Figura 4. 25. Microfotografías de los arqueosomas de la fórmula E.

La fórmula F asocia el conservador y los dos antioxidantes (ácido ascórbico y acetato de tocoferol) y presentó una distribución de tamaño bastante homogénea y sin diferencias estructurales significativas entre estas muestras y las fórmulas estudiadas hasta este momento. Posiblemente esta homogeneidad podría deberse a la propia composición de la fórmula, ya que tanto los antioxidantes como el conservador pueden influir en las propiedades de las vesículas originadas. Las microfotografías muestran

las características de los liposomas originados con esta composición, la más compleja de todas las ensayadas (Figura 4. 26). El tamaño de partícula aportó el menor valor de los evaluados ($0,333\pm 0,202 \mu\text{m}$). A su menor tamaño hay que unir una captación notablemente inferior (42%) a la aportada por el resto de formulaciones ensayadas.

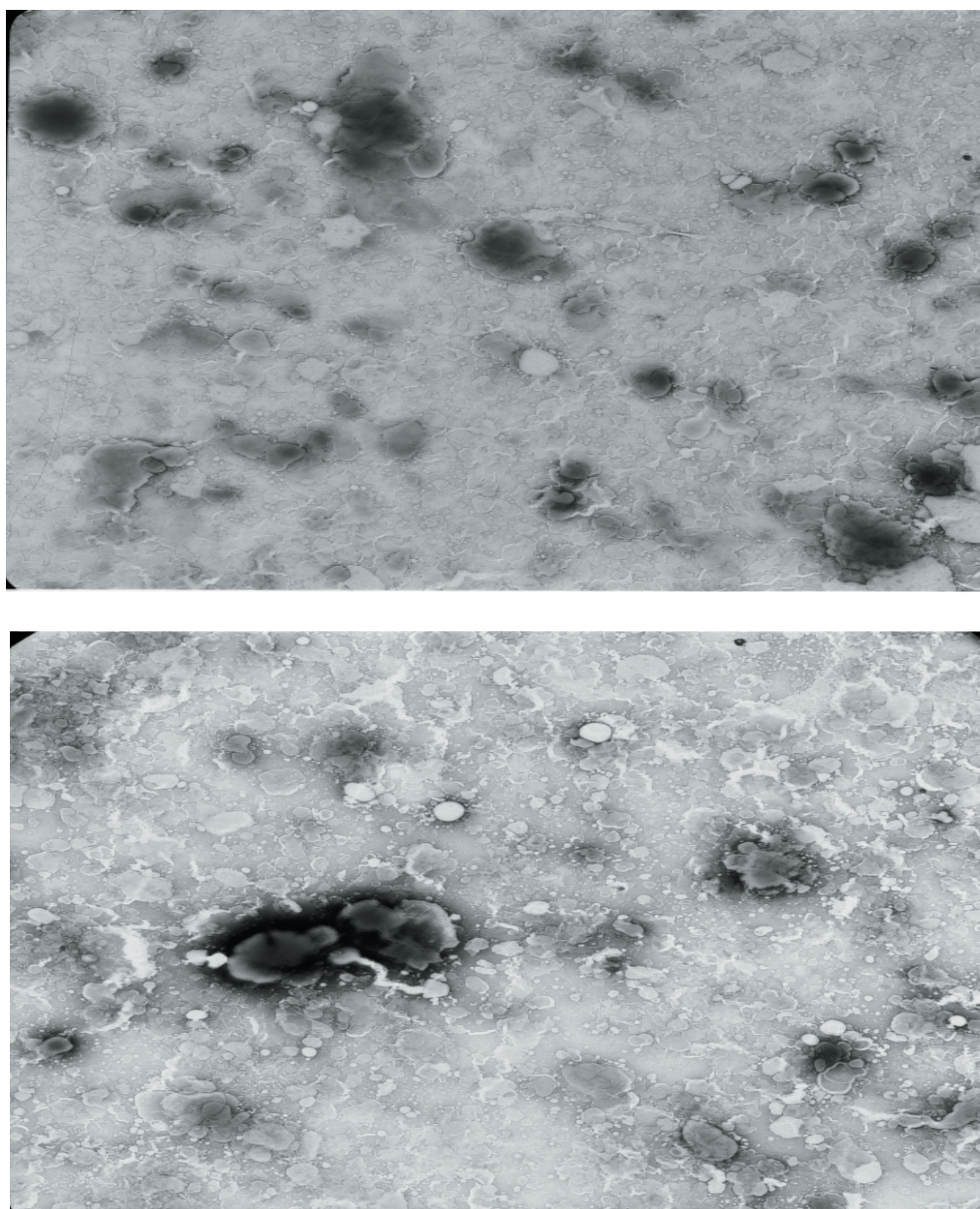


Figura 4. 26. Microfotografías de los arqueosomas de la fórmula F.

Los liposomas formulados con los dos antioxidantes (fórmula G) presentaron una estructura plurilaminar con membranas bien definidas y lisas. Se observó la existencia de cierta heterogeneidad en el diámetro de estos liposomas portadores de dipropionato de betametasona. Este aspecto se confirmó al realizar el estudio de tamaño de partícula ya que

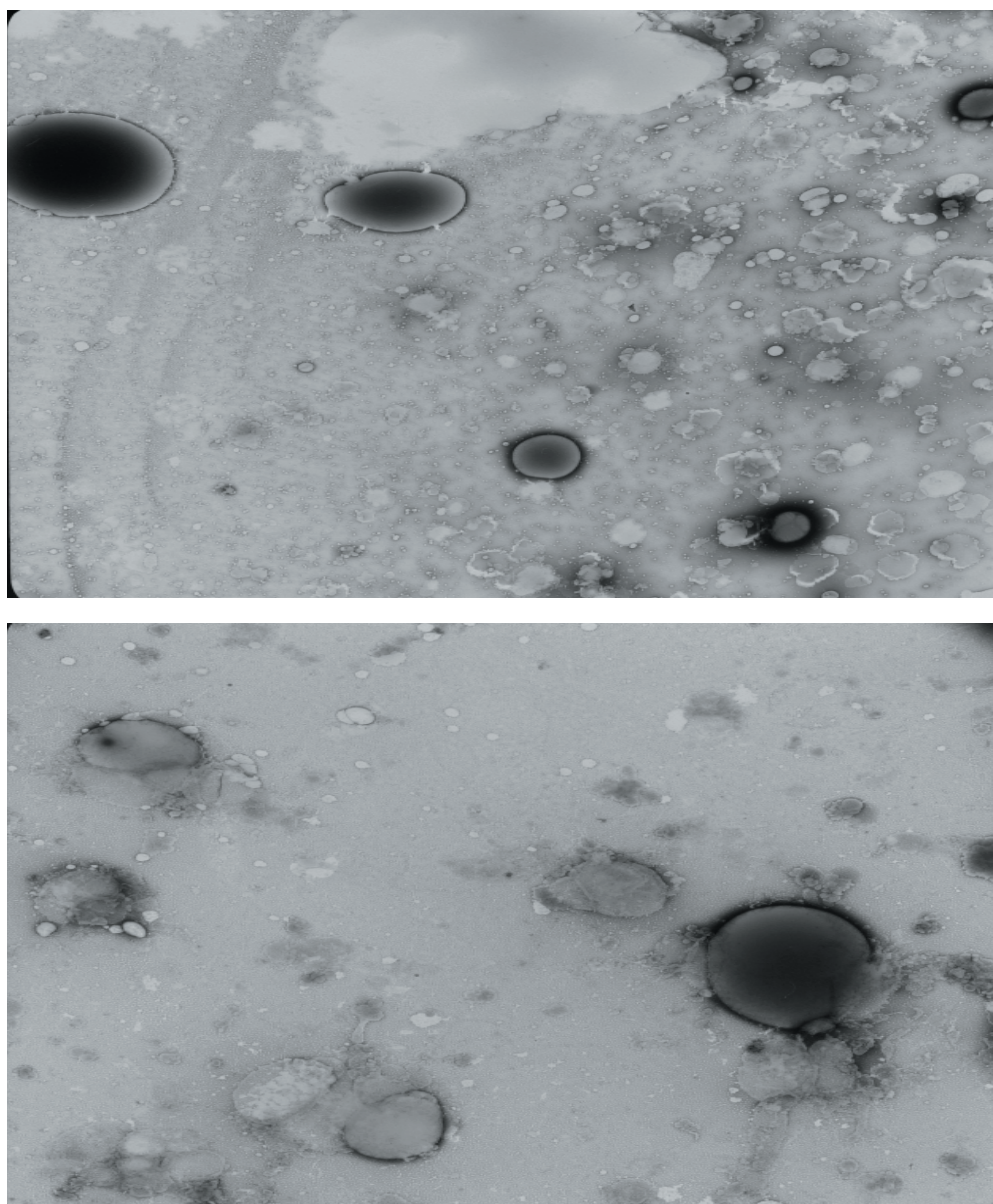


Figura 4. 27. Microfotografías de los arqueosomas de la fórmula G.

el diámetro medio y la correspondiente desviación estándar resultaron $0,650\pm 0,489 \mu\text{m}$. Las microfotografías correspondientes a los liposomas de esta fórmula corroboran los aspectos comentados (heterogeneidad de tamaño de partícula, estructura y morfología) (Figura 4. 27).

5. 3. Conclusión.

En resumen, la caracterización de las formulaciones mediante tinción negativa de las muestras y microscopía electrónica de transmisión pone de manifiesto la idoneidad del método de elaboración normalizado y basado en el descrito por Bangham *et al.* (1974).

Esta técnica de caracterización ha permitido constatar la formación de vesículas lipídicas multilaminares portadoras de dipropionato de betametasona en todas las formulaciones ensayadas, elaboradas bien con lípidos procedentes de arqueas (arqueosomas), bien con fosfolípidos naturales (liposomas). En todos los casos se aprecia la presencia de múltiples bicapas concéntricas de lípidos alternando con compartimentos acuosos.

El diámetro medio de las vesículas formadas ha sido muy reducido, inferior en todos los casos a $1\mu\text{m}$. Comparativamente, las fórmulas A (lípidos) y B (lípidos y colesterol) de arqueosomas presentaron un tamaño medio inicial (día 0) inferior al detectado en los liposomas y mayor grado de homogeneidad.

6. ESTABILIDAD DE ARQUEOSOMAS.

Para evaluar la estabilidad de cada tipo de vesículas se realizó una valoración espectrofométrica de las mismas a los 0, 15, 45, 75 y 90 días de la elaboración de las muestras con el fin de cuantificar el porcentaje de principio activo captado que se liberaba a lo largo del tiempo. Paralelamente, se efectuó una caracterización microscópica mediante tinción negativa y posterior visualización al microscopio de transmisión electrónica.

6. 1. Evaluación del porcentaje de principio activo perdido en función del tiempo.

A continuación, en las siguientes tablas se exponen los resultados obtenidos en este estudio de estabilidad, tanto a temperatura de refrigeración (4-8°C) como a temperatura ambiente (25-30°C). Los datos corresponden a porcentaje de agente captado durante el periodo de estudio (Tabla 4. 22) y porcentaje de agente perdido a lo largo de los 90 días desde la elaboración de las muestras (Tabla 4. 23).

El porcentaje de corticoide liberado o perdido por las vesículas lipídicas se determinó por diferencia entre el tanto por ciento captado en el día 0 y el evaluado en los sucesivos días del estudio. De este modo se pudo constatar la estabilidad de los arqueosomas a lo largo del tiempo.

Tabla 4. 22. Porcentaje captado (media±desviación estándar) por las distintas formulaciones de arqueosomas.

Fórmula	A		B	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	59,544±7,104	59,544±7,104	58,979±7,523	58,979±7,523
15 días	45,740±7,621	40,960±7,770	49,506±7,585	46,233±7,208
45 días	42,467±7,787	33,341±7,428	43,886±7,205	38,411±7,479
75 días	42,061±7,299	25,780±7,729	38,643±7,470	32,907±7,442
90 días	35,137±7,316	25,114±7,317	38,701±7,574	31,198±7,377

Fórmula	C		G	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	45,031±7,525	45,031±7,525	80,315±7,429	80,315±7,429
15 días	34,993±7,229	31,487±7,455	78,707±7,700	77,085±7,773
45 días	28,359±7,612	15,294±6,307	74,275±7,165	72,566±7,296
75 días	26,099±7,418	10,890±7,330	74,304±7,667	70,683±7,621
90 días	25,404±7,235	10,803±6,609	72,653±7,342	67,033±7,552

Tabla 4. 23. Porcentaje de agente captado liberado o perdido por los arqueosomas en función del tiempo (valor medio).

Fórmula	A		B		C		G	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	0	0	0	0	0	0	0	0
15 días	13,804	18,584	9,473	12,747	10,038	13,543	1,608	3,230
45 días	17,077	26,203	15,093	20,586	16,672	29,737	6,040	7,749
75 días	17,483	33,764	20,336	26,072	18,931	34,140	6,011	9,632
90 días	24,407	34,430	20,279	27,782	19,627	34,227	7,662	13,282

6. 1. 1. Fórmula A.

A los resultados obtenidos con esta fórmula de arqueosomas, elaborada únicamente con los lípidos polares totales de *Halobacterium salinarum* CECT 396 y principio activo, se les realizó un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo del tiempo. Los resultados se analizaron para cada una de las temperaturas de conservación y también para un determinado tiempo, comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

La tabla 4. 24 resume los porcentajes medios captados por estos arqueosomas a lo largo del periodo de estudio y sus desviaciones estándar. La tabla 4. 25 recopila los porcentajes perdidos por los arqueosomas de esta formulación.

Tabla 4. 24. Porcentajes captados por los arqueosomas de la fórmula A.

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	59,544±7,104	45,740±7,621	42,467±7,787	42,061±7,299	35,138±7,316
25°C	59,544±7,104	40,960±7,770	33,341±7,428	25,780±7,730	25,114±7,317

Tabla 4. 25. Porcentajes de principio activo perdido o liberado por los arqueosomas de la fórmula A.

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	13,804	17,077	17,483	24,407
25°C	0	18,584	26,203	33,764	34,430

En la tabla 4. 26 se han recopilado los datos correspondientes a la pérdida de esteroide retenido producida a lo largo de los periodos de tiempo a los cuales se ha cuantificado el fármaco encapsulado en los liposomas, indicándose los casos en los cuales hay diferencias significativas.

Tabla 4. 26. Porcentajes de principio activo perdido por los arqueosomas de la fórmula A en cada periodo de tiempo.

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	*13,804	3,274	0,406	*6,924
25°C	*18,584	*7,619	*7,561	0,666

Con las muestras conservadas a 4-8°C se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (59,544%) y tras 15 días (45,740%), lo cual representó una pérdida de fármaco captado del 13,804%.

Posteriormente, en el periodo de tiempo entre 15 y 75 días no se detectaron diferencias significativas y la pérdida de principio activo encapsulado en los arqueosomas a lo largo de esos 60 días sólo representó un 3,679% del total encapsulado al elaborar las muestras, lo cual denota un periodo de gran estabilidad en estos liposomas éter.

En los últimos 15 días del estudio, entre los 75 y 90 días, se produjo la liberación de un 6,924% del dipropionato de betametasona encapsulado que resultó estadísticamente significativa con respecto al porcentaje retenido a los 75 días.

El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 24,407% del principio activo captado inicialmente.

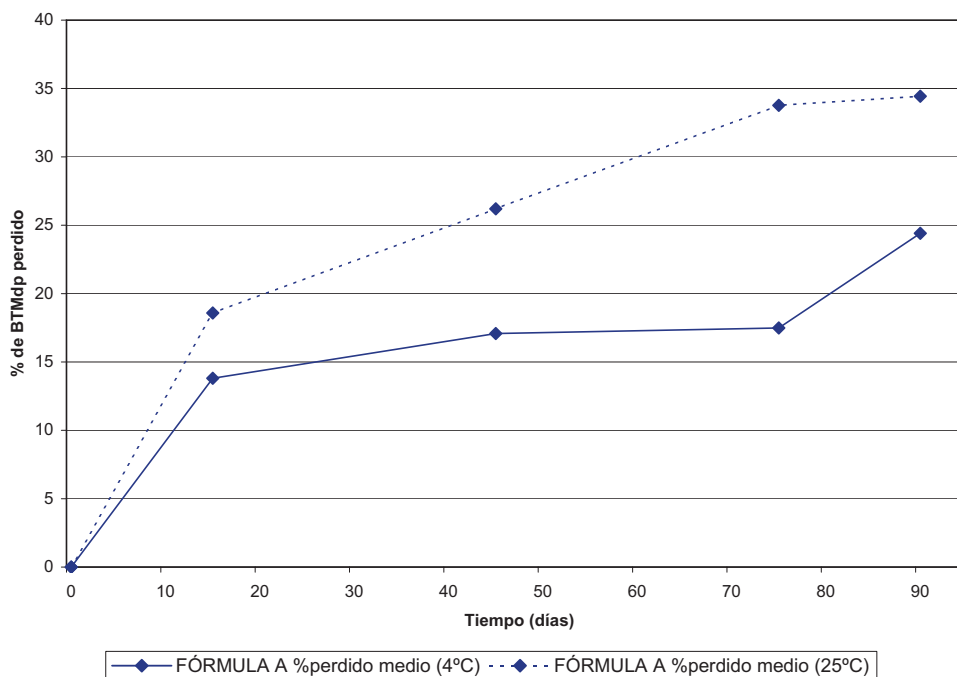
Este mismo procedimiento se siguió para el análisis de los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente observándose diferencias significativas entre todos los periodos excepto el de los 15 días finales (0 a 15 días, 15 a 45 días y 45 a 75 días).

En todos los casos el porcentaje perdido para los periodos de tiempo estudiados fue superior en las muestras conservadas a temperatura ambiente que en aquellas que estuvieron refrigeradas (Tabla 4. 26).

Al analizar comparativamente los resultados obtenidos para un determinado tiempo a las dos temperaturas de conservación empleando el test de ANOVA de un factor en todos los casos se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fármaco retenido en uno y otro caso, siendo innecesaria la realización de pruebas *post hoc* ya que sólo se comparaban dos grupos (Tabla 4.27). Estos resultados confirmaron que la conservación en condiciones de refrigeración influye positivamente en la estabilidad de los arqueosomas, coincidiendo con los resultados obtenidos en otros trabajos realizados por el grupo de investigación (Clares y Medina, 2003).

Tabla 4. 27. Diferencias porcentuales de principio activo retenidos por los arqueosomas de la fórmula A según la temperatura.

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	*4,780	*9,125	*16,281	*10,024



Gráfica 4. 17. Comparación de la estabilidad de los arqueosomas de la fórmula A.

La gráfica 4. 17 permite comparar la estabilidad de esta formulación a lo largo del tiempo y la influencia de la temperatura de conservación.

6. 1. 2. Fórmula B.

Los resultados obtenidos con esta fórmula de arqueosomas, elaborada con los extractos lipídicos polares totales de *Halobacterium salinarum* CECT 396, colesterol y dipropionato de betametasona, se analizaron estadísticamente (ANOVA) para establecer posibles diferencias significativas en el porcentaje retenido a lo largo del tiempo. Los resultados se analizaron para temperatura de conservación y también para un determinado tiempo comparando el porcentaje captado retenido a las diferentes temperaturas.

La tabla 4. 28 resume los porcentajes captados por estos arqueosomas a lo largo del periodo de estudio. La tabla 4. 29 expone los porcentajes perdidos por estas vesículas lipídicas durante el estudio.

Tabla 4. 28. Porcentajes captados por los arqueosomas de la fórmula B.

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	58,979±7,523	49,506±7,585	43,886±7,205	38,643±7,470	38,701±7,574
25°C	58,979±7,523	46,233±7,208	38,411±7,479	32,907±7,442	31,198±7,377

Tabla 4. 29. Porcentajes de principio activo perdido o liberado por los arqueosomas de la fórmula B.

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	9,473	15,093	20,337	20,279
25°C	0	12,747	20,568	26,072	27,782

El porcentaje de principio activo captado inicialmente por los arqueosomas fue elevado, aunque ligeramente inferior (0,565%) al captado por la fórmula A de los arqueosomas.

La tabla 4. 30 recopila los porcentajes medios de fármaco perdidos en cada periodo de tiempo, indicando las diferencias significativas.

Tabla 4. 30. Porcentajes de principio activo perdido por los arqueosomas de la fórmula B en cada periodo de tiempo.

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	*9,473	*5,620	5,244	-0,058
25°C	*12,747	*7,822	*5,504	1,709

Con las muestras conservadas a 4-8°C se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (58,979%) y tras 15 días (49,506%), lo cual representó una

pérdida de fármaco captado del 9,473%. También se produjo una pérdida estadísticamente significativa en el periodo de tiempo comprendido entre los 15 y 45 días del estudio, cuantificada en el 5,620% del corticoide retenido.

Posteriormente, en el periodo de tiempo entre 45 y 90 días no se detectaron diferencias significativas y la pérdida de principio activo encapsulado en los arqueosomas a lo largo de esos 45 días representó un 5,185% del total encapsulado al elaborar las muestras, lo cual denota un periodo de estabilidad en estos arqueosomas.

El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 20,279% del principio activo captado inicialmente.

Al analizar los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente se determinaron diferencias significativas entre todos los periodos excepto en los últimos 15 días (0 a 15 días, 15 a 45 días y 45 a 75 días) (Tabla 4. 30).

Al igual que sucedía en la fórmula A, el porcentaje perdido para los periodos de tiempo estudiados fue superior en las muestras conservadas a temperatura ambiente que en aquellas que estuvieron refrigeradas. Estos resultados nuevamente manifiestan la influencia de la temperatura de conservación sobre la estabilidad del sistema, de tal manera que los arqueosomas mantenidos a baja temperatura (4-8°C) poseen una estabilidad mayor, con menor difusión prematura del principio activo

Tabla 4. 31. Diferencias porcentuales de principio activo retenidos por los arqueosomas de la fórmula B según la temperatura.

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	*3,273	*5,475	*5,736	*7,503

a través de la pared. Los datos obtenidos experimentalmente se han recopilado en la tabla 4. 31.

Al igual que se observó con los resultados obtenidos para un determinado tiempo a las dos temperaturas de conservación para la fórmula A, con los resultados de la fórmula B se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fármaco retenido en todos los casos entre ambas condiciones de conservación, aunque esta diferencia es menor al inicio del estudio como reflejan los datos obtenidos a los 15 días de la elaboración de las muestras (Tabla 4. 31).

Cuando se comparó la estabilidad de esta fórmula conservada en frío con los resultados de estabilidad de la fórmula A en iguales condiciones de almacenamiento, sólo a los 15 y 90 días del estudio se detectaron diferencias significativas con un 4,331 y 4,128% respectivamente para uno y otro tiempo. Esto puede deberse al efecto ejercido por el colesterol sobre la fluidez de las membranas liposomiales (Yatvin y Lelkes, 1982).

El efecto protector de la integración del colesterol en las membranas resultó más marcado en las muestras conservadas a temperatura ambiente ya que se pudieron determinar diferencias significativas a lo largo de todo el ensayo realizado, corroborando el citado beneficio que el colesterol

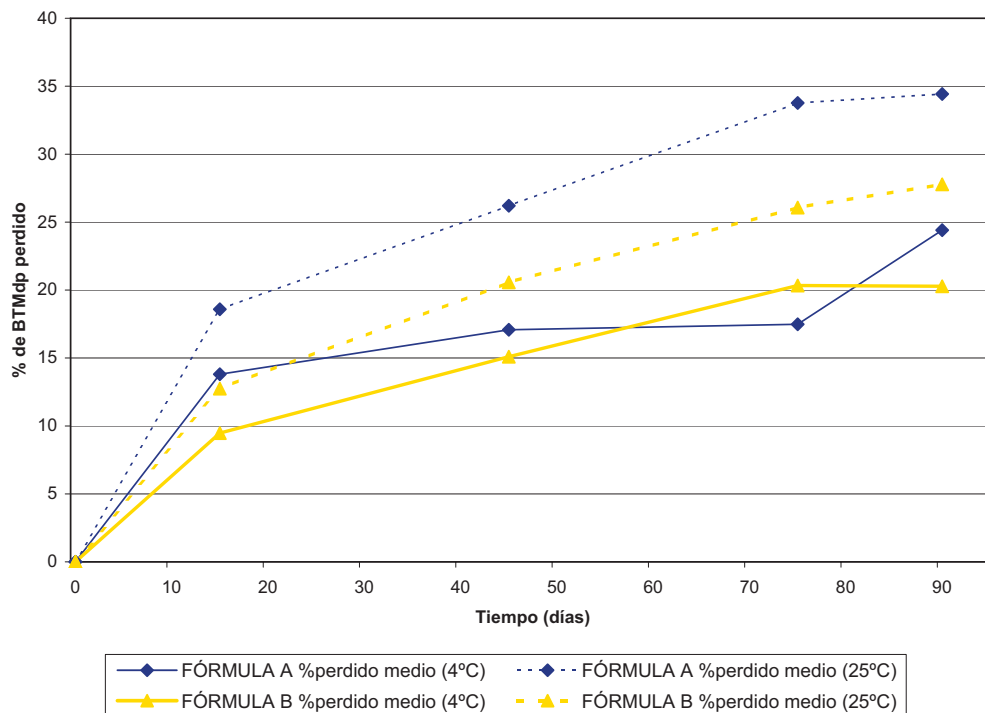
ejerce sobre la estabilidad. Su efecto se traduciría en un descenso de la permeabilidad del fármaco a través de la bicapa (Mc Mullen *et al.*, 1993).

A continuación se han recopilado en la tabla 4. 32 los resultados obtenidos para la pérdida de corticoide por ambas fórmulas así como la diferencia entre ambos porcentajes a 4-8°C y a 25-30°C.

Tabla 4. 32. Comparación de las pérdidas de principio activo por los arqueosomas de las fórmulas A y B.

Porcentaje de BTMdp perdido						
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula A	0	13,804	17,077	17,483	24,407
	Fórmula B	0	9,473	15,093	20,336	20,279
	Diferencia	0	*4,331	1,981	-2,854	*4,128
25 °C	Fórmula A	0	18,584	26,203	33,764	34,430
	Fórmula B	0	12,747	20,568	26,072	27,782
	Diferencia	0	*5,837	*5,635	*7,691	*6,648

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza: 0,95%).



Gráfica 4. 18. Comparación de la estabilidad de los arqueosomas de la fórmula B.

La gráfica 4. 18 permite observar la evolución en la pérdida de principio activo durante el estudio de estabilidad de la fórmula B y compararlo con la de la fórmula A.

6. 1. 3. Fórmula C.

Esta fórmula de arqueosomas fue elaborada con los extractos lipídicos polares totales de *Halobacterium salinarum* CECT 396, colesterol, fármaco y ácido ascórbico como antioxidante, al objeto de constatar su posible influencia sobre la estabilidad del sistema. Los resultados experimentales obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo del estudio de estabilidad. Los resultados igualmente se analizaron para ambas temperaturas de conservación y

también para un determinado tiempo comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

Tabla 4. 33. Porcentajes captados por los arqueosomas de la fórmula C.

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	45,031±7,525	34,993±7,229	28,359±7,612	26,099±7,418	25,404±7,235
25°C	45,031±7,525	31,487±7,455	15,294±6,307	10,890±7,330	10,803±6,609

Tabla 4. 34. Porcentajes de principio activo perdido o liberado por los arqueosomas de la fórmula C.

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	10,038	16,672	18,931	19,627
25°C	0	13,543	29,698	34,140	34,227

La tabla 4. 33 resume los porcentajes captados por estos arqueosomas a lo largo del periodo de estudio, mientras que en la tabla 4. 34 se han recopilado los porcentajes perdidos durante el estudio.

El porcentaje de principio activo captado inicialmente por los arqueosomas fue elevado, pero sensiblemente inferior al constatado para las fórmulas A y B (59,544% y 58,979% respectivamente).

Con las muestras conservadas a 4-8°C se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (45,031%) y tras 15 días (34,993%), lo cual representó una pérdida de fármaco captado del 10,038%. También se produjo una pérdida estadísticamente significativa en el periodo de tiempo comprendido entre los 15 y 45 días del estudio, cuantificada en el 6,634% del corticoide retenido.

Posteriormente, en el periodo de tiempo entre 45 y 90 días no se detectaron diferencias significativas y la pérdida de principio activo encapsulado en los arqueosomas a lo largo de esos 45 días representó un 2,955% del total encapsulado al elaborar las muestras, lo cual denota un periodo de alta estabilidad en estos arqueosomas, posiblemente debido a la acción sinérgica del colesterol y ácido ascórbico presentes en la composición de estos liposomas éter.

El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 19,627% del principio activo captado inicialmente.

El análisis de los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) puso de manifiesto diferencias significativas en los mismos periodos que en el caso anterior (conservación de la muestra en condiciones de refrigeración), si bien los porcentajes perdidos fueron superiores en todos los tiempos muestreados (Tabla 4. 35). El porcentaje perdido al final de este ensayo de estabilidad fue del 34,227%, lo cual revela, al igual que en las dos fórmulas anteriores, una gran influencia de la temperatura de conservación de las muestras sobre la estabilidad de los arqueosomas ya que en las muestras conservadas en frío la pérdida de corticoide no alcanzó el 20%.

Tabla 4. 35. Porcentaje de principio activo perdido por los arqueosomas de la fórmula C en cada periodo de tiempo.

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	*10,038	*6,634	2,260	0,695
25°C	*13,543	*16,194	4,404	0,087

Al igual que con los resultados obtenidos para un determinado tiempo a las dos temperaturas de conservación para las fórmulas anteriores, con los resultados de la fórmula C se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fármaco retenido en todos los casos entre ambas condiciones de conservación, aunque esta diferencia es considerablemente menor al inicio del estudio como reflejan los datos obtenidos a los 15 días de la elaboración de las muestras, mientras que al avanzar el estudio estas diferencias se incrementan (Tabla 4. 36).

Tabla 4. 36. Diferencias porcentuales de principio activo retenidos por los arqueosomas de la fórmula C según la temperatura.

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	*3,505	*13,065	*15,209	*14,601

También se ha efectuado una comparación entre los datos aportados por esta fórmula y la más sencilla (A). En la tabla 4. 37 se han recopilado los resultados obtenidos para la pérdida de corticoide por ambas fórmulas así como la diferencia entre ambos porcentajes a 4-8°C y a 25-30°C.

Tabla 4. 37. Comparación de las pérdidas de principio activo por los arqueosomas de la fórmula A y C.

Porcentaje de BTMdp perdido						
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula A	0	13,804	17,077	17,483	24,407
	Fórmula C	0	10,038	16,672	18,931	19,627
	Diferencia	0	*3,766	0,405	-1,448	*4,780
25 °C	Fórmula A	0	18,584	26,203	33,764	34,430
	Fórmula C	0	13,543	29,737	34,140	34,227
	Diferencia	0	*5,041	*-3,534	-0,376	0,203

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza: 0,95%).

A 4-8°C, sólo se detectaron diferencias significativas a los 15 y 90 días (3,766 y 4,780%, respectivamente). No obstante la cantidad de principio activo retenida por la fórmula C fue mayor durante todo el estudio. La incorporación de colesterol y un antioxidante a esta formulación de arqueosomas permitió reducir la pérdida del dipropionato de betametasona retenido por los mismos inicialmente.

Al evaluar comparativamente la estabilidad de los arqueosomas de ambas fórmulas (A y C) a 25°C se determinó un efecto protector del colesterol y del ácido ascórbico durante los 15 primeros días del estudio de estabilidad. Sin embargo, este efecto protector se reduce a lo largo del periodo de estudio hasta los tres meses, tiempo al que la diferencia entre una y otra fórmula es prácticamente nula, mostrando la importante influencia que tiene la temperatura de conservación de las muestras en la estabilidad de los arqueosomas.

Cuando se comparó la estabilidad de esta fórmula conservada en frío (4-8°C) con los resultados de estabilidad de la fórmula B en iguales condiciones de almacenamiento, no se detectaron diferencias significativas en todo el tiempo (Tabla 4. 38). Se puede deducir de estos resultados que el efecto protector desarrollado por la incorporación del colesterol a la formulación de los arqueosomas confiere gran fluidez a las membranas mejorando la estabilidad de los liposomas, mientras que la asociación del colesterol y la vitamina C no mejora en gran medida la estabilidad de las vesículas, con respecto a la formulación B.

Por tanto, la composición de fórmula C no aporta un beneficio notable a la estabilidad en comparación con igual fórmula sin antioxidante. En tal caso, sería preferible la fórmula B puesto que supondría un mejor rendimiento en la encapsulación del corticoide (58,979% captado inicialmente frente al 45,031% captado por la fórmula C), además de ventajas económicas al incluir menor número de componentes.

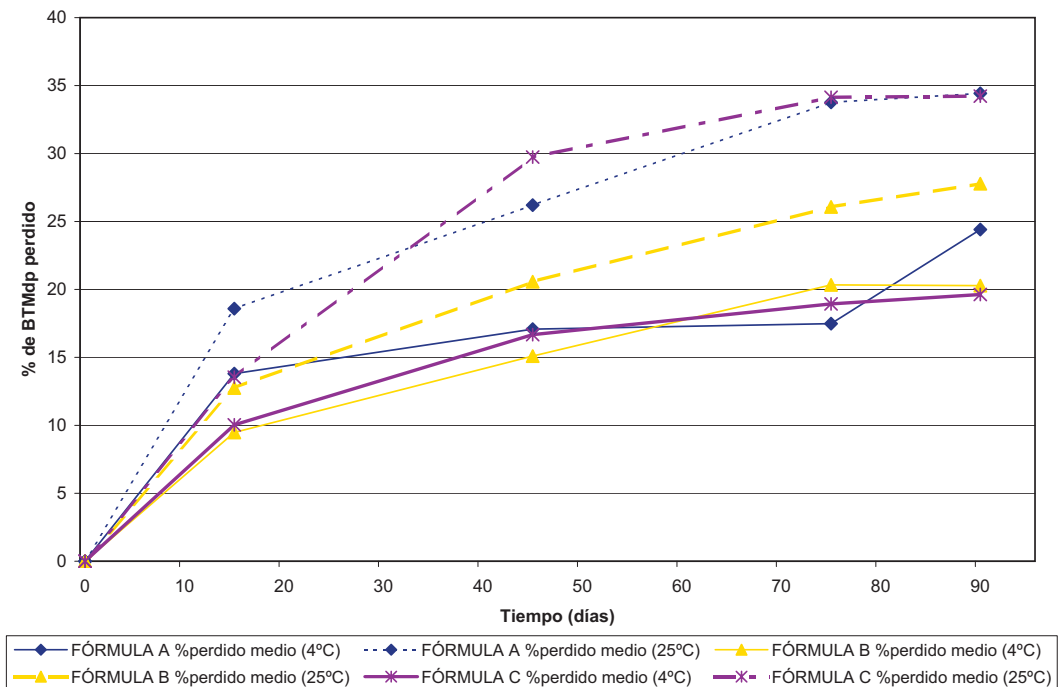
A 25°C se obtuvieron unos resultados paradójicos puesto que la pérdida de principio activo encapsulado fue superior en la fórmula que contenía vitamina C y colesterol (fórmula C) que en aquella que contenía únicamente colesterol (fórmula B). Las diferencias resultaron significativas a partir de los 45 días tras la elaboración de las muestras.

En la tabla siguiente se han resumido las pérdidas de principio activo cuantificadas a lo largo del estudio de estabilidad realizado.

Tabla 4. 38. Comparación de las pérdidas de principio activo por los arqueosomas de la fórmula B y C.

		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula B	0	9,473	15,093	20,336	20,279
	Fórmula C	0	10,038	16,672	18,931	19,627
	Diferencia	0	-0,565	-1,579	1,405	0,652
25 °C	Fórmula B	0	12,747	20,568	26,072	27,782
	Fórmula C	0	13,543	29,737	34,140	34,227
	Diferencia	0	-0,796	*-9169	*-8,068	*-6,445

La gráfica 4. 19 permite constatar la evolución en la pérdida de principio activo durante el estudio de estabilidad de la fórmula C y compararla con las de las fórmulas A y B.



Gráfica 4. 19. Comparación de la estabilidad de los arqueosomas de la fórmula C.

6. 1. 4. Fórmula G.

Esta última fórmula de arqueosomas fue elaborada con lípidos, colesterol, fármaco y ácido ascórbico y acetato de α -tocoferol como antioxidantes. Los resultados experimentales obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo de los 3 meses del estudio de estabilidad. Los resultados se analizaron para ambas temperaturas de conservación y también para un determinado tiempo comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

Las tablas 4. 39 y 4. 40 resumen los porcentajes captados y perdidos por estos liposomas de la fórmula G a lo largo del periodo de estudio.

Tabla 4. 39. Porcentajes captados por los arqueosomas de la fórmula G.

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	80,315±7,429	78,707±7,700	74,275±7,165	74,304±7,667	72,653±7,342
25°C	80,315±7,429	77,085±7,773	72,566±7,296	70,683±7,621	67,033±7,552

Tabla 4. 40. Porcentajes de principio activo perdido o liberado por los arqueosomas de la fórmula G.

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	1,608	6,040	6,011	7,662
25°C	0	3,230	7,749	9,632	13,282

El porcentaje de principio activo captado inicialmente por los liposomas fue el más elevado de todos los evaluados (80,315%) (Tabla 4. 39).

A continuación, en la siguiente tabla se reúnen los porcentajes perdidos medios del principio activo captado por los liposomas en cada periodo de tiempo del estudio de estabilidad (Tabla 4. 41).

Tabla 4. 41. Porcentajes de principio activo perdido por los arqueosomas de la fórmula G en cada periodo de tiempo.

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	1,608	4,403	-0,029	1,622
25°C	3,230	4,519	1,883	3,650

Al conservar las muestras a 4-8°C se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (80,315%) y tras 90 días (72,653%), que representó una pérdida de fármaco captado del 7,662%. (Tabla 4. 40), correspondiente al porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses.

El análisis de los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) puso de manifiesto diferencias significativas en los periodos comprendidos entre 0 y 45 días y 15 y 75 días. El porcentaje perdido al final de este ensayo de estabilidad fue del 13,282%, lo cual revela la influencia de la temperatura de conservación de las muestras sobre la estabilidad de los liposomas.

La Tabla 4. 42 recopila las diferencias entre los porcentajes medios de fármaco retenido por los liposomas conservados a las distintas temperaturas empleadas para el estudio de la estabilidad.

Tabla 4. 42. Diferencias porcentuales de principio activo retenidos por los arqueosomas de la fórmula G según la temperatura.

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	1,622	1,709	*3,621	*5,620

Con los resultados de la fórmula G se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fármaco retenido entre ambas condiciones de conservación en la parte final del estudio (Tabla 4. 42), aunque en este caso esta diferencia es considerablemente inferior durante todo el estudio como reflejan los datos obtenidos respecto al resto de formulaciones.

Como en los casos anteriores, se han comparado los datos aportados por la formulación G con el resto de arqueosomas, comenzando por la fórmula más sencilla. En la tabla 4. 43 se recopilan los resultados obtenidos para la pérdida de corticoide por las fórmulas A y G, así como la diferencia entre ambos porcentajes a 4-8°C y a 25-30°C.

Tabla 4. 43. Comparación de las pérdidas de principio activo por los arqueosomas de la fórmula A y G.

		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula A	0	13,804	17,077	17,483	24,407
	Fórmula G	0	1,608	6,040	6,011	7,662
	Diferencia	0	*12,196	*11,037	*11,472	*16,745
25 °C	Fórmula A	0	18,534	26,203	33,764	34,430
	Fórmula G	0	3,230	7,749	9,632	13,282
	Diferencia	0	*15,354	*18,454	*24,132	*21,148

* Diferencias significativas estadísticamente (nivel de confianza = 95%).

La comparación entre las estabilidades observadas para ambas formulaciones reveló diferencias significativas desde el inicio del estudio en ambas condiciones de conservación si bien, como muestra la tabla 4. 43, se aprecia un mayor efecto protector de los antioxidantes cuando el almacenamiento de las muestras se lleva a cabo a temperatura ambiente. Así, los arqueosomas de la fórmula G retienen mayor cantidad de corticoide, perdiendo sólo un 13,28%, frente al 34, 34% liberado por las vesículas de la fórmula A.

La pérdida del dipropionato de betametasona retenido por los arqueosomas inicialmente pudo reducirse significativamente gracias a la composición de esta formulación de liposomas, por la acción combinada

del colesterol y de los antioxidantes.

Se han resumido en la tabla 4. 44 los resultados obtenidos para las fórmulas B y G expresados como porcentaje de corticoide perdido o liberado, así como las diferencias observadas a ambas temperaturas de conservación.

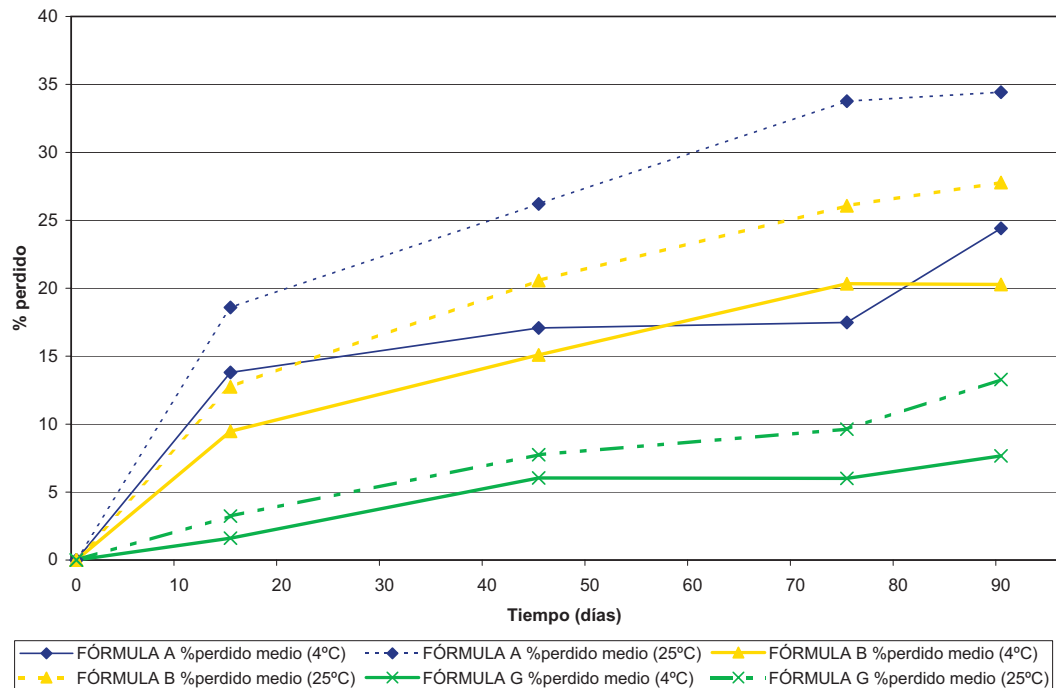
Tabla 4. 44. Comparación de las pérdidas de principio activo por los arqueosomas de la fórmula B y G.

		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula B	0	9,473	15,093	20,336	20,279
	Fórmula G	0	1,608	6,040	6,011	7,662
	Diferencia	0	*7,865	*9,053	*14,326	*12,617
25 °C	Fórmula B	0	12,747	20,568	26,072	27,782
	Fórmula G	0	3,230	7,749	9,632	13,282
	Diferencia	0	*9,517	*12,819	*16,440	*14,500

* Diferencias significativas estadísticamente (nivel de confianza = 95%).

Cuando se compararon las estabildades de esta fórmula conservada en frío (4-8°C) y a temperatura ambiente respectivamente con la de la fórmula B, se detectaron diferencias significativas durante el estudio de estabilidad completo (Tabla 4. 44). La fórmula G resultó más estable que la elaborada sólo con colesterol, incluso en frío, con una pérdida del 7,66% a los 90 días de la elaboración, frente a un 20,27% de la fórmula B. De lo anterior se deduce un efecto protector adicional al del colesterol, aportado por la combinaicón de los dos antioxidantes seleccionados.

La gráfica 4. 20 permite confrontar la evolución en la pérdida de principio activo durante el estudio de estabilidad de la fórmula



Gráfica 4. 20. Comparación de la estabilidad de los arqueosomas de la fórmula G.

G y compararlo con las de las fórmulas A y B. Asimismo permite la comparación de la estabilidad para un determinado tiempo entre las dos condiciones de conservación.

Para finalizar este apartado sobre la estabilidad de los liposomas elaborados con lípidos éter se incluye un gráfica comparativa de las estabilidades halladas para cada una de las fórmulas elaboradas y a las dos temperaturas de conservación (Gráfica 4. 21) que comentaremos a continuación para poder concluir con qué formulación se obtienen mejores resultados y sería, por tanto, la más idónea para próximos trabajos.

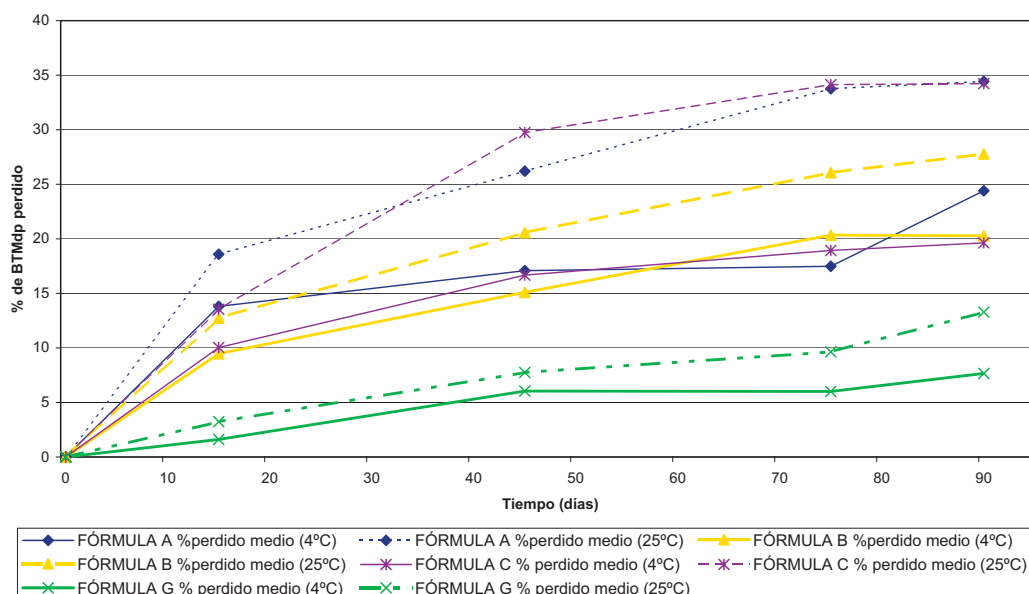
Desde el inicio del estudio (15 días) destaca la gran estabilidad de la fórmula G, independientemente de la temperatura de conservación de las muestras. En el extremo opuesto, la fórmula que presenta mayor pérdida

del principio activo encapsulado es la más sencilla, elaborada únicamente con los lípidos arqueobacteriales y el dipropionato de betametasona (fórmula A).

A la mitad del estudio la fórmula G mantiene su buena estabilidad, con una leve diferencia a favor de las muestras conservadas a 25-30°C. En este punto del estudio los peores resultados se observaron en las muestras C y A conservadas a mayor temperatura, con pérdidas de principio activo superiores al 25%.

Pasados 75 días del estudio se observó que las muestras de las formulaciones A y C conservadas a temperatura ambiente presentaban pérdidas de principio activo muy similares (próximas al 35%) y que se mantuvieron hasta el final del estudio. Respecto a las muestras correspondientes a estas formulaciones que fueron conservadas a baja temperatura, las pérdidas de principio activo son semejantes y ligeramente inferiores a las de la fórmula B en iguales condiciones.

Al final del ensayo de estabilidad se detectó una mayor diferencia entre las pérdidas de principio activo por los liposomas de la fórmula G conservadas a cada una de las temperaturas de trabajo, con mejores resultados en las refrigeradas. En este momento se produjo una pérdida de fármaco más brusca por los arqueosomas de la fórmula más sencilla hasta alcanzar casi el 25% a 4-8°C.



Gráfica 4. 21. Comparación general de la estabilidad de los arqueosomas.

La gráfica 4. 21 evidencia que la fórmula de elección sería la G por su mayor estabilidad respecto a las otras formulaciones. Si se eligiera como condición de conservación la temperatura de 4-8°C, la fórmula B podría ofrecer unos resultados adecuados a pesar de presentar pérdidas superiores a las de la fórmula elaborada con colesterol y la combinación de antioxidantes. La formulación elaborada con colesterol y sin antioxidantes (fórmula B) presenta durante todo el estudio resultados muy parecidos a los de la que incorpora ácido ascórbico (fórmula C) cuando ambas se conservan en frío. Esto justificaría la elección de la fórmula B puesto que supondría ventajas económicas y tecnológicas por su menor número de componentes y mayor grado de captación (58,9% frente al 45% de la fórmula C). No obstante, la formulación de los arqueosomas elaborados con ambos antioxidantes mejoró la captación inicial (80% frente al 59 % de la fórmula A) y fue capaz de retener el principio activo captado con menores pérdidas durante su conservación (7,6% y 13,28% perdidos a 4-8°C y 25-30°C, respectivamente).

6. 2. Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión.

Se han caracterizado los arqueosomas estudiados mediante microscopía electrónica de transmisión, con objeto de obtener información sobre su estructura, dimensiones y grado de agregación, acompañando gráficamente la caracterización con microfotografías de las vesículas lipídicas portadoras de dipropionato de betametasona teñidas con acetato de uranilo al 2% mediante tinción negativa.

En la siguiente tabla (Tabla 4. 45) se han resumido los valores medios de tamaño de partícula, expresados en micras, evaluados para las cuatro formulaciones ensayadas y las diferentes condiciones de conservación. Los diámetros han sido determinados en el momento de la elaboración y tras 15, 45, 75 y 90 días de la misma. Esta evaluación del diámetro de los liposomas se ha realizado con el fin de analizar la influencia del paso del tiempo en las dimensiones de estos vectores. El número de medidas efectuadas han sido de 100 por fórmula, temperatura de conservación y periodo de tiempo. Las muestras se han conservado a temperatura de refrigeración (4-8°C) y a temperatura ambiente (25-30°C), protegidas de la luz.

A continuación se analizan los resultados obtenidos para cada una de las formulaciones estudiadas.

Tabla 4. 45. Diámetros medios y desviaciones estándar de los arqueosomas de las distintas formulaciones en función del tiempo.

TIEMPO (Días)		0	15	45	75	90
FÓRMULA Y TEMPERATURA						
A	4°C	0,368±0,185	0,340±0,171	0,383±0,171	0,486±0,229	0,507±0,375
	25°C		0,216±0,150	0,519±0,248	0,494±0,218	0,550±0,233
B	4°C	0,465±0,327	0,393±0,231	0,526±0,226	0,511±0,280	0,426±0,245
	25°C		0,590±0,372	0,657±0,388	0,475±0,300	0,633±0,343
C	4°C	0,694±0,344	0,510±0,321	0,569±0,289	0,720±0,451	0,788±0,435
	25°C		0,667±0,451	0,657±0,284	0,652±0,316	0,686±0,349
G	4°C	0,630±0,443	0,623±0,336	0,653±0,300	0,431±0,189	0,333±0,123
	25°C		0,447±0,178	0,467±0,286	0,379±0,198	0,395±0,162

6. 2. 1. Fórmula A.

La figura 4. 28 corresponde a una microfotografía de una suspensión de los arqueosomas elaborados con la fórmula más sencilla (lípidos y principio activo) a las 24 horas de la elaboración. Se caracterizan por poseer un diámetro medio de $0,368 \pm 0,185 \mu\text{m}$. En la imagen se visualiza la estructura de los liposomas éter formados y se diferencian las bicapas fosfolipídicas alternando con compartimentos acuosos. La difusión del colorante revela la existencia de regiones transparentes al bombardeo electrónico a las cuales no pudo acceder el colorante y de zonas electrodensas donde se localiza el metal pesado.

Debido a esta distribución del colorante, las capas hidrófobas se comportan como transparentes mientras que las partes polares corresponden a las zonas oscuras a nuestra percepción.

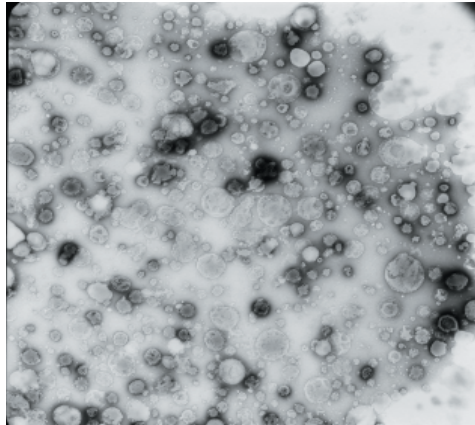


Figura 4. 28. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula A (0 días).

En las siguientes figuras (figuras 4. 29 y 4.30) podemos observar cómo evoluciona la estructura y agregación de los liposomas conservados en frío. Estas fotografías permiten comprobar el mantenimiento de la estructura descrita, poniendo de manifiesto la escasa alteración que sufren estas vesículas a lo largo del tiempo, acompañada de un ligero incremento del tamaño de partícula medio ($0,507\pm 0,375\ \mu\text{m}$). En estas condiciones el tamaño de partícula se mantuvo aproximadamente constante hasta los 75 días en que el aumento del diámetro medio así como de la desviación estándar fue más notable.

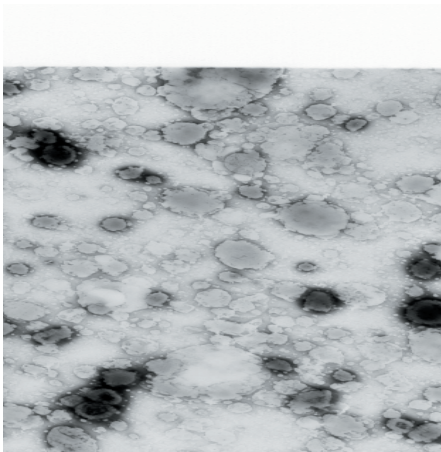


Figura 4. 29. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula A (45 días, 4-8°C).

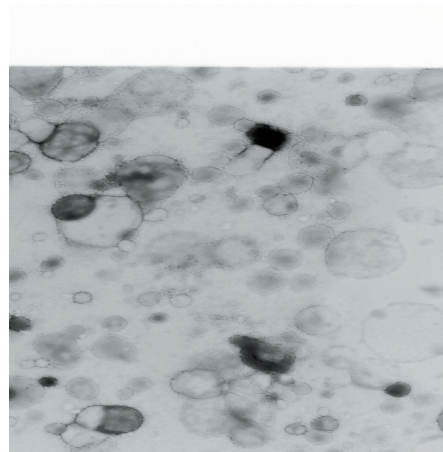


Figura 4. 30. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula A (90 días, 4-8°C).

Sin embargo cuando la muestra se conservó a 25-30°C la alteración de los arqueosomas fue mayor, los liposomas sufrieron una agregación superior que en el caso de la conservación en frío. A lo largo del tiempo los liposomas fueron variando en su tamaño, que se redujo e incrementó alternativamente a lo largo de los 3 meses de duración del estudio. Finalmente el diámetro medio de los arqueosomas de la fórmula A conservada a temperatura ambiente fue $0,550\pm 0,233$ μm . Sus características estructurales y la agregación de las vesículas formadas queda reflejado en las fotografías realizadas a las suspensiones liposomiales (figuras 4. 31 y 4.32).

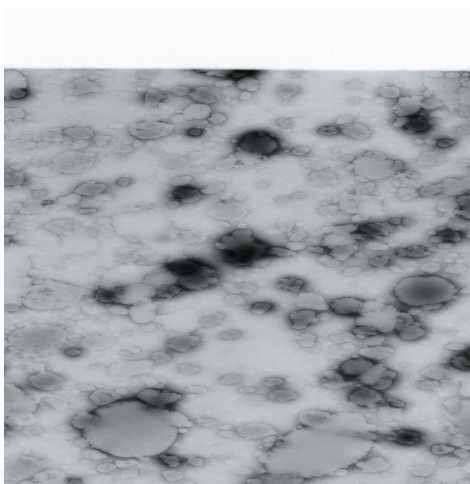
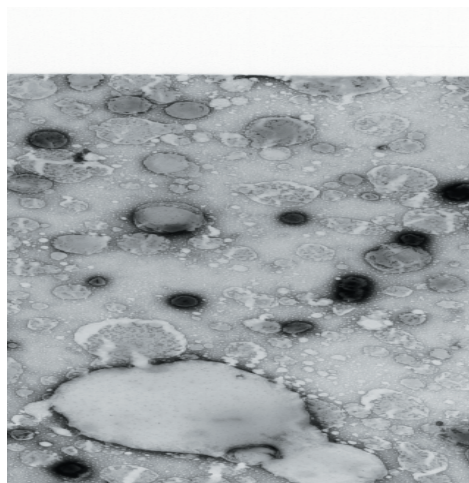


Figura 4. 31. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula A (15 días, 25-30°C).

Figura 4. 32. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula A (90 días, 25-30°C).



6. 2. 2. Fórmula B.

Se puede observar en la fotografía (Figura 4. 33) que cierta dispersión en el tamaño de partícula de los arqueosomas de esta fórmula en la que se incorporó el colesterol. Posteriormente las muestras que se caracterizarían se conservaron protegidas de la acción de la luz y bajo las mismas condiciones de temperatura citadas anteriormente. Los resultados obtenidos a cada intervalo de tiempo en ambos casos fueron notablemente diferentes.

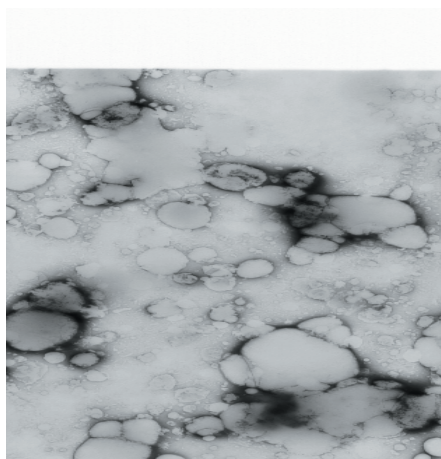


Figura 4. 33. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula B (0 días).

Las muestras conservadas a 4-8°C que fueron caracterizadas a los 45 días de la elaboración las vesículas presentaron el mayor diámetro medio y la visualización de las muestras permitió observar la alteración parcial de algunos arqueosomas. Este aspecto se confirmó tras la caracterización a los 75 días. Por último, los liposomas de esta fórmula redujeron su tamaño hasta quedar ligeramente por debajo del diámetro medido al inicio del estudio de estabilidad, lo cual podría deberse a la consolidación de las vesículas por pérdida de la fase acuosa.

En cuanto a la morfología y agregación de los arqueosomas de esta fórmula se observaron leves alteraciones en las membranas liposomiales, que aparecieron más deterioradas con el tiempo. Este efecto puede observarse en las microfotografías tomadas a estas muestras a los diferentes tiempos (Figuras 4. 33- 4. 36).

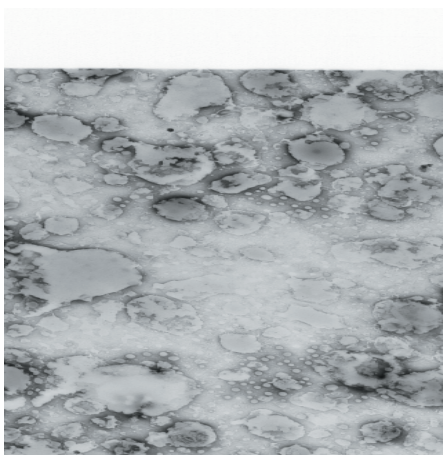


Figura 4. 34. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula B (45 días, 4-8°C).

Figura 4. 35. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula B (75 días, 4-8°C).

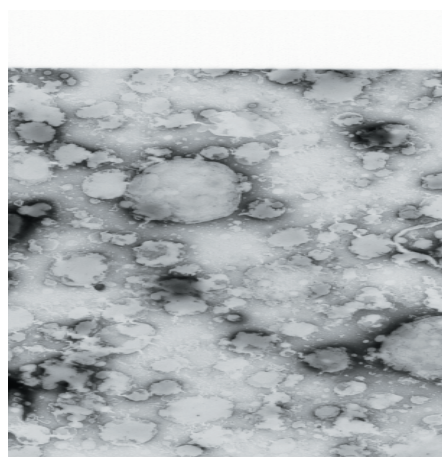
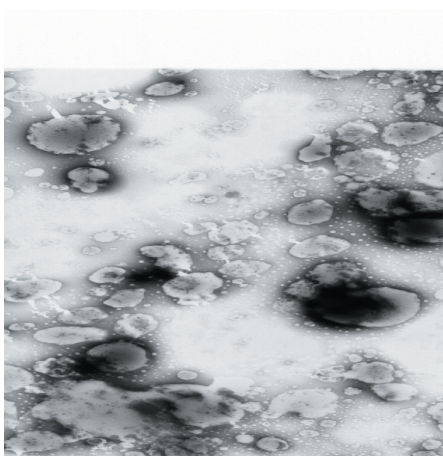


Figura 4. 36. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula B (90 días, 4-8°C).



En cambio, las muestras que fueron conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) fueron incrementado su tamaño de partícula medio hasta los 45 días, mostrando su máximo diámetro a este tiempo. Posteriormente se produjo un descenso del tamaño de partícula a los 75 días seguido de un nuevo aumento hasta alcanzar un diámetro medio próximo al observado a los 45 días de la elaboración.

Respecto a la agregación sufrida por las vesículas a lo largo del estudio, se determinó una cierta tendencia a la fusión de los arqueosomas a partir de los 45 días que se corroboró al caracterizar las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión como muestran las microfotografías de las figuras 4. 37-4. 39.

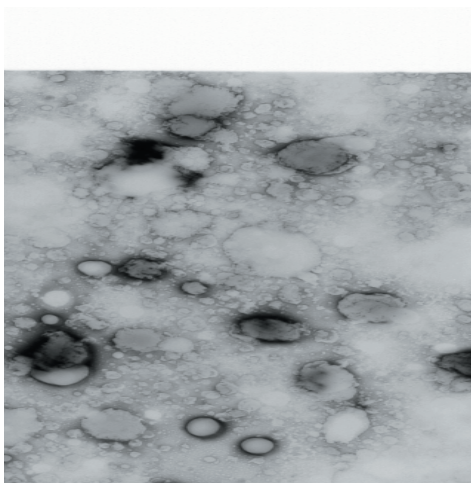
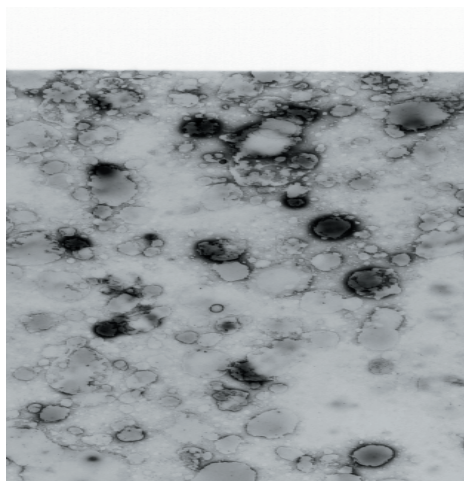


Figura 4. 37. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula B (15 días, 25-30°C).

Figura 4. 38. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula B (45 días, 25-30°C).



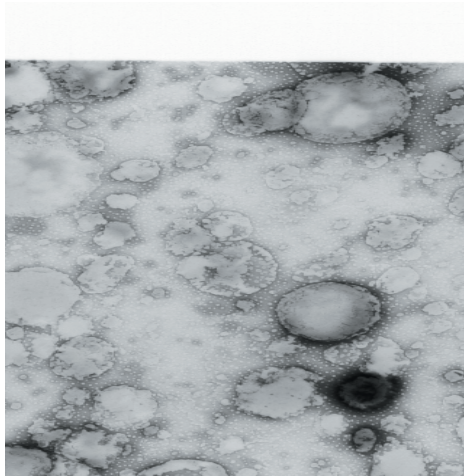


Figura 4. 39. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula B (90 días, 25-30°C).

6. 2. 3. Fórmula C.

En esta formulación de los arqueosomas se adicionó colesterol y vitamina C que actúan respectivamente sobre la fluidez de la membrana y como antioxidante. Estas primeras microfotografías (Figura 4. 40 y 4. 41) muestran la estructura que presentaron las vesículas formadas con esta composición en las 24 horas siguientes a la elaboración. Entonces el tamaño de partícula medio de las mismas fue de $0,694 \pm 0,344 \mu\text{m}$.

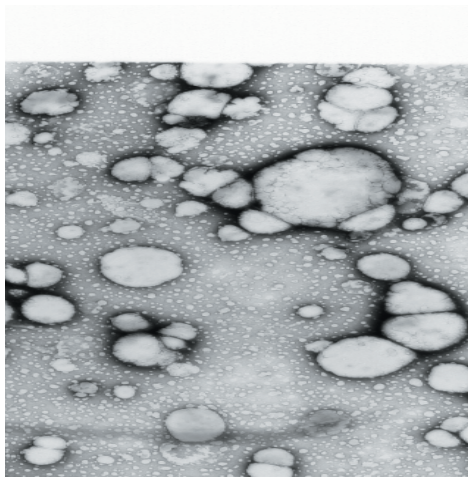
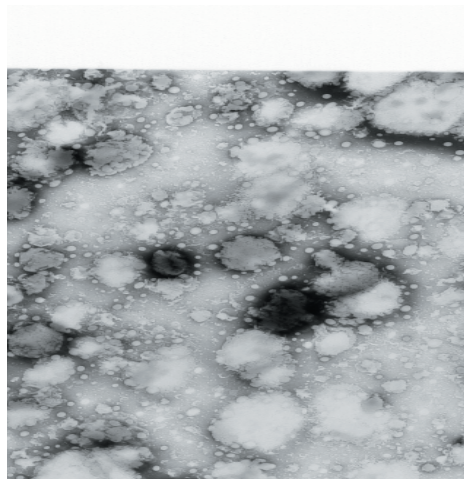


Figura 4. 40. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (0 días).

Figura 4. 41. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (0 días).



La conservación a 4-8°C produjo un cierto descenso en el tamaño de partícula medio de estos arqueosomas hasta los 45 días aunque posteriormente se observó un aumento del diámetro hasta alcanzar las $0,788\pm 0,435 \mu\text{m}$.

Las fotografías tomadas a los 15 días de la elaboración de las muestras (Figura 4. 42) permitieron observar una cierta heterogeneidad en el tamaño de los liposomas éter elaborados con esta formulación. Aisladamente se observó cierta tendencia a la fusión de las vesículas entre sí. Dicha tendencia se mantuvo e incrementó entre los 45 y 90 días de la preparación de estos arqueosomas como puede comprobarse al observar las figuras 4. 43- 4. 45.

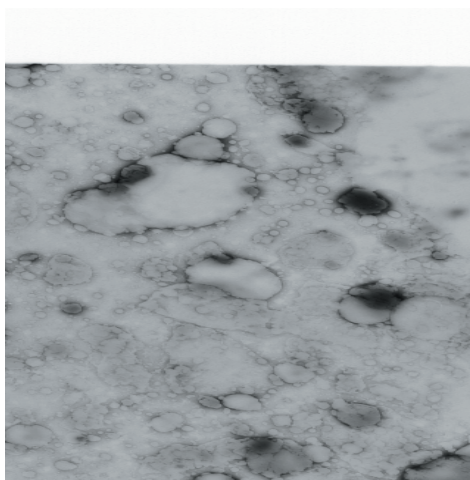


Figura 4. 42. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (15 días, 4-8°C).

Figura 4. 43. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (45 días, 4-8°C).

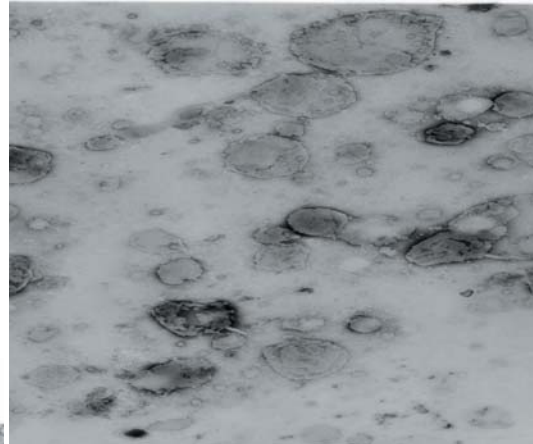
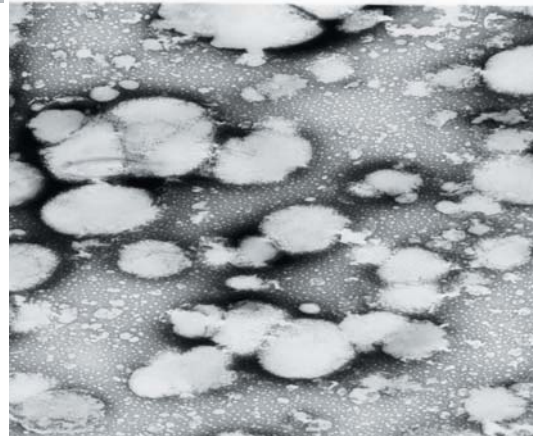


Figura 4. 44. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (75 días, 4-8°C).

Figura 4. 45. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (90 días, 4-8°C).



Con las muestras preparadas con esta misma formulación y conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) se determinó una menor variabilidad en el tamaño de partícula medio que permaneció aproximadamente constante (entre $0,694 \pm 0,344 \mu\text{m}$ al inicio y $0,652 \pm 0,316 \mu\text{m}$ a los 75 días) a lo largo de los 3 meses de duración del estudio de estabilidad.

Respecto a su estructura y agregación, estos arqueosomas no mostraron grandes cambios estructurales hasta la caracterización llevada a cabo transcurridos 75 días de la elaboración. Este aspecto puede observarse en las microfotografías de las figuras 4. 46-4. 48. La alteración de las muestras fue superior en los últimos 15 días del estudio (Figura 4. 49).

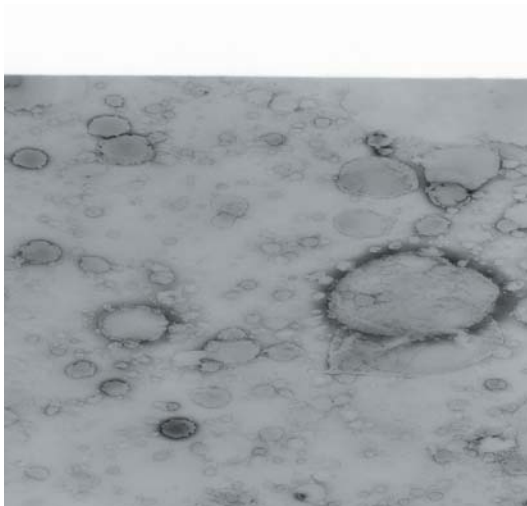


Figura 4. 46. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (15 días, 25-30°C).

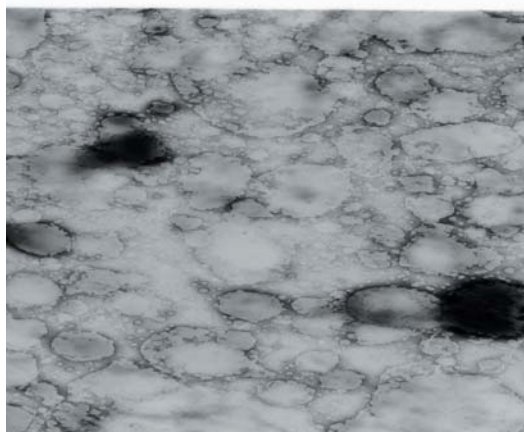


Figura 4. 47. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (45 días, 25-30°C).

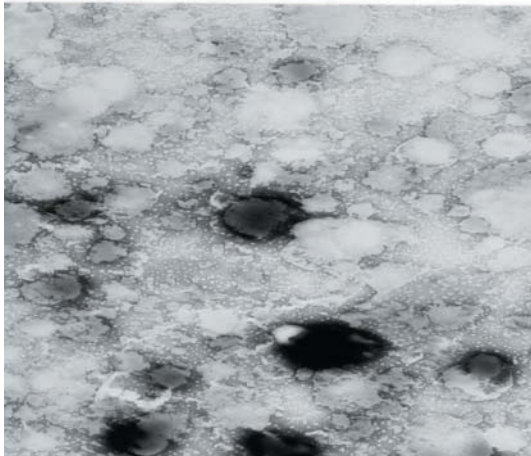


Figura 4. 48. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (75 días, 25-30°C).

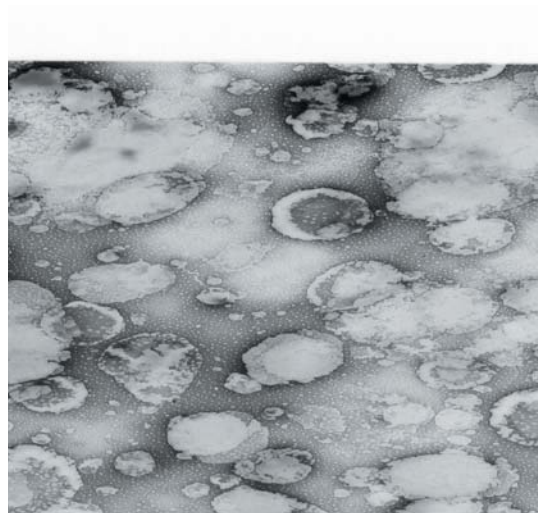


Figura 4. 49. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula C (90 días, 25-30°C).

6. 2. 4. Fórmula G.

Las vesículas formuladas con los TPL de *H. salinarum* CECT396, colesterol, dipropionato de betametasona y la asociación de los dos antioxidantes fueron caracterizados al inicio, en las 24 horas siguientes a su preparación, y se pudo observar la existencia de membranas liposomiales externas bien definidas y cierta heterogeneidad en el tamaño de partícula de estos vectores de dipropionato de betametasona.

A los 15 días se mantenían las características de las vesículas visualizadas anteriormente en estas muestras conservadas a 4-8°C. No obstante, algunas membranas se observaron rugosas. Por otro lado, la caracterización y toma de fotografías permitió analizar posibles modificaciones en el tamaño de partícula, comprobando que las variaciones fueron leves ($0,623\pm 0,336$).

Después de un mes, a los 45 días de la conservación de las muestras se detectó el inicio de los procesos de agregación de los liposomas. Las membranas externas de las vesículas permanecían sin alterarse significativamente y se observaban ligeramente rugosas pero bien definidas. Respecto al tamaño de partícula de estos liposomas, cuando se estudiaron las medidas de diámetro realizadas se ratificó la estabilidad de estos liposomas ya que los cambios en el diámetro medio y la dispersión del mismo fueron muy pequeños ($0,653\pm 0,300$). Cabe destacar la reducción en la heterogeneidad del tamaño de partícula.

Pasados 75 días de la preparación de estos arqueosomas portadores de dipropionato de betametasona, la visualización de las muestras reflejó la agregación de los liposomas de menor tamaño y el mantenimiento de la independencia de aquellos de mayor tamaño. Las membranas se observaron más rugosas que en las caracterizaciones anteriores. Las medidas de diámetro de estos arqueosomas revelaron un considerable descenso en el diámetro ($0,431\pm 0,189$).

La última caracterización realizada a estas muestras se llevó a cabo tras 90 días de almacenamiento y se detectó mayor agregación y rugosidad en los arqueosomas. Con el estudio de tamaño de partícula se determinó

una nueva disminución del mismo así como de su heterogeneidad ($0,333\pm 0,129$).

Para estudiar el efecto de la temperatura de conservación sobre la estabilidad de estos liposomas se estudió la evolución de las muestras conservadas a temperatura ambiente ($25-30^{\circ}\text{C}$) mediante sucesivas caracterizaciones a los 15, 45, 75 y 90 días a partir de su elaboración.

A los 15 días de su preparación se visualizaron estas muestras detectando una disminución del tamaño de partícula así como una cierta alteración en la morfología de los liposomas caracterizados. El tamaño de partícula de los arqueosomas se determinó mediante las medidas de diámetro de los mismos y los resultados obtenidos confirmaron esta reducción del tamaño ($0,477\pm 0,178$).

La siguiente caracterización de las muestras se realizó a los 45 días y mostró gran similitud con las vesículas conservadas a $4-8^{\circ}\text{C}$ durante el mismo plazo de tiempo. No se apreciaron cambios significativos en el diámetro medio de estas vesículas lipídicas aunque sí se incrementó la heterogeneidad de los tamaños como se confirmó con el estudio de tamaño de partícula ($0,467\pm 0,286$).

A los 75 días de su conservación se visualizaron las muestras mediante microscopía electrónica de transmisión, detectándose una mayor agregación de los arqueosomas y cierto deterioro de las membranas liposomiales que ya no aparecían tan lisas como se habían observado inicialmente. El análisis de los diámetros liposomales puso de manifiesto una reducción del mismo ($0,379\pm 0,198$). Para finalizar el estudio, las

muestras se caracterizaron a los 90 días de su preparación. Esto permitió estudiar la morfología de las vesículas revelando que los procesos de agregación se habían intensificado durante los últimos 15 días del estudio y que las membranas liposomiales también se hallaban más deterioradas. Las medidas de diámetro de estos liposomas desvelaron un pequeño aumento en el diámetro medio de las vesículas y en la homogeneidad de la distribución de tamaños de los mismos ($0,395\pm 0,162$).

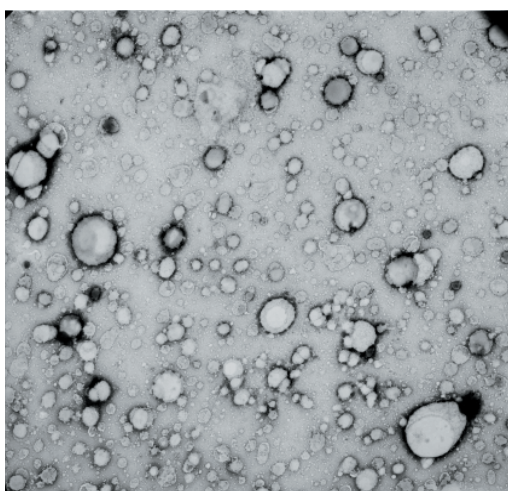


Figura 4. 50. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G (15 días, 4-8°C).

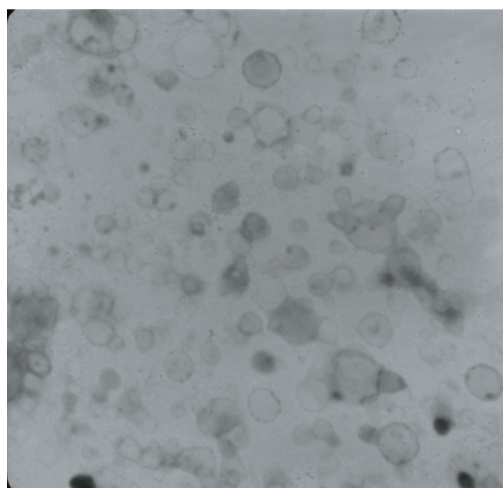


Figura 4. 51. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G (45 días, 4-8°C).

Las microfotografías correspondientes a las Figuras 4. 50-4. 53 y 4.54-4.57 permiten valorar los citados cambios sufridos por los arqueosomas de esta formulación conservados a 4-8°C y a 25-30°C respectivamente.

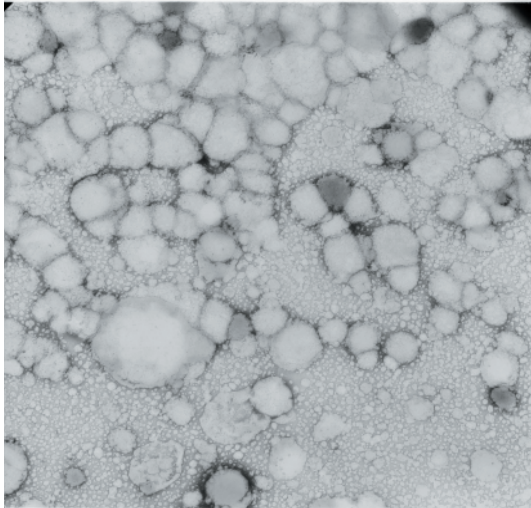


Figura 4. 52. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G (75 días, 4-8°C).

Figura 4. 53. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G (90 días, 4-8°C).

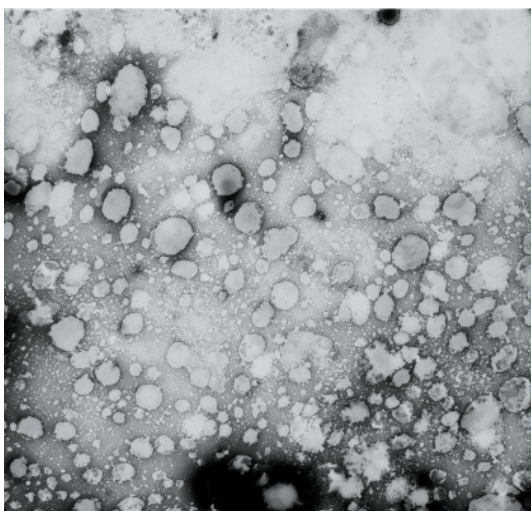
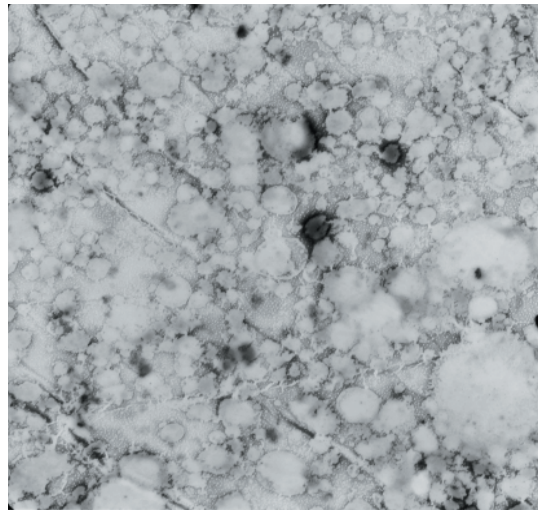


Figura 4. 54. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G (15 días, 25-30°C).

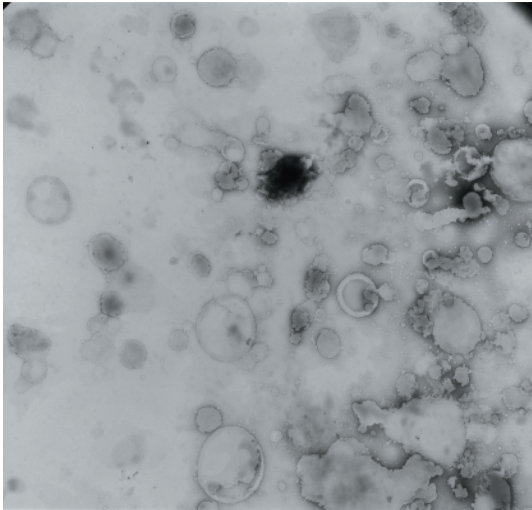


Figura 4. 55. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G (45 días, 25-30°C).

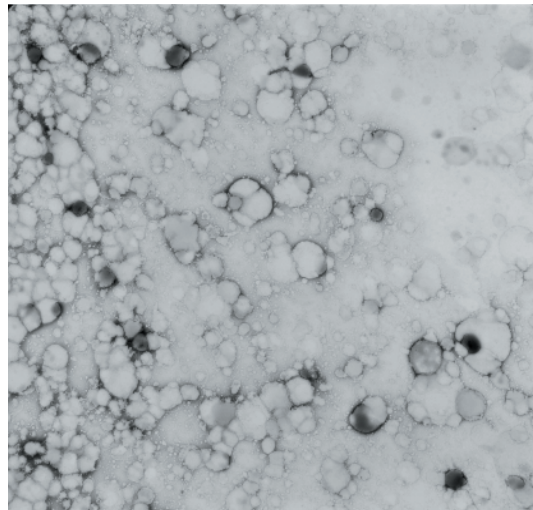


Figura 4. 56. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G (75 días, 25-30°C).

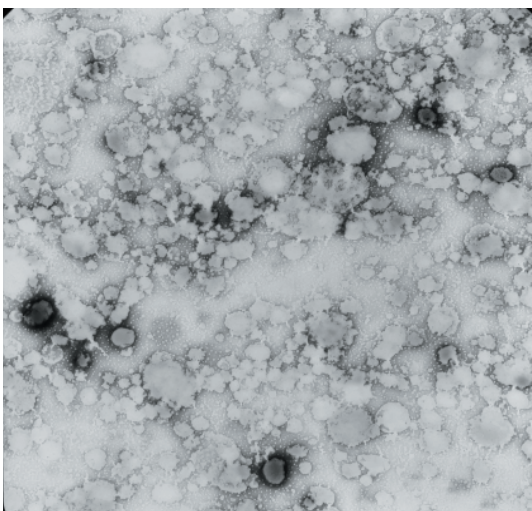


Figura 4. 57. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G (90 días, 25-30°C).

7. ESTABILIDAD DE LIPOSOMAS.

Al igual que en el caso de los arqueosomas, para evaluar la estabilidad de cada tipo de vesículas se realizó una valoración espectrofométrica de las mismas a los 0, 15, 45, 75 y 90 días de la elaboración de las muestras con el fin de cuantificar el porcentaje de principio activo captado que se liberaba a lo largo del tiempo. Paralelamente se ha efectuado una caracterización microscópica mediante tinción negativa y posterior visualización al microscopio de transmisión electrónica.

7. 1. Evaluación del porcentaje de principio activo perdido en función del tiempo.

A continuación, en las siguientes tablas se exponen los resultados obtenidos en este estudio de estabilidad, tanto a temperatura de refrigeración (4-8°C) como a temperatura ambiente (25-30°C). Dichos resultados corresponden a porcentaje de principio activo captado por los liposomas durante el periodo de estudio (90 días) y a porcentaje de corticosteroide perdido o liberado por las diferentes formulaciones a lo largo del tiempo.

Tabla 4. 46. Porcentaje captado (media± desviación estándar) por las diferentes formulaciones de liposomas (n=12).

Formulación	A		B	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	66,029±7,709	66,029±7,709	59,308±7,677	59,308±7,677
15 días	61,452±7,577	53,765±7,469	55,812±7,422	54,962±7,502
45 días	51,486±7,671	47,777±7,425	54,421±7,825	41,018±7,736
75 días	23,366±7,724	17,418±7,347	45,499±7,767	27,229±7,302
90 días	20,701±7,399	16,336±7,204	42,022±7,425	14,405±7,787

Formulación	C		D	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	61,084±7,601	61,084±7,601	63,673±7,672	63,673±7,672
15 días	54,112±7,769	40,439±7,579	59,906±7,449	56,971±7,626
45 días	49,555±7,350	36,345±7,399	56,198±7,431	47,546±7,741
75 días	41,019±7,744	29,238±7,774	46,349±7,537	37,349±7,109
90 días	29,353±7,610	21,860±7,735	38,971±7,579	30,821±7,591

Formulación	E		F	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	66,492±7,674	66,492±7,674	42,619±7,688	42,619±7,688
15 días	65,430±7,568	62,919±7,678	38,795±7,739	38,447±7,506
45 días	58,439±7,451	52,297±7,473	36,607±7,402	32,654±7,802
75 días	47,121±7,792	39,048±7,648	31,703±7,516	25,870±7,555
90 días	38,508±7,550	21,126±7,296	24,347±7,493	18,231±7,412

Formulación	G	
	4°C	25°C
0 días	79,992±7,676	79,992±7,676
15 días	76,631±7,258	72,653±7,673
45 días	72,035±7,947	70,219±7,534
75 días	70,953±7,346	63,924±7,728
90 días	63,074±7,346	54,653±7,728

El porcentaje de corticoide encapsulado por los liposomas que se libera o se pierde con respecto al tiempo se determinó por diferencia entre el tanto por ciento captado en el día 0 y el cuantificado en los sucesivos días del estudio. De este modo se pudo evaluar la estabilidad de los liposomas a lo largo del tiempo (90 días).

Tabla 4. 47. Porcentaje de principio activo perdido por las distintas fórmulas de liposomas en función del tiempo (valor medio) (n=12).

Formulación	A		B		C		D	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	0	0	0	0	0	0	0	0
15 días	4,577	12,264	3,496	4,345	6,972	20,646	3,766	6,702
45 días	14,543	18,251	4,886	18,289	11,530	24,740	7,474	16,126
75 días	42,662	46,611	13,809	32,079	20,066	31,847	17,324	26,324
90 días	45,327	49,692	17,285	44,903	31,731	39,225	24,701	32,851

Fórmula	E		F		G	
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	0	0	0	0	0	0
15 días	1,062	3,573	3,824	4,172	3,361	7,339
45 días	8,054	14,195	6,013	9,966	6,605	9,772
75 días	19,371	27,444	10,916	16,749	9,038	16,068
90 días	27,985	45,366	18,272	24,388	16,918	25,339

Al final de este apartado se incluye una gráfica (Gráfica 4. 29) que resume todos estos resultados y permite concluir cuál sería la mejor formulación en función de estos datos. Para el análisis de cada formulación se incluye otra serie de gráficas en las que se compara la estabilidad de cada una de las formulaciones elaboradas en función del tiempo, de la temperatura de conservación así como respecto de las formulas más sencillas (fórmulas A y B).

7. 1. 1. Fórmula A.

A los resultados obtenidos con estos liposomas, elaborados únicamente con fosfatidilcolina de yema de huevo y principio activo, se les realizó un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo del tiempo. Los resultados se analizaron para cada una de las temperaturas de conservación y también para un determinado tiempo, comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

Las tablas 4. 48 y 4. 49 resumen los porcentajes captados y perdidos por estos liposomas a lo largo del periodo de estudio.

Tabla 4. 48. Porcentajes captados por los liposomas de la fórmula A (media± desviación estándar) (n=12).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	66,029±7,709	61,452±7,577	51,486±7,671	23,366±7,724	20,701±7,399
25°C	66,029±7,709	53,765±7,469	47,777±7,425	17,418±7,347	16,336±7,204

Tabla 4. 49. Pérdida de principio activo (%) por los liposomas de la fórmula A (n=12).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	4,577	14,543	42,662	45,327
25°C	0	12,264	18,251	46,611	49,692

El porcentaje inicial de principio activo captado por los liposomas fue bastante elevado e igual a un 66,029%.

En la tabla 4. 50 se han recopilado los datos correspondientes a la pérdida de corticoide retenido producida a lo largo de los periodos

de tiempo a los cuales se ha cuantificado el fármaco encapsulado en los liposomas, indicándose los casos en los cuales hay diferencias significativas.

Tabla 4. 50. Porcentaje de BTMdp perdido en cada periodo de tiempo para la fórmula A (n=12).

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	4,577	*9,966	*27,822	2,963
25°C	*12,264	*5,987	*30,360	1,082

En las muestras conservadas a 4-8°C no se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración y tras 15 días, lo cual representó una pérdida de fármaco captado del 4,577%. Posteriormente, en el periodo de tiempo entre 15 y 45 días se detectaron diferencias significativas y la pérdida de principio activo encapsulado en los liposomas a lo largo de esos 30 días representó un 9,966%. Entre los 45 y 75 días la pérdida de fármaco ascendió al 27,822% del retenido a los 45 días, representando una nueva disminución significativa en el principio activo captado por los liposomas. En los últimos 15 días del estudio, entre los 75 y 90 días, se produjo la liberación de un 2,963% del dipropionato de betametasona encapsulado que no resultó estadísticamente significativa con respecto al porcentaje retenido a los 75 días (Tabla 4.50).

El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 45,327% del principio activo captado inicialmente, lo que representa una pérdida muy elevada y superior a la detectada en los arqueosomas elaborados sólo con lípidos (Tabla 4. 49).

Este mismo procedimiento se siguió para el análisis de los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente observándose diferencias significativas entre todos los periodos excepto el de los 15 días finales, de los 75 a los 90 días tras la elaboración de las muestras (Tabla 4. 50). Además, el porcentaje perdido fue superior en estas muestras que en aquellas que estuvieron refrigeradas. En este caso la pérdida de principio activo encapsulado por los liposomas tras completarse el estudio de estabilidad alcanzó el 49,692% del fármaco captado por los liposomas inicialmente (Tabla 4. 49). Esta pérdida representa aproximadamente el 75% del corticoide captado por los liposomas durante la elaboración.

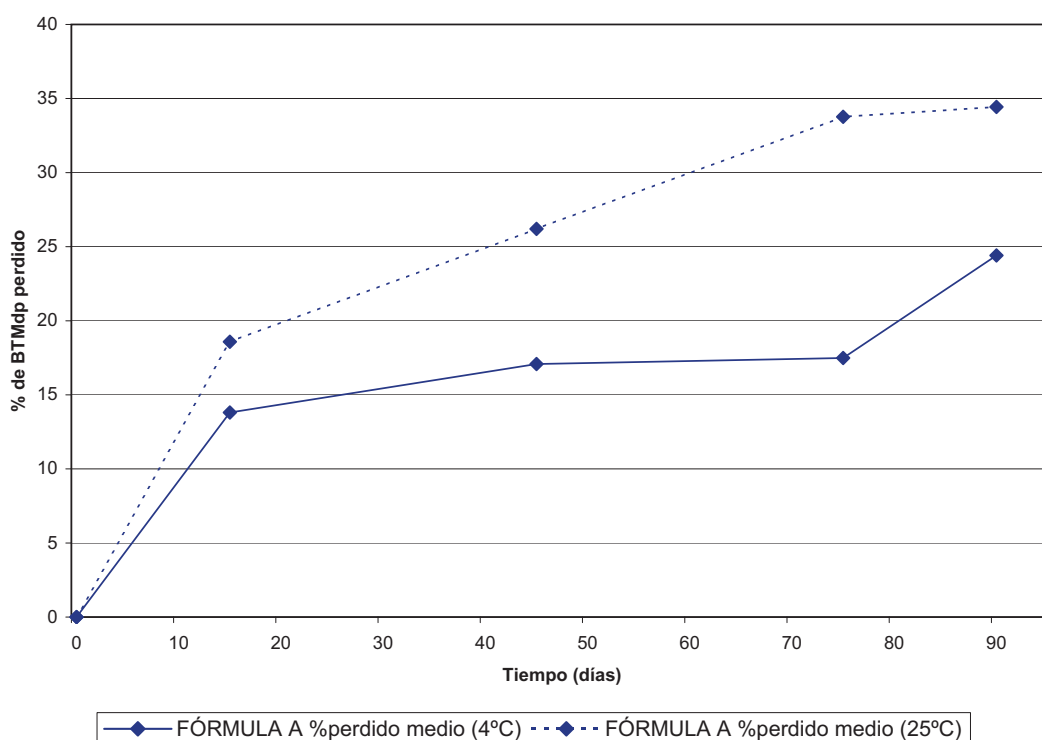
Para analizar la posible existencia de diferencias significativas en la retención del principio activo debidas a las condiciones de conservación se han comparado los porcentajes de fármaco retenidos por las muestras refrigeradas y conservadas a temperatura ambiente a cada tiempo (15, 45, 75 y 90 días) y se ha desarrollado un análisis ANOVA con el fin de establecer la significación estadística entre ambos grupos (4-8°C y 25-30°C). En este caso no fue necesario realizar pruebas *post hoc* dado que sólo se comparaban dos grupos y la diferencia, en caso de existir, había de ser necesariamente entre ambos. La Tabla 4. 51 expone las diferencias en el porcentaje de principio activo retenido en función de la temperatura.

Tabla 4. 51. Diferencia de % de BTMdp retenido según la temperatura de conservación (n=12).

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	*7,687	*3,708	*5,948	*4,365

Al analizar los resultados obtenidos para un determinado tiempo a las dos temperaturas de conservación en todos los casos se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fármaco retenido en uno y otro caso. Estos resultados confirmaron que la refrigeración influye positivamente en la estabilidad de los liposomas, coincidiendo con los resultados obtenidos en otros trabajos realizados por el grupo de investigación (Clares y Medina, 2003).

En la gráfica siguiente (Gráfica 4. 22) podemos comparar la estabilidad de esta formulación a lo largo del tiempo así como la influencia que tiene la temperatura de conservación de los liposomas.



Gráfica 4. 22. Comparación de la estabilidad de la fórmula A.

7. 1. 2. Fórmula B.

Los resultados obtenidos con esta fórmula de los liposomas, elaborada con los fosfolípidos éster, colesterol y dipropionato de betametasona, se analizaron estadísticamente (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo del tiempo. Los resultados se analizaron para cada una de las temperaturas de conservación y también para un determinado tiempo comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

Las tablas 4. 52 y 4 .53 resumen los porcentajes captados y perdidos por estos liposomas a lo largo del periodo de estudio.

Tabla 4. 52. Porcentajes captados por los liposomas de la fórmula B (porcentaje medio±desviación estándar) (n=12).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	59,308±7,677	55,812±7,422	54,421±7,825	45,499±7,767	42,022±7,425
25°C	59,308±7,677	54,962±7,502	41,018±7,736	27,229±7,302	14,405±7,787

Tabla 4. 53. Porcentaje de principio activo perdido por los liposomas de la fórmula B (valor medio).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	3,496	4,886	13,809	17,285
25°C	0	4,345	18,289	32,079	44,903

El porcentaje de principio activo captado inicialmente por los liposomas fue elevado (Tabla 4. 52), aunque inferior al captado por la fórmula A, lo que podría ser consecuencia de la incorporación de colesterol en las membranas.

La tabla 4. 54 recopila los porcentajes medios de fármaco perdido o liberado en cada periodo de tiempo, indicando las diferencias significativas.

Tabla 4. 54. Porcentaje de BTMdp perdido en cada periodo de tiempo (n=12).

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	3,476	1,391	*8,923	3,476
25°C	4,346	*13,944	*13,789	*12,824

Con las muestras conservadas a 4-8°C sólo se observó diferencia significativa entre el porcentaje captado entre los 45 y los 75 días, correspondiente a una pérdida de fármaco captado del 8,923% (Tabla 4. 54). Posteriormente, en el periodo de tiempo entre 75 y 90 días no se detectó significación estadística y la pérdida de principio activo encapsulado en los liposomas a lo largo de esos días representó un 3,476% del total encapsulado al elaborar las muestras, lo cual denota una pérdida equiparable a la del periodo inicial de estabilidad detectado entre los 0 y 45 días. Estos resultados se exponen en la tabla 4. 54.

El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 17,285% del principio activo captado inicialmente, lo que supone una pérdida mucho menor que en la fórmula A, cuya estabilidad se ha estudiado anteriormente.

Al analizar los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente se determinaron diferencias significativas entre

todos los periodos excepto en los primeros 15 días (Tabla 4. 54). En todos los casos el porcentaje perdido para los tiempos estudiados fue superior en las muestras conservadas a temperatura ambiente que en aquellas que estuvieron refrigeradas. Los datos obtenidos experimentalmente se han recopilado en la tabla 4. 53. Destaca una pérdida del 44,903% de agente encapsulado a los 90 días de la elaboración.

Para determinar diferencias significativas durante los 3 meses de estudio en la retención del principio activo debidas a la temperatura de conservación se ha desarrollado un análisis ANOVA, no siendo necesario el desarrollo de pruebas *post hoc*. La Tabla 4. 55 expone las diferencias en el porcentaje de principio activo retenido en función de la temperatura.

Tabla 4. 55. Diferencia de % de BTMdp retenido según la temperatura de conservación (n=12).

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	0,850	*13,403	*18,270	*27,617

Al igual que se observó con los resultados obtenidos para un determinado tiempo a las dos temperaturas de conservación para la fórmula A, con los resultados de la fórmula B se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fármaco retenido entre ambas condiciones de conservación en todos los casos excepto en los 15 primeros días (Tabla 4. 55).

A continuación se han recopilado en la tabla 4. 56 los resultados obtenidos para la pérdida de corticoide por las fórmulas A y B así como la diferencia entre ambos porcentajes a 4-8°C y a 25-30°C.

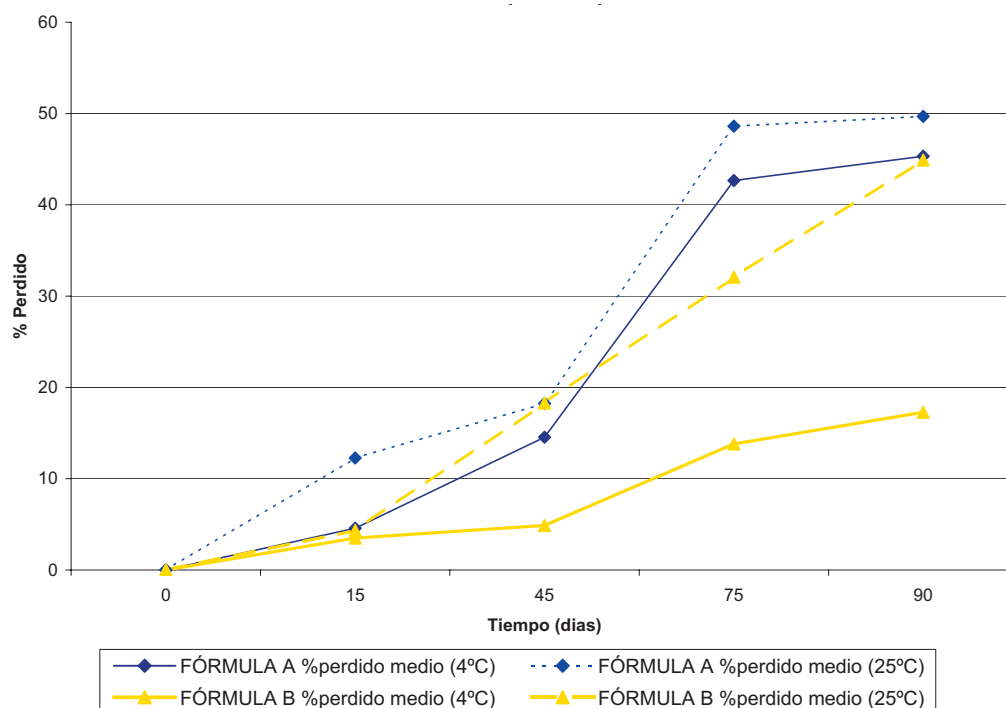
Tabla 4. 56. Comparación de las pérdidas del fármaco captado por los liposomas de las fórmulas A y B.

		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula A	0	4,577	14,543	42,662	45,327
	Fórmula B	0	3,496	4,886	13,809	17,285
	Diferencia	0	1,082	*9,657	*28,854	*28, 042
25 °C	Fórmula A	0	12,264	18,251	48,611	49,692
	Fórmula B	0	4,345	18,289	32,079	44,903
	Diferencia	0	*7,918	-0,039	*16,532	4,790

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza = 95%).

Cuando se comparó la estabilidad de esta fórmula conservada en frío con los resultados de estabilidad de la fórmula A en iguales condiciones de almacenamiento, se detectaron diferencias significativas a todos los tiempos muestreados excepto los primeros 15 días del estudio (Tabla 4. 56). Esto puede deberse al efecto ejercido por el colesterol sobre la fluidez de las membranas liposomiales (Yatvin y Lelkes, 1982), efecto que se traduce en una reducción de la cantidad de agente encapsulado perdida por las vesículas lipídicas.

El efecto protector de la integración del colesterol en las membranas resultó más marcado en las muestras conservadas a temperatura ambiente a los 15 y 75 días determinándose diferencias significativas que permitieron corroborar el citado beneficio que el colesterol ejerce sobre la estabilidad (Tabla 4. 56).



Gráfica 4. 23. Comparación de la estabilidad de la fórmula B.

La gráfica 4. 23 permite observar la evolución en la pérdida de principio activo durante el estudio de estabilidad y comparar el proceso con el seguido por la fórmula A.

7. 1. 3. Fórmula C.

Esta fórmula de los liposomas fue elaborada con fosfatidilcolina, colesterol, fármaco y ácido ascórbico como antioxidante. Los resultados experimentales obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo de los 3 meses del estudio de estabilidad. Al igual que en las dos fórmulas anteriores, los resultados se analizaron para ambas temperaturas de conservación y también para un determinado tiempo comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

Tabla 4. 57. Porcentajes captados por los liposomas de la fórmula C (porcentaje medio±desviación estándar).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	61,084±7,601	54,112±7,769	49,555±7,350	41,019±7,744	29,353±7,610
25°C	61,084±7,601	40,439±7,579	36,345±7,399	29,238±7,774	21,860±7,735

Tabla 4. 58. Porcentajes de principio activo perdidos por los liposomas de la fórmula C (valor medio).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	6,972	11,530	20,066	31,731
25°C	0	20,646	24,740	31,847	39,225

Para contrastar los datos obtenidos experimentalmente en el estudio de estabilidad de esta formulación se han agrupado en la tabla 4. 59 los porcentajes de corticoide perdidos o liberados por las vesículas lipídicas durante cada periodo o intervalo de tiempo. Se ha señalado la existencia o no de diferencias significativas.

Tabla 4. 59. Porcentaje perdido de BTMdp en cada periodo de tiempo (n=12).

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	*6,972	4,558	*8,536	*11,665
25°C	*20,645	4,094	*7,107	*7,378

Al conservar las muestras a 4-8°C se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (61,084%) y tras 15 días (54,112%), que representó una pérdida de fármaco captado del 6,972%. También se produjo una pérdida

estadísticamente significativa en el periodo de tiempo comprendido entre los 45 y 75 días del estudio, cuantificada en el 8,536% del corticoide retenido (Tabla 4. 59). Posteriormente, en el periodo de tiempo entre 75 y 90 días se detectó nuevamente diferencia significativa y la pérdida de principio activo encapsulado en los liposomas a lo largo de ese periodo representó un 11,665% del total encapsulado al elaborar las muestras, lo cual denota la mayor pérdida de estabilidad en estos liposomas (Tabla 4. 59).

El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 31,731% del principio activo captado inicialmente (Tabla 4. 58).

El análisis de los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) (Tabla 4. 59) puso de manifiesto diferencias significativas en los mismos periodos que en el caso anterior (conservación de la muestra en condiciones de refrigeración), si bien la mayor pérdida de fármaco encapsulado se produjo al inicio del estudio de estabilidad y posteriormente los porcentajes perdidos fueron inferiores en los demás tiempos muestreados. El porcentaje perdido al final de este ensayo de estabilidad fue del 39,984% (Tabla 4. 58). Esta diferencia revela la influencia de la temperatura de conservación de las muestras sobre la estabilidad de los liposomas.

En la tabla 4. 60 se han reunido las diferencias en los porcentajes de fármaco retenidos por los liposomas de esta fórmula en función de la temperatura.

Figura 4. 60. Microfotografía de los arqueosomas de la fórmula G (15 días, 25-30°C).

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	*13,674	*13,210	*11,781	*7,493

Al igual que con los resultados obtenidos para un determinado tiempo a las dos temperaturas de conservación para las fórmulas anteriores, con los resultados de la fórmula C se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fármaco retenido en todos los casos entre ambas condiciones de conservación, aunque en este caso la diferencia es considerablemente menor al final del estudio como reflejan los datos obtenidos a los 90 días de la elaboración de las muestras.

Del mismo modo que se efectuó con la fórmula anterior, los resultados obtenidos para la pérdida de corticoide por las fórmulas A y C se han comparado estableciéndose las diferencias entre ambos porcentajes a 4-8°C y a 25-30°C (Tabla 4. 61).

Tabla 4. 61. Comparación de las pérdidas de principio activo captado por los liposomas de las fórmulas A y C.

Porcentaje de BTMdp perdido						
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula A	0	4,577	14,543	42,662	45,327
	Fórmula C	0	6,972	11,792	20,066	31,731
	Diferencia	0	-2,395	3,013	*22,596	*13,596
25 °C	Fórmula A	0	12,264	18,251	48,611	49,692
	Fórmula C	0	20,646	24,740	31,847	39,225
	Diferencia	0	*-8,382	*-6,489	*16,764	*10,468

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza = 95%).

La comparación entre las estabilidades observadas para la fórmula A en iguales condiciones de almacenamiento sólo reveló diferencias significativas a los 75 y 90 días del estudio con un 22,596 y 13,596% respectivamente para uno y otro tiempo (Tabla 4. 61). La pérdida del dipropionato de betametasona retenido por los liposomas inicialmente pudo reducirse gracias a la incorporación de colesterol y un antioxidante a esta formulación de liposomas.

Al evaluar comparativamente la estabilidad de los liposomas de ambas fórmulas a 25°C se determinó un efecto protector del colesterol y del ácido ascórbico a partir de los 75 días del estudio de estabilidad, ya que anteriormente la pérdida de fármaco fue superior en las muestras de la fórmula C que en las de la fórmula A (Tabla 4. 61). Sin embargo, este efecto protector se pone de manifiesto principalmente al pasar más tiempo. Esto puede ser debido a que el efecto protector del colesterol y el ácido ascórbico tenga mayor relevancia cuando se podrían inestabilizar más las vesículas tanto por acción del tiempo como de la temperatura.

También se han comparado los datos aportados por las fórmulas B y C. Los resultados obtenidos para la pérdida de corticoide por ambas fórmulas, así como la diferencia entre ambos porcentajes a 4-8°C y a 25-30°C, se han resumido en la tabla 4. 62.

Tabla 4. 62. Comparación de las pérdidas de principio activo captado por las fórmulas B y C.

		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula B	0	3,496	4,886	13,809	17,285
	Fórmula C	0	6,972	11,792	20,066	31,731
	Diferencia	0	-3,476	*-6,644	*-6,257	*-14,446
25 °C	Fórmula B	0	4,345	18,289	32,079	44,903
	Fórmula C	0	20,646	24,740	31,847	39,225
	Diferencia	0	*-16,300	*-6,451	0,232	*5,678

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza = 95%).

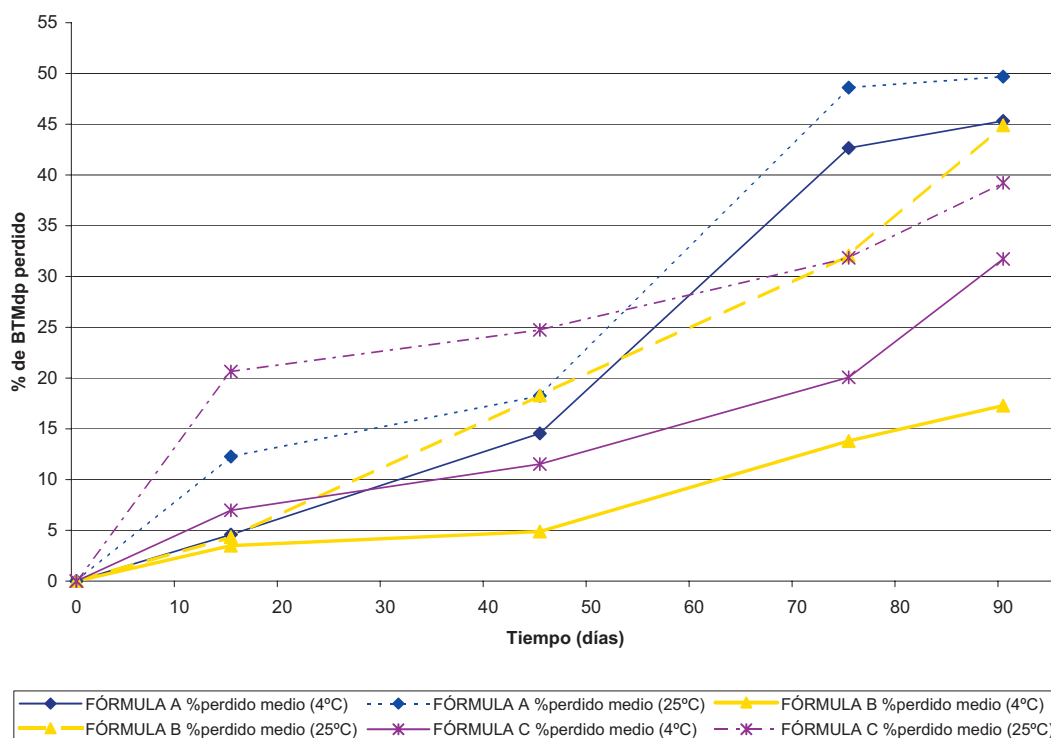
Cuando se comparó la estabilidad de esta fórmula conservada en frío (4-8°C) con los resultados de estabilidad de la fórmula B (Tabla 4. 62) en iguales condiciones de almacenamiento, se manifestaron diferencias significativas desde los 45 días del estudio de estabilidad, con pérdidas de principio activo menores en la fórmula que contiene exclusivamente el fosfolípido, colesterol y fármaco y no contiene el antioxidante. Se puede deducir de estos resultados que el efecto protector desarrollado por la incorporación del colesterol a la formulación de los liposomas confiere gran fluidez a las membranas mejorando la estabilidad de los liposomas, y la asociación del colesterol y la vitamina C no mejora la estabilidad de las vesículas de manera efectiva en estas condiciones.

Por tanto, la composición de fórmula C no aporta un beneficio notable a la estabilidad y en tal caso sería preferible la fórmula B puesto que supondría un mejor rendimiento en la encapsulación del corticoide además de un beneficio económico. Cabe destacar que en el caso de

los arqueosomas se observó un comportamiento análogo entre estas dos formulaciones.

A 25°C se determinaron diferencias significativas desde los 15 días, caracterizadas por una menor pérdida del corticoide encapsulado en los liposomas de la fórmula B que en aquellos contenían vitamina C y colesterol (fórmula C). Sólo en las determinaciones de fármaco libre realizadas a los 75 y 90 días del estudio las pérdidas del principio activo encapsulado fueron superiores en la fórmula B que en la fórmula C (Tabla 4. 62).

Observando la Gráfica 4. 24 se corrobora el análisis realizado a partir de los datos resumidos en las tablas anteriores (Tablas 4. 61 y 4. 62).



Gráfica 4. 24. Comparación de la estabilidad de la fórmula C.

7. 1. 4. Fórmula D.

Tras la realización de los correspondientes análisis estadísticos (ANOVA) se pueden estudiar los resultados obtenidos de igual modo que en las fórmulas anteriores.

Es interesante recordar que esta fórmula incluye en su composición el fosfolípido éster, colesterol, el fármaco y un conservador, el Phenonip[®], cuya actividad fue comentada en el Capítulo III de esta memoria.

Las tablas 4. 63 y 4. 64 resumen los porcentajes captados y perdidos por los liposomas de la fórmula D a lo largo de todo el estudio de estabilidad.

Tabla 4. 63. Porcentajes captados por los liposomas de la fórmula D (media \pm desviación estándar) (n=12).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	63,673 \pm 7,672	59,906 \pm 7,449	56,198 \pm 7,431	46,349 \pm 7,537	38,971 \pm 7,579
25°C	63,673 \pm 7,672	56,971 \pm 7,626	47,546 \pm 7,741	37,349 \pm 7,109	30,821 \pm 7,591

Tabla 4. 64. Porcentajes medios de dipropionato de betametasona perdido por los liposomas de la fórmula D (n=12).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	3,766	7,474	17,324	24,701
25°C	0	6,702	16,126	26,324	32,851

Inicialmente la captación del fármaco por los liposomas fue elevada (Tabla 4. 63).

Para contrastar los datos obtenidos experimentalmente en el estudio de estabilidad de esta formulación se han agrupado en la Tabla 4. 65 los porcentajes de corticoide perdidos durante cada periodo de tiempo.

Tabla 4. 65. Porcentaje perdido de BTMdp en cada periodo de tiempo (n=12).

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	3,766	3,708	*9,850	*7,337
25°C	*6,701	*9,425	*10,197	*6,258

Las muestras conservadas en frío (4-8°C) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre 0 y 45 días (7,474%), entre los 45 y 75 días (9,850%) y los 75 y 90 días (7,377%) (Tabla 4. 65). No se establecieron diferencias entre los 0 y 15 días y en el mes comprendido entre los 45 y 75 días. A la vista de estos resultados podemos establecer un periodo de relativa estabilidad en la primera mitad del estudio, en el cual la pérdida (7,474%) es inferior a la tercera parte de la pérdida total al final del ensayo de estabilidad (24,701%) (Tabla 4. 64).

Al conservar las muestras a temperatura ambiente (25-30°C) se determinó la existencia de diferencia significativa en las pérdidas de corticoide entre cada periodo de tiempo estudiado (Tabla 4. 65). Se pone de manifiesto de este modo que la estabilidad es menor en estas muestras que en las conservadas a temperaturas inferiores (4-8°C), sin que la incorporación del conservador pueda frenar la pérdida de estabilidad de las vesículas al conservar las muestras a temperatura ambiente.

La pérdida total de corticoide por estos liposomas conservados a 25-30°C al final del estudio desarrollado fue del 32,852% del fármaco captado.

En la tabla 4. 66 se exponen las diferencias entre los porcentajes medios de fármaco retenido por los liposomas en función de la temperatura de conservación de las preparaciones.

Tabla 4. 66. Diferencia entre los % de BTMdp retenidos por la fórmula D de los liposomas según la temperatura.

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	2,935	*8,652	*9,000	*8,150

Al analizar los resultados obtenidos para el mismo tiempo a las dos temperaturas de conservación, el único periodo en que no se determinó la existencia de diferencia significativa debida a la temperatura fue el primer periodo, a los 15 días de iniciar el estudio de estabilidad. Durante el resto del ensayo se detectaron diferencias significativas (Tabla 4. 66) en todos los tiempos que se evaluaron. Las pérdidas producidas a lo largo del tiempo de estudio mostraron el efecto beneficioso de la conservación en frío coincidiendo con los resultados obtenidos con las fórmulas anteriores de liposomas y con trabajos anteriores realizados por Clares y Medina (2003).

En la tabla 4. 67 se han reunido los resultados de pérdidas de fármaco obtenidos para las fórmulas A y D y las diferencias entre ambos porcentajes a las distintas condiciones de conservación.

Tabla 4. 67. Comparación de las pérdidas de principio activo captado por las fórmulas A y D.

		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula A	0	4,577	14,543	42,662	45,327
	Fórmula D	0	3,766	7,474	17,324	24,701
	Diferencia	0	0,811	*7,069	*25,339	*20,626
25 °C	Fórmula A	0	12,264	18,251	48,611	49,692
	Fórmula D	0	6,702	16,126	26,324	32,851
	Diferencia	0	*5,562	2,131	*22,287	*16,841

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza: 0,95%).

Al comparar los resultados de estabilidad obtenidos para la fórmula A (elaborada únicamente con fosfatidilcolina y principio activo) con los hallados para la fórmula D en la cual se incorpora colesterol y Phenonip® se ha podido confirmar el efecto protector sobre las membranas liposomiales que ejerce la conservación en frío de las muestras. En tales condiciones las pérdidas del corticoide retenido son menores en ambos casos. En este caso cabe señalar que al iniciarse el estudio de estabilidad, a los 15 días, la diferencia entre las dos fórmulas fue mínima. Un mes después se establecieron diferencias significativas a favor de la fórmula D que se mantuvieron hasta la finalización del estudio (Tabla 4. 67). La mayor estabilidad de esta fórmula podría deberse a la incorporación de colesterol y Phenonip®.

La conservación a temperatura ambiente de ambos tipos de liposomas permitió observar la mayor estabilidad de la fórmula D durante todo el tiempo objeto de estudio. Las diferencias entre los porcentajes de fármaco perdido fueron significativas a todos los tiempos evaluados excepto a los 45 días (Tabla 4. 67).

La tabla 4. 68 resume los resultados de pérdidas de fármaco obtenidos para las fórmulas B y D y las diferencias entre ambos porcentajes a las distintas condiciones de conservación.

Tabla 4. 68. Comparación de las pérdidas de principio activo captado por las fórmulas B y D.

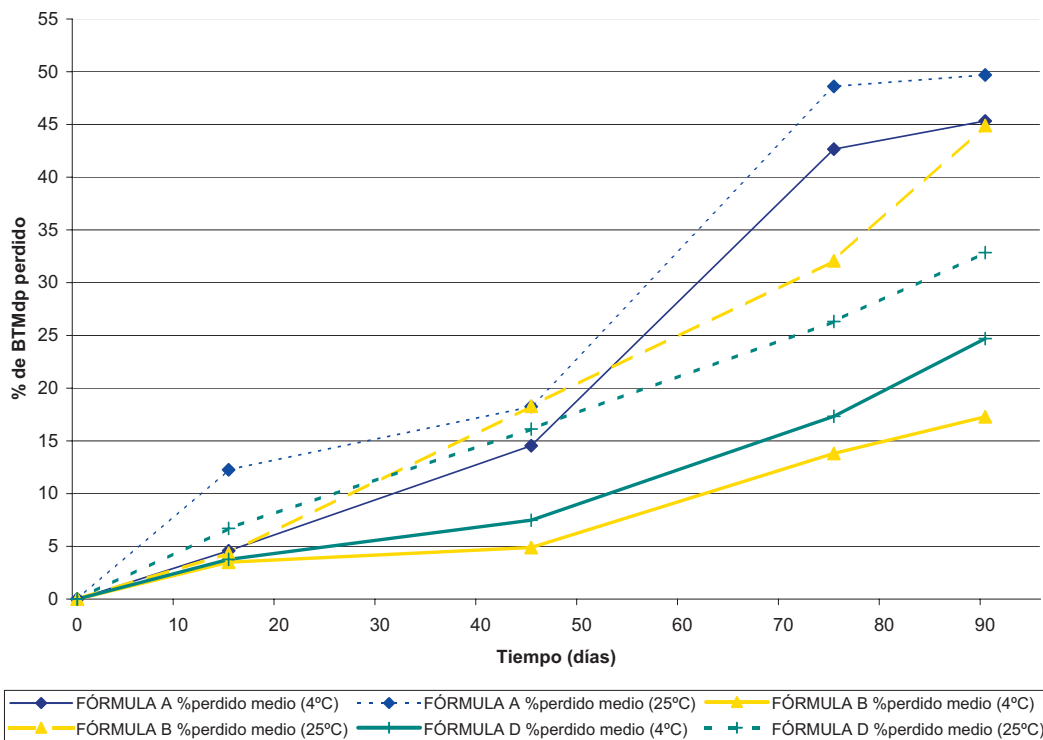
		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula B	0	3,496	4,886	13,809	17,285
	Fórmula D	0	3,766	7,474	17,324	24,701
	Diferencia	0	-0,270	-2,588	-3,515	*-7,416
25 °C	Fórmula B	0	4,345	18,289	32,079	44,903
	Fórmula D	0	6,702	16,126	26,324	32,851
	Diferencia	0	-2,356	2,163	*5,755	*12,051

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza = 95%).

La comparación de la cuantificación de las pérdidas de fármaco perdido por los liposomas de las fórmulas B y D a lo largo de 3 meses y conservadas a 4-8°C pone de manifiesto una estabilidad relativamente mayor en los liposomas de la fórmula B que carecen de Phenonip. Las diferencias entre ambas fórmulas solo tienen significación estadística al final del estudio (Tabla 4. 68).

El comportamiento detectado en el caso de la conservación de las citadas fórmulas a temperatura ambiente (25-30°C) pone de relieve que la protección del conservador empleado se manifiesta a partir de los 45 días siendo significativa la diferencia entre las fórmulas comparadas desde los 75 días.

La Gráfica 4. 25 permite comparar la estabilidad de esta fórmula en distintas condiciones de conservación y frente al tiempo así como frente a la estabilidad mostrada por las fórmulas A y B y avala las conclusiones obtenidas anteriormente.



Gráfica 4. 25. Comparación de la estabilidad de la fórmula D.

7. 1. 5. Fórmula E.

Los resultados obtenidos con esta fórmula de los liposomas, elaborada con fosfatidilcolina, colesterol, dipropionato de betametasona ácido ascórbico y conservador, se analizaron estadísticamente (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo del tiempo. Los resultados se analizaron para cada una de las temperaturas de conservación y también para un determinado tiempo comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

Las tablas 4. 69 y 4. 70 recopilan los porcentajes captados y perdidos por estos liposomas a lo largo del estudio.

Tabla 4. 69. Porcentajes captados por los liposomas de la fórmula E (porcentaje medio \pm desviación estándar).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	66,492 \pm 7,674	65,430 \pm 7,568	58,439 \pm 7,451	47,121 \pm 7,792	38,508 \pm 7,550
25°C	66,492 \pm 7,674	62,919 \pm 7,678	52,297 \pm 7,473	39,048 \pm 7,648	21,126 \pm 7,296

Tabla 4. 70. Porcentajes de principio activo perdido por los liposomas de la fórmula E (valor medio).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	1,062	8,054	19,371	27,985
25°C	0	3,573	14,195	27,444	45,366

El porcentaje de principio activo captado inicialmente por los liposomas fue elevado (66,492%) y similar al evaluado para la fórmula más simple (A).

Para contrastar los datos obtenidos experimentalmente en el estudio de estabilidad de esta formulación se han agrupado en la Tabla 4. 71 los porcentajes de corticoide perdidos durante cada periodo de tiempo.

Tabla 4. 71. Porcentaje perdido de BTMdp en cada periodo de tiempo (n=12).

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	1,062	*6,991	*11,317	*8,614
25°C	3,573	*10,622	*13,249	*17,922

En las muestras conservadas a 4-8°C no se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (66,492%) y tras 15 días (65,430%), lo cual representó una pérdida de fármaco captado del 1,062% (Tabla 4. 71).

Posteriormente, en el periodo de tiempo entre 15 y 45 días se detectaron diferencias significativas y la pérdida de principio activo encapsulado en los liposomas a lo largo de esos 30 días representó un 6,991%. Entre los 45 y 75 días la pérdida de fármaco ascendió al 11,317% del retenido a los 45 días, representando una nueva disminución significativa en el principio activo captado por los liposomas (Tabla 4. 71). Por último, en los últimos 15 días del estudio, entre los 75 y 90 días, se produjo la liberación de un 8,614% del dipropionato de betametasona encapsulado, estadísticamente significativa con respecto al porcentaje retenido a los 75 días (Tabla 4. 71). El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue el 27,984% del principio activo captado.

El análisis de los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) puso de manifiesto diferencias significativas en los mismos periodos que en el caso anterior (conservación de la muestra en condiciones de refrigeración), si bien las pérdidas de fármaco encapsulado se incrementaron desde el inicio del estudio de estabilidad hasta la finalización del mismo (Tabla 4. 71).

El porcentaje perdido al final de este ensayo de estabilidad realizado con muestras conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) fue del 45,366%, lo cual revela nuevamente la influencia de la temperatura de conservación de las muestras sobre la estabilidad de los liposomas.

En la Tabla 4. 72 se exponen las diferencias determinadas entre los porcentajes de dipropionato de betametasona medios retenidos por los liposomas de la fórmula E según la temperatura.

Tabla 4. 72. Diferencia entre los % medios de corticoide retenidos según la temperatura de conservación.

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	2,511	*6,142	*8,073	*17,382

Al analizar los resultados obtenidos para el mismo tiempo a las dos temperaturas de conservación, el único periodo en que no se determinó la existencia de diferencia significativa debida a la temperatura fue el primer periodo, a los 15 días de iniciar el estudio de estabilidad. Durante el resto del ensayo se detectaron diferencias significativas en todos los tiempos que se evaluaron (Tabla 4. 72). Las pérdidas producidas a lo largo

del tiempo de estudio mostraron el efecto beneficioso de la conservación frío ya que las diferencias se hacen mayores con el paso del tiempo.

A continuación se han recopilado en la tabla 4. 73 los resultados obtenidos para la pérdida de corticoide por las fórmulas A y E así como la diferencia entre ambos porcentajes a 4-8°C y a 25-30°C.

Tabla 4. 73. Comparación de las pérdidas de principio activo captado por las fórmulas A y E.

		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula A	0	4,577	14,543	42,662	45,327
	Fórmula E	0	1,062	8,054	19,371	27,985
	Diferencia	0	3,515	*6,489	*23,291	*17,342
25 °C	Fórmula A	0	12,264	18,251	48,611	49,692
	Fórmula E	0	3,573	14,195	27,444	45,366
	Diferencia	0	*8,691	*4,056	*21,167	*4,326

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza = 95%).

Cuando se comparó la estabilidad de esta fórmula conservada en frío con los resultados de estabilidad de la fórmula A en iguales condiciones de almacenamiento, se detectaron diferencias significativas a todos los tiempos muestreados excepto los primeros 15 días del estudio con un 6,489%, 23,291% y 17,343% respectivamente para cada tiempo. Esto puede deberse al efecto conjunto ejercido por el colesterol sobre la fluidez de las membranas liposomiales (Yatvin y Lelkes., 1982), el antioxidante sobre la estabilidad de los fosfolípidos y el conservador.

Durante la primera mitad del estudio de estabilidad de las muestras conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) se observa menor influencia de la composición de las vesículas sobre la pérdida de principio activo por los mismos. El efecto protector de los componentes que diferencian una y otra fórmula se observa desde el inicio del estudio, alcanzándose la máxima diferencia a los 75 días del estudio (Tabla 4. 73).

La tabla 4. 74 resume los resultados de pérdidas de fármaco obtenidos para las fórmulas B y E y las diferencias entre ambos porcentajes a las distintas condiciones de conservación.

Tabla 4. 74. Comparación de las pérdidas de principio activo captado por las fórmulas B y E.

		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula B	0	3,496	4,886	13,809	17,285
	Fórmula E	0	1,062	8,054	19,371	27,985
	Diferencia	0	2,434	-3,168	*-5,562	*-10,700
25 °C	Fórmula B	0	4,345	18,289	32,079	44,903
	Fórmula E	0	3,573	14,195	27,444	45,366
	Diferencia	0	0,772	*4,094	*4,635	-0,464

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza: 0,95%).

El análisis estadístico comparado de las pérdidas de corticoide en las fórmulas E y B (conservadas a 4-8°C) reflejó una estabilidad significativamente mejor para las muestras de la fórmula B, en cuya composición solo intervienen los fosfolípidos de tipo éster, el colesterol y el fármaco. La cuantificación de las pérdidas del fármaco retenido fueron mayores en la fórmula E, complementada con un antioxidante (ácido

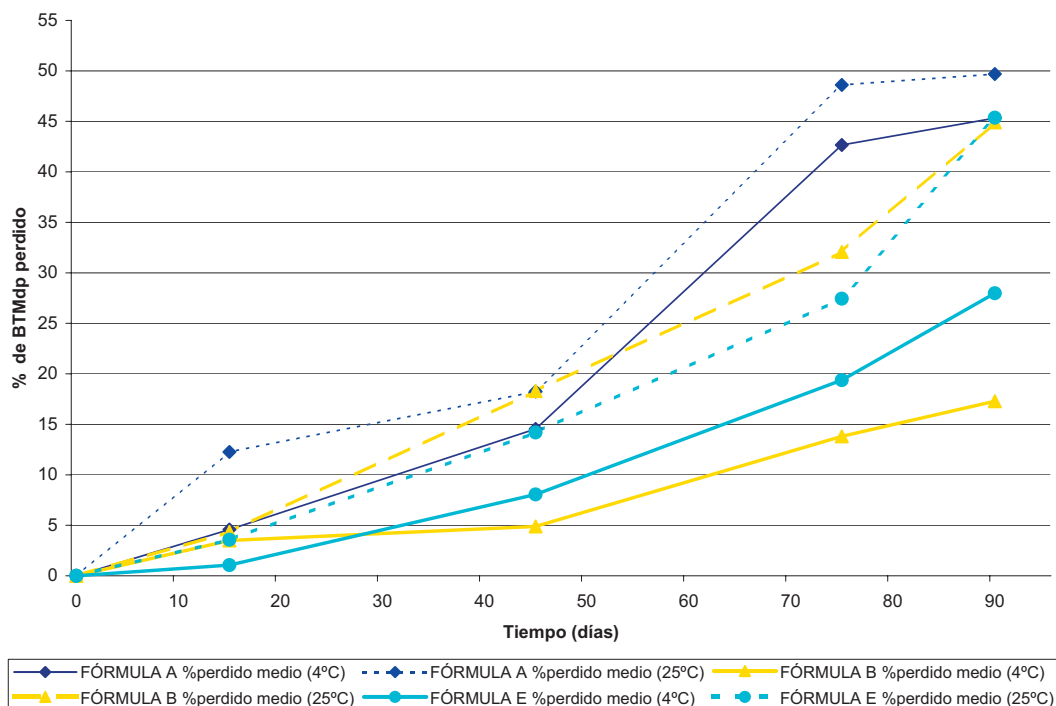
ascórbico) y un conservador, presentando diferencias significativas a partir de los 75 días (Tabla 4. 74).

Cuando se compararon los porcentajes de principio activo perdidos por las mismas formulaciones conservadas a 25-30°C se observaron diferencias estadísticamente significativas desde los 45 días con porcentajes de pérdida menores en los liposomas de la formulación más compleja (Tabla 4. 74).

Esto pone de manifiesto que la actividad protectora de los diferentes componentes de una y otra fórmula es dependiente de la temperatura a la cual se conserven las vesículas tras su elaboración. En este aspecto suponen una ventaja las buenas propiedades de los liposomas de la fórmula B (refrigerada) ya que aportaría una buena estabilidad con una formulación más sencilla en la cual se reduce el riesgo de interacciones entre los componentes.

Si fuera necesario el almacenamiento de las preparaciones a temperatura ambiente sería más conveniente la selección de la fórmula E por presentar mejores resultados entre los 15 y 75 días del estudio de estabilidad realizado.

En la Gráfica 4. 26 se comparan los resultados de estabilidad de esta formulación (conservada a 4-8°C y 25-30°C) con las de las fórmulas A y B, permitiendo presentar las mismas conclusiones anteriores.



Gráfica 4. 26. Comparación de las estabildades de las fórmulas A, B y E.

7. 1. 6. Fórmula F.

Tras la realización de los correspondientes análisis estadísticos (ANOVA) se pueden estudiar los resultados obtenidos de igual modo que en las fórmulas anteriores.

Esta fórmula incluye en su composición el fosfolípido éster, colesterol, el fármaco, un conservador, el Phenonip[®] y dos antioxidantes, las vitaminas C y E cuya actividad fue comentada en el Capítulo III de esta memoria.

Las tablas 4. 75 y 4. 76 resumen los porcentajes captados y perdidos por los liposomas de la fórmula F a lo largo de todo el estudio de estabilidad desarrollado durante 3 meses con valoraciones del fármaco retenido a los 0, 15, 45 75 y 90 días tras la elaboración de las preparaciones.

Tabla 4. 75. Porcentajes captados por los liposomas de la fórmula F (valor medio \pm desviación estándar) (n=12).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	42,619 \pm 7,688	38,795 \pm 7,739	36,607 \pm 7,402	31,703 \pm 7,516	24,347 \pm 7,493
25°C	42,619 \pm 7,688	38,447 \pm 7,507	32,654 \pm 7,803	25,870 \pm 7,555	18,231 \pm 7,412

Tabla 4. 76. Porcentajes de dipropionato de betametasona perdido por los liposomas de la fórmula F (valor medio).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	3,824	6,013	10,916	18,272
25°C	0	4,172	9,966	16,749	24,388

Al inicio, la captación de principio activo por los liposomas de la fórmula F fue del 42,619%, la menor captación obtenida en las fórmulas estudiadas (Tabla 4. 69).

A continuación en la tabla 4. 77 se exponen los porcentajes perdidos medios del corticoide encapsulado durante cada periodo de tiempo.

Tabla 4. 77. Porcentaje medio de BTMdp perdido en cada periodo de tiempo.

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	3,824	2,189	4,904	*7,355
25°C	4,172	5,794	*6,783	*7,639

Las muestras conservadas en frío (4-8°C) presentaron diferencias estadísticamente significativas entre 15 y 75 días (7,093%) y los 75 y 90 días (7,355%). No se establecieron diferencias entre los 0 y 45 días y en el mes comprendido entre los 45 y 75 días (Tabla 4. 77). A la vista de estos resultados podemos establecer un periodo de relativa estabilidad durante los primeros 75 días del estudio, en el cual la pérdida es 10,916% del principio activo encapsulado, lo cual representa el mejor resultado obtenido hasta el momento para este periodo de tiempo tan extenso.

La pérdida total de dipropionato de betametasona alcanzó al cabo de los 3 meses de estudio el 18,272% (Tabla 4. 76).

Al conservar las muestras a temperatura ambiente (25-30°C) se determinó la existencia de diferencias significativas en las pérdidas de corticoide entre cada periodo de tiempo estudiado exceptuando el periodo inicial entre 0 y 45 días (Tabla 4. 77). Se pone de manifiesto de este modo que la estabilidad es menor en estas muestras que en las conservadas a temperaturas inferiores (4-8°C), sin que la mejora de la formulación pueda frenar la pérdida de estabilidad de las vesículas al conservar las muestras a temperatura ambiente. El porcentaje total perdido al final del estudio desarrollado fue del 24,388% del fármaco captado al inicio.

La tabla siguiente resume las diferencias en el porcentaje medio de fármaco retenido debidas a la temperatura de conservación de los liposomas de la fórmula F.

Tabla 4. 78. Diferencia del % retenido de BTMdp según la temperatura.

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	0,348	*3,953	*5,832	*6,116

Al analizar los resultados obtenidos para el mismo tiempo a las dos temperaturas de conservación, el único periodo en que no se determinó la existencia de diferencia significativa debida a la temperatura fue el primer periodo, a los 15 días de iniciar el estudio de estabilidad. Durante el resto del ensayo se detectaron diferencias significativas en todos los tiempos que se evaluaron (Tabla 4.78). Las pérdidas producidas a lo largo del tiempo de estudio mostraron el efecto beneficioso de la conservación frío coincidiendo con los resultados obtenidos anteriormente.

En la tabla 4. 79 se han reunido los resultados de pérdidas de fármaco obtenidos para las fórmulas A y F y las diferencias entre ambos porcentajes a las distintas condiciones de conservación.

Tabla 4. 79. Comparación de las pérdidas de principio activo captado por las fórmulas A y F.

Porcentaje de BTMdp perdido						
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula A	0	4,577	14,543	42,662	45,327
	Fórmula F	0	3,824	6,013	10,916	18,272
	Diferencia	0	0,753	*8,530	*31,746	*27,110
25 °C	Fórmula A	0	12,264	18,251	48,611	49,692
	Fórmula F	0	4,172	9,966	16,749	24,388
	Diferencia	0	*8,092	*8,285	*31,862	*25,304

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza = 95%).

Al comparar los resultados de estabilidad obtenidos para la fórmula A (elaborada únicamente con fosfatidilcolina y principio activo) con los hallados para la fórmula F se ha confirmado la mayor estabilidad de las vesículas obtenidas con la formulación F con respecto a los liposomas formados exclusivamente con el fosfolípido y el fármaco. En este caso cabe señalar que, al iniciarse el estudio de estabilidad, a los 15 días la diferencia entre las dos fórmulas conservadas en frío fue mínima. Un mes después se establecieron diferencias significativas a favor de la fórmula F que se mantuvieron hasta la finalización del estudio de forma notable (Tabla 4. 79).

La conservación a temperatura ambiente de ambos tipos de liposomas permitió observar la mayor estabilidad de la fórmula F durante todo el tiempo objeto de estudio. Las diferencias entre los porcentajes de fármaco perdido fueron significativas desde los 15 días (Tabla 4. 79).

La tabla 4. 80 resume los resultados de pérdidas de fármaco obtenidos para las fórmulas B y F y las diferencias entre ambos porcentajes a las distintas condiciones de conservación.

Tabla 4. 80. Comparación de las pérdidas de principio activo captado por las fórmulas B y F.

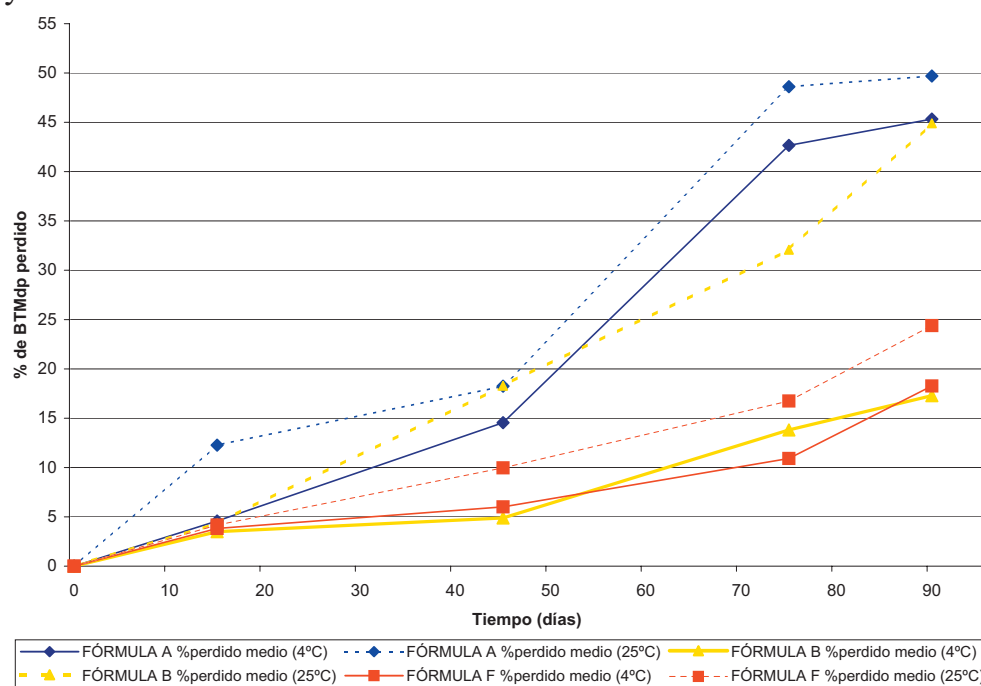
		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula B	0	3,496	4,886	13,809	17,285
	Fórmula F	0	3,824	6,013	10,916	18,272
	Diferencia	0	0,328	-1,127	2,893	-0,987
25 °C	Fórmula B	0	4,345	18,289	32,079	44,903
	Fórmula F	0	4,172	9,966	16,749	24,388
	Diferencia	0	0,174	*8,324	*15,330	*20,514

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza = 95%).

La comparación de la cuantificación de las pérdidas de fármaco perdido por los liposomas de las fórmulas B y F a lo largo de 3 meses y conservadas a 4-8°C pone de manifiesto una estabilidad similar en los liposomas de las fórmulas B y F. Las diferencias entre ambas fórmulas no tienen significación estadística durante el periodo del estudio (Tabla 4. 80).

El comportamiento detectado en el caso de la conservación de las citadas fórmulas a temperatura ambiente (25-30°C) pone de relieve la protección sinérgica que ejercen los antioxidantes y el conservador a partir de los 15 días siendo significativa y creciente la diferencia entre las fórmulas comparadas desde los 45 días (Tabla 4. 80).

A partir de la Gráfica 4. 27 podemos observar los resultados obtenidos para esta formulación y compararlos con la estabilidad de las fórmulas A y B.



Gráfica 4. 27. Comparación de las estabilidades de las fórmulas A, B y F.

7. 1. 7. Fórmula G.

Esta última fórmula de los liposomas fue elaborada con fosfatidilcolina, colesterol, fármaco y ácido ascórbico y acetato de α -tocoferol como antioxidantes. Los resultados experimentales obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo de los 3 meses del estudio de estabilidad. Los resultados se analizaron para ambas temperaturas de conservación y también para un determinado tiempo comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

Las tablas 4. 81 y 4. 82 resumen los porcentajes captados y perdidos por estos liposomas de la fórmula G a lo largo del periodo de estudio.

Tabla 4. 81. Porcentajes captados por los liposomas de la fórmula G (porcentaje medio \pm desviación estándar) (n=12).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	79,992 \pm 7,676	76,631 \pm 7,258	72,035 \pm 7,947	70,953 \pm 7,346	63,074 \pm 7,346
25°C	79,992 \pm 7,676	72,653 \pm 7,673	70,219 \pm 7,534	63,924 \pm 7,728	54,653 \pm 7,728

Tabla 4. 82. Porcentajes de principio activo perdidos por los liposomas de la fórmula G (valor medio).

	0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4°C	0	3,361	6,605	9,038	16,918
25°C	0	7,339	9,772	16,068	25,339

El porcentaje de principio activo captado inicialmente por los liposomas fue el más elevado de los obtenidos en el presente estudio de encapsulación en liposomas (79,992%) (Tabla 4. 81).

A continuación, en la siguiente tabla se reúnen los porcentajes perdidos medios del principio activo captado por los liposomas en cada periodo de tiempo del estudio de estabilidad (Tabla 4. 83).

Tabla 4. 83. Porcentajes perdidos medios de BTMdp en cada periodo de tiempo.

	0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	3,361	4,596	1,082	*7,880
25°C	*7,339	2,433	*6,296	*9,270

Al conservar las muestras a 4-8°C se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (79,992%) y tras 45 días (72,035%), que representó una pérdida de fármaco captado del 7,957%. También se produjo una pérdida estadísticamente significativa en el periodo de tiempo comprendido entre los 75 y 90 días del estudio, cuantificada en el 7,880% del corticoide retenido (Tabla 4. 83). El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 16,918% del principio activo captado inicialmente (Tabla 4. 82).

El análisis de los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) (Tabla 4. 83) puso de manifiesto diferencias significativas en los periodos comprendidos entre 0 y 15 días, 45 y 75 días y por último 75 y 90 días, al cual corresponde la mayor

pérdida de fármaco encapsulado. El porcentaje perdido al final de este ensayo de estabilidad fue del 25,339%, lo cual revela la influencia de la temperatura de conservación de las muestras sobre la estabilidad de los liposomas.

La Tabla 4. 84 recopila las diferencias entre los porcentajes medios de fármaco retenido por los liposomas conservados a las distintas temperaturas empleadas para el estudio de la estabilidad.

Tabla 4. 84. Diferencia entre los porcentajes de BTMdp retenido según la temperatura.

Tiempo	15 días	45 días	75 días	90 días
Diferencia %	*4,780	*9,125	*16,281	*10,024

Con los resultados de la fórmula G se observaron diferencias significativas en el porcentaje de fármaco retenido en todos los casos entre ambas condiciones de conservación (Tabla 4. 84), aunque en este caso esta diferencia es considerablemente inferior durante todo el estudio como reflejan los datos obtenidos respecto al resto de formulaciones a excepción de la fórmula F.

Al igual que en los casos anteriores se han comparado los datos aportados por la fórmula base (A) y la G. A continuación se han recopilado en la tabla 4. 85 los resultados obtenidos para la pérdida de corticoide por ambas fórmulas así como la diferencia entre ambos porcentajes a 4-8°C y a 25-30°C.

Tabla 4. 85. Comparación de la estabilidad de las fórmulas A y G.

Porcentaje de BTMdp perdido						
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula A	0	4,577	14,543	42,662	45,327
	Fórmula G	0	3,361	6,605	9,038	16,918
	Diferencia	0	1,217	*7,938	*33,624	*28,409
25 °C	Fórmula A	0	12,264	18,251	48,611	49,692
	Fórmula G	0	7,339	9,772	16,068	25,339
	Diferencia	0	*4,925	*8,478	*32,542	*24,354

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza: 0,95%).

La comparación entre las estabilidades observadas para la fórmula A en iguales condiciones de almacenamiento (4-8°C) sólo reveló diferencias significativas desde los 45 días del estudio las cuales se han reunido en la tabla 4. 85. La pérdida del dipropionato de betametasona retenido por los liposomas inicialmente pudo reducirse gracias a la composición de esta formulación de liposomas, por acción combinada del colesterol y antioxidantes.

Al evaluar comparativamente la estabilidad de los liposomas de ambas fórmulas a 25°C se determinó un efecto protector del colesterol y del ácido ascórbico y la vitamina E (acetato) a partir de los 15 días del estudio de estabilidad. Sin embargo, este efecto protector se potencia en el periodo central del estudio, entre los 45 y 75 días de la elaboración de las vesículas (Tabla 4. 85).

Igualmente, al comparar las fórmulas B y G se han obtenido una serie de resultados resumidos en la tabla 4. 86.

Tabla 4. 86. Comparación de la estabilidad de las fórmulas B y G.

		Porcentaje de BTMdp perdido				
		0 días	15 días	45 días	75 días	90 días
4 °C	Fórmula B	0	3,496	4,886	13,809	17,285
	Fórmula G	0	3,361	6,605	9,038	16,918
	Diferencia	0	0,135	-1,719	*4,770	0,367
25 °C	Fórmula B	0	4,345	18,289	32,079	44,903
	Fórmula G	0	7,339	9,772	16,068	25,339
	Diferencia	0	-2,994	*8,517	*16,010	*19,564

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza: 0,95%).

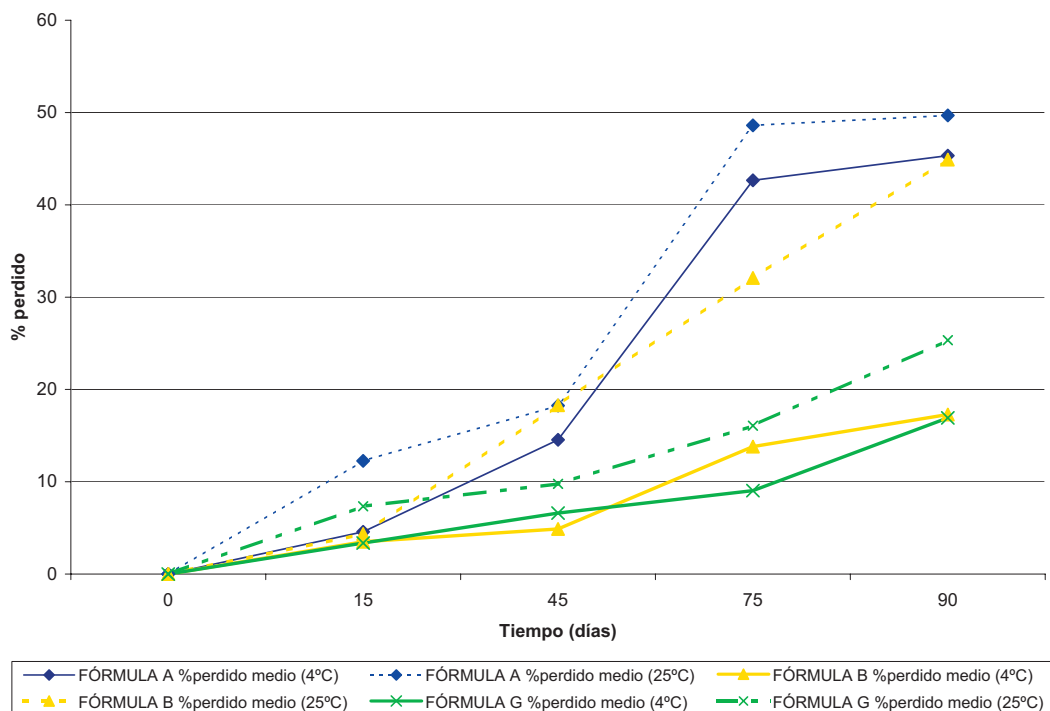
Cuando se comparó la estabilidad de esta fórmula conservada en frío (4-8°C) con la de la fórmula B en iguales condiciones de almacenamiento, se detectó diferencia significativa únicamente a los 75 días del estudio de estabilidad (Tabla 4. 86). Se puede deducir de estos resultados que el efecto protector desarrollado por la incorporación del colesterol a la formulación de los liposomas confiere una adecuada fluidez a las membranas mejorando la estabilidad de los liposomas, y la asociación del colesterol y los restantes componentes de la formulación no mejoran sensiblemente la estabilidad de las vesículas.

Por tanto, la composición de la fórmula G no aporta un beneficio notable a la estabilidad y en tal caso sería preferible la fórmula B puesto que supondría una menor probabilidad de interacción entre los componentes, además de una mayor economía con vistas a su utilización posterior, al incluir menor número de componentes.

A 25°C se determinaron diferencias significativas desde los 15 días (Tabla 4. 86), caracterizadas por una menor pérdida del corticoide

encapsulado en los liposomas de la fórmula B. A partir de las determinaciones de fármaco libre realizadas a los 45 días del estudio las pérdidas del principio activo encapsulado fueron superiores en la fórmula B que en la fórmula G. Es en este aspecto en el que se presenta la mayor ventaja de esta fórmula de los liposomas, al igual que en el caso de la fórmula F, la temperatura de conservación influye muy levemente en la estabilidad de las vesículas.

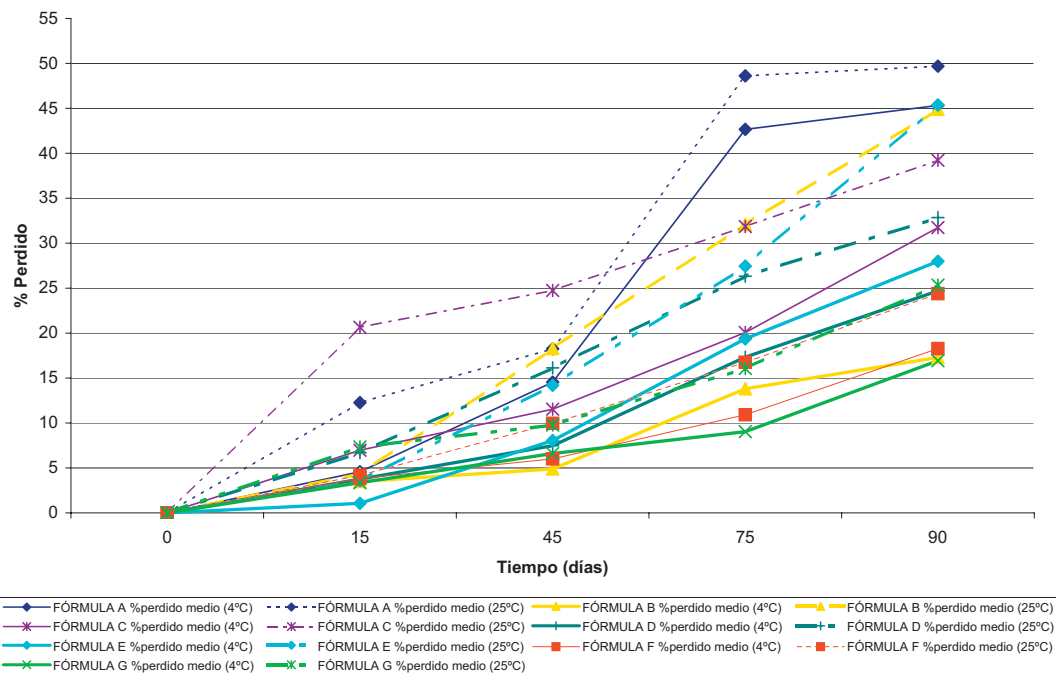
La Gráfica 4. 28 permite compara de una forma rápida la estabilidad de esta formulación elaborada con fosfolípidos, colesterol, principio activo y los dos antioxidantes a las dos temperaturas de conservación. Asimismo permite la comparación de la estabilidad para un determinado tiempo entre las dos condiciones de conservación. Por último también facilita la comparación entre la estabilidad determinada para la fórmula G respecto a las dos formulaciones más sencillas: las fórmulas A y B. A partir de la observación detenida de la misma se obtienen conclusiones idénticas a las anteriores: la estabilidad de la fórmula G esta menos influida por la temperatura de conservación que las fórmulas A y B mientras que la conservación de las fórmulas B y G en frío revela estabilidades similares en los dos tipos de vesículas, principalmente hacia el final del estudio.



Gráfica 4. 28. Comparación de las estabildades de las fórmulas A, B y G.

Para finalizar este apartado sobre la estabilidad de los liposomas elaborados con lípidos éster se incluye un gráfica comparativa de las estabildades halladas para cada una de las fórmulas elaboradas y a las dos temperaturas de conservación (Gráfica 4. 29) que comentaremos a continuación para poder concluir con qué formulación se obtienen mejores resultados y sería, por tanto, la más idónea para próximos trabajos.

En la Gráfica 4. 29 destaca la baja estabilidad de los liposomas de la fórmula A que presentó las mayores pérdidas del fármaco retenido independientemente de las condiciones de conservación de las muestras.



Gráfica 4. 29. Comparación general de la estabilidad de los liposomas.

La adición de colesterol mejora notablemente la estabilidad de las vesículas cuando se conservan refrigeradas, mientras que a temperatura ambiente la pérdida al final del estudio es similar a la sufrida por los liposomas carentes de colesterol y conservados en frío. Cuando la fórmula B es conservada en frío su estabilidad es semejante a la observada en las vesículas de las fórmulas más complejas (F y G) conservadas bajo condiciones de refrigeración.

Se pone de manifiesto en la citada gráfica que la fórmula C mejora las propiedades de la B cuando se conserva a temperatura ambiente mientras que al conservarla en frío la estabilidad es peor que en los liposomas de la fórmula B.

Se puede observar que la diferencia en la estabilidad de la fórmula D bajo las dos condiciones diferentes de conservación no es muy elevada, lo cual indica menor influencia de la temperatura en estas vesículas.

Las muestras de la fórmula E conservada a temperatura ambiente destacan por la pérdida de estabilidad que sufren bruscamente a partir de los 45 días. La conservación bajo condiciones de refrigeración reduce en gran medida esta inestabilización de las vesículas.

Las fórmulas F y G siguen patrones muy similares entre sí tanto cuando se conservan en frío como a temperatura ambiente. Además en frío su estabilidad es equiparable a la de las vesículas de la fórmula B.

Como conclusión podría seleccionarse la fórmula B (elaborada con fosfolípidos y colesterol) conservada en frío por presentar una buena estabilidad con una de las formulaciones más sencillas. Por otra parte, considerando también el porcentaje retenido inicialmente por los liposomas, parece interesante el rendimiento presentado por la fórmula G (compuesta por fosfolípido, colesterol, ácido ascórbico y acetato de α -tocoferol) con una captación recién elaborada del 79,992%, frente al 59,308% evaluado en la fórmulas B. A este hecho se une una buena estabilidad y retención del principio activo captado durante la elaboración, tanto a temperatura ambiente como a temperatura de refrigeración.

7. 2. Caracterización mediante microscopía electrónica de transmisión.

Para estudiar la evolución de las distintas formulaciones liposomiales elaboradas con fosfatidilcolina se realizó la caracterización de las muestras por microscopía electrónica de transmisión a los 15, 45, 75 y 90 días de la elaboración de las citadas formulaciones. De este modo se pudieron analizar los cambios en el tamaño y morfología de las vesículas lipídicas formadas.

Los resultados obtenidos mediante la visualización por microscopía electrónica de transmisión, tras la tinción negativa de las muestras, han sido muy satisfactorios y han permitido realizar un análisis del tamaño de partícula de los liposomas éster portadores de dipropionato de betametasona, así como su estructura y morfología. El número de medidas realizadas por formulación, tiempo y temperatura ha sido, como en los casos anteriores, de 100. La siguiente tabla incluye los diámetros medios (expresados en μm) y sus correspondientes desviaciones estándar (Tabla 4. 87).

Tabla 4. 81. Diámetros medios y desviaciones estándar de los liposomas de las distintas formulaciones en función del tiempo.

Formulación	A		B	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	0,534±0,390		0,553±0,352	
15 días	0,393±0,290	0,469±0,502	0,644±0,501	0,293±0,239
45 días	0,262±0,310	0,299±0,180	0,182±0,115	0,224±0,132
75 días	0,595±0,349	0,625±0,536	0,646±0,388	0,302±0,175
90 días	0,517±0,392	0,453±0,413	0,534±0,318	0,613±0,497

Tabla 4. 81. Diámetros medios y desviaciones estándar de los liposomas de las distintas formulaciones en función del tiempo.

Formulación	C		D	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	0,505±0,352		0,635±0,421	
15 días	0,987±0,745	0,590±0,507	0,394±0,478	0,394±0,478
45 días	0,450±0,242	0,302±0,230	0,343±0,130	0,343±0,130
75 días	0,683±0,320	0,684±0,372	0,451±0,225	0,451±0,225
90 días	0,843±0,617	0,899±0,711	0,491±0,260	0,491±0,260

Formulación	E		F	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0 días	0,653±0,393		0,333±0,209	
15 días	0,881±0,539	0,705±0,416	0,901±0,407	0,523±0,299
45 días	0,792±0,371	0,813±0,410	0,370±0,188	1,05±0,468
75 días	0,575±0,302	0,343±0,230	0,458±0,261	0,890±0,371
90 días	0,673±0,493	0,841±0,557	0,827±0,441	0,393±0,225

Formulación	G	
	4°C	25°C
0 días	0,650±0,489	
15 días	0,467±0,270	0,557±0,323
45 días	0,885±0,596	0,891±0,479
75 días	0,569±0,289	0,818±0,465
90 días	0,545±0,373	0,499±0,327

7.2.1. Fórmula A.

Como se comentó en el apartado 5 de este Capítulo, la caracterización inicial de estas vesículas permitió observar la estructura multilaminar y la ausencia de agregación de los liposomas así como su morfología y tamaño de partícula.

A los 15 días de la elaboración, la caracterización de las muestras conservadas a 4-8°C permitió determinar el tamaño de partícula de los liposomas ($0,393\pm 0,290$), observándose una disminución en el mismo respecto a la obtenida en la caracterización realizada en las 24 horas posteriores a la elaboración ($0,534\pm 0,390$). Respecto a la estructura, se reiteró la multilaminaridad de los liposomas aunque las membranas de los mismos resultaron más irregulares y rugosas que al inicio.

Estas mismas muestras se caracterizaron un mes después observándose una nueva disminución del tamaño de partícula medio y un incremento en la heterogeneidad del mismo, cuantificada a partir de la desviación estándar ($0,262\pm 0,310$). Estructuralmente se puso de manifiesto una alteración de las muestras cada vez mayor, con vesículas que tendían a agregarse y con las membranas irregulares como ya se había observado tras 15 días de la elaboración.

A los 75 días los liposomas mostraban ya un alto grado de fusión, aspecto confirmado al estudiar el diámetro medio de las vesículas que se situó en $0,595\pm 0,349$ μm . Morfológicamente se observó que las membranas eran menos rugosas que anteriormente en algunas vesículas mientras que otras membranas mantienen la rugosidad.

En la última caracterización de estas muestras, realizada 3 meses después de la elaboración de las muestras, se visualizaron algunas vesículas de gran tamaño y con menor agregación que en la caracterización anterior. Este aspecto aparecía en contraposición con la observación de otras vesículas de menor tamaño de partícula y bordes mal definidos debido a la agregación con otras vesículas. En este momento del estudio el diámetro medio ($0,517\pm 0,392$) fue próximo al inicial.

Las modificaciones en el tamaño y la estructura de estas vesículas durante los 3 meses de duración del estudio de estabilidad son indicativas de las alteraciones sufridas por los liposomas pasando por una fragmentación de los mismos y posteriores fenómenos de agregación y fusión, conducentes a la formación de vesículas lipídicas de mayor tamaño. Las figuras 4. 58-4. 61 reflejan los cambios en las características estructurales y morfológicas de las vesículas durante el tiempo de estudio.

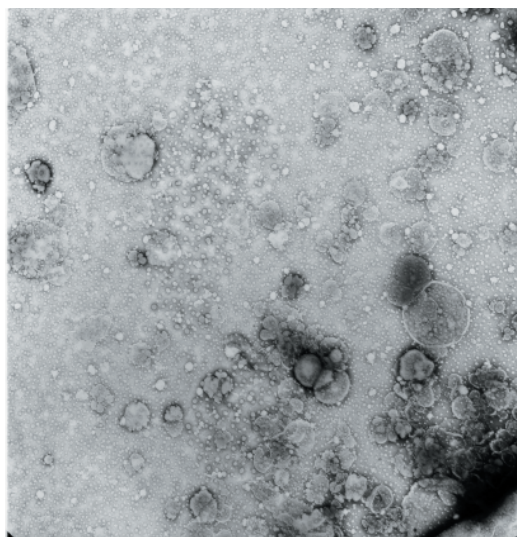


Figura 4. 58. Microfotografía de los liposomas de la fórmula A (15 días, 4-8°C).

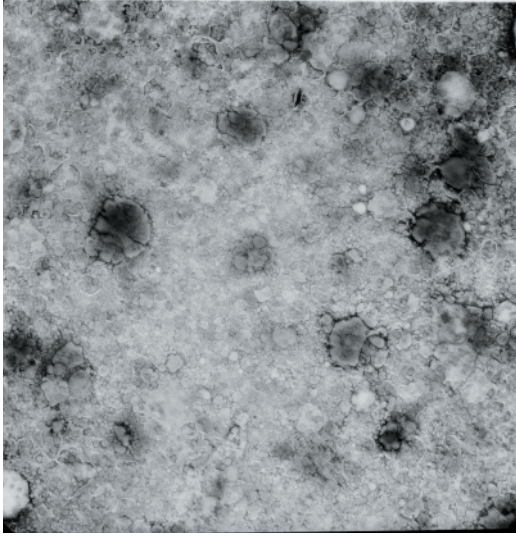


Figura 4. 59. Microfotografía de los liposomas de la fórmula A (45 días, 4-8°C).

Figura 4. 60. Microfotografía de los liposomas de la fórmula A (75 días, 4-8°C).

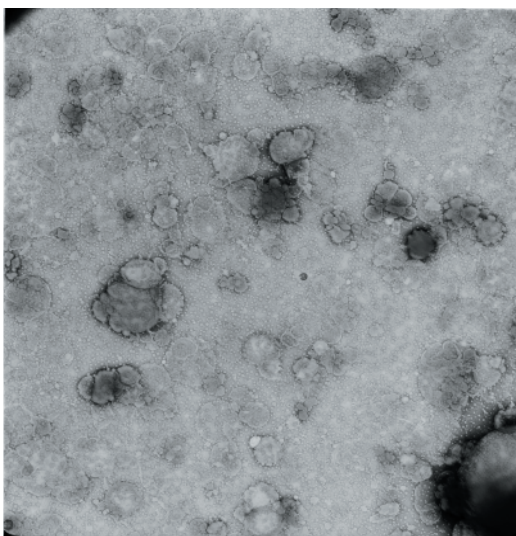
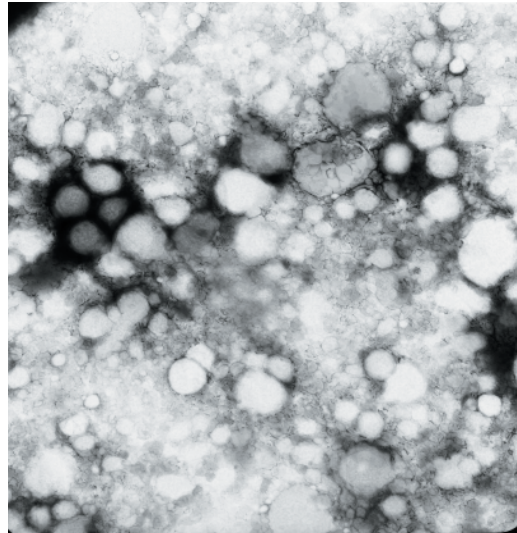


Figura 4. 61. Microfotografía de los liposomas de la fórmula A (90 días, 4-8°C).

Cuando las muestras correspondientes a esta formulación se conservaron a temperatura ambiente (25-30°C), el tamaño de partícula de estos liposomas portadores dipropionato de betametasona se modificó levemente tras los primeros 15 días de almacenamiento. Sí se detectó un mayor incremento de la dispersión del diámetro de estos vectores de fármacos ($0,469\pm 0,502$) y una mayor heterogeneidad en el tamaño de los mismos, que quedó reflejada en las microfotografías, donde se observaron vesículas de tamaños muy dispares. La microfotografía de la figura 4. 62 corresponde a una imagen tomada a 20000X en la cual se observan liposomas representativos de la población de menor tamaño. Sus propiedades (uniformidad, agregación, morfología y aspecto de las paredes lipídicas) son mejores que las de los liposomas de mayor tamaño.

La caracterización de estas muestras realizada pasados 45 días tras su elaboración permitió estudiar el tamaño de partícula de estos liposomas, poniendo de manifiesto una disminución en el diámetro medio de las vesículas ocasionado posiblemente por la ruptura de las mismas ($0,299\pm 0,180$). Se observó cierta agregación de las vesículas, corroborando el resultado de la caracterización realizada a los 15 días, cuyas estructuras reflejaron mayores irregularidades. También se observó la fusión de algunas vesículas de menor diámetro con otras de mayor tamaño de partícula. Entre los liposomas menores, la mayoría de los mismos permanecieron libres. No obstante la alteración de estas muestras conservadas a 25-30°C es mayor que en aquellas mantenidas en frío.

Las microfotografías realizadas a las muestras tras su almacenamiento durante 75 días permitieron caracterizar los liposomas desde un punto de vista morfológico y estructural así como analizar las posibles modificaciones en el tamaño de partícula. Las vesículas sufrieron un considerable aumento de su tamaño de partícula ($0,625\pm 0,536$) respecto al medido a los 45 días. Morfológicamente se detectó una mayor rugosidad en la membrana de los liposomas sin modificación en la estructura multilaminar con alternancia de las bicapas lipídicas y los compartimentos acuosos.

A los 90 días se puso de manifiesto, mediante la visualización de las muestras, la alteración de la membrana liposomal externa, presentándose más rugosa que en las caracterizaciones anteriores. Asimismo se analizó el tamaño de partícula de los liposomas de esta formulación tras su conservación a temperatura ambiente durante 90 días. Se determinó el diámetro medio de los liposomas y su desviación estándar ($0,453\pm 0,413$), revelando una reducción notable respecto al observado a los 75 días y una elevada heterogeneidad en el tamaño de partícula.

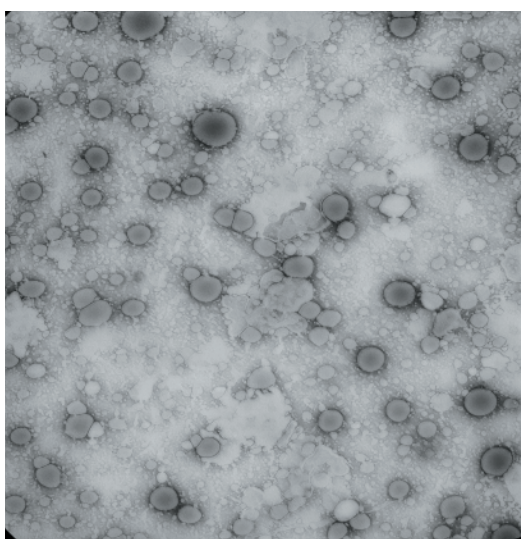


Figura 4. 62. Microfotografía de los liposomas de la fórmula A (15 días, 25-30°C).

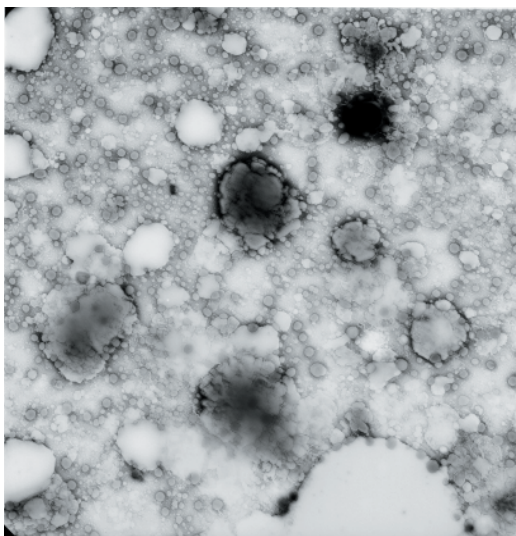


Figura 4. 63. Microfotografía de los liposomas de la fórmula A (45 días, 25-30°C).

Figura 4. 64. Microfotografía de los liposomas de la fórmula A (75 días, 25-30°C).

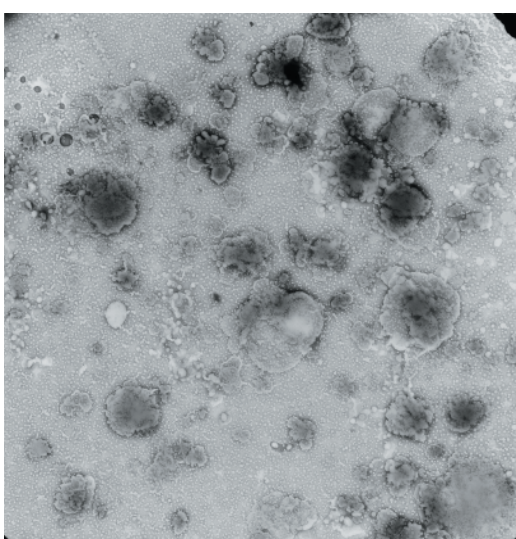
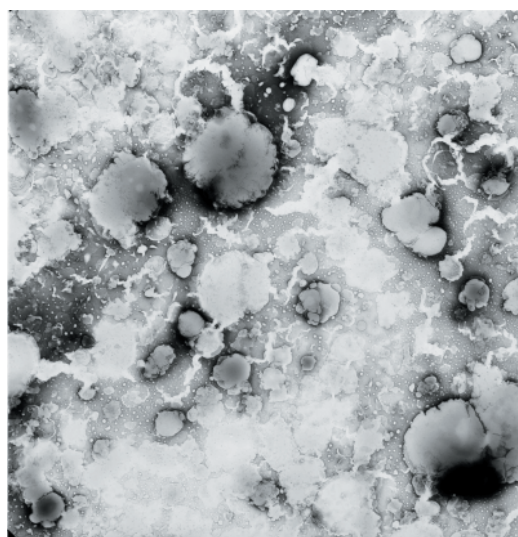


Figura 4. 65. Microfotografía de los liposomas de la fórmula A (90 días, 25-30°C).

Las microfotografías de las figuras 4. 62-4. 65 corresponden a imágenes de los liposomas tomadas en las sucesivas caracterizaciones realizadas durante el estudio de estabilidad desarrollado durante 3 meses.

7. 2. 2. Fórmula B.

En la caracterización inicial de los liposomas elaborados con fosfatidilcolina, colesterol y dipropionato de betametasona se puso de manifiesto la presencia de membranas lisas y bien definidas, tal vez gracias a la incorporación del esterol que actúa modificando la fluidez de las membranas. Su diámetro medio y desviación estándar fue $0,533\pm 0,352$ μm .

Las muestras que se mantuvieron refrigeradas fueron caracterizadas a los 15 días de su elaboración mediante tinción negativa y visualización al microscopio electrónico de transmisión. En esta se observó una ligera transformación de las membranas con bordes algo irregulares. La estructura de estos liposomas es multilaminar y se puede comprobar observando en las microfotografías la alternancia de zonas hidrófobas correspondientes a las bicapas lipídicas y de zonas polares correspondientes a los compartimentos acuosos. Respecto al tamaño de partícula medio, las imágenes captadas en las microfotografías permitieron estudiar este aspecto. Las medidas de diámetro de los liposomas de esta formulación mostraron un aumento del tamaño de partícula medio y la dispersión de las medidas ($0,644\pm 0,501$).

Tras pasar 45 días de la preparación de las muestras, estas se caracterizaron con el fin de detectar posibles cambios en la morfología y tamaño de partícula de los liposomas así como posibles fenómenos de

agregación y fusión. No se determinó mayor deterioro de las membranas lipídicas que en la caracterización realizada un mes antes, a los 15 días de la elaboración de los liposomas. El tamaño de partícula disminuyó con respecto a la citada determinación, presentando el menor valor de los observados durante el estudio de estabilidad con $0,182\pm 0,115$ μm . Este cambio podría deberse a la ruptura de algunas vesículas lipídicas.

A los 75 días, las muestras se caracterizaron y se comprobó la existencia de algunas vesículas agregadas. El estudio de tamaño de partícula puso de manifiesto un aumento del diámetro medio de los liposomas y una menor dispersión relativa ($0,646\pm 0,388$), confirmando las apreciaciones efectuadas al observar las microfotografías.

En la caracterización final de las muestras, realizadas 3 meses después de su elaboración, los liposomas se mostraron menos agregados que a los 75 días si bien las membranas mantiene bordes poco definidos y algo irregulares. El análisis de tamaño de las vesículas lipídicas puso de manifiesto que los diámetros al final del estudio presentaron un tamaño de partícula medio ($0,534\pm 0,318$) muy próximo al inicial ($0,553\pm 0,352$).

Las microfotografías de las figuras 4. 66-4. 68 muestran la evolución de los liposomas elaborados con esta formulación tras conservarlos refrigerados durante 90 días.

Figura 4. 66. Microfotografía de los liposomas de la fórmula B (15 días, 4-8°C).

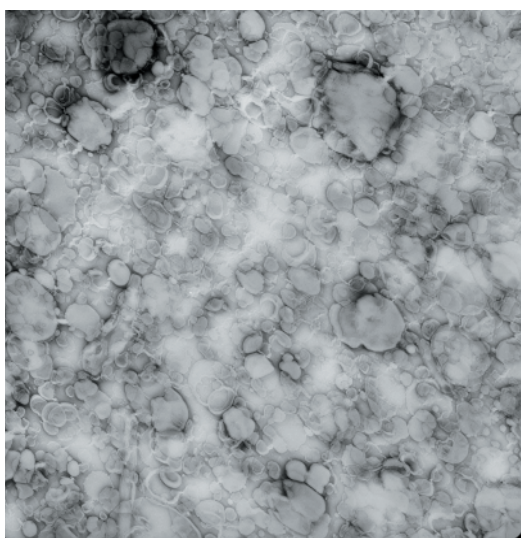
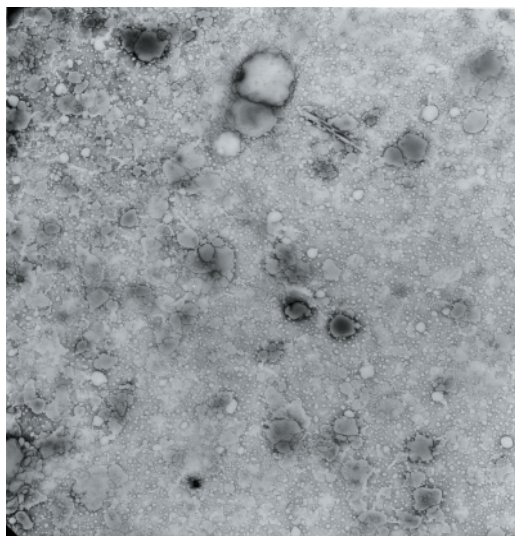
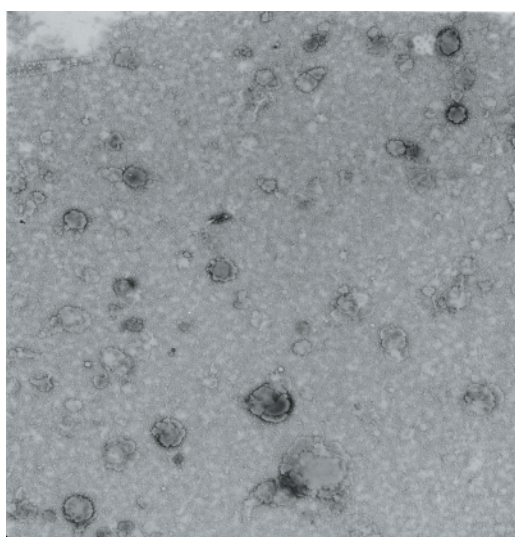


Figura 4. 67. Microfotografía de los liposomas de la fórmula B (45 días, 4-8°C).

Figura 4. 68. Microfotografía de los liposomas de la fórmula B (90 días, 4-8°C).



La conservación de las muestras de la fórmula B también se realizó a temperatura ambiente (25-30°C) y se caracterizaron las muestras a los 15, 45, 75 y 90 días de la elaboración de las muestras con objeto de analizar los cambios sufridos por las vesículas lipídicas almacenadas en estas condiciones tanto en su morfologías como en su tamaño de partícula y estado de agregación.

La segunda caracterización (15 días) reveló que los liposomas tenían las paredes muy irregulares, con bordes rugosos. Algunas vesículas permitieron observar la alternancias de zonas apolares y polares en los liposomas debido a sus bicapas lipídicas y compartimentos acuosos. Respecto al análisis del tamaño de los liposomas realizado a partir de las medidas de diámetro de las vesículas, permitió establecer el valor medio y su desviación estándar ($0,293 \pm 0,239$). Estas determinaciones mostraron una disminución del tamaño de partícula de los liposomas junto a una mayor dispersión relativa en el mismo, como cabía esperar de la observación de las microfotografías en las cuales se revelaba la heterogeneidad. En una imagen tomada a mayor aumento se observó una población homogénea de vesículas con una morfología muy regular y paredes lipídicas lisas y definidas. También se observaron liposomas de mayor tamaño, tal vez por la fusión de aquellos de menor diámetro.

A los 45 días se detectó, gracias a la caracterización, un aumento en la agregación de las vesículas. Además la morfología observada inicialmente se vio alterada, originando liposomas con formas irregulares como se puede observar en la microfotografía correspondiente a esta etapa del estudio (figura 4. 70). En cuanto al estudio de diámetro realizado a

los liposomas en esta fase, se determinó una pequeña disminución del tamaño de partícula de los mismos así como de la desviación estándar ($0,224\pm 0,132$) con respecto a las medidas realizadas a los 15 días.

Pasado un mes más (75 días) los liposomas previamente teñidos con acetato de uranilo se visualizaron por microscopía electrónica de transmisión. Las microfotografías mostraron unas vesículas multilaminares con alternancia de bicapas lipídicas y compartimentos acuosos. Morfológicamente se comprobó la existencia de irregularidades tanto de las membranas liposomiales como de las propias vesículas lipídicas. Respecto al diámetro de estos vectores, se detectó un ligero incremento en comparación con el resultado obtenido a los 45 días. Los valores resultantes del estudio fueron $0,302\pm 0,175$ μm .

Por último, la caracterización final de las muestras de esta formulación almacenada durante 3 meses a temperatura ambiente permitió estudiar la morfología y agregación de los liposomas. En las microfotografías se puede ver que las vesículas lipídicas presentaron una estructura multilaminar como ya se había observado anteriormente, pero su alteración es notable ya que las paredes lipídicas se muestran irregulares y con una elevada agregación. Por su parte, el análisis de tamaño realizado a partir de las medidas de diámetro realizadas a los liposomas fotografiados estableció un gran incremento en el mismo, con un resultado que representaba el doble del valor obtenido a los 75 días. También resultó elevada la dispersión de las medidas, poniéndose de manifiesto la disparidad de los diámetros.

El incremento absoluto del tamaño de partícula de los liposomas objeto de estudio desde el inicio del ensayo hasta esta última caracterización no es significativa, pero sí es posible destacar la modificación en la dispersión de las medidas, indicativa del incremento de la heterogeneidad del tamaño de partícula con el paso del tiempo. Este aspecto no debe extrañar una vez constatados los cambios y alteraciones físicas de las membranas que constituyen los liposomas.

Las figuras 4. 69-4. 72 son representativas de las sucesivas caracterizaciones de estos liposomas formulados con el fosfolípido éster, colesterol y el principio activo.

Al comparar los resultados obtenidos del estudio de estabilidad realizado con estas vesículas conservadas a cada una de las temperaturas se comprueba que existe gran influencia de la temperatura de conservación a pesar de la incorporación del esteroles a la formulación de las vesículas.

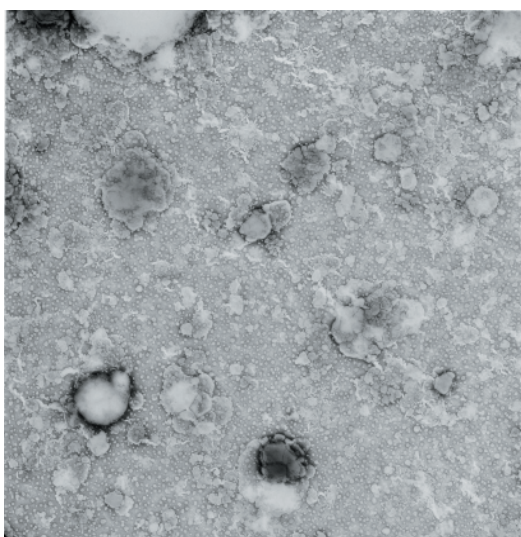


Figura 4. 69. Microfotografía de los liposomas de la fórmula B (15 días, 25-30°C).

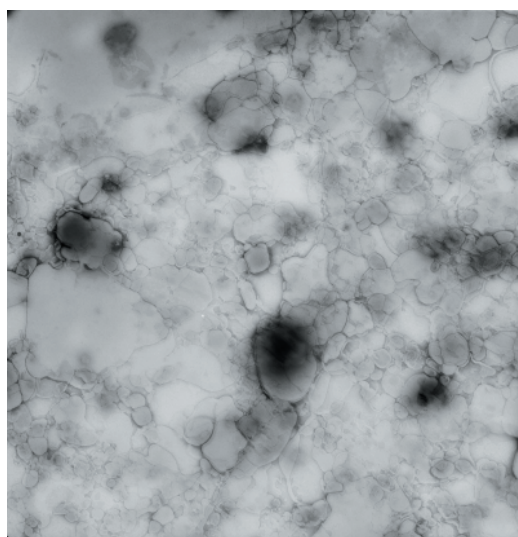


Figura 4. 70. Microfotografía de los liposomas de la fórmula B (45 días, 25-30°C).

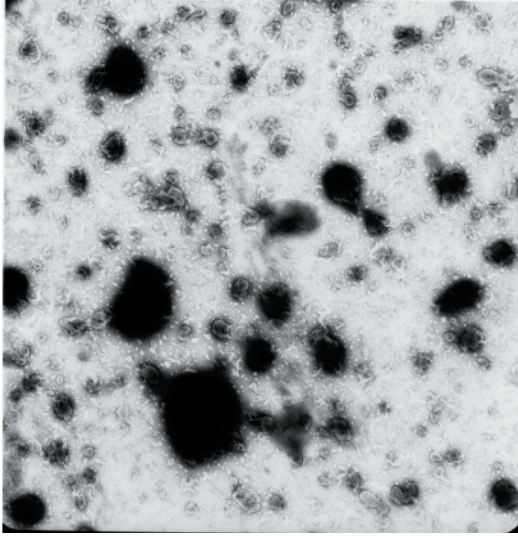
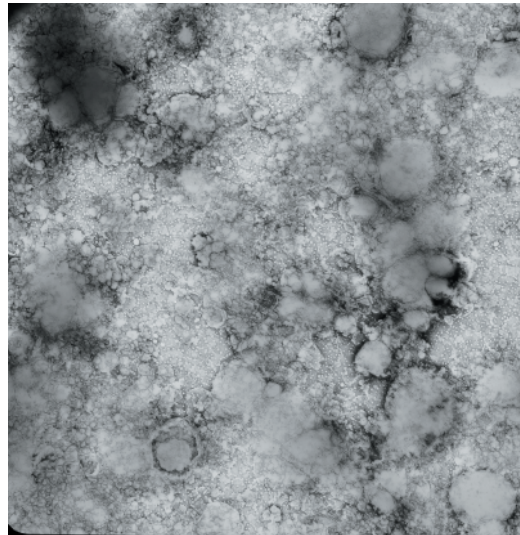


Figura 4. 71. Microfotografía de los liposomas de la fórmula B (75 días, 25-30°C).

Figura 4. 72. Microfotografía de los liposomas de la fórmula B (90 días, 25-30°C).



7. 2. 3. Fórmula C.

Los liposomas de esta formulación se elaboraron con fosfolípidos, colesterol, dipropionato de betametasona y vitamina C como antioxidante. Presentaron una estructura multilaminar y escasa agregación. Posteriormente, con el fin de evaluar la estabilidad de los liposomas, las muestras se caracterizaron a los 15, 45, 75 y 90 días a partir de su preparación.

Aquellas muestras conservadas a 4-8°C manifestaron una leve alteración de la morfología observada en las 24 horas siguientes a su elaboración. Las vesículas mostraron un tamaño de partícula notablemente superior respecto a la caracterización inicial. Se confirmó en ellas la estructura multilaminar y se visualizaron las membranas externas de los liposomas con un aspecto más liso y uniforme que en los de menor tamaño. Respecto al tamaño de partícula de los liposomas se detectó un gran incremento ($0,978\pm 0,745$) hasta duplicar casi el valor obtenido inicialmente ($0,505\pm 0,352$). La dispersión en el tamaño de los liposomas fue considerablemente mayor en esta ocasión y es indicativa de la heterogeneidad del diámetro de los liposomas, debido tal vez a la fusión de vesículas lipídicas, lo cual originaría un problema en su mecanismo de eliminación.

A los 45 días de la preparación de estas muestras destacó la baja alteración sufrida por los liposomas con respecto a las observaciones realizadas en las caracterizaciones anteriores. La morfología y características de las membranas no se modificaron a lo largo de este mes. No obstante el estudio de tamaño de las vesículas puso de manifiesto una importante reducción del diámetro de los liposomas acompañada de una reducción aún mayor de la desviación estándar ($0,450\pm 0,242$).

Pasados 30 días más (75 días) se realizó otra caracterización de las muestras que puso de manifiesto que las vesículas estaban sufriendo procesos de agregación y fusión. Este aspecto se corroboró al analizar el tamaño de partícula de las vesículas caracterizadas, ya que presentaron un diámetro medio de $0,683\pm 0,320$ μm , es decir, que el tamaño de las vesículas se incrementó debido a estos fenómenos.

Por último, la caracterización final de los liposomas elaborados con esta composición se realizó a los 90 días tras la elaboración de las muestras constatándose un incremento en el tamaño de partícula de las vesículas así como de la heterogeneidad del mismo. También pudieron observarse vesículas lipídicas con paredes alteradas e irregulares con los bordes rugosos. Los fenómenos de agregación quedaron reflejados en algunas de las microfotografías realizadas a las muestras. El estudio de los diámetros liposomiales medidos en las imágenes tomadas a estas muestras reveló un incremento en el tamaño de partícula ($0,843\pm 0,617$), confirmando la existencia de procesos de agregación y una mayor heterogeneidad en la distribución de tamaños de los liposomas.

Las figuras 4. 73-4. 76 muestran la evolución de las muestras durante el estudio.

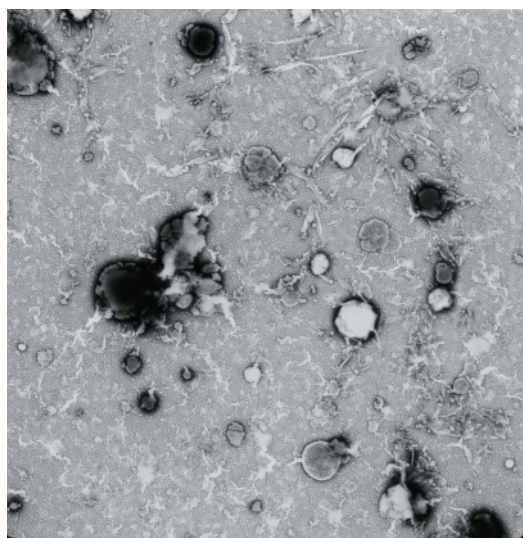


Figura 4. 73. Microfotografía de los liposomas de la fórmula C (15 días, 4-8°C).

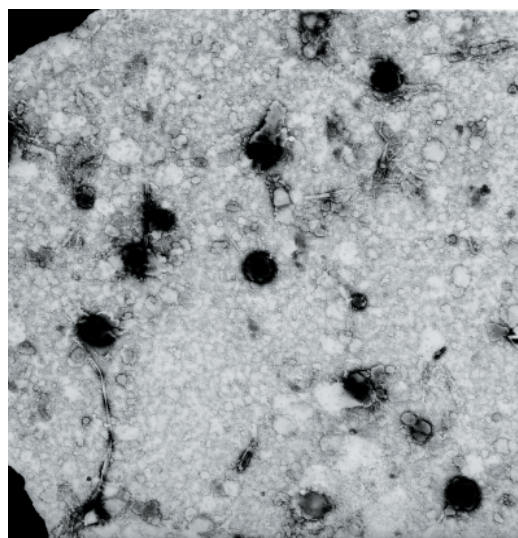


Figura 4. 74. Microfotografía de los liposomas de la fórmula C (45 días, 4-8°C).

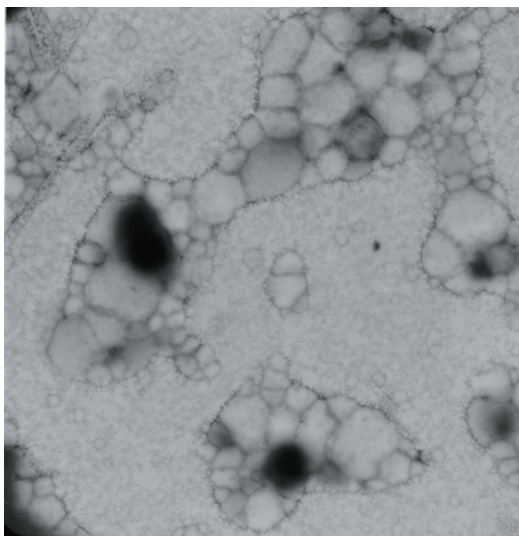
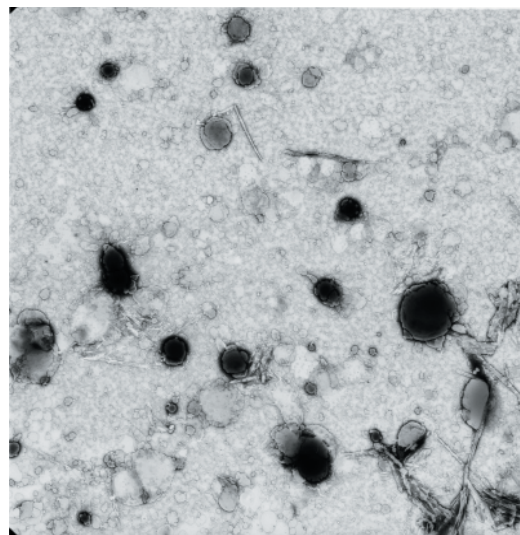


Figura 4. 75. Microfotografía de los liposomas de la fórmula C (75 días, 4-8°C).

Figura 4. 76. Microfotografía de los liposomas de la fórmula C (90 días, 4-8°C).



Las muestras conservadas a 25-30 °C se caracterizaron en estos mismos periodos de tiempo y los resultados obtenidos se analizan a continuación.

Pasados 15 días de la preparación de las muestras de esta formulación se detectó un incremento en su tamaño, observable en las microfotografías tomadas. En cuanto a su morfología y estructura se observó cierta agregación de las vesículas aunque las membranas liposomiales no se alteraron en este breve periodo de tiempo. Las microfotografías han corroborado

la estructura multilaminar con alternancia de compartimentos acuosos y bicapas lipídicas, constituidas en este caso por la fosfatidilcolina, el colesterol y el fármaco. En los compartimentos acuosos, debido a su solubilidad se encuentra el antioxidante incorporado a la formulación, el ácido ascórbico. El análisis de tamaño de partícula reveló un aumento del diámetro medio de las vesículas. El diámetro medio y su desviación estándar fueron $1,037 \pm 0,681 \mu\text{m}$ y posiblemente ese incremento en el tamaño de partícula sea debido a la agregación de las vesículas.

A los 45 días se caracterizaron nuevamente los liposomas de estas muestras mediante tinción negativa y visualización al microscopio electrónico de transmisión. Los liposomas aparecieron muy agregados y sus membranas se observaron rugosas. La realización del estudio del tamaño de partícula de los liposomas estudiados reveló un nuevo incremento en el diámetro de las vesículas ($1,522 \pm 0,853$) que estuvo acompañado de un aumento en la desviación estándar de los liposomas, es decir, de la dispersión y heterogeneidad de los mismos. Es destacable que, en esta etapa del estudio, los liposomas de esta formulación han triplicado su tamaño con respecto al inicial.

Un mes después, a los 75 días de la elaboración, las vesículas mostraron una notable heterogeneidad en el tamaño. Morfológicamente algunos liposomas mostraron unas membranas rugosas y mal definidas mientras en otras estaban mejor delimitadas y menos rugosas.

El tamaño de partícula también fue analizado en este periodo de tiempo y se determinó un importante cambio en el diámetro de estas vesículas. Los resultados obtenidos a partir de las medidas realizadas

fue $0,463\pm 0,354$ μm , muy próximo al obtenido al inicio del estudio ($0,505\pm 0,352$).

Por último, la caracterización final de estas muestras permitió obtener microfotografías de las vesículas lipídicas pasados 3 meses de su elaboración. A partir de esas imágenes se han analizado los cambios en la morfología y el tamaño de partícula de estos liposomas portadores de dipropionato de betametasona. En las microfotografías se pudo observar que las vesículas se habían agregado en gran medida y sólo algunos liposomas aparecían libres. Las membranas estaban muy poco definidas en las zonas de fusión de los liposomas. No obstante, los liposomas que se observaban libres mantenían su morfología sin cambio. En su mayoría los liposomas que no se habían agregado presentaban un tamaño de partícula menor. El análisis de tamaño de estas vesículas al final del estudio puso de manifiesto un nuevo aumento del diámetro liposomal ($1,055\pm 0,458$) que se debería a la fusión de las mismas a lo largo del tiempo de estudio y debido en gran medida a las condiciones de almacenamiento a temperatura ambiente.

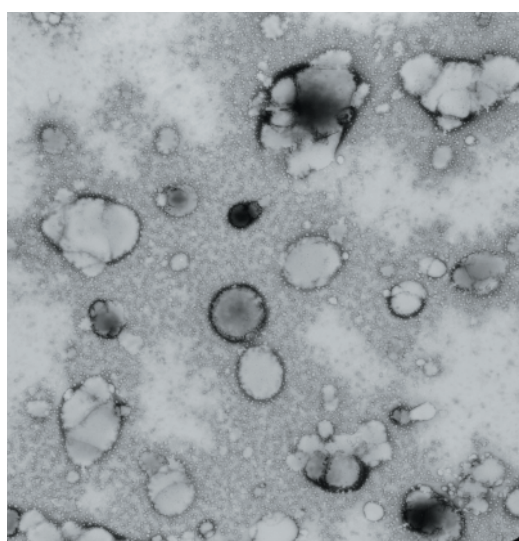


Figura 4. 77. Microfotografía de los liposomas de la fórmula C (15 días, 25-30°C).

Figura 4. 78. Microfotografía de los liposomas de la fórmula C (45 días, 25-30°C).

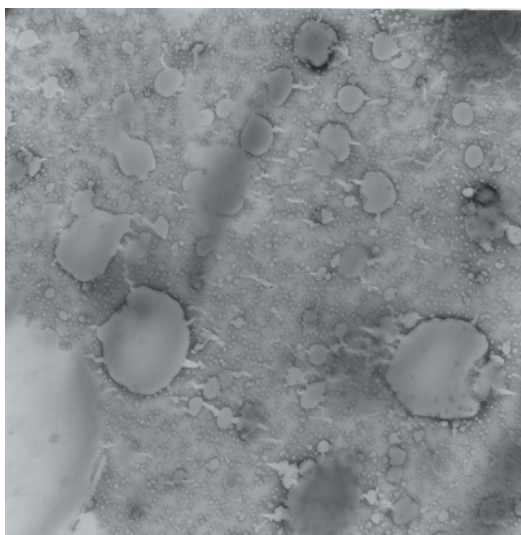
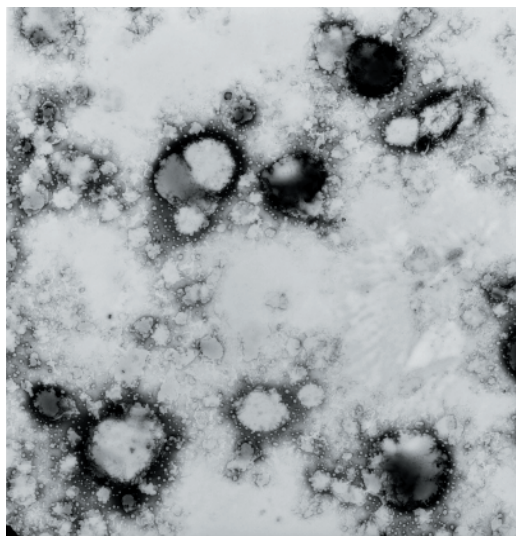
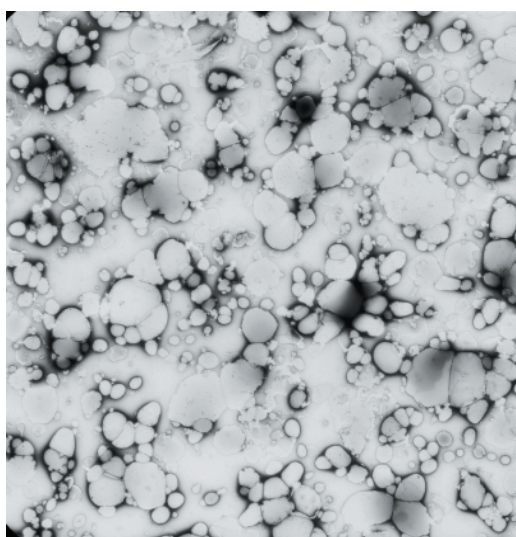


Figura 4. 79. Microfotografía de los liposomas de la fórmula C (75 días, 25-30°C).

Figura 4. 80. Microfotografía de los liposomas de la fórmula C (90 días, 25-30°C).



Las microfotografías de las figuras 4. 77-4. 80 reflejan la evolución de las vesículas lipídicas de esta formulación a lo largo del periodo de estudio.

7. 2. 4. Fórmula D.

Esta formulación se diferencia de la anterior por la incorporación de un conservador y los liposomas presentaron una estructura similar a la de formulaciones anteriores.

La caracterización de las muestras conservadas a 4-8°C realizada 15 días después de la elaboración puso de manifiesto una alta heterogeneidad en el tamaño de partícula de las vesículas así como el inicio de fenómenos de agregación en las mismas. Las membranas liposomiales no se alteraron notablemente en este breve periodo de tiempo. Respecto al tamaño de partícula durante estos primeros 15 días de estudio ($0,590\pm 0,507$) sufrió una ligera disminución en su valor medio, pero la desviación estándar se incrementó respecto a la observada en la caracterización inicial ($0,635\pm 0,421$).

Pasado un mes tras la segunda caracterización (45 días) se procedió a la tercera caracterización de las vesículas de esta formulación, obteniéndose microfotografías en las cuales se observó una modificación en la estructura de los liposomas de mayor diámetro. Las vesículas lipídicas mostraron una estructura en la cual las membranas parecen alteradas. En contraposición con estas alteraciones coexisten vesículas casi inalteradas con membranas lisas y bien definidas. En este momento del estudio se analizó el diámetro medio de las vesículas lipídicas y se

cuantificó la desviación estándar correspondiente a las medidas realizadas a los liposomas fotografiados. Se determinó una nueva reducción del diámetro medio de los liposomas ($0,302\pm 0,230$).

A los 75 días de la preparación de las muestras, los liposomas presentaban un alto grado de alteración con fusión de las vesículas lipídicas. Algunas microfotografías permitieron ver que aún se mantenían libres parte de las vesículas mientras que otras de ellas se agregaban y fusionaban. El análisis del tamaño de partícula de los liposomas de esta formulación reveló un aumento del diámetro medio de las vesículas si bien la dispersión relativa en el mismo es menor que a los 45 días. El diámetro medio de estos liposomas fue $0,684\pm 0,372 \mu\text{m}$.

En la caracterización final se visualizaron liposomas con mayor tamaño de partícula, en las cuales se observó la estructura multilaminar de las vesículas. Otras microfotografías pusieron de manifiesto la existencia de liposomas muy inferior a los citados anteriormente. También se observaron vesículas en las cuales se producían fenómenos de agregación. En cuanto al análisis del tamaño de partícula de los liposomas a los 90 días de su elaboración se determinó un diámetro medio de $0,899\pm 0,711 \mu\text{m}$, corroborando la existencia de liposomas con una relativa heterogeneidad en el tamaño de partícula que se había observado en las microfotografías.

Las figuras 4. 81-4. 84 muestran la evolución seguida por estos liposomas de esta formulación cuando fueron conservados en frío ($4-8^{\circ}\text{C}$).

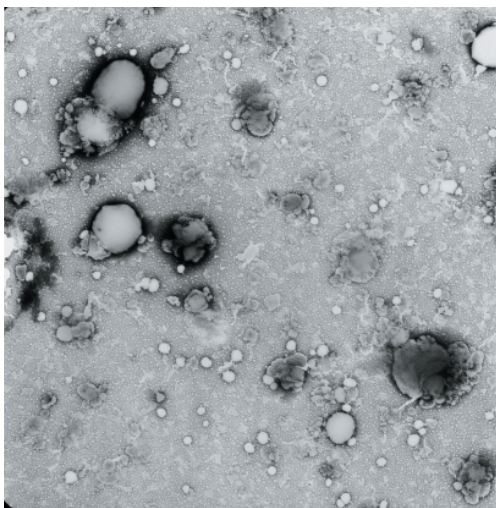


Figura 4. 81. Microfotografía de los liposomas de la fórmula D (15 días, 4-8°C).

Figura 4. 82. Microfotografía de los liposomas de la fórmula D (45 días, 4-8°C).

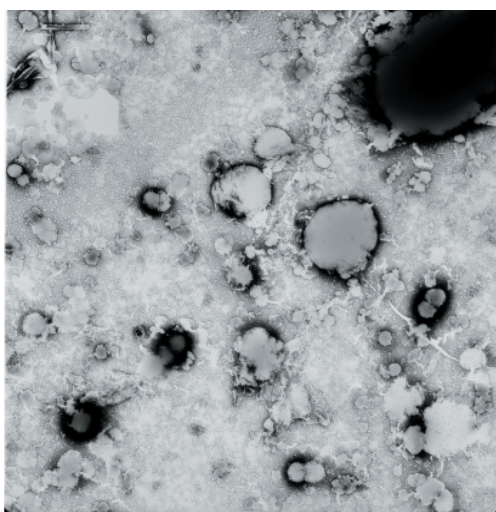
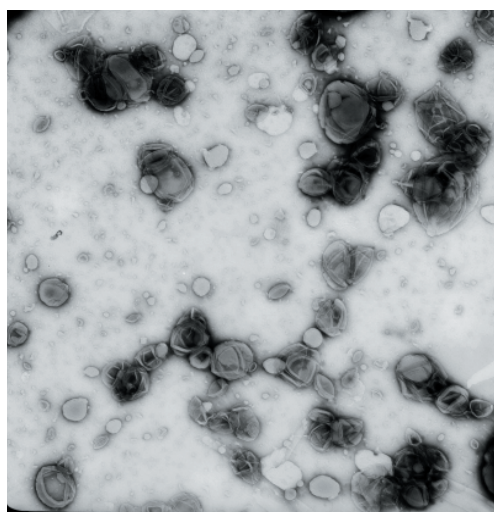
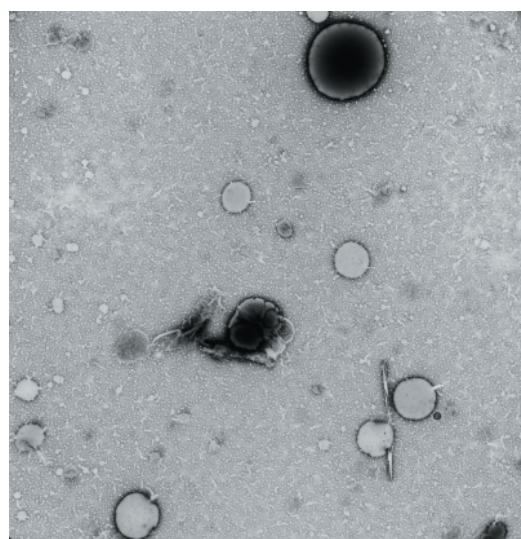


Figura 4. 83. Microfotografía de los liposomas de la fórmula D (75 días, 4-8°C).

Figura 4. 84. Microfotografía de los liposomas de la fórmula D (90 días, 4-8°C).



Con las muestras de esta formulación conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) se siguió el mismo procedimiento, caracterizándolas a los 15, 45, 75 y 90 días de su elaboración.

En la primera de estas caracterizaciones, llevada a cabo a los 15 días de la preparación de las suspensiones liposomiales, se detectó la existencia de dos poblaciones de liposomas con diferentes tamaños de partícula. La morfología y estructura de los mismos no presentaba alteraciones y la agregación de las vesículas era prácticamente nula. El estudio sobre el tamaño de partícula de los liposomas confirmó la existencia de una gran dispersión en los diámetros de estos liposomas ya que fue $0,394 \pm 0,478 \mu\text{m}$. En la microfotografía (Figura 4. 85) se observa que las vesículas se conservan en buen estado a pesar de no estar almacenadas en condiciones óptimas.

La caracterización realizada pasados 45 días de la elaboración de las muestras reveló una cierta tendencia a la agregación de las vesículas aunque los liposomas conservan su estructura y las membranas no se hallan alteradas. El tamaño de las vesículas lipídicas se redujo ligeramente y se alcanzó mayor uniformidad en los tamaños de partícula de estos liposomas ($0,343 \pm 0,130$).

Tras un mes se volvieron a caracterizar los liposomas de estas suspensiones, observándose un gran cambio en el estado de agregación de los mismos. La agregación y la fusión de las vesículas lipídicas eran muy superiores a las detectadas a los 45 días de la preparación de las muestras. Sin embargo, algunos liposomas permanecían bien conservados (sin agregarse ni alterarse sus membranas) como muestra la microfotografía

de la figura 4. 86. A los 75 días, el estudio sobre el diámetro medio de estos liposomas portadores de dipropionato de betametasona reveló un incremento en el tamaño de partícula así como de la heterogeneidad en el mismo.

La caracterización final, realizada 90 días después de la elaboración de las muestras, reveló un gran deterioro en los liposomas, cuyas membranas se alteraron significativamente haciéndose rugosas y con un estado de elevada agregación. Respecto al estudio del diámetro de las muestras no se produjeron grandes diferencias en comparación con los resultados obtenidos a los 75 días. El diámetro final de estas vesículas lipídicas fue $0,491\pm 0,260$).

Las microfotografías de realizadas (Figuras 4. 85-4. 87) permiten observar los cambios sufridos por los liposomas durante su almacenamiento a temperatura ambiente (25-30°C).

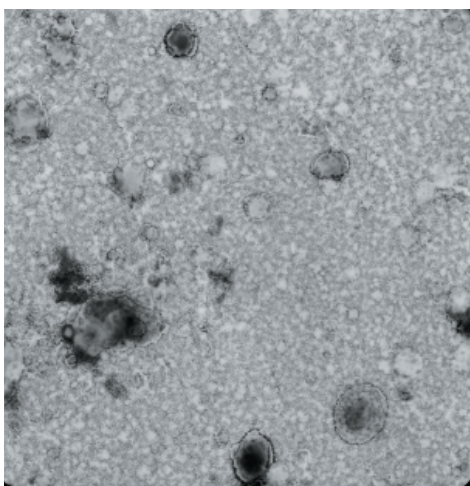
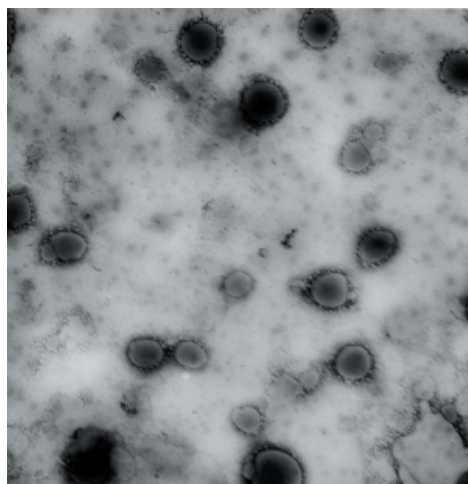


Figura 4. 85. Microfotografía de los liposomas de la fórmula D (15 días, 25-30°C).

Figura 4. 86. Microfotografía de los liposomas de la fórmula D (45 días, 25-30°C).



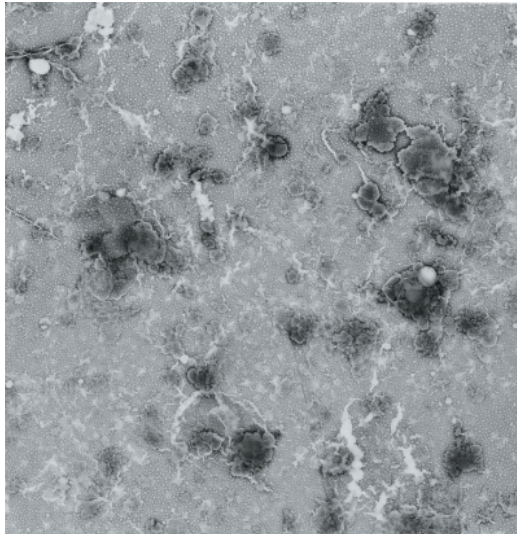


Figura 4. 87. Microfotografía de los liposomas de la fórmula D (90 días, 25-30°C).

7. 2. 5. Fórmula E.

Para la formulación de estas muestras se empleó, junto al fosfolípido, el colesterol y el principio activo, un antioxidante (vitamina C) y un conservador (Phenonip®). Al ser caracterizados inicialmente se apreció un mayor tamaño de los liposomas y la existencia de estructuras menos definidas.

Posteriormente la caracterización de las muestras conservadas en frío se realizó a los 15 días de su preparación. En esta ocasión no se detectaron cambios estructurales. Los liposomas no se agregaron durante este periodo de tiempo. Los resultados aportados por el estudio de tamaño revelaron un aumento del tamaño de partícula y la heterogeneidad del mismo ($0,881\pm 0,539$).

A los 45 días de la elaboración de las suspensiones liposomales se caracterizaron nuevamente las muestras mediante tinción negativa y

visualización por microscopía electrónica de transmisión. En este punto del estudio se detectó la alteración de las vesículas ya que mostraron tendencia a la agregación. Las membranas presentaban un aspecto rugoso. En cuanto al estudio de tamaño realizado a partir de las medidas de diámetro de las vesículas lipídicas, se ha detectado un leve descenso del diámetro medio y de la desviación estándar ($0,792\pm 0,371$).

Se observó una mayor alteración de las muestras cuando se caracterizaron a los 75 días. La agregación de las vesículas fue notablemente superior que en anteriores caracterizaciones. Morfológicamente, los liposomas se habían deteriorado y sus membranas estaban poco definidas. El análisis de tamaño de los liposomas reveló una reducción del tamaño de partícula medio aunque la desviación estándar permanecía similar a la determinada a los 45 días, con lo cual la heterogeneidad en este momento era mayor ($0,575\pm 0,302$).

Por último se caracterizaron las muestras a los 90 días, observándose una alteración similar a la detectada a los 75 días. No obstante, las microfotografías mostraron una distribución de tamaños heterogénea. Se detectaron liposomas de gran tamaño junto a otros de tamaño considerablemente menor. La agregación y fusión de las vesículas lipídicas era similar a la detectada anteriormente. El estudio de los tamaños de partícula de estos liposomas, realizado mediante la medida de sus diámetros, determinó un ligero aumento en el mismo aunque fue más notable el aumento de la desviación estándar, de la heterogeneidad en los tamaños de las vesículas ($0,673\pm 0,493$). Respecto a las medidas iniciales ($0,653\pm 0,393$) cabe destacar que el cambio en los diámetros de los liposomas fue muy pequeño aunque la dispersión en los diámetros sí

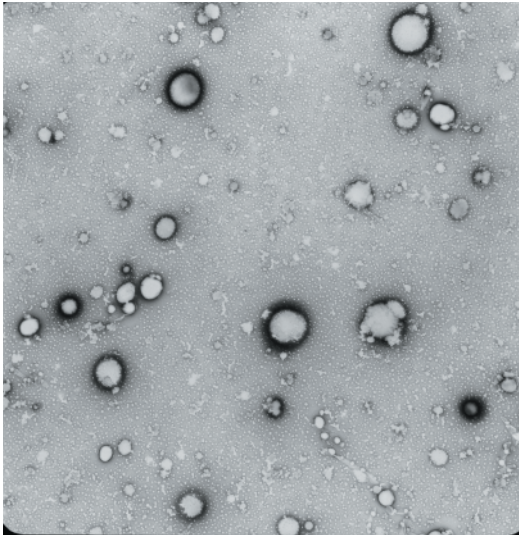


Figura 4. 88. Microfotografía de los liposomas de la fórmula E (15 días, 4-8°C).

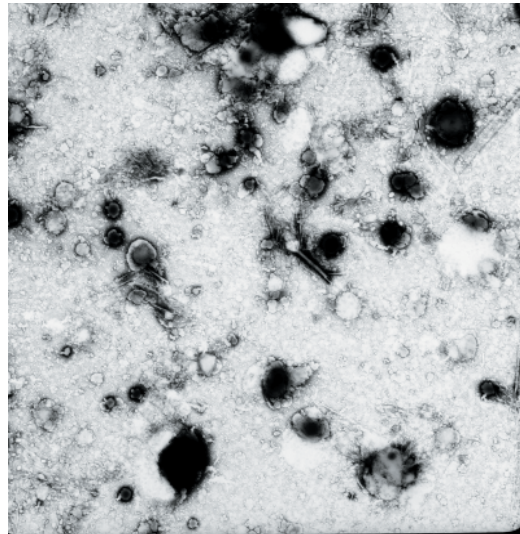


Figura 4. 89. Microfotografía de los liposomas de la fórmula E (45 días, 4-8°C).

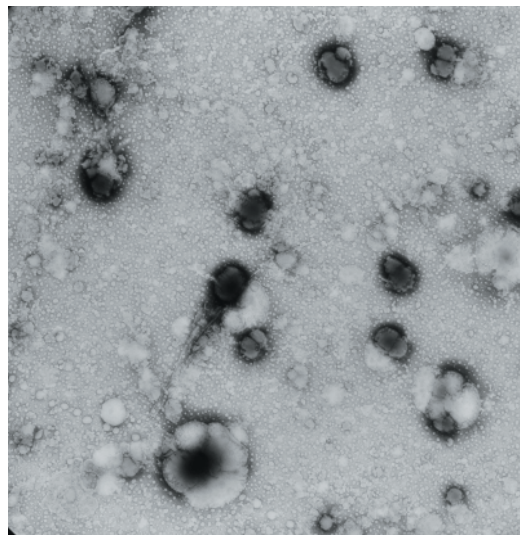


Figura 4. 90. Microfotografía de los liposomas de la fórmula E (75 días, 4-8°C).

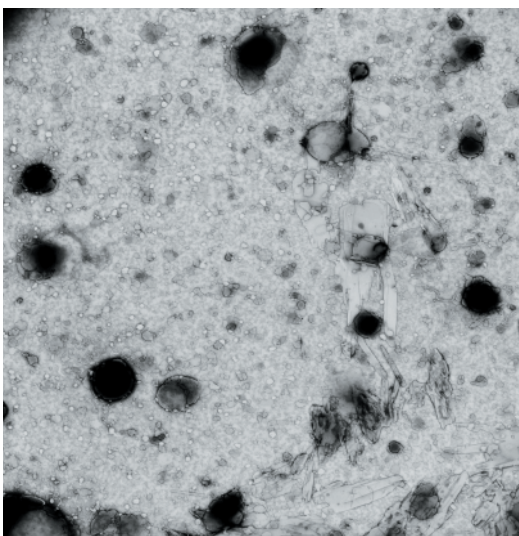


Figura 4. 91. Microfotografía de los liposomas de la fórmula E (90 días, 4-8°C).

fue superior. Esto resulta indicativo de una mayor heterogeneidad en los tamaños de los liposomas.

Las muestras conservadas a 25-30°C se caracterizaron tras pasar 15 días de su preparación detectándose una mayor alteración de las vesículas en comparación con la observada en la misma formulación conservada en frío. Respecto al tamaño de partícula de los liposomas se produjo un cierto aumento en la desviación estándar del diámetro de las vesículas lipídicas ($0,705 \pm 0,416$).

Pasados 45 días de la elaboración de las muestras se observaron vesículas agregadas y con bordes mal definidos. El análisis de diámetro realizado reveló un leve aumento del tamaño de partícula ($0,813 \pm 0,410$).

A los 75 días se caracterizaron nuevamente las muestras comprobándose que las vesículas se habían agregado en mayor medida que a los 45 días y que en algunas vesículas podía detectarse la fusión con otras. Las medidas de diámetro realizadas pusieron de manifiesto un notable descenso en el tamaño de partícula y una gran heterogeneidad en el mismo ($0,343 \pm 0,230$).

La caracterización final realizada a los 90 días permitió detectar vesículas con membranas mal definidas y bordes rugosos junto a otras de tamaño más reducido. Los liposomas de mayor tamaño presentaban mayor grado de agregación. Esta heterogeneidad en el tamaño de partícula quedó corroborada gracias a las medidas de diámetro realizadas en las microfotografías, cuyo resultado fue $0,841 \pm 0,557 \mu\text{m}$.

Figura 4. 92. Microfotografía de los liposomas de la fórmula E (15 días, 25-30°C).

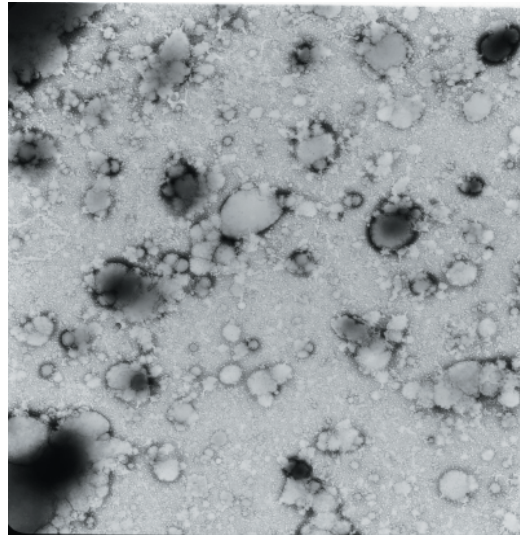
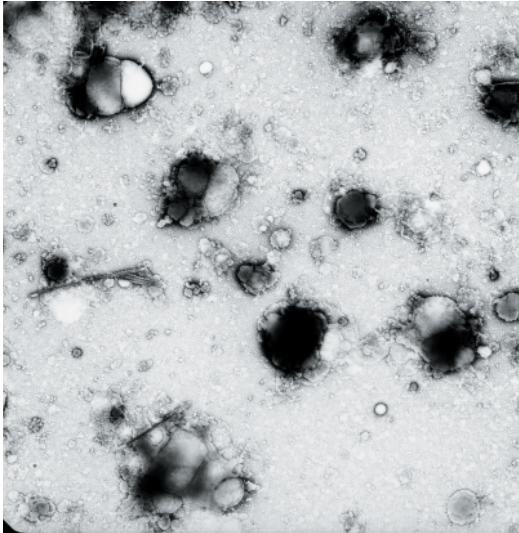


Figura 4. 93. Microfotografía de los liposomas de la fórmula E (45 días, 25-30°C).

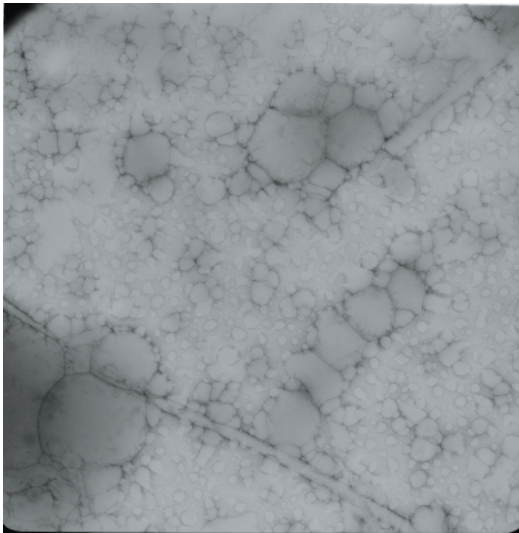
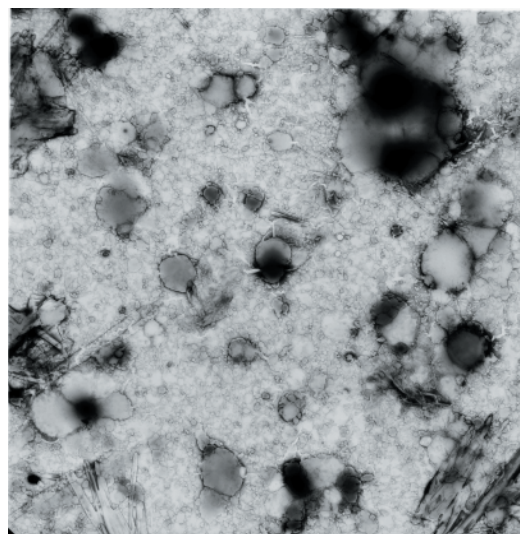


Figura 4. 94. Microfotografía de los liposomas de la fórmula E (75 días, 25-30°C).

Figura 4. 95. Microfotografía de los liposomas de la fórmula E (90 días, 25-30°C).



Las figuras 4. 88-4. 91 y 4. 92-4. 95 ilustran la evolución seguidas por las muestras de esta formulación conservadas en frío y a temperatura ambiente respectivamente.

7. 2. 6. Fórmula F.

La composición de esta fórmula incorpora, respecto a la anterior, un segundo antioxidante, el acetato de α -tocoferol. La caracterización inicial de las muestras permitió comprobar la homogeneidad en el tamaño y estructura de los liposomas, tal vez debido a la composición de la formulación. En cuanto a la estructura, son semejantes a los de otras formulaciones, pero su tamaño de partícula es inferior al observado en las formulaciones anteriores.

A los 15 días se puso de manifiesto un mayor tamaño de los liposomas conservados en frío (4-8°C) y la agregación de las vesículas. Las medidas de diámetro realizadas a las vesículas de las microfotografías permitieron confirmar el incremento del tamaño de partícula apreciado en las imágenes. Los resultados del estudio de tamaño fueron $0,901 \pm 0,407$ μm . Al compara estos resultados con los obtenidos en la caracterización inicial se detectó una mayor desviación estándar aunque no es relevante puesto que el cambio en el tamaño medio de los liposomas es mucho mayor.

Las imágenes obtenidas a los 45 días de la preparación de la muestra mostraron un avance de la agregación de las vesículas y un deterioro de las membranas. Sin embargo, algunas vesículas permanecían sin agregarse y su tamaño es variable. El análisis de las medidas de diámetro

tomadas a los liposomas reveló un descenso ($0,370\pm 0,188$) con respecto a los resultado obtenidos a los 15 días ($0,901\pm 0,407$).

A los 75 días las vesículas no sufrieron grandes cambios en su morfología con respecto a los 45 días. Algunas vesículas lipídicas aparecían agregadas como se detectó anteriormente. El análisis del tamaño de partícula puso de manifiesto un pequeño aumento del diámetro medio de las vesículas ($0,458\pm 0,261$), situándose por encima del observado en la caracterización inicial de estas muestras sin aumentar la heterogeneidad (cuantificada a través de la desviación típica) ($0,333\pm 0,209$).

Por último, las muestras se visualizaron a los 90 días de su elaboración detectándose la formación de agregados y vesículas de gran tamaño, con bordes irregulares, rugosos y mal definidos. Todo esto es indicativo de la alteración física de las muestras. Las medidas de diámetro tomadas a los liposomas confirmaron el aumento de tamaño observado en las microfotografías ($0,827\pm 0,441$). Estos resultados pusieron de manifiesto un notable incremento en el diámetro de los liposomas respecto al inicial

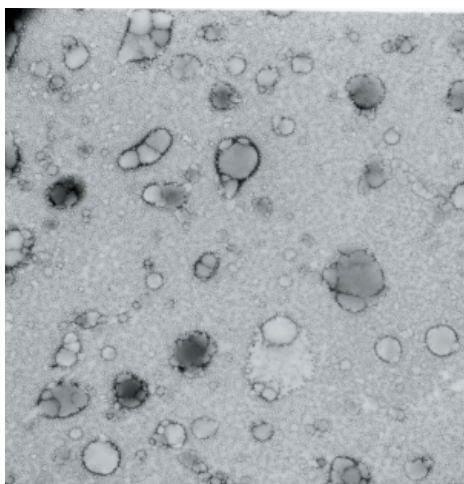


Figura 4. 96. Microfotografía de los liposomas de la fórmula F (15 días, 4-8°C).

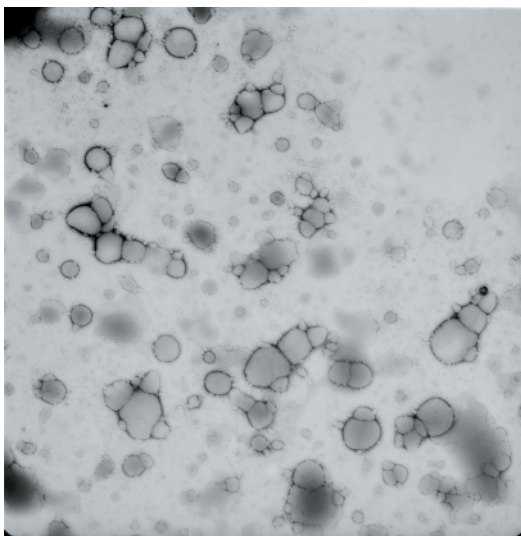


Figura 4. 97. Microfotografía de los liposomas de la fórmula F (45 días, 4-8°C).

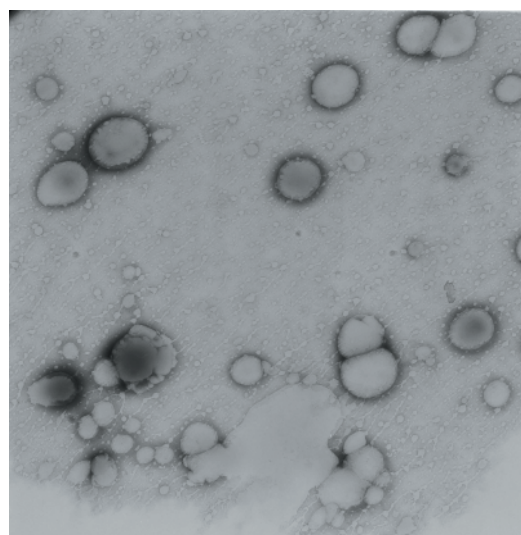


Figura 4. 98. Microfotografía de los liposomas de la fórmula F (75 días, 4-8°C).

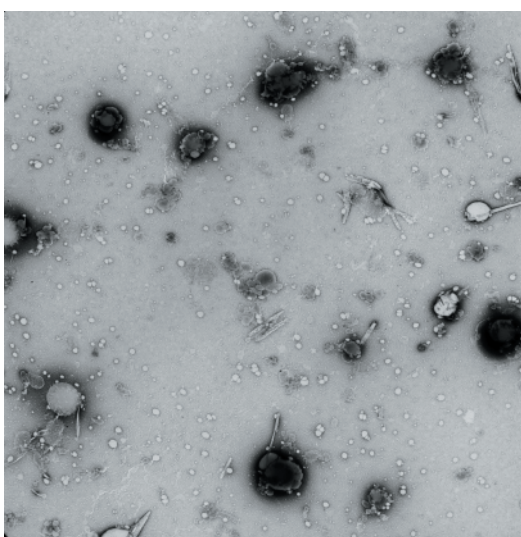


Figura 4. 99. Microfotografía de los liposomas de la fórmula F (90 días, 4-8°C).

de los mismos ($0,333\pm 0,209$). También se incrementó la heterogeneidad en el tamaño.

Las microfotografías de las figuras 4. 96-4. 99 permiten comprobar las alteraciones sufridas por las muestras durante el estudio de estabilidad realizado.

En el caso de la conservación de las muestras a temperatura ambiente ($25-30^{\circ}\text{C}$), la mayoría de las vesículas permanecían sin una alteración significativa, manteniendo la integridad de las membranas tras 15 días. El estudio de tamaño realizado a las vesículas se detectó un pequeño incremento en el diámetro medio de los liposomas ($0,523\pm 0,299$).

Pasados 45 días de la preparación de las muestras se detectó una notable alteración de las vesículas con una agregación muy elevada y sin definición de las membranas de los liposomas. Las vesículas observadas presentaron un diámetro considerablemente superior al observado en las caracterizaciones anteriores y esto resultó confirmado mediante el estudio de tamaño realizado ($1,050\pm 0,468$).

A los 75 días de almacenamiento a temperatura ambiente de estas muestras se detectó la agregación de las vesículas que mostraron membranas lipídicas mal definidas y morfologías irregulares en algunos casos. Los resultados obtenidos del estudio de tamaño de partícula fueron $0,890\pm 0,371\ \mu\text{m}$, lo cual representó una disminución del tamaño de partícula con respecto al determinado a los 45 días.

Finalmente a los 90 días del estudio se caracterizaron los liposomas para determinar su grado de agregación y el estado de sus membranas y morfología. Las conclusiones que se pueden obtener al observar las imágenes captadas en las microfotografías son que las vesículas lipídicas presentaban una gran alteración con agregación generalizada. Por otra parte, las membranas liposomiales se habían deteriorado considerablemente y se hallaban mal definidas. Morfológicamente los liposomas resultaron irregulares. El estudio realizado sobre el tamaño de partícula de las vesículas reveló una importante reducción del diámetro

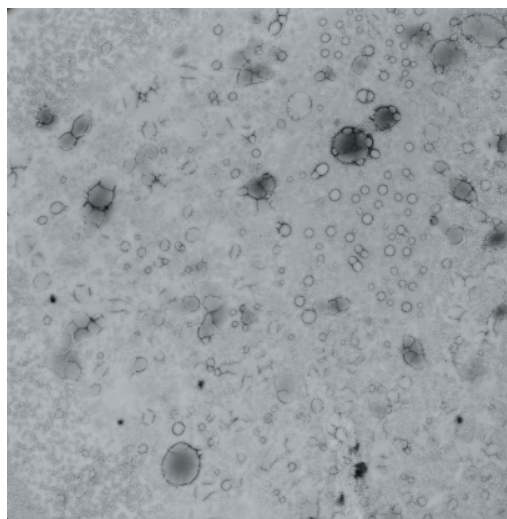


Figura 4. 100. Microfotografía de los liposomas de la fórmula F (15 días, 25-30°C).

Figura 4. 101. Microfotografía de los liposomas de la fórmula F (75 días, 25-30°C).

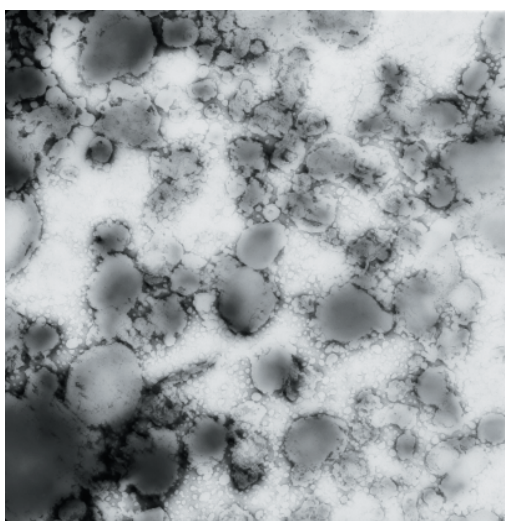
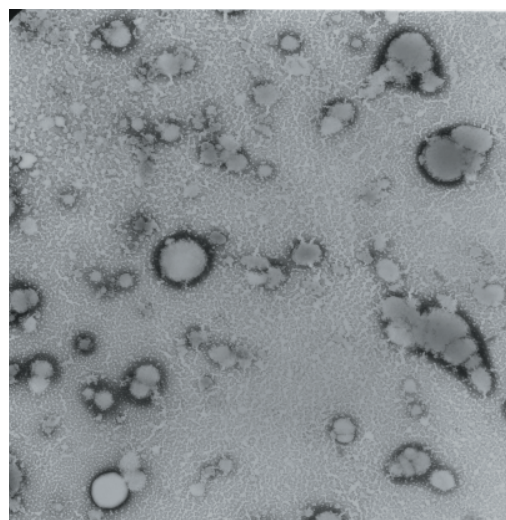


Figura 4. 102. Microfotografía de los liposomas de la fórmula F (90 días, 25-30°C).

medio que se situó próximo al determinado en la caracterización inicial ($0,333\pm 0,209$). El resultado obtenido a los 90 días fue $0,393\pm 0,225$ μm .

En las microfotografías correspondientes a los liposomas de esta formulación conservadas a 25-30 °C (Figuras 4. 100-4. 102) se pueden corroborar los aspectos comentados anteriormente y observar los cambios sufridos por los liposomas durante todo el estudio.

7. 2. 7. Fórmula G.

La caracterización inicial de estas vesículas lipídicas elaboradas con la combinación de dos antioxidantes además de fosfatidilcolina, colesterol y principio activo reveló cierta dispersión en los tamaños de partícula de los liposomas. Estructuralmente eran liposomas multilaminares con membranas externas bien definidas y lisas. Para valorar su estabilidad se han caracterizado estas muestras a los 15, 45, 75 y 90 días, realizándose un estudio de la morfología y tamaño de los liposomas.

Conservadas a los 15 días las vesículas se mantienen libres, sin agregarse aunque también se observaron algunos liposomas con sus membranas deterioradas. El análisis de tamaño de partícula puso de manifiesto una disminución en el diámetro ($0,467\pm 0,270$), respecto al observado al inicio del estudio.

Pasados 45 días desde la preparación de las muestras, estas se caracterizaron nuevamente sin observarse grandes cambios morfológicos aunque se detectó un aumento del tamaño de partícula de las vesículas. Se empezaron a observar ligeros fenómenos de agregación de los liposomas. El estudio de las medidas de diámetros realizadas confirmó el mayor

tamaño de partículas de los liposomas ($0,885\pm 0,596$). La heterogeneidad de los tamaños de los liposomas también resultó mayor en este momento del estudio.

Un mes después de esta caracterización (75 días) se comprobó, mediante una nueva visualización de las muestras conservadas en frío al microscopio electrónico de transmisión, una cierta tendencia a la agregación de las vesículas si bien cabe destacar que aún no se han fusionado los liposomas y se conservan las membranas. Algunos de ellos se mantienen sin agregarse y conservan la integridad de las membranas.

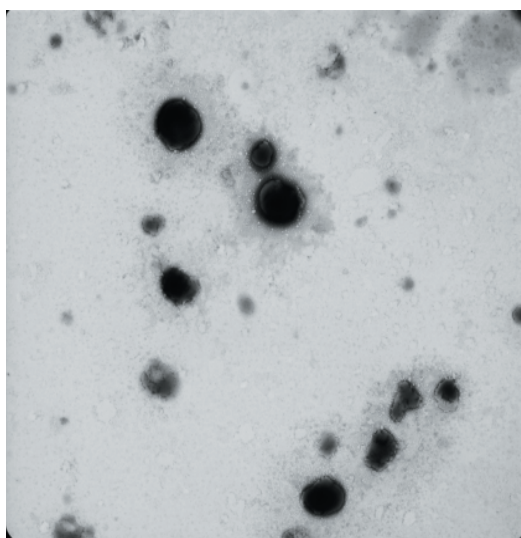


Figura 4. 103. Microfotografía de los liposomas de la fórmula G (15 días, 4-8°C).

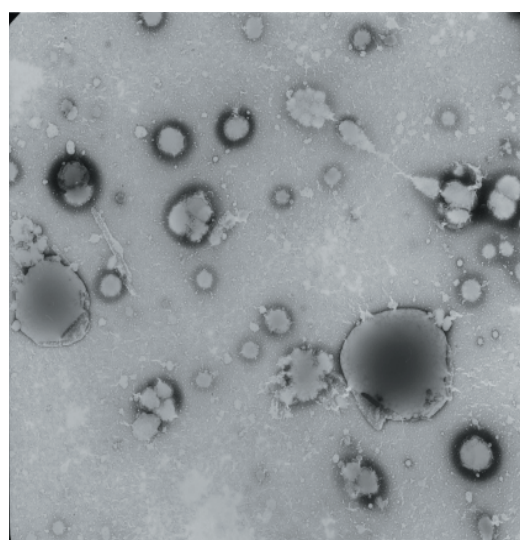


Figura 4. 104. Microfotografía de los liposomas de la fórmula G (45 días, 4-8°C).

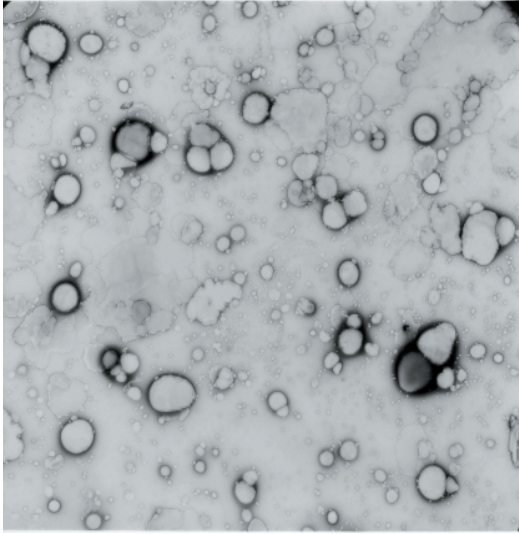


Figura 4. 105. Microfotografía de los liposomas de la fórmula G (75 días, 4-8°C).

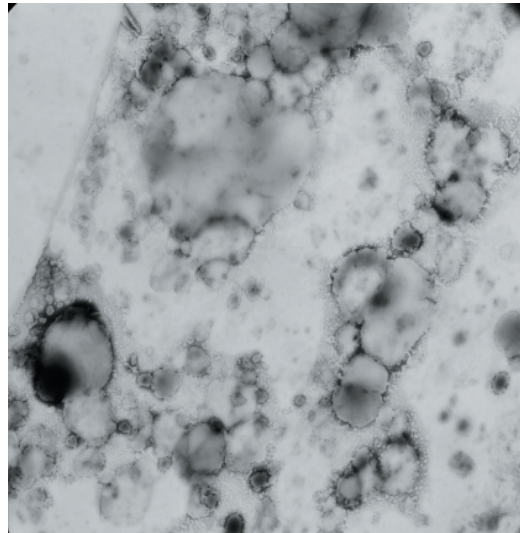


Figura 4. 106. Microfotografía de los liposomas de la fórmula G (90 días, 4-8°C).

El estudio sobre el tamaño de partícula puso de manifiesto una reducción del diámetro y la heterogeneidad ($0,569\pm 0,289$).

En la última caracterización realizada a estas muestras se observó la presencia de liposomas sin agregarse y con escasa alteración. Las medidas de diámetro de las vesículas lipídicas permitieron determinar un nuevo descenso del diámetro acompañado de una mayor dispersión del mismo ($0,545\pm 0,373$).

Cuando las muestras se conservaron a temperatura ambiente, la caracterización de las muestras a los 15 días mostró la existencia de agregación entre las vesículas y la alteración de las membranas liposomiales externas. El estudio realizado del tamaño de los liposomas mostró una reducción del diámetro y heterogeneidad de las vesículas ($0,557\pm 0,323$). Esta alteración de las muestras podría deberse a las condiciones de conservación.

Pasados 45 días de la preparación de las muestras se ratificó la agregación de las vesículas que mantuvieron las membranas bien definidas a pesar de la alteración sufrida. El diámetro de las vesículas creció en gran medida alcanzando $0,891\pm 0,479$ μm .

La caracterización realizada a los 75 días tras la elaboración de las muestras puso de manifiesto un mantenimiento de las estructura y grado de agregación observados en la caracterización anterior, confirmándose estas apreciaciones mediante el estudio de tamaño de partícula ($0,818\pm 0,465$). Este tamaño fue inferior a los 90 días ($0,499\pm 0,327$)

Las microfotografías de las figuras 4. 103-4. 110 muestran la evolución de las muestras de ambas series (frío y temperatura ambiente).

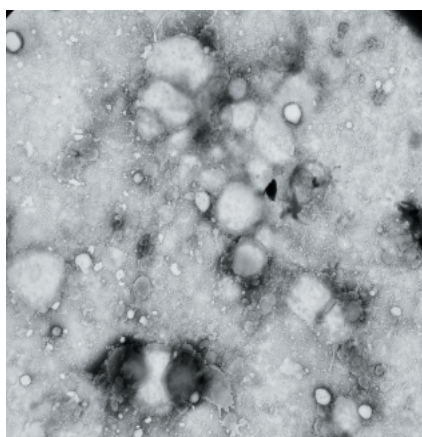


Figura 4. 107. Microfotografía de los liposomas de la fórmula G (15 días, 25-30°C).

Figura 4. 108. Microfotografía de los liposomas de la fórmula G (45 días, 25-30°C).

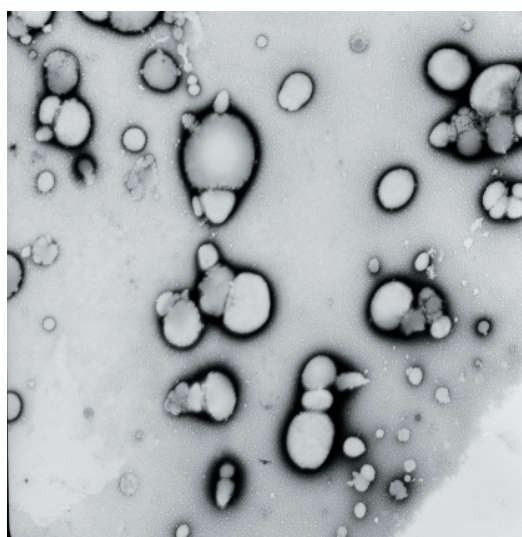
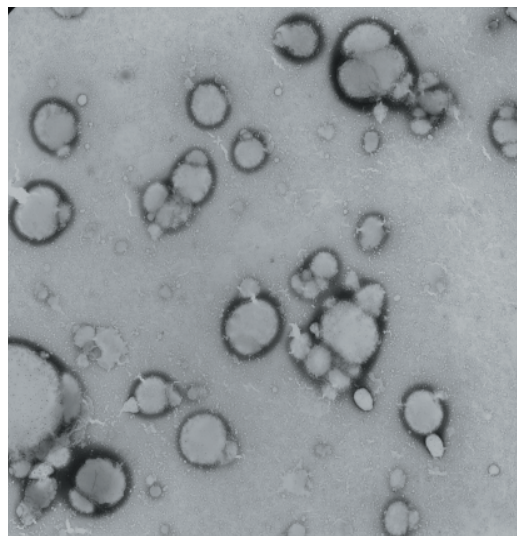
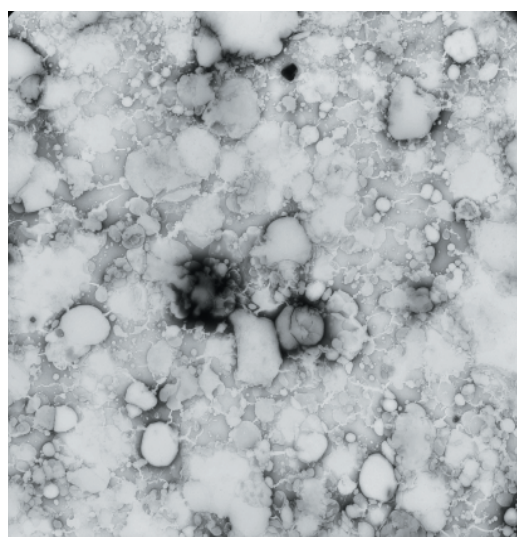


Figura 4. 109. Microfotografía de los liposomas de la fórmula G (75 días, 25-30°C).

Figura 4. 110. Microfotografía de los liposomas de la fórmula G (90 días, 25-30°C).



8. COMPARACIÓN DE ESTABILIDAD DE ARQUEOSOMAS Y LIPOSOMAS.

Con objeto de obtener conclusiones finales, se han comparado los resultados aportados por el estudio de estabilidad de las formulaciones correspondientes a liposomas y arqueosomas de idéntica composición (A, B, C y G).

A continuación, en las siguientes tablas se exponen los resultados obtenidos en este estudio de estabilidad, tanto a temperatura de refrigeración (4-8°C) como a temperatura ambiente (25-30°C). Los datos corresponden a porcentaje de agente captado durante el periodo de estudio (Tabla 4. 88) y porcentaje de agente perdido a lo largo de los 90 días desde la elaboración de las muestras (Tabla 4. 89).

Tabla 4.88. Porcentaje captado (media \pm desviación estándar) por las formulaciones de arqueosomas y liposomas.

Formulación	A			
	4°C		25°C	
	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	59,544 \pm 7,104	66,029 \pm 7,709	59,544 \pm 7,104	66,029 \pm 7,709
15 días	45,740 \pm 7,621	61,452 \pm 7,577	40,960 \pm 7,770	53,765 \pm 7,469
45 días	42,467 \pm 7,787	51,486 \pm 7,671	33,341 \pm 7,428	47,777 \pm 7,425
75 días	42,061 \pm 7,299	23,366 \pm 7,724	25,780 \pm 7,729	17,418 \pm 7,347
90 días	35,137 \pm 7,316	20,701 \pm 7,399	25,114 \pm 7,317	16,336 \pm 7,204

Tabla 4.88. Porcentaje captado (media \pm desviación estándar) por las formulaciones de arqueosomas y liposomas.

Formulación	B			
Temperatura	4°C		25°C	
	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	58,979 \pm 7,523	59,308 \pm 7,677	58,979 \pm 7,523	59,308 \pm 7,677
15 días	49,506 \pm 7,585	55,812 \pm 7,422	46,233 \pm 7,208	54,962 \pm 7,502
45 días	43,886 \pm 7,205	54,421 \pm 7,825	38,411 \pm 7,479	41,018 \pm 7,736
75 días	38,643 \pm 7,470	45,499 \pm 7,767	32,907 \pm 7,442	27,229 \pm 7,302
90 días	38,701 \pm 7,574	42,022 \pm 7,425	31,198 \pm 7,377	14,405 \pm 7,787

Formulación	C			
Temperatura	4°C		25°C	
	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	45,031 \pm 7,525	61,084 \pm 7,601	45,031 \pm 7,525	61,084 \pm 7,601
15 días	34,993 \pm 7,229	54,112 \pm 7,769	31,487 \pm 7,455	40,439 \pm 7,579
45 días	28,359 \pm 7,612	49,555 \pm 7,350	15,294 \pm 6,307	36,345 \pm 7,399
75 días	26,099 \pm 7,418	41,019 \pm 7,744	10,890 \pm 7,330	29,238 \pm 7,774
90 días	25,404 \pm 7,235	29,353 \pm 7,610	10,803 \pm 6,609	21,860 \pm 7,735

Formulación	G			
Temperatura	4°C		25°C	
	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	80,315 \pm 7,429	79,992 \pm 7,676	80,315 \pm 7,429	79,992 \pm 7,676
15 días	78,707 \pm 7,700	76,631 \pm 7,258	77,085 \pm 7,773	72,653 \pm 7,673
45 días	74,275 \pm 7,165	72,035 \pm 7,947	72,566 \pm 7,296	70,219 \pm 7,534
75 días	74,304 \pm 7,667	70,953 \pm 7,346	70,683 \pm 7,621	63,924 \pm 7,728
90 días	72,653 \pm 7,342	63,074 \pm 7,346	67,033 \pm 7,552	54,653 \pm 7,728

Tabla 4.89. Porcentaje de principio activo perdido por las diferentes fórmulas de arqueosomas y liposomas (valor medio).

Formulación	A				B			
Temperatura	4°C		25°C		4°C		25°C	
	Arq	Lip	Arq	Lip	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	0	0	0	0	0	0	0	0
15 días	13,804	4,577	18,584	12,264	9,473	3,496	12,747	4,345
45 días	17,077	14,543	26,203	18,251	15,093	4,886	20,586	18,289
75 días	17,483	42,662	33,764	46,611	20,336	13,809	26,072	32,079
90 días	24,407	45,327	34,430	49,692	20,279	17,285	27,782	44,903

Formulación	C				G			
Temperatura	4°C		25°C		4°C		25°C	
	Arq	Lip	Arq	Lip	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	0	0	0	0	0	0	0	0
15 días	10,038	6,972	13,543	20,646	1,608	3,361	3,230	7,339
45 días	16,672	11,530	29,737	24,740	6,040	6,605	7,749	9,772
75 días	18,931	20,066	34,140	31,847	6,011	9,038	9,632	16,068
90 días	19,627	31,731	34,227	39,225	7,662	16,918	13,282	25,339

El porcentaje de corticoide liberado o perdido por las vesículas lipídicas se determinó por diferencia entre el tanto por ciento captado en el día 0 y el evaluado en los sucesivos días del estudio. De este modo se pudo constatar la estabilidad de los arqueosomas y liposomas a lo largo del tiempo.

8. 1. Fórmula A.

A los resultados obtenidos con esta fórmula de arqueosomas y liposomas, elaboradas únicamente con los lípidos polares totales de *Halobacterium salinarum* CECT 396 o fosfatidilcolina y principio activo, se les realizó un análisis estadístico de la varianza (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo del tiempo. Los resultados se analizaron para cada una de las temperaturas de conservación y también para un determinado tiempo, comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

La tabla 4. 90 resume los porcentajes medios captados por estos arqueosomas y liposomas a lo largo del periodo de estudio y sus desviaciones estándar. La tabla 4. 91 recopila los porcentajes perdidos por los mismos.

A partir de los datos de la tabla 4. 90. se puede comprobar que los liposomas éster captan inicialmente mayor porcentaje del fármaco (66,029%) que los arqueosomas (59,544%). Esta diferencia en el porcentaje captado de fármaco podría deberse a las diferencias estructurales de los lípidos constituyentes de las bicapas lipídicas de ambos tipos de vesículas.

Tabla 4.90. Porcentaje de principio activo captado por las formulaciones A.

Formulación	A			
Temperatura	4°C		25°C	
	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	59,544±7,104	66,029±7,709	59,544±7,104	66,029±7,709
15 días	45,740±7,621	61,452±7,577	40,960±7,770	53,765±7,469
45 días	42,467±7,787	51,486±7,671	33,341±7,428	47,777±7,425
75 días	42,061±7,299	23,366±7,724	25,780±7,729	17,418±7,347
90 días	35,137±7,316	20,701±7,399	25,114±7,317	16,336±7,204

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza=95%)

Tabla 4.91. Porcentaje de BTMdp perdido por arqueosomas y liposomas de las formulaciones A.

Formulación	A					
Temperatura	4°C			25°C		
	Arq	Lip	Diferencia %	Arq	Lip	Diferencia %
0 días	0	0	0	0	0	0
15 días	13,804	4,577	*9,227	18,584	12,264	*6,320
45 días	17,077	14,543	2,535	26,203	18,251	*7,952
75 días	17,483	42,662	*-25,179	33,764	48,611	*-14,847
90 días	24,407	45,327	*-20,921	34,430	49,692	*-15,262

En la tabla 4. 92 se han recopilado los datos correspondientes a la pérdida de esteroide retenido producida a lo largo de los periodos de tiempo a los cuales se ha cuantificado el fármaco encapsulado en ambos tipos de liposomas.

Tabla 4.92. Porcentaje de BTMdp perdido en cada periodo de tiempo por las formulaciones A.

		0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	Arq	13,804	3,273	0,406	6,924
	Lip	4,577	9,966	28,119	2,665
25°C	Arq	18,584	7,619	7,561	0,666
	Lip	12,264	5,987	30,360	1,081

Como se comentó anteriormente en el apartado 6. 1. 1. de este Capítulo, en los arqueosomas conservados en frío se detectó diferencia significativa entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (59,544%) y tras 15 días (45,740%). Por su parte, los liposomas éster presentaron menor pérdida del principio activo encapsulado entre las 24 horas posteriores a la elaboración de los mismos (66,029%) y los 15 días siguientes (61,452%) y la diferencia en el porcentaje de fármaco retenido no fue significativa (apartado 7. 1. 1. del presente Capítulo).

Al comparar la evolución de las muestras a lo largo del estudio de estabilidad se comprobó que los arqueosomas presentaron un periodo de estabilidad entre los 15 y 75 días y la pérdida de principio activo encapsulado en los arqueosomas a lo largo de esos 60 días sólo representó un 3,679% del total encapsulado al elaborar las muestras. En cambio los liposomas elaborados con fosfatidilcolina sufrieron pérdidas mayores que originaron diferencias significativas entre 15 y 45 días y 45 y 75 días, poniendo de manifiesto una mayor inestabilidad de estas vesículas.

En los últimos 15 días del estudio, entre los 75 y 90 días, se produjo la liberación de un 6,924% del dipropionato de betametasona encapsulado en los arqueosomas que resultó estadísticamente significativa con

respecto al porcentaje retenido a los 75 días. Los liposomas, en ese mismo periodo de tiempo, perdieron menor cantidad del principio activo retenido (2,963%) y no supuso diferencia significativa con respecto a la valoración anterior.

El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 24,407% del principio activo captado inicialmente, mientras que en los liposomas la pérdida total del dipropionato de betametasona captado inicialmente fue del 45,327%.

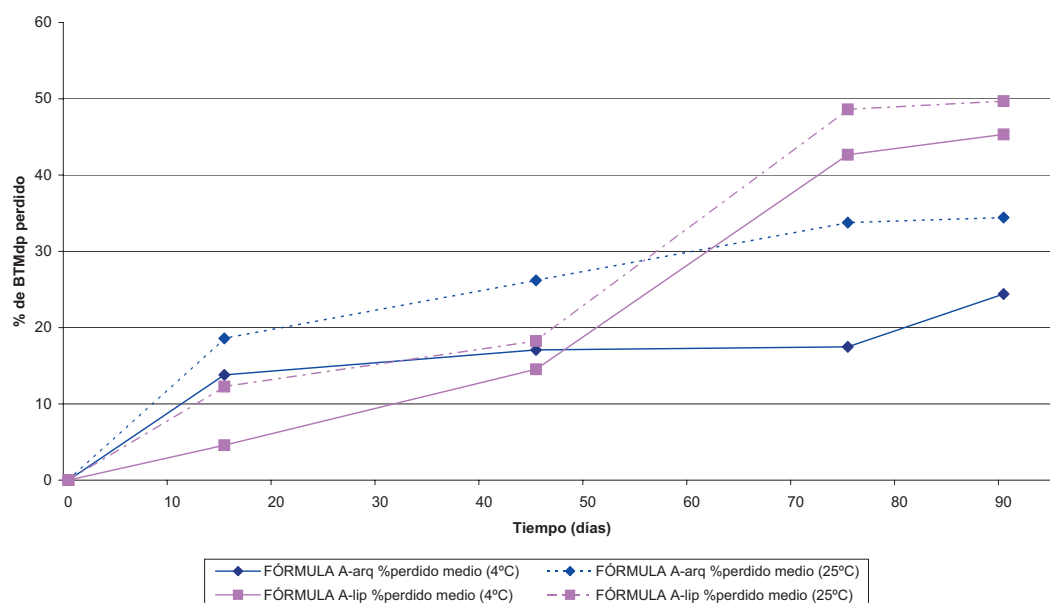
Este mismo procedimiento se siguió para el análisis de los resultados obtenidos con las muestras de liposomas y arqueosomas conservadas a temperatura ambiente, observándose en ambos casos diferencias significativas entre todos los periodos excepto el de los 15 días finales (0 a 15 días, 15 a 45 días y 45 a 75 días).

En todos los casos el porcentaje perdido para los periodos de tiempo estudiados fue superior en las muestras conservadas a temperatura ambiente que en aquellas que estuvieron refrigeradas (Tabla 4. 92).

Tras comparar los cambios en la estabilidad de los arqueosomas y liposomas se compararon entre sí los resultados obtenidos en cada valoración para las muestras conservadas en iguales condiciones de temperatura. Para ello se realizaron análisis estadísticos de los resultados con el test de ANOVA, cuyos resultados se muestran en la tabla 4. 91 expresados como la diferencias en el porcentaje de BTMdp perdido por ambos tipos de liposomas.

Las diferencias detectadas en la pérdida del fármaco captado inicialmente ponen de manifiesto que los arqueosomas presentan mayor estabilidad a largo plazo en esta fórmula ya que, tanto a temperatura ambiente como en frío, las pérdidas son mucho menores. Esto denota que el efecto protector que ejercen los lípidos arqueales se presenta a largo plazo. A corto plazo la estabilidad de los liposomas fue significativamente mejor que en los arqueosomas (Tabla 4. 91 y Gráfica 4. 30).

La gráfica 4. 30 permite comparar la estabilidad de esta formulación a lo largo del tiempo y la influencia de la temperatura de conservación así como la estabilidad de los distintos tipos de vesículas lipídicas.



Gráfica 4.30. Comparación de la estabilidad de las formulaciones A.

8. 2. Fórmula B.

Los resultados obtenidos con esta formulación, elaborada con lípidos, colesterol y dipropionato de betametasona, se analizaron estadísticamente (ANOVA) para establecer posibles diferencias significativas en el porcentaje retenido a lo largo del tiempo. Los resultados se analizaron para cada una de las temperaturas de conservación y también para un determinado tiempo comparando el porcentaje captado a las diferentes temperaturas.

La tabla 4. 93 resume los porcentajes captados por estos arqueosomas a lo largo del periodo de estudio. La tabla 4. 94 expone los porcentajes perdidos por estas vesículas lipídicas durante el estudio.

Tabla 4.93. Porcentaje de principio activo captado por las formulaciones B.

Formulación	B			
	4°C		25°C	
Temperatura	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	58,979±7,523	59,308±7,677	58,979±7,523	59,308±7,677
15 días	49,506±7,585	55,812±7,422	46,233±7,208	54,962±7,502
45 días	43,886±7,205	54,421±7,825	38,411±7,479	41,018±7,736
75 días	38,643±7,470	45,499±7,767	32,907±7,442	27,229±7,302
90 días	38,701±7,574	42,022±7,425	31,198±7,377	14,405±7,787

El porcentaje de principio activo captado inicialmente por los arqueosomas y liposomas fue elevado, aunque inferior (0,565% en los arqueosomas y 6,721% en liposomas) al captado por la fórmula A, lo que podría ser consecuencia de la incorporación de colesterol en las membranas.

Tabla 4.94. Porcentaje de BTMdp perdido por arqueosomas y liposomas de las formulaciones B.

Formulación	B					
	4°C			25°C		
Temperatura	Arq	Lip	Diferencia %	Arq	Lip	Diferencia %
0 días	0	0	0	0	0	0
15 días	9,473	3,496	*5,977	12,746	4,345	*8,401
45 días	15,093	4,886	*10,207	20,568	18,289	2,279
75 días	20,336	13,809	*6,528	26,072	32,079	*-6,006
90 días	20,279	17,285	2,994	27,782	44,903	*-17,121

* Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza=95%)

La tabla 4. 95 recopila los porcentajes medios de fármaco perdidos en cada periodo de tiempo.

Tabla 4.95. Porcentaje de BTMdp perdido en cada periodo de tiempo por las formulaciones B.

		0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	Arq	9,473	5,620	5,241	-0,057
	Lip	3,496	1,391	8,923	3,476
25°C	Arq	12,747	5,653	5,327	1,709
	Lip	4,345	13,944	13,789	12,824

Con las muestras de arqueosomas conservadas a 4-8°C se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (58,979%) y tras 15 días (49,506%), lo cual representó una pérdida de fármaco captado del 9,473%. También se produjo una pérdida estadísticamente significativa en el periodo de tiempo comprendido entre los 15 y 45 días del estudio, cuantificada en el 5,620% del corticoide retenido. En el caso de los liposomas sólo se observó diferencia significativa entre el porcentaje captado entre los 45

y los 75 días, correspondiente a una pérdida de fármaco captado del 8,923%

El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 20,279% del principio activo captado inicialmente por los arqueosomas y en los liposomas la pérdida total de fármaco encapsulado fue del 17,285%. En ambos casos la pérdida es considerablemente menor a la cuantificada en la formulación más sencilla.

Al analizar los resultados obtenidos con las muestras conservadas a temperatura ambiente se determinaron diferencias significativas entre todos los periodos excepto en los últimos 15 días (0 a 15 días, 15 a 45 días y 45 a 75 días).

Al igual que sucedía en ambos tipos de vesículas lipídicas de la fórmula A, el porcentaje perdido para los periodos de tiempo estudiados fue superior en las muestras conservadas a temperatura ambiente que en aquellas que estuvieron refrigeradas. En comparación con la fórmula A, los arqueosomas y liposomas de fórmula B mantenidos a baja temperatura (4-8°C) poseen una estabilidad mayor, con menor difusión del principio activo a través de la pared. Esto puede deberse al efecto ejercido por el colesterol sobre la fluidez de las membranas liposomiales (Yatvin y Lelkes, 1982).

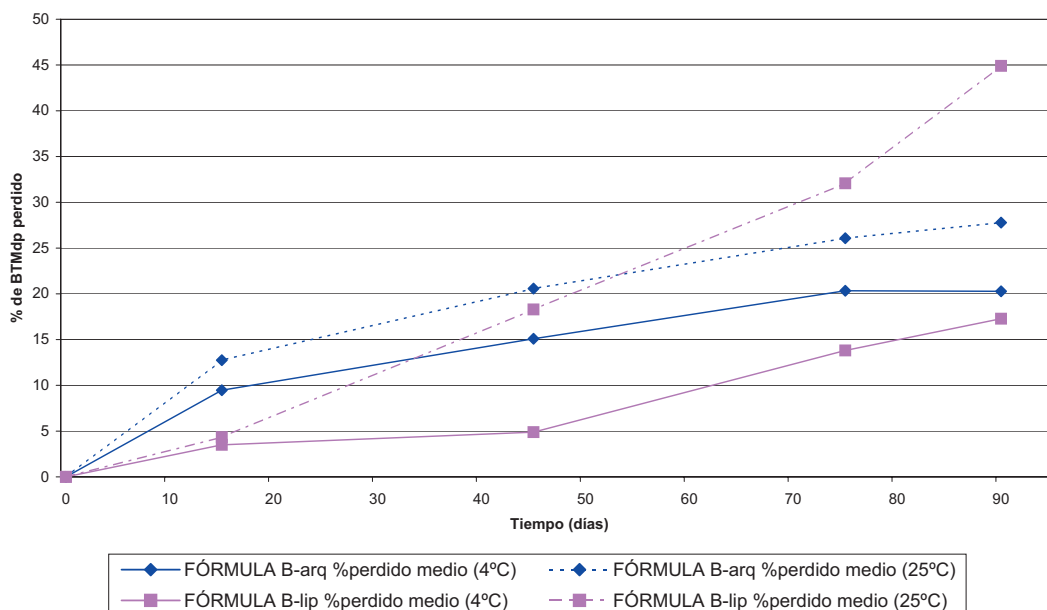
El efecto protector de la integración del colesterol en las membranas resultó más marcado en las muestras conservadas a temperatura ambiente, lo que corrobora el citado beneficio que el colesterol ejerce sobre la

estabilidad. Su efecto se traduciría en un descenso de la permeabilidad del fármaco a través de la bicapa (Mc Mullen *et al.*, 1993).

Una vez comparadas las evoluciones seguidas por ambos tipos de muestras en función del tiempo y la temperatura de conservación se procedió al análisis comparativo de las pérdidas de BTMdp sufridas por los arqueosomas y liposomas de esta formulación para un mismo tiempo y temperatura. Esto permitió establecer la diferencia existente en el porcentaje perdido por los liposomas éter y éster.

Los resultados obtenidos se resumieron en la tabla 4. 94 y revelaron que los liposomas elaborados con fosfatidilcolina son más estables que los arqueosomas durante los 3 meses de estudio cuando son conservados en frío. En cambio, a temperatura ambiente la estabilidad relativa de los liposomas respecto a los arqueosomas decayó desde ser significativamente más estables los liposomas a los 15 días de la elaboración hasta se los arqueosomas los que presentan pérdidas significativamente inferiores a las de los liposomas desde los 75 días (Tabla 4. 94 y Gráfica 4. 31).

La gráfica 4. 31 permite observar la evolución en la pérdida de principio activo durante el estudio de estabilidad de la fórmula B y compararlo con la de la fórmula A.



Gráfica 4.31. Comparación de la estabilidad de las formulaciones B.

8. 3. Fórmula C.

Esta fórmula de los arqueosomas y liposomas fue elaborada con los extractos lipídicos polares totales de *Halobacterium salinarum* CECT 396 o fosfatidilcolina de yema de huevo, colesterol, fármaco y ácido ascórbico como antioxidante al objeto de constatar su posible influencia sobre la estabilidad del sistema. Los resultados experimentales obtenidos se analizaron estadísticamente mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para establecer posibles diferencias en el porcentaje retenido a lo largo del estudio de estabilidad.

La tabla 4. 96 resume los porcentajes captados por estos arqueosomas y liposomas a lo largo del periodo de estudio, mientras que en la tabla 4. 97 se han recopilado los porcentajes perdidos durante el estudio.

Tabla 4.96. Porcentaje de principio activo captado por las formulaciones C.

Formulación	C			
Temperatura	4°C		25°C	
	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	45,031±7,525	61,084±7,601	45,031±7,525	61,084±7,601
15 días	34,993±7,229	54,112±7,769	31,487±7,455	40,439±7,579
45 días	28,359±7,612	49,555±7,350	15,294±6,307	36,345±7,399
75 días	26,099±7,418	41,019±7,744	10,890±7,330	29,238±7,774
90 días	25,404±7,235	29,353±7,610	10,803±6,609	21,860±7,735

Tabla 4.97. Porcentaje de BTMdp perdido por arqueosomas y liposomas de las formulaciones C.

Formulación	C					
Temperatura	4°C			25°C		
	Arq	Lip	Diferencia %	Arq	Lip	Diferencia %
0 días	0	0	0	0	0	0
15 días	10,038	6,972	3,066	13,543	20,646	*-7,102
45 días	16,672	11,530	*5,142	29,737	24,740	*4,997
75 días	18,931	20,066	-1,135	26,072	31,847	*-5,774
90 días	19,627	31,731	*-12,104	27,782	39,225	*-11,443

*Diferencias estadísticamente significativas (nivel de confianza = 95%)

El porcentaje de principio activo captado inicialmente por los arqueosomas fue elevado (45,031%), pero sensiblemente inferior al constatado para las fórmulas A y B (59,544% y 58,979% respectivamente). Los liposomas elaborados con fosfatidilcolina presentaron una captación del dipropionato de betametasona del 61,084%, superior a la de la formulación exenta de vitamina C (59,308%) e inferior a la determinada

Tabla 4.98. Porcentaje de BTMdp perdido en cada periodo de tiempo por las formulaciones C.

		0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	Arq	10,038	6,634	2,260	0,695
	Lip	6,972	4,558	8,536	11,665
25°C	Arq	13,544	16,193	4,404	0,087
	Lip	20,645	4,094	7,107	7,378

en la fórmula A (66,029%).

En las muestras de arqueosomas conservadas a 4-8°C se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (45,031%) y tras 15 días (34,993%), lo cual representó una pérdida de fármaco captado del 10,038%. También se produjo una pérdida estadísticamente significativa en el periodo de tiempo comprendido entre los 15 y 45 días del estudio, cuantificada en el 6,634% del corticoide retenido. Durante el resto del estudio de estabilidad no se detectaron diferencias significativas y la pérdida de principio activo encapsulado en los arqueosomas a lo largo de esos 45 días representó un 2,955%, lo cual denota un periodo de alta estabilidad en estos arqueosomas, posiblemente debido a la acción sinérgica del colesterol y ácido ascórbico presentes en la composición de estos liposomas éter. En los liposomas éster se determinaron diferencias significativas entre 0 y 15 días, 45 y 75 días y entre 75 y 90 días, mostrando mayor inestabilidad que los arqueosomas ya que las pérdidas se van produciendo progresivamente (Tabla 4. 98).

El porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses fue del 19,627% del principio activo captado

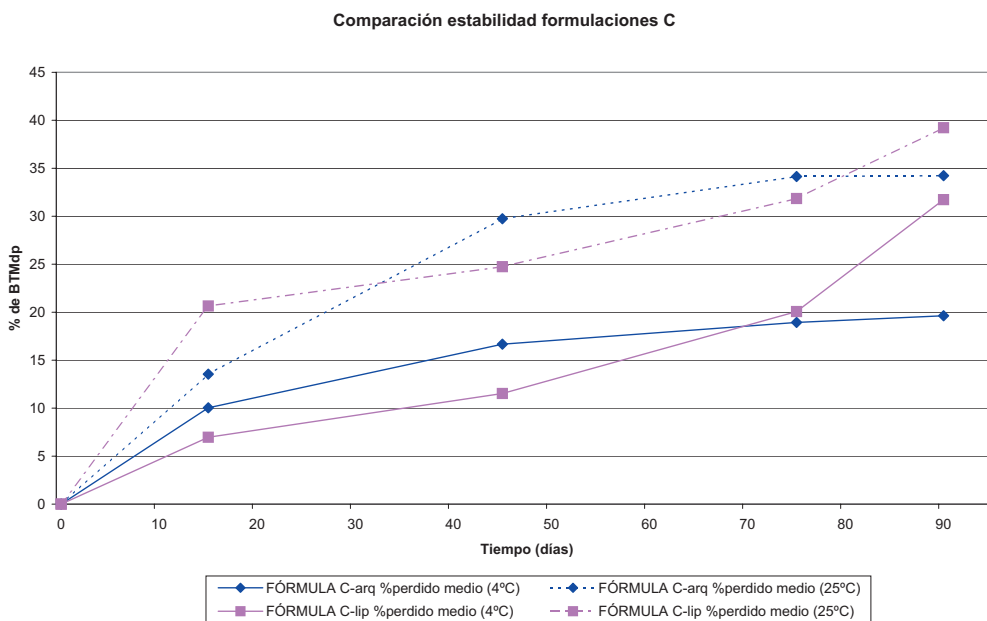
inicialmente. En el caso de los liposomas la pérdida total de principio activo fue del 31,731%. De este modo quedó patente la mayor estabilidad de los arqueosomas.

El análisis de los resultados obtenidos con las muestras de ambos tipos de vesículas lipídicas conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) puso de manifiesto diferencias significativas en los mismos periodos que en el caso anterior (conservación de la muestra en condiciones de refrigeración), si bien los porcentajes perdidos fueron superiores en todos los tiempos muestreados (Tabla 4. 97). El porcentaje perdido por los arqueosomas y liposomas al final de este ensayo de estabilidad fue del 34,227% y 39,984% respectivamente, lo cual revela una gran influencia de la temperatura de conservación de las muestras sobre la estabilidad de las vesículas.

La incorporación de colesterol y un antioxidante a esta formulación de arqueosomas permitió reducir la pérdida del dipropionato de betametasona retenido por los mismos inicialmente.

Siguiendo el mismo protocolo que en las formulaciones analizadas anteriormente, se establecieron las diferencias porcentuales en las pérdidas de principio activo en cada una de las cuantificaciones realizadas para el mismo tiempo y temperatura por ambos tipos liposomiales. Estos cálculos pusieron de manifiesto la mayor estabilidad de los liposomas éster que incorporaban colesterol y vitamina C en su composición entre la elaboración y los 45 días, siendo en este momento significativa la diferencia entre los porcentajes perdido por arqueosomas y liposomas. A los 75 días del estudio, los arqueosomas eran ligeramente más estables que los liposomas y mostraron una gran estabilidad durante el periodo final del estudio, revelando una diferencia en el porcentaje

de fármaco perdido muy superior y estadísticamente significativo en los liposomas respecto a los arqueosomas (Tabla 4. 97 y Gráfica 4. 32).



Gráfica 4.32. Comparación de la estabilidad de las formulaciones C.

La gráfica 4. 32 permite constatar la evolución en la pérdida de principio activo durante el estudio de estabilidad de la fórmula C y compararla con las de las fórmulas A y B.

8. 4. Fórmula G.

Esta fórmula de arqueosomas y liposomas fue elaborada con lípidos, colesterol, fármaco y ácido ascórbico y acetato de α -tocoferol como antioxidantes. Los resultados experimentales obtenidos se analizaron de igual forma que en los casos anteriores.

Las tablas 4. 99 y 4. 100 resumen los porcentajes captados y perdidos por estos liposomas de la fórmula G a lo largo del periodo de estudio.

Tabla 4.99. Porcentaje de principio activo captado por las formulaciones G.

Formulación	G			
	4°C		25°C	
	Arq	Lip	Arq	Lip
0 días	80,315±7,429	79,992±7,676	80,315±7,429	79,992±7,676
15 días	78,707±7,700	76,631±7,258	77,085±7,773	72,653±7,673
45 días	74,275±7,165	72,035±7,947	72,566±7,296	70,219±7,534
75 días	74,304±7,667	70,953±7,346	70,683±7,621	63,924±7,728
90 días	72,653±7,342	63,074±7,346	67,033±7,552	54,653±7,728

* Diferencias significativas estadísticamente (nivel de confianza = 95%).

Tabla 4.100. Porcentaje de BTMdp perdido por arqueosomas y liposomas de las formulaciones G.

Formulación	G					
	4°C			25°C		
	Arq	Lip	Diferencia %	Arq	Lip	Diferencia %
0 días	0	0	0	0	0	0
15 días	5,142	3,361	1,782	3,230	7,339	*-4,109
45 días	8,821	6,605	2,216	7,749	9,772	-2,023
75 días	8,966	9,038	-0,072	9,632	16,068	*-6,436
90 días	14,789	16,918	-2,129	13,282	25,339	*-12,057

* Diferencias significativas estadísticamente (nivel de confianza = 95%).

El porcentaje de principio activo captado inicialmente por los arqueosomas y liposomas fue el más elevado de todos los obtenidos en este estudio (80,315% y 79,992% respectivamente) (Tabla 4. 99).

A continuación, en la siguiente tabla se reúnen los porcentajes perdidos medios del principio activo captado por cada tipo de liposomas en cada periodo de tiempo del estudio de estabilidad (Tabla 4. 101).

Tabla 4.101. Porcentaje de BTMdp perdido en cada periodo de tiempo por las formulaciones G.

		0-15 días	15-45 días	45-75 días	75-90 días
4°C	Arq	1,608	4,403	0,029	1,622
	Lip	3,361	4,596	1,082	7,880
25°C	Arq	3,230	4,519	1,883	3,650
	Lip	7,339	2,433	6,296	9,270

Al conservar las muestras a 4-8°C se observó diferencia significativa entre el porcentaje captado por los arqueosomas en las primeras 24 horas tras la elaboración (80,315%) y tras 90 días (72,653%), que representó una pérdida de fármaco captado del 7,662%. (Tabla 4. 100), correspondiente al porcentaje total perdido al final del estudio de estabilidad realizado durante 3 meses. En los liposomas éster se observaron diferencias significativas entre el porcentaje captado en las primeras 24 horas tras la elaboración (79,992%) y tras 45 días (72,035%), que representó una pérdida de fármaco captado del 7,957%. También se produjo una pérdida estadísticamente significativa en el periodo de tiempo comprendido entre los 75 y 90 días del estudio, cuantificada en el 7,880% del corticoide retenido.

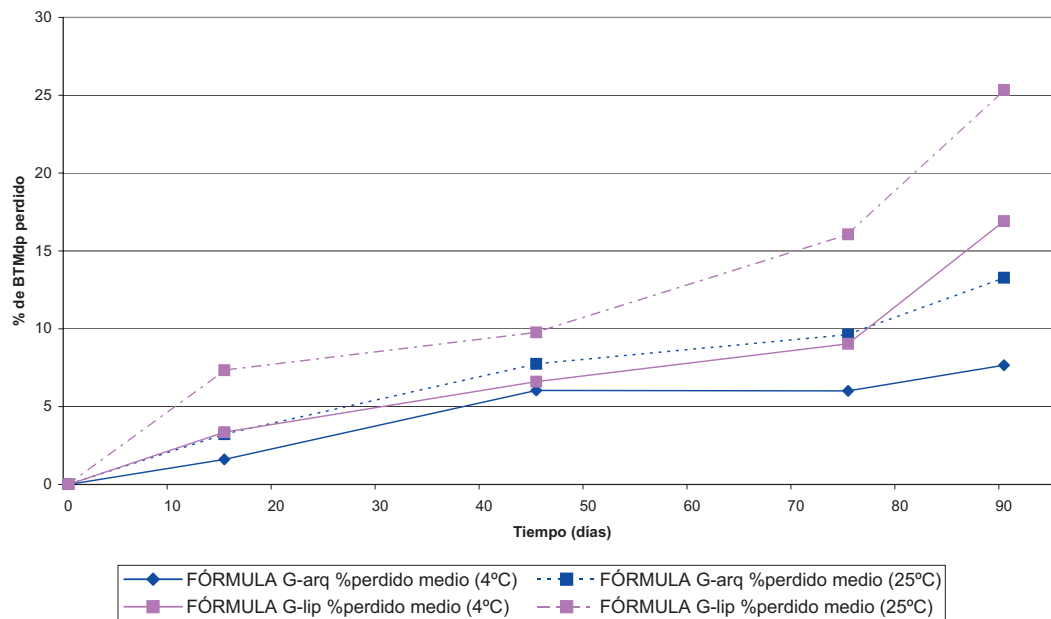
El análisis de los resultados obtenidos con las muestras de arqueosomas conservadas a temperatura ambiente (25-30°C) reveló diferencias significativas en los periodos comprendidos entre 0 y 45 días y 15 y 75 días. El porcentaje perdido al final de este ensayo

de estabilidad fue del 13,282%, lo cual manifiesta la influencia de la temperatura de conservación de las muestras sobre la estabilidad de los liposomas éter. En los liposomas éster se detectó un periodo de relativa estabilidad en el tiempo comprendido entre los 15 y 45 días, pero durante el resto del estudio de estabilidad las diferencias en el porcentaje perdido son significativas, mostrando la menor estabilidad de los liposomas con respecto a los arqueosomas en iguales condiciones de conservación.

La realización de los correspondientes tests de ANOVA a los resultados de las cuantificaciones del principio activo liberado por los liposomas éter y éster de esta formulación obtenidos durante los 3 meses de estudio permitió determinar la existencia de diferencias significativas entre ellos para un mismo tiempo y temperatura. Los resultados de los tests estadísticos se exponen en la tabla 4. 100.

En la citada tabla se observa que las diferencias existentes entre los arqueosomas y liposomas de la fórmula G son muy pequeñas y en ningún caso significativas. Inicialmente los liposomas conservados a 4°C resultaron levemente más estables que los arqueosomas, pero desde los 75 días mostraron pérdidas inferiores los liposomas éter. A temperatura ambiente las muestras de los arqueosomas fueron más estables que las de los liposomas durante el estudio completo, presentando diferencias significativas en todas las valoraciones realizadas excepto la de los 45 días (Tabla 4. 100 y Gráfica 4. 33)

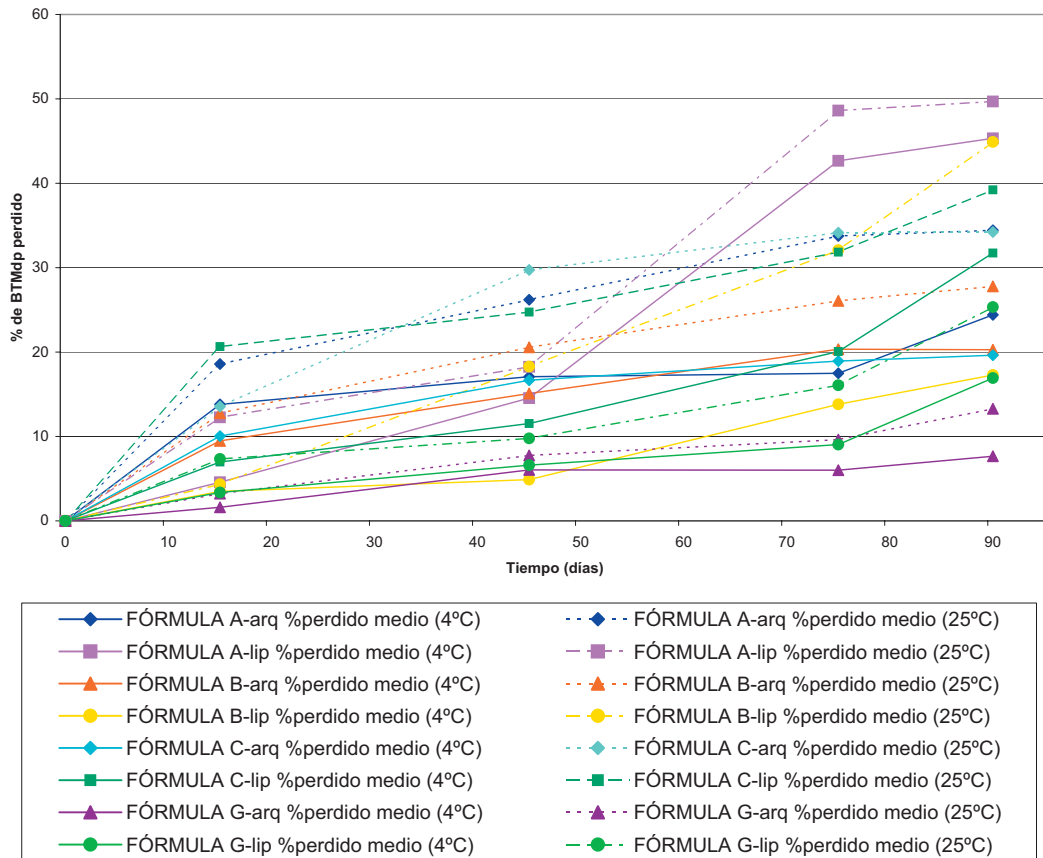
La gráfica 4. 33 permite examinar la evolución en la pérdida de principio activo durante el estudio de estabilidad de la fórmula G de ambos tipos de liposomas.



Gráfica 4.33. Comparación de la estabilidad de las formulaciones G.

Para finalizar este apartado relativo a la estabilidad de los liposomas éster y éter se incluye un gráfica comparativa de las estabilidades halladas para cada una de las fórmulas elaboradas y a las dos temperaturas de conservación (Gráfica 4. 34). Únicamente se han considerado en este estudio final formulaciones de igual composición.

Los arqueosomas de la formulación A aportaron ventajas importantes a partir de los 75 días, que fueron más notables cuando la conservación se llevó a cabo en frío. La protección se empezó a notar desde los 45 días en que no existió diferencia significativa entre arqueosomas y liposomas, cuando a los 15 días sí la hubo a favor de los liposomas. A 25-30°C la diferencia se estableció desde los 75 días.



Gráfica 4.34. Comparación general de la estabilidad de arqueosomas y liposomas.

Respecto a las formulaciones B de ambos tipos de liposomas se observó un efecto beneficioso de los lípidos éter únicamente cuando las muestras se conservaron a temperatura ambiente y dicho efecto fue superior a los 75 y 90 días en que se establecieron diferencias significativas entre arqueosomas y liposomas. Refrigeradas, resultaron más estables las muestras de liposomas ya que se detectaron diferencias significativas entre los 15 y 75 días.

En las muestras refrigeradas de la formulación C se detectó una menor pérdida de principio activo en los arqueosomas desde los 75 días. A los 15 y 45 días del estudio de estabilidad, las pérdidas en liposomas fueron inferiores y resultó significativa la diferencia a los 15 días. Más adelante la estabilidad de los arqueosomas mejoró, llegando a superar la de los liposomas y alcanzando una diferencia significativa a los 90 días. A temperatura ambiente las diferencias fueron significativas en todos los tiempos, destacando la pérdida sufrida por los liposomas a los 45 días que fue casi un 5% menor que en los arqueosomas.

La refrigeración de las muestras de la fórmula G permitió obtener resultados muy satisfactorios con ambos tipos de vesículas y no se establecieron diferencias significativas durante los 3 meses del estudio. Además se confirmó un efecto que se ha repetido en las formulaciones anteriores: las pérdidas de principio activo al inicio del estudio fueron menores en liposomas que en arqueosomas. En cambio destaca en las muestras conservadas a temperatura ambiente una mayor estabilidad de los arqueosomas desde el inicio del estudio.

Como conclusión de esta comparación entre arqueosomas y liposomas cabe destacar que la formulación A de los arqueosomas conservada en frío permite reducir en mayor medida las pérdidas del fármaco retenido inicialmente y su efecto se observó desde los 45 días. Asimismo las muestras de la formulación B conservadas a temperatura ambiente confirmaron el efecto protector de la incorporación de colesterol en la matriz lipídica de los arqueosomas. En todas las formulaciones y

temperaturas de conservación (excepto la G a 25°C), la estabilidad de los liposomas al inicio del estudio es superior que en los arqueosomas mientras que al avanzar el estudio se invierte esta situación. Esto permitiría concluir que la estabilidad de los liposomas éter es mejor a largo plazo y la de los liposomas elaborados con fosfatidilcolina es mayor a corto plazo. No obstante sería necesario realizar estudios de estabilidad de mayor duración para confirmar este aspecto.

V. Conclusiones.

1.- El estudio de la capacidad formadora de arqueosomas y las características de los mismos ha permitido preseleccionar cuatro cepas:

- *Haloarcula californiae* ATCC 33799,
- *Halobacterium salinarum* CECT 396,
- *Halococcus morrhuae* NCMB757 y
- *Halorubrum coriense* DSM 10284.

Por sus propiedades se ha elegido *Halobacterium salinarum* CECT 396 para desarrollar las siguientes investigaciones planteadas al inicio de este trabajo.

2.- La validación del método espectrofotométrico permitió confirmar la linealidad, precisión y exactitud del mismo en el intervalo de concentraciones empleadas.

3.- El diseño optimizado de las formulaciones de arqueosomas y liposomas permitió concluir que la proporción “lípidos: principio activo” más idónea fue 15:1 en los arqueosomas y 40:1 en los liposomas. En ambos casos el tiempo de agitación seleccionado fue el menor.

4.- Los resultados del estudio previo de encapsulación del fármaco han sido bastante satisfactorios tanto para los arqueosomas como para los liposomas.

Los porcentajes de captación medios han oscilado entre un mínimo del 42,619% (formulación F de liposomas) y un máximo del 80,315% (formulación G de arqueosomas).

5.- La caracterización mediante tinción negativa de las muestras de las diversas formulaciones y microscopía electrónica de transmisión confirmó la idoneidad del método de elaboración normalizado.

Mediante esta técnica se ha constatado la formación de vesículas lipídicas multilaminares portadoras del principio activo en todas las formulaciones ensayadas.

El diámetro medio de las vesículas formadas ha sido muy reducido, inferior a 1 μm en todos los casos.

6.- Comparativamente, las fórmulas A y B de arqueosomas presentaron un tamaño medio inicial inferior al detectado en los liposomas y mayor grado de homogeneidad.

7.- El análisis de la estabilidad de los arqueosomas ha puesto de manifiesto que la fórmula de elección sería la G, elaborada con lípidos, colesterol, y la combinación de antioxidantes, ya que sus pérdidas de principio activo fueron muy bajas tanto en las muestras que se conservaron refrigeradas como en aquellas mantenidas a temperatura ambiente, haciéndola muy idónea para su posterior aplicación. A lo largo del estudio de estabilidad en esta formulación se observó poca variación del tamaño de partícula y un bajo grado de agregación.

8.- Los liposomas elaborados empleando fosfatidilcolina de yema de huevo presentaron estabilidades variables según la composición de la formulación. La elevada captación inicial y la gran estabilidad mostrada por la fórmula G, independientemente de la temperatura, la hacen también idónea para su aplicación.

La caracterización de los liposomas de la fórmula G a temperatura ambiente puso de manifiesto mayores cambios morfológicos que en el caso de los arqueosomas de igual composición.

9.- Comparativamente, la estabilidad a largo plazo de los arqueosomas es mayor que la de los liposomas en todas las formulaciones estudiadas.

10.- Por último, todos nuestros resultados nos llevan a considerar las posibilidades de uso de los arqueosomas obtenidos de arqueas halófilas extremas como nuevo sistema de vectorización de fármacos.

VI. Bibliografía

(1958). *Documenta Geigy. Tablas científicas (Quinta edición)*, Edición edn. Barcelona: S.A.D.A.G.

(2004). *Catálogo de Especialidades Farmacéuticas*, Edición edn. Madrid: C.G.C.O.F.

Alving, C. R. (1986). Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. *Parasitol. Today* **2**, 101-107.

Allison, L. E. (1973). *Suelos salinos y sódicos*, Edición edn. México: Limusa Ed.

Antón, J., Meseguer, I. y Rodríguez-Valera, F. (1988). Production of an extracellular polysaccharide by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Env. Microbiol.* **54**, 2381-2386.

Antón, J., García-Lillo, J. A., Meseguer, I. y Rodríguez-Valera, F. (1989). Biopolymer production by *Haloferax mediterranei*. En *General and applied aspects of halophilic microorganisms*, pp. 373-388. Editado por F. Rodríguez-Valera. New York: Plenum Press.

Ash, M. y Ash, I. (1995). *Handbook of pharmaceutical additives*, Edición edn. Aldershot.

Balch, W. E., Fox, G. E., Magrum, L. J., Woese, C. R. y Wolfe, R. S. (1979). Methanogens: reevaluation of a unique biological group. *Microbiol. Rev.* **43**, 260-

Bamberg, E., Hegeman, P. y Oesterhelt, D. (1984). Reconstitution of the light-driven electrogenic ion pump halorhodopsin into black lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **773**, 53-60.

Bangham, A. D., Standish, M. M. y Watkins, J. C. (1965). Diffusion of swollen lipids. *J. Mol. Biol.* **13**, 238-252.

Bangham, A. D., Hill, M. W. y Miller, N. G. A. (1974). Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. En *Methods in membrane biology*, pp. 1-68. Editado por K. E.D. New York: Plenum Press.

Behl, C. R., Bellantone, N. H. y Flynn, G. L. (1987). Influence of age on percutaneous absorption of drug substances. En *Transdermal delivery of drugs*, pp. 183-212. Editado por A. F. Kydonieus y B. Berrer. Boca Raton, Florida: CRC Press.

Ben-Mahrez, K., Thierry, D., Sorokine, I., Danna-Müller, A. y Kohiyama, M. (1988). Detection of circulating antibodies against c-myc protein in cancer patient sera. *British J. Canc.* **57**, 529-534.

Berrocal, M. C., Bujan, J., García -Honduvilla, N. y Abeger, A. (1998). Comparison of the effects of dimyristoyl and soya phosphatidylcholine liposomes on human fibroblasts. *Drug Deliv* **7**, 37-44.

Bertrand, J. C., Almallah, M., Acquaviva, M. y Mille, G. (1990). Biodegradation of hydrocarbons by an extremely halophilic archaeobacterium. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**, 260-263.

Betageri, G. V., Jenkins, S. A. y Parsons, D. L. (1993). *Liposome drug delivery system*, Edición edn. Lancaster, P.A.: Technomic, Ed.

Betlach, M., Pfeifer, F., Friedman, J. y Boyer, H. W. (1983). Bacterio-opsin mutants of *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1416.

Betlach, M., Friedman, J., Boyer, H. W. y Pfeifer, F. (1984). Characterization of a halobacterial gene affecting bacterio-opsin gene expression. *Nucl. Acid. Res.* **12**, 7949.

Bhupathiraju, V. K., Oren, A., Sharma, P. K., Tanner, R. S., Woese, C. R. y McInerney, M. J. (1994). *Haloanaerobium salsugo* sp. nov., moderately halophilic, anaerobic bacterium from a subterranean brine. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 565-572.

Bibikov, S. I., Grishanin, R. N., Kaulen, A. D., Marwan, W., Oesterhelt, D. y Skulachev, V. (1993). Bacteriorhodopsin is involved in halobacterial photoreception. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 9446-9450.

Bickel-Sandkötter, S., Gärtner, W. y Dane, M. (1996). Conversion of energy in

halobacteria: ATP synthesis and phototaxis. *Arch. Microbiol.* **166**, 1-11.

Bligh, E. G. y Dyer, W. J. (1959). *Canadian Journal of Biochem, and Physiol.* **31**, 911.

Brock, T. D. (1969). Microbial growth under extreme conditions. *XIX Symposia of the Society for General Microbiology*, 15-41.

Bula, D. y Ghaly, E. S. (1995). Liposome delivery systems containing ibuprofen. *Drug development and industrial pharmacy* **21**, 1621-1629.

Bullock, C. (2000). The Archaea- A biochemical perspective. *Biochemistry and Molecular Biology Education* **28**, 186-191.

Canto, G. S., Dalmora, S. L. y Oliveira, A. G. (1999). Piroxicam encapsulated in liposomes: characterization and in vivo evaluation of topical anti-inflammatory effect. *Drug development and industrial pharmacy* **25**, 1235-1239.

Caraballo, I., Alvarez-Fuentes, J., Melgoza, L. M., Millán, M., Holgado, M. A., Rabasco, A. M. y Fernández-Arévalo, M. (1998). Validation study of the conductometrical analysis. Application to drug release studies from controlled release systems. *J. Pharm and Biomed Analysis* **18**, 281-285.

Casiano, C., Matheson, A. T. y Traut, R. R. (1990). Occurrence in the archaeobacterium *Sulfolobus solfataricus* of a ribosomal protein complex

corresponding to *Escherichia coli* (L7/L12) 4L10 and eukaryotic (P1)2 (P2)2P0. *J. Biol. Chem.* **265**, 18757-18761.

Cayol, J. L., Ollivier, B., Soh, A. L. A., Fardeau, M. L., Ageron, E., Grimont, P. A. D., Presier, G., Guezennec, Magot, M. y García, J. L. (1994). *Haloicola saccharolytica* subsp. *senegalensis* subsp. nov., isolated from the sediments of a hypersaline lake and emended description of *Haloicola saccharolytica*. *J. Syst. Bacteriol.* **44**, 805-811.

Cervantes, L. A. y Olivares, J. (1976). Estudio microbiológico de un suelo salino "El Salitre". *Rev. Lat. Microbiol.* **18**, 73-76.

Cevc, G. y Blume, G. (1992). Lipid vesicles penetrate intact into skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* **1104**, 226-232.

Cevc, G., Blume, G. y Schatzlein, A. (1997). Transfersomes mediated transepidermal delivery improves the regio-specificity and biological-activity of corticosteroids in vivo. *Journal of controlled release* **45**, 211-216.

Clares, B. y Medina, M. M. (2003). Efecto antioxidante de la vitamina E en la estabilidad química de los liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona. En *VI Congreso de SEFIG y III Jornadas de Tecnología Farmacéutica*, pp. 81-84. Granada.

Clarke, E. G. C. (1986). *Isolation and identification of drugs*, Edición edn: The pharmaceutical Society of Great Britain.

Claus, D., Fahmy, F., Rolf, H. J. y Tosunoglu, N. (1983). *Sporosarcina halophila* sp.nov., an obligate, slightly halophilic bacterium from salt marsh soils. *Syst. Appl. Microbiol.* **4**, 496-506.

Collins, M. D. (1985). Structure of thermoplasmaquinone from *Thermoplasma acidophilum*. *FEMS Microbiol. Lett* **28**, 21-23.

Collins, M. D., Ross, H. N. R., Tindall, B. J. y Grant, W. D. (1981). Distribution of isoprenoid quinones in halophilic bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* **50**, 559-565.

Comita, P. B. y Gagosian, R. B. (1983). Membrane lipid from Dead Sea hydrothermal vent methanogen: a new macrocyclic glycerol diether. *Sci.* **222**, 1329-1331.

Conlan, J. W., Krishnan, L., Willick, G. E., Patel, G. B. y Sprott, G. D. (2001). Immunization of mice with lipopeptide antigens encapsulated in novel liposomes prepared from the polar lipids of various *Archaeobacteria* elicits rapid and prolonged specific protective immunity against infection with the facultative intracellular pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Vaccine* **19**, 3509-3517.

Cooper, D. G. (1986). Biosurfactants. *Microbiolo. Sci.* **3**, 145-149.

Coran, D., Gruenberg, J., Knupfer, A. L., Buri, P. y Deshusses, J. (1980).

Interactions liposomes/trypanosomes (Cita muy rara).

Crommelin, D. J. A., Slaats, N. y Van Bloois, L. (1983). Preparation and characterization of doxorubicin-containing liposomes. *Int. J. Pharm* **16**, 79-92.

Chang, E. L. (1994). Unusual thermal stability of liposomes made from bipolar tetraether lipids. *Biochemistry and Biophysical research communications* **202**, 673-679.

Choquet, C. G., Patel, G. B. y Sprott, G. D. (1996). Heat sterilization of archaeal liposomes. *Canadian Journal of Microbiology*, 183-186.

Choquet, C. G., Patel, G. B., Beveridge, T. J. y Sprott, G. D. (1992). Formation of Unilamellar Liposomes from Total Polar Lipid Extracts of Methanogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2894-2900.

Choquet, C. G., Patel, G. B., Beveridge, T. J. y Sprott, G. D. (1994). Stability of pressure-extruded liposomes made from archaeobacterial ether lipids. *Applied and Environmental Microbiology*, 375-384.

Daniels, L. y Zeikus, J. G. (1978). One-carbon metabolism in methanogenic bacteria: analysis of short-term fixation products of $^{14}\text{CO}_2$ and $^{14}\text{CH}_3\text{OH}$ incorporated into whole cells. *J. Bacteriol.* **136**, 75-84.

Danson, M. J. (1988). Archaeobacteria: the comparative enzymology of their central metabolic pathways. *Adv. Microbiol. Physiol.* **29**, 165-231.

Danson, M. J. y Hough, D. W. (1992a). The enzymology of archaeobacterial pathways of central metabolism. En *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*. Editado por M. J. Danson, D. W. Hough y G. G. Lunt. London Biochem. Soc. Symp.: Portland Press.

Danson, M. J., Hough, D. W. y Lunt, G. G. (1992b). The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology. En *Biochemical society Symposia*.

DasSarma, S., Damerval, T., Jones, J. G. y Tandeau De Marsac, N. (1987). A plasmid-encoded gas vesicle gene in *Halobacterium halobium*. *Molec. Microbiol.* **1**, 365-370.

Davis, J. S. (1974). Importance of microorganisms in salt production. En *Proc. 4th Symp. on Salt*, pp. 369-372. Editado por A. L. Coogan. Cleveland: Northern Ohio Geological Society.

Davis, J. S. (1978). Biological communities in a nutrient enriched salina. *Aquat. Bot.* **4**, 23-42.

Davis, S. S. (1981). Hunt for the "heineken factor". *Pharm. Int.* **3**, 41-45.

De Dekker, P. (1983). Australian salt lakes: their history, chemistry and biota- a

review. *Hydrobiol* **105**, 231-234.

De Gier, J., Mandersloot, J. G. y Van Deenen, L. L. M. (1969). The role of cholesterol in lipid membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **173**, 143-145.

De Rosa, M., Gambacorta, A. y Gliozzi, A. (1986). Structure, biosynthesis, and physicochemical properties of archaeobacterial lipids. *Microbiol. Rev.* **50**, 70-80.

De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B. y Grant, W. D. (1983). Cita rarísima, buscarla en el laboratorio, internet.

De Rosa, M., Trincone, A., Nicolaus, B. y Gambacorta, A. (1991). Archaeobacteria: lipids, membrane structures, and adaptation to environmental stress. En *Life under extreme conditions*, pp. 61-87. Editado por G. Di Prico: Springer-Verlag.

De Rosa, M., Gambacorta, A., Nicolaus, B., Ross, H. N. R., Grant, W. D. y Bu'Lock, J. D. (1982). An asymmetric archaeobacterial diether lipid from alkaliphilic halophiles. *Journal of General Microbiology* **128**, 343-348.

Del Moral, A., Quesada, E. y Ramos-Cormenzana, A. (1987). Distribution and types of bacteria isolated from an island saltern. *Ann. Inst. Pasteur/ Microbiol.* **138**, 59-66.

Dennis, P. (1993). The molecular biology of halophilic archaeobacteria. En *The*

biology of halophilic bacteria, pp. 255-287. Editado por R. H. Vreeland y I. H. Lawrence: CRC Press Boca Raton.

Domenech, J., Martinez, J. y Pla, J. M. (1998). Absorci43?n percutánea. Procesos y dispositivos. En *Biofarmacia y Farmacocinética*, pp. 407-419.

Dousset, N. y Douste-Blazy, L. (1985). Méthodes de préparation des liposomes. En *Les liposomes: Applications thérapeutiques*, pp. 41-67. Editado por F. Puissieux y J. Delattre. Paris: Technique et Documentati43n (Lavoisier).

Dufourc, J. (1985). Physico-chimie des phospholipides. En *Les liposomes, applications thérapeutiques*, pp. 1-10. Editado por F. Puissieux y J. Delattre. Paris.

Duschl, A. y Wagner, G. (1986). Primary and secondary chloride transport in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **168**, 548-552.

Duschl, A., Lanyi, J. K. y Zimanyi, L. (1990). Properties and photochemistry of halorhodopsin from the haloalkalophile, *Natronobacterium pharaonis*. *J. Biol. Chem.* **265**, 1261-1267.

Ebert, K. y Goebel, W. (1985). Conserved and variable regions in the chromosomal and extrachromosomal DNA of halobacteria. *Mol. Gen. Genet.* **200**, 96-102.

Ebert, K., Goebel, W. y Pfeifer, F. (1984). Homologies between heterogeneous extrachromosomal DNA populations of *Halobacterium halobium* and four new isolates. *Mol. Gen. Genet.* **194**, 91-97.

Egbaria, K., Ramachandran, C. y Weiner, N. (1990). Topical application of liposomally entrapped cyclosporin evaluated by *in vitro* diffusion studies with human skin. *Skin Pharmacol.* **4**, 21-28.

Ekiel, I., Sprott, G. D. y Smith, I. C. P. (1986). Mevalonic acid is partially synthesized from amino acids in *Halobacterium cutirubrum*. A ¹³C-NMR study. *J. Bacteriol.* **166**, 559-564.

Elias, P. M. (1991). Epidermal barrier function: Intercellular lamellar lipid structures, origin, composition and metabolism. *J. Control. Release* **15**, 199-208.

Fairbrother, J. E. (1979). Laser light scattering techniques. *Pharm. J.* **223**, 651.

Fang, J. Y., Lin, H. H., Hsu, L. R. y Tsai, Y. H. (1997). Characterization and stability of various liposome-encapsulated enoxacin formulations. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1504-1509.

Fang, J. Y., Hong, C. T., Chiu, W. T. y Wang, Y. Y. (1999). Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *J. Control. Release* **60**, 1-10.

Filipek, J., Uhrikova, D., Slosarcik, P. y Balgavy, p. (2001). Effect of

cholesterol on egg yolk phosphatidylcholine peroxidation in multilamellar liposomes. *Pharmazie* **56**, 953-957.

Florez, J., Armijo, J. A. y Mediavilla, A. (1993). *Farmacología humana*, Edición edn. Barcelona: Científicas Técnicas.

Foldvari, M., Gesztes; A y Mezei, M. (1990). Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electron microscopic studies. *J. Microencapsulation* **7**, 479-489.

Forterre, P., Elie, C. y Kohiyama, M. (1984). Aphidicolin inhibits growth and DNA synthesis in halophilic archaeobacteria. *J. Bacteriol.* **159**, 800-802.

Fox, G. E., Stackebrandt, E., Hespell, R. B., Gibson, J., Maniloff, J., Dyer, T. A., Wolfe, R. S., Balch, W. E., Tanner, R. S., Magrum, L. J., Zablen, L. B., Blakemore, R., Gupta, R., Bonem, L., Lewis, B. J., Sthal, D. A., Leuhrsens, K. R., Chen, K. N. y Woese, C. R. (1980). The phylogeny of prokariotes. *Sci.* **209**, 457-463.

Fraser, H. M., Sandow, J., Seidel, H. R. y Lunn, S. F. (1989). Controlled release of a GnRH agonist from a polyhydroxybutyric acid implant: reversible suppression of the menstrual cycle in the macaque. *Acta Endocrinol.* **121**, 841-848.

Fredickson, H. L., de Leeuw, J. W., Tas, A. C., van der Greef, J., La Vos, G. F. y Boon, J. J. (1989). Fast atom bombard (tandem) mass spectrometric

analysis of intact polar ether lipids extracted from the extremely halophilic archaeobacterium *Halobacterium cutirubrum*. *Biomed. Environ. Mass Spectrom* **18**, 96-105.

Fresno, M., Ramirez, A. y Jimenez, M. M. (2001). *Ciencia y Tecnología Farmacéutica* **11**, 3-18.

Fresta, M. y Puglisi, G. (1997). Corticosteroid dermal delivery with skin-lipid liposomes. *J. Controlled Release* **44**, 141-151.

Frokjaer, S., Hjorth, E. y Worts, O. (1982). Stability and storage of liposomes. En *Optimization of drug delivery*, pp. 384-397. Editado por H. Bundgaard, A. B. Hansen y H. Kofod. Munksgaard. Copenhagen: Alfred Benzon Symposium Series.

Fujiwara, S. (2002). Extremophiles: Developments of their special functions and potential resources. *Journal of bioscience and bioengineering* **94**, 518-525.

Gal, S., Pinchuk, I. y Lichtenberg, D. (2003). Peroxidation of liposomal palmitoyl linoleoylphosphatidylcholine (PLPC), effects of surface charge on the oxidizability and on the potency of the antioxidants. *Chem. and Phys. of Lipids* **126**, 95-110.

Galiano, P., Ruggiero, G. y Menozzi, M. (1990). Dermatiti superficiali micotiche tratate con una nuova crema als 2% miconazola in liposomi. *Dermatologi* **5**, 60-63.

García-Lillo, J. A. y Rodríguez-Valera, F. (1990).

Garrity, G. M., Bell, J. A. y Lilburn, T. G. (2004). *Taxonomic outline of the prokaryotes. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition*, Edición edn.

Gest, H. (1987). Evolutionary roots of the citric acid cycle in prokaryotes. En *Biochem. Soc. Symp.*, pp. 3-16.

Gibbons, N. E. (1969). Isolation, growth and requeriment of halophilic bacteria. En *Methods in Microbiology*. Editado por J. R. Morris y D. W. Ribbons. London: Academic Press.

Giomini, M., Giuliani, A. M., Gattegno, D. y Conti, F. (1979). Un nuovo tipo di trasportadori di sostanze biologicamente active: I liposimi. *Il farmaco ed. Pr.* **34**, 3-14.

Gochnauer, M. B., Johnson, K. G. y Kushner, D. J. (1989). Genus *Actinopolyspora*. En *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 2398-2401. Editado por S. T. Williams, M. E. Sharpe y J. G. Holt. Baltimore: Williams y Wilkins.

Gomez-Fernandez, J. C. y Goñi, F. M. (1983). Fluidez de las membranas celulares. *Invest y Cienc. Ed. Española* **79**, 14-23.

González, C. y Gutiérrez, C. (1970). Presence of lipase among species of extremely halophilic bacteria. *Can. J. Microbiol.* **16**, 1165-1166.

Good, V. A. y Hartman, P. A. (1970). Properties of the amilase from *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **104**, 601-603.

Gordon, R. E., Mayer, P. R. y Kildsig, D. O. (1982). Lyophilization, a means of increasing shelf-life of phospholipid bilayer vesicles. *Drug development and industrial pharmacy* **8**, 465-473.

Grant, W. D. y Larsen, H. (1989). Extremely halophilic archaeobacteria. Order *Halobacteriales* ord. nov. En *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 2216-2219. Editado por M. J. Stanley, M. P. Bryant, N. Pfennig y J. G. Holt. Baltimore: Williams y Wilkins.

Gregoriadis, G. (1976). The carrier potential of liposomes in Biology and Medicine. *New Engl. J. Med* **295**, 704-710.

Gregoriadis, G. (1990). Immunological adjuvants, a role for liposomes. *Immunol. Today* **11**, 89-97.

Gregoriadis, G. (1995). Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. **13**, 527-537.

Hadgraft, J. (1987). Variables associated with a kinetic analysis of skin penetration. En *Pharmacology and the skin*, pp. 154-162. Basilea: Karger.

Haller, P. H. (1987). Empleo y utilidad de los lípidos y fosfolípidos en cosmética. *NCP* **146**, 14-18.

Hanel, H., Braun, B. y Nedjeko, J. (1992). Comparative activity of a liposomal and a conventional econazole preparation for topical use according to a guinea pig tinea model. En *Liposomes dermatics*, pp. 251-257. Editado por O. Braun-Falco y H. C. Korting.

Hanin, I. y Pepeu, G. (1990). *Phospholipids: biochemical, pharmaceutical and analytical considerations*, Edición edn. New York.

Hazemoto, N., Kamo, N., Kobatake, Y., Tsuda, M. y Terayama, Y. (1984). Effect of salt on photocycle and ion pumping of halorhodopsin and third rhodopsinlike pigment of *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* **45**, 1073-1077.

Henderson, R., Jubb, J. S. y Whytock, S. (1978). Specific labelling of the protein and lipid on the extracellular surface of purple membrane. *J. Mol. Biol.* **123**, 259-274.

Hinkle, G. H., Born, G. S., W.V., K. y Shaw, S. M. (1978). Preferential localization of radiolabelled liposomes in liver. *J. Pharm. Sci.* **67**, 795-798.

Holgado, M. A., Fernandez-Arevalo, M. y Rabasco, A. M. (1990). Sistemas de liberación controlada (II). Métodos de obtención farmacocinéticos. *Ind. farm.* **2**, 67-79.

Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Satley, J. T. y Williams, S. T. (1994). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Edición edn. USA: Williams y Wilkins.

Hunt, C. A. y Tsang, S. (1981). α -tocopherol retards autooxidation and prolongs the self life of liposomes. *Int. J. Pharm* **8**, 101-110.

Imhoff, J. F., Sahl, H. G., Soliman, G. S. H. y Trüper, H. G. (1979). The Wadi Natrum: chemical composition and microbial mass developments in alkaline brines of eutrophic desert lakes. *Geomicrobiol. J.* **1**, 219-234.

Isotova, L. S., Strongin, A. Y., Chekulaeva, L. N., Sterkin, V. E., Ostoslavskaya, V. I., Lyublinskaya, L. A., Timokhina, E. A. y Spenavov, V. M. (1983). Purification and properties of serine protease from *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **155**, 826-830.

Itoh, Y. H., Sugai, A., Uda, I. y Itoh, T. (2001). The evolution of lipids. *Advances in Space Research* **28**, 719-724.

Jacobs, M. y Martin, G. P. (1988). Effects of phosphatidylcholine on the topical bioavailability of corticosteroids assessed by human skin blanching assay. *J.*

Pharm. Pharmacol. **40**, 829-833.

Jarrell, H. C., Zukotynski, K. A. y Sprott, G. D. (1998). Lateral diffusion of the total polar lipids from *Thermoplasma acidophilum* in multilamellar liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1369**, 259-266.

Jia, L., Garza, M., Wong, H., Reimer, D., redelmeier, D., Camden, J. B. y Steve, D. (2002). Pharmacokinetic comparison of intravenous carbendazim and remote loadaes carbendazim liposomes in nude mice. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **28**, 65-72.

Johnson, K. G., Lanthier, P. H. y Gochnauer, M. B. (1986). Studies of two strains of *Actinopolyspora halophila*, an extremely halophilic actinomycete. *Arch. Microbiol.* **143**, 370-378.

Juliano, R. L. (1989). Liposomes as drug carriers in the therapy of infectious diseases. *Horiz in Biochem and biophys* **9**, 249-279.

Juninger, H. E., Hofland, H. E. y Bowsra, J. A. (1991). Liposomes and niosomes: interactions with human skin. *Cosm. & Toil.* **106**, 45-50.

Kamekura, M. y Kates, M. (1988). Lipids of halophilic archaeobacteria. En *Halophilic Bacteria*, pp. 25-54. Editado por F. Rodríguez-Valera. Boca Raton: CRC Press.

Kamekura, M. y Dyall-Smith, M. (1995). Taxonomy of the family *Halobacteriaceae* and the description of two new genera *Halorubrobacterium* and *Natrialba*. *J.Gen. Appl. Microbiol.* **41**, 333-350.

Kamekura, M., Dyall-Smith, M., Upasani, V. N., Ventosa, A. y Kates, M. (1997). Diversity of alkaliphilic halobacteria: proposals for transfer of *Natronobacterium vacuolatum*, *Natronobacterium magadii* and *Natronobacterium pharaonis* to *Halorubrum*, *Natrialba* and *Natronomonas* gen.nov. respectively as *Halorubrum vaculoatum* comb. nov., *Natrialba magadii* comb. nov. and *Natronomonas pharaonis* comb. nov. respectively. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**, 853-857.

Kandler, O. (1982). Cell wall structures and their phylogenetic implications. *Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe C* **3**, 149-160.

Kandler, O. (1994). Cell wall biochemistry and three-Domain concept of life. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 501-509.

Kandler, O. y Köning, H. (1978). Chemical composition of the peptidoglycan-free cell walls of methanogenic bacteria. *Arch. Microbiol.* **118**, 141-152.

Kandler, O. y Köning, H. (1985). Cell envelopes of archaebacteria. En *The Bacteria*, pp. 413-457. Editado por C. R. Woese y R. S. Wolfe. New York: Academic Press, Inc.

Katahira, N., Murakami, T., Shizuka, K., Yata, Norubu y Tacaño, M. (1998).

Enhancement of topical delivery of a lipophilic drug charged multilamellar liposomes. *J. Drug Targeting*.

Kates, M. (1978). Phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria. *Prog. Chem. Fats* **15**, 301-342.

Kates, M. (1986). *Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids (Second revised edition)*, Edición edn. Amsterdam- New York -Oxford:

Burdon, R.H.

Knippenberg, P.H.

Kates, M. (1990). Glyco-phosphoglyco- and glycolipids of bacteria. En *Glycolipids, phosphoglycolipids and sulfoglycolipids*, pp. 1-22. Editado por M. Kates. New York: Plenum Press.

Kates, M. (1993). Membrane lipids of archaea. En *The biochemistry of archaea (archaeobacteria)*, pp. 261-295. Editado por M. Kates, D. J. Kushner y A. T.

Matheson. Amsterdam: Elsevier.

Kates, M., Porter, S. y Kushner, D. J. (1987). *Actinopolyspora halophila* does not contain mycolic acid. *Can. J. Microbiol.* **33**, 822-823.

Kato, A., Ishibashi, Y. y Miyake, Y. (1987). Effects of egg yolk lecithin on transdermal delivery of bunazosin hydrochloride. *J. Pharm. Pharmacol.* **39**, 399-

400.

Kaurichev, I. S. (1980). *Prácticas de Edafología*, Edición edn. Moscow: Mir Publisher.

Keeler, R. (1991). Don't let food go to waste-make plastic out of it. *RanD Magazine* **33**, 52-57.

Kerscher, L., Nowitzki, S. y Oesterhelt, D. (1982). Thermoacidophilic archaeobacteria contain bacterial-type ferredoxins acting as electron acceptors of 2-oxoacid: ferredoxin oxidoreductases. *Eur. J. Biochem.* **128**, 223-230.

Kidric, J. (1980). Application of NMR spectroscopy to model membrane systems. *Farm. Vestr.* **31**, 223-231.

Kimura, T., Nagahara, N., Hirabayashi, K., Kurosaki y Nakayama, T. (1989). Enhanced percutaneous penetration of flufenamic acid using lipid disperse systems containing glycosylceramides. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 454-457.

Kirby, C. (1984). Application of liposomes. *Biotechnology* **2**, 979.

Klegerman, M. E., Hamilton, A. J., Huang, S.-L., Tiukinhoy, S. D., Khan, A. A., Mc Donald, R. C. y Mc Person, D. D. (2002). Quantitative immunoblot assay for assessment of liposomal antibody conjugation efficiency. *Analytical Biochemistry* **300**, 46-52.

Kogut, M. y Russell, N. J. (1987). Life at the limits. Considerations on how bacteria can grow at extremes of temperature and pressure, or with high concentrations of ions and solutes. *Sci. Prog., Oxford* **71**, 381-399.

Krishnan, L., Dicaire, C. J., Patel, G. B. y Sprott, G. D. (2000a). Archaeosome Vaccine Adjuvants induce strong humoral, cell-mediated, and memory responses: Comparison to conventional liposomes and alum. *Infection and Immunity*, 54-63.

Krishnan, L., Sad, S., Patel, G. B. y Sprott, G. D. (2000b). Archaeosomes induce long-term CD8+ cytotoxic T cell response to entrapped soluble protein by the exogenous cytosolic pathway, in the absence of CD4+ T cell help. *The Journal of Immunology*, 5177-5185.

Krishnan, L., Sad, S., Patel, G. B. y Sprott, G. D. (2001). The potent adjuvant activity of archaeosomes correlates to the recruitment and activation of macrophages and dendritic cell in vivo. *The Journal of Immunology*, 1885-1893.

Krishnan, L., Sad, S., Patel, G. B. y Sprott, G. D. (2003). Archaeosomes induce enhanced cytotoxic T lymphocyte responses to entrapped soluble protein in the absence of interleukin 12 and protect against tumor challenge. *Cancer research* **63**, 2526-2534.

Kulkarni, S. B. y Vargha-Butler, E. I. (1995). Study of liposomal drug delivery systems. Encapsulation efficiencies of some steroids in MLV liposomes. *Colloids*

and Surfaces B: Biointerfaces **4**, 77-85.

Kunikazu, M., Kazuo, M. y Motoharu, I. (2000). spectroscopic investigation of the molecular state of nystatin encapsulated in liposomes. *Int. J. Pharm* **15**, 37-49.

Kushner, D. J. (1980). Extreme environments. En *Contemporary microbial ecology*. Editado por D. C. Elwood, J. N. Hedger, M. H. Latham, J. M. Lynch y J. H. Slater. London: Academic Press.

Kushner, D. J. (1985). The *Halobacteriaceae*. En *Archaeobacteria*. Editado por C. R. Woese y R. S. Wolfe. London: Academic Press.

Kushner, D. J. y Kamekura, M. (1988). Physiology of halophilic eubacteria. En *Halophilic bacteria*. Editado por R. H. Vreeland y L. I. Hochstein. Florida: CRC Press Inc., Boca Raton.

Kushwaha, S. C., Kates, M., Juez, G., Rodríguez-Valera, F. y Kushner, D. J. (1982). Survey of lipids of a new group of extremely halophilic bacteria from salt ponds in Spain. *Can. J. Microbiol.* **28**, 1365-1372.

Langworthy, T. A. (1977). Long-chain diglycerol tetraether from *Thermoplasma acidophilum*. *Biochim. Biophys. Acta* **487**, 37-50.

Langworthy, T. A. (1985). Lipids of archaeobacteria. En *The Bacteria*, pp. 459-

497. Editado por C. R. Woese y R. S. Wolfe. New York: Academic Press.

Langworthy, T. A. y Pond, J. L. (1986). Archeobacterial ether lipids and chemotaxonomy. *Syst. Appl. Microbiol.* **7**, 253-257.

Langworthy, T. A., Tornabene, T. G. y Holzer, G. (1982). Lipids of Archaeobacteria. *Zbl. Bakt. Hyg. Abt. Orig.* **3**, 228-244.

Lanyi, J. K. (1974). Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* **38**, 272.

Lanyi, J. K. (1978). Light energy conversion in *Halobacterium halobium*. *Microbiol. Rev.* **42**, 682-706.

Lanyi, J. K. y Mc Donald, R. E. (1976). Existence of electrogenic hydrogen ion sodium ion antiport in *Halobacterium halobium* cell envelope vesicles. *Biochem.* **15**, 4608-4614.

Lanzotti, V., Nicolaus, B., Trincone, A. y Grant, W. D. (1982). The glycolipid of *Halobacterium saccharovorum*. *FEMS Microbiol. Lett* **55**, 223-228.

Lanzotti, V., Nicolaus, B., Trincone, A., De Rosa, M., Grant, W. D. y Gambacorta, A. (1989). A complex lipid with a cyclic phosphate from the archaeobacterium *Natronococcus occultus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid metabolism* **1001**, 31-34.

Larsen, H. (1962). Halophilism. En *The Bacteria*, pp. 297-342. Editado por I. C. Gunsalus y R. Y. Stanier. New York: Academic Press.

Larsen, H. (1973). The halobacteria's confusion to biology. *Antoinie van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol* **39**, 383-396.

Larsen, H. (1980). Ecology of hypersaline environments. En *Hypersaline brines and evaporitic environments*, pp. 23-39. Editado por A. Nissenbaum. Amsterdam: Elsevier.

Larsen, H. (1984). Family V. *Halobacteriaceae*. En *Bergey's manual of systematic bacteriology*, pp. 261-267. Editado por N. R. Krieg y J. G. Holt. Baltimore: The Williams and Wilkins Co.

Lasic, D. D. (1980). Liposomes: preparation and characterization. *Farm. Vestr.* **31**, 183-186.

Lasic, D. D. (1993). *Liposomes: from physics to applications*, Edición edn. Amsterdam-London-New York: Elsevier.

Lasic, D. D., Sentjurc, M., Nemeč, M., Sramel, V. y Schara, M. (1980). Incorporation of the biologically active materials into liposomes. *Farm. Vestr.* **31**, 219-222.

Lautenschlager, H. (1990). Liposomes in dermatological preparations. *Coms & Toil.* **105**, 63-72.

Laverman, N., Zalipsky, S., Oyen, W. J., Dams, E. T., Storm, G., Mullah, N., Corstens, F. H. y Boerman, O. C. (2000). Improved imaging of infections by avidin-induced clearance of ^{99m}Tc-biotin-PEG liposomes. *J. Nucl. Med.* **41**, 912-918.

Law, s. L., Huang, K. J. y Chiang, C. H. (2000). Acyclovir-containing liposomes ocular delivery. *Journal of controlled release* **63**, 135-140.

Lenhinger, A. L. (1988). Bioquímica. pp. 293-297. Barcelona.

Lillo, J. G. y Rodríguez-Valera, F. (1990). Effects of culture conditions on poly (beta-hydroxybutyric acid) production by *Haloferax mediterranei*. *Appl. Env. Microbiol.* **56**, 2517-2521.

Lind, C., Hojeberg, B. y Khorana, H. G. (1981). Reconstitution of delipidated bacteriorhodopsin with endogenous polar lipids. *J. Biol. Chem.* **256**, 8298-8305.

Lizama, C., Monteoliva-Sanchez, M., Prado, B., Ramos-Cormenzana, A., Weckesser, J. y Campos, V. (2001). Taxonomic study of extreme halophilic archaea isolated from the Salar de Atacama, Chile. *Syst. Appl. Microbiol.* **24**, 464-474.

Lizama, C., Monteoliva-Sanchez, M., Suárez, A., Roselló-Mora, R., Aguilera, M., Campos, V. y Ramos-Cormenzana, A. (2002). *Halorubrum tebenquichense* sp. nov., a novel halophilic archeon isolated from Atacama saltern, Chile. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, 149-155.

Longer, M. A. y Robinson, J. R. (1987). Sistemas de liberación sostenida de drogas. En *Remington. Farmacia*, pp. 2240-2264. Buenos Aires.

Lopez- Garcia, F., Vazquez-Auton, J. M., Gil, F., Latoore, R., Moreno, F., Vullalain, J. y Gomez-Fernandez, J. C. (1993). Intra-articular therapy of experimental arthritis with a derivate of triamcinolone acetonide incorporated in liposomes. *J. Pharm. Pharmacol.* **45**.

Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J. C., Lizasoain, I. y Moro, M. A. (2004). *Velazquez. Farmacología Basica y Clínica (17ª edición)*, Edición edn: Médica Edit.

Maibach, H. I. (1976). *In vivo* percutaneous penetration of corticosteroids in man and unresolved problems in their efficacy. *Dermatologica* **152 (Supl.I)**, 11-25.

Maierhofer, G. (1988). Introducción a una nueva Tecnología y descripción de técnicas preparativas. *Farm. Clín.* **5**, 658-680.

Makabi-Panzu, B., Sprott, G. D. y Patel, G. B. (1998). Coenzyme Q10 in vesicles composed of archaeal ether lipids or conventional lipids enhances the

immuno-adjuvanticity to encapsulated protein. *Vaccine* **16**, 1504-1510.

Marquez, M. C., Ventosa, A. y Ruiz-Berraquero, F. (1990). *Marinococcus hispanicus*, a new specie of moderately halophilic Gram positive cocci. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 165-169.

Marti, E., Cemelli, J. y Del Pozo, A. (1998). Aplicaci
3?n de técnicas biofísicas no invasivas en la determinación de la capacidad de hidratación cutánea de liposomas PML. *Ciencia Pharm.* **8**, 31-37.

Masini, V., Bonte, F., Meybeck, A. y Wepierre, J. (1993). Cutaneous bioavailability in hairless rats of tretionin in lipoosomes or gel. *J. Pharm. Sci.* **82**, 17-21.

Matheson, A. T. (1992). Structure, function and evolution of archaeal ribosome. *Biochem. Soc. Symp* **58**, 89-98.

Mathies, R. A., Lin, S. W., Ames, J. B. y Pollard, W. T. (1991). From fem to second to biology: mechanism of bacteriorhodopsin's light-driven proton pump. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* **20**, 491-518.

Matsubara, T., Tanaka, M., Kamekura, M., Moldoveanu, N., Kates, M., Ishizuka, I., Onishi, H., Kushner, D. J. y Hayashi, A. (1994). Polar lipids of a non-alkaliphilic extremely halophilic archaebacterium strain 172: a novel bis-sulfated glycolipid. *Biochim. Biophys. Acta* **1214**, 97-108.

Mattenberger-Kreber, L. (1976). *Experientia* **32**, 1522.

Mc Donald, R. E. y Lanyi, J. K. (1975). Light-induced leucine transport in *Halobacterium halobium* envelope vesicles: a chemi-osmotic system. *Biochem.* **14**, 2882-2889.

Mc Donald, R. E., Greene, R. V. y Lanyi, J. K. (1977). Light-activated amino acid transport systems in *Halobacterium halobium* envelope vesicles: role of chemical and electrical gradients. *Biochem.* **16**, 3227-3235.

Mc Genity, T. J. y Grant, W. D. (1995). Transfer of *Halobacterium saccharovorum*, *Halobacterium sodomense*, *Halobacterium trapanicum* NRC 34021 and *Halobacterium lacusprofundi* to the Genus *Halorubrum* gen. nov., as *Halorubrum saccharovorum* comb.nov., and *Halorubrum sodomense* comb.nov., *Halorubrum trapanicum* comb.nov., and *Halorubrum lacusprofundi* comb.nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **18**, 237-243.

Mc Mullen, J. N., Newton, D. W. y Becker, C. H. (1984). Pectin- gelatin complex coacervates (part 2) Effects of microencapsulated sulfamerazine on size, morphology, recovery and extraction of water dispersible microglobules. *J. Pharm. Sci.* **73**, 1799-1803.

Medina, M. M., Cerezo, A. y Sanchez-Morcillo, J. (1986). Elaboración, caracterización y estudio de la estabilidad de los liposomas. *An. Real Acad.*

Farm. **52**, 251-264.

Medina, M. M., Cerezo, A. y Sanchez-Morcillo, J. (1989). Preservation of liposomes through freezing study as cryoprotective effect developed by various saccharides. En *5ème Congrès International de Technologie Pharmaceutique*, pp. 238-246. Paris.

Medina, M. M., Cerezo, A., Sanchez-Morcillo, J. y Fernandez-Feijoo, M. A. (1984). Liposomas transportadores de mebendazol: Elaboración y estudio de la estabilidad. En *XXIX Congreso de A.E.F.H. (Alicante)*, pp. 383-391.

Medina, M. M., Cerezo, A., Sanchez-Morcillo, J. y Fernandez-Feijoo, M. A. (1984). Liposomas transportadores de vitamina B₆: Elaboración y caracterización. En *XXIX Congreso de A.E.F.H. (Alicante)*, pp. 399-408.

Mehlhorn, R. J., Schobert, B., Packer, L. y Lanyi, J. K. (1985). ESR studies of light-dependent volume changes in cell envelope vesicles from *Halobacterium halobium*. *Biochim. Biophys. Acta* **809**, 66-73.

Mezei, M. (1985). Liposomes as a skin drug delivery systems. En *Topics in Pharmaceutical Sciences*, pp. 345-358. Editado por D. D. Breimer y P. Speiser. Amsterdam: Elsevier Sci. Pub.

Mezei, M. (1988). Multiphase liposomal drug delivery system. En *Brevet*, pp. 228. USA: 4.

Mezei, M. (1993). Techniques for the study of liposomes-skin interaction. En *Liposome technology*, pp. 91-106. Editado por G. Gregoriadis. Florida: CRC Press Boca Raton.

Mezei, M. y Gulasekharam, V. (1981). Liposomes, a selective drug delivery system from the topical route of administration. (I) Lotion dosage form. *Life Sci* **26**, 1473-1477.

Mezei, M. y Gulasekharam, V. (1982). Liposomes, a selective drug delivery system from the topical route of administration. (II) Gel dosage form. *J. Pharm. Pharmacol* **34**, 473-474.

Michelland-Henry, S., Poly, P. A., Puisieux, F., Delattre, J. y Likforman, J. (1983). Etude du comportement des liposomes lors d'expériences de congélation/décongélation et de lyophilisation, influence des cryoprotecteurs. En *3ème Congrès International de Technologie Pharmaceutique*, pp. 223-233. Editado por AGPI. Paris.

Moldoveanu, N. y Kates, M. (1988). Biosynthetic studies of the polar lipids of *Halobacterium cutirubrum*. Formation of isoprenyl ether intermediates. *Biochim. Biophys. Acta* **960**, 164-182.

Moldoveanu, N. y Kates, M. (1989). Effect of bacitracin on growth and polar lipid biosynthesis. *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2503-2508.

Moldoveanu, N., Kates, M., Montero, C. G. y Ventosa, A. (1990). Polar lipids of non-alkaliphilic Halococci. *Biochim. Biophys. Acta* **1046**, 127-135.

Montagna, W. (1961). En *The structure and function of skin*, pp. 154-. Editado por A. Press. New York.

Moses, V. y Cape, R. E. (1991). *Biotechnology: the science and the business*, Edición edn. London, New York and Chur.

Moufti, A., Weingarten, C., Desjeux, J. F., Loung, T. T. y Duran, G. (1989). Administration orale de liposomes d'insulina. Etude de l'influence du mode d'administration. En *II Congrès International de Technologie Pharmaceutique*, pp. 9-19. Paris.

Nagarsenker, M. S., Londhe, V. Y. y Nadkarni, G. D. (1999). Preparation and evaluation of liposomal formulations of tropicamide for ocular delivery. *International Journal of Pharmaceutics*, 63-71.

Nishihara, M., Morii, H. y Koga, Y. (1987). Structure of a quartet of novel tetraether lipids from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *J. Biochem* **101**, 1007-1115.

Nishihara, M., Morii, H. y Koga, Y. (1991). Hydroxyarchaetidylserine and hydroxyarchaetidyl-myoinositol in *Methanosarcina barkeri*: polar lipids with a

new ether core portion. *Biochim. Biophys. Acta* **1082**, 211-217.

Nishihata, T., Kotera, K., Nakano, Y. y Yamakazi, M. (1987). Rat percutaneous transport of diclofenac and influence of hydrogenated soya phospholipids. *Chem. Pharm. Bull.* **35**, 3807-3812.

Nissembaum, A. (1975). The microbiology and biogeochemistry of the Dead Sea. *Microbial Ecol* **2**, 139-161.

Norberg, P. y Hofsten, B. V. (1969). Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **55**, 251-256.

Oesterhelt, D. (1975). The purple membrane of *Halobacterium halobium*, a new system for light energy conversion. En *Ciba Foundation, Symposium 31. Energy transformation in biological systems*, pp. 147-167: Elsevier, Amsterdam.

Oesterhelt, D. y Stoeckenius, W. (1971). Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nat. New Biol.* **233**, 149-152.

Oesterhelt, D. y Hess, B. (1973). Reversible photolysis of the purple complex in the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.* **37**, 316-326.

Oliva, M., Díez-Pérez, I., Gorostiza, P., Lastra, C. F., Oliva, I., Caramella, C. y Marino, E. L. (2003). Self assembly of drug-polymer complexes: A spontaneous nanoencapsulation process monitored by atomic force microscopy. *J. Pharm. Sci.*

92, 77-83.

Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J. y Papahadjopoulos, D. (1984).

Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **557**, 9-23.

Olson, F., Hunt, C. A., Szoka, F. C., Vail, W. J. y Papahadjopoulos, D.

(1984). Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **557**, 9-23.

Ollivier, B., Caumette, P., García, J. L. y Mah, R. A. (1994). Anaerobic bacteria from hypersaline environments. *Microbiol. Rev.* **58**, 27-38.

Oren, A. (1983 a). A thermophilic amyloglucosidase from *Halobacterium sodomense*, a halophilic bacterium from the Dead Sea. *Curr. Microbiol.* **8**, 225-230.

Oren, A. (1983 b). *Halobacterium sodomense* sp.nov., a Dead Sea *Halobacterium* with an extremely high magnesium requirement. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **33**, 381-386.

Oren, A. (2002). Molecular ecology of extremely halophilic Archaea and Bacteria. *FEMS Microbiology Ecology* **39**, 1-7.

Oren, A. y Shilo, M. (1981). Bacteriorhodopsin in a bloom of halobacteria in the

Dead Sea. *Arch. Microbiol.* **130**, 185-187.

Ostro, M. J. y Cullis, P. R. (1989). Use of liposomes as injectable drug delivery system. *Am. J. Hosp. Pharm.* **46**, 1576-1587.

Patel, G. B., Agnew, B. J., Deschatelets, L., Fleming, L. P. y Sprott, G. D. (2000). In vitro assessment of archaeosome stability for developing oral delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 39-49.

Patel, H. M. (1985). Liposomes as controlled release system. *Biochim. Soc. Trans.* **13**, 513-516.

Pecar, S. (1980). Liposomes in ERS spectroscopy. *Farm. Vestr.* **31**, 237.

Pedrajas, F. M. y Medina, M. M. (2003). Estudio de la encapsulación de antidepresivos tricíclicos en liposomas multilaminares. En *VI Congreso de la SEFIG y III Jornadas de Tecnología Farmacéutica*, pp. 153-156. Granada.

Pfeifer, F. y Englert, C. (1992). Function and biosynthesis of gas vesicles in halophilic Archaea. *J. Bioenergetics and Biomembranes* **24**, 577-585.

Pfeifer, F., Weidinger, G. y Goebel, W. (1981 a). Genetic variability in *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **145**, 375.

Pfeifer, F., Weidinger, G. y Goebel, W. (1981 b). Characterization of plasmids in halobacteria. *J. Bacteriol.* **145**, 369.

Pfeifer, F., Boyer, H. W. y Betlach, M. (1985). Restoration of bacterio-opsin gene expression in a revertant of *Halobacterium halobium*. *J. Bacteriol.* **164**, 414.

Pidgeon, C. H. y Hunt, A. (1981). Calculation number and surface area of liposomes in any suspension. *J. Pharm. Sci.* **70**, 173-176.

Pipkin, B. W., Glorslie, D. S., Casey, R. E. y Hammond, D. E. (1977).
Laboratory exercises in Oceanography, Edición edn. San Francisco: W.S. Freeman.

Pons Gimier, J. L. y Parra, J. (1995). *Ciencia cosm?tica*, Edición edn. Madrid: C. G. C. O. F.

Post, F. J. (1977). The microbial ecology of the Great Salt Lake. *Microb. Ecol.* **3**, 143-165.

Post, F. J. y Collins, N. F. (1982). A preliminary investigation of the membrane lipid of *Halobacterium halobium* as a food additive. *J. F. Biochem.* **6**, 25-38.

Pots, R. O. (1986). Stratum corneum hydratation: experimental techniques and interpretation of results. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **37**, 9-33.

Poxton, I. R. (1993). Prokaryote envelope diversity. *J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement* **74**, 1s-11s.

Prado, B., Del Moral, A., Quesada, E., Ríos, R., Monteoliva-Sanchez, M., Campos, V. y Ramos-Cormenzana, A. (1991). Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram negative rods isolated from the Salar of Atacama, Chile. *Syst. Appl. Microbiol.* **14**, 275-281.

Prado, B. L. (1987). Estudio taxonómico de bacterias halófilas moderadas aisladas del Salar de Atacama, Chile. En *Departamento de Microbiología. Facultad de Ciencias*. Granada: Universidad de Granada.

Prentis, S. (1981). Microbes that capture the sun. *New Scientist.* **101**, 159-163.

Puisieux, F. y Delattre, J. (1985). *Les liposomes*, Edición edn. París: Technique et documentation (Lavoisier).

Puissieux, F. (1978). Les liposomes: Classification et obtention. *Labo. Pharma. Probl. Tech.* **281**, 899-904.

Puissieux, F. (1985). Vecteurs micro et nanoparticulaires. En *Formes pharmaceutiques nouvelles*, pp. 465-481. Editado por T. e. D. (Lavoisier). Paris.

Puissieux, F., Poly, P. A. y Salin-Drouin, D. (1982). Les liposomes, formes pharmaceutiques du futur. *Labo. Pharma. Probl. Tech.* **30**, 133-151.

Quesada, E., Ventosa, A., Rodríguez-Valera, F. y Ramos-Cormenzana, A.

(1982). Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J. Appl. Bacteriol.* **53**, 155-161.

Quigley, J. W. y Bucks, D. A. (1998). Reduced skin irritation with tretionin

containing polyolprepolymer-2, a new topical tretionin delivery system: a

summary of preclinical and clinical investigations. *J. Am. Acad. Dermatol.* **38**

(Supl 5), 10.

Ramos-Cormenzana, A. (1989). Ecological distribution and biotechnological

potential of halophilic microorganisms. En *Microbiology of Extreme Environments*

and its potential for Biotechnology, pp. 289-309. Editado por M. S. Da Costa, J.

C. Duarte y R. A. D. Williams. London: Elsevier.

Ramos-Cormenzana, A. (1991). Halophilic organisms and the environment. En

General and Applied aspects of halophilic microorganisms, pp. 15-24. Editado

por F. Rodríguez-Valera. New York: Plenum Press.

Ramos-Cormenzana, A. (1993). Ecology of moderately halophilic bacteria. En

The Biology of Halophilic Bacteria. Editado por R. H. Vreeland y L. I. Hochstein.

Florida: CRC Press Inc., Boca Raton.

Ramos-Cormenzana, A. (2000). Microorganismos halófilos: Potencial

biotecnológico e interés farmacéutico. *Ars Pharmaceutica* **41**, 211-227.

Rangelnova, D. S., Zhelev, Z., Bakalova, R. A., Tiurin, V. A., Denisova, N. A., Serbinova, E. A., Parker, L. y Kagan, V. E. (1990). Intermembrane transport and antioxidant action of alpha-tocopherol in liposomes. *Bull. Eksp. Biol. Med.* **109**, 37-39.

Readfearn, E. R. (1966). Mode of action of ubiquinones (coenzymes Q) in electron transport systems. *Vitam Horm* **24**, 465-488.

Recasens, M. M., Trullas, C., Coll, J., Pelejero, C. y Sabes, M. (1998). Estudio comparativo de la eficacia fotorreparadora de la vitamina A palmitato en dos formas galénicas: crema y liposomas. *Industria Farmacéutica*, 65-69.

Ring, K., Henkel, B., Valenteijn, A. y Gutermann, R. (1986). Studies on permeability and stability of liposomes derived from membrane-spanning bipolar archeobacterial tetraetherlipid. En *Liposomes as drug carriers*, pp. 100-123. Editado por K. H. Schmidt. New York: Georg Thieme Verlag Stuttgart.

Robertson, J. D., Scheril, W. y Reedy, M. (1982). Halobacterium halobium: I: A thin-sectioning electron-microscopic study. *J. Ultrstruct, Res* **80**, 148-162.

Rodríguez-Valera, F. (1988). Characteristics and microbial ecology of hypersaline environments. En *The halophilic Bacteria*, pp. 3-30. Editado por B. R. C.R.C Press.

Rodríguez-Valera, F. (1992). Biotechnological potential of halobacteria. En *The Archaeobacteria: Biochemistry and Biotechnology*. Editado por M. J. Danson, D. W. Hough y G. G. Lunt. London: Portland Press.

Rodríguez-Valera, F. y Ruiz-Berraquero, F. (1983). Halobacterias. *Invest y Cienc. Ed. Española* **80**, 94-102.

Rodríguez-Valera, F. y Lillo, J. G. (1992). Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**, 181-186.

Rodríguez-Valera, F., Ventosa, A., Juez, G. y Imhoff, J. F. (1985). Variation of environmental features and microbial populations with salt concentrations in a multipond saltern. *Microb. Ecol.* **11**, 107-115.

Ross, H. N. R. y Grant, W. D. (1985). Nucleic acid studies on halophilic archaeobacteria. *J. Gen. Microbiol.* **131**, 165-173.

Sadzuka, Y., Hirama, R. y Sonobe, T. (2002). Effects of intraperitoneal administration of liposomes and methods of preparing liposomes for local therapy. *Toxicology Letters* **126**, 83-90.

Santos, B. y Guerrero, M. D. (1994). Investigación y desarrollo de nuevos sistemas de administración de medicamentos. En *Administración de medicamentos*, pp. 329-340.

Sarig, S., Robertson, E. B. y Firestone, M. K. (1993). Microbial activity-soil structure: response to saline water irrigation. *Soil Biol. Biochem.* **5**, 693-697.

Schafer-Korting, M., Korting, H. C. y Braun-Falco, O. (1989). Liposome preparation: a step forward in topical drug therapy of skin disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* **21**, 1271-1275.

Schafer, S., Barbowski, C. y Fuchs, G. (1986). Carbon assimilation by the autotrophic thermophilic archaebacterium *thermoproteus neutrophilus*. *Arch. Microbiol.* **146**, 301-308.

Scheuplein, R. J. (1972). Properties of the skin as a membrane. *Adv. Biol. Skin* **12**, 125-152.

Schindler, H. (1979). Exchange and interactions between lipid layers at the surface of liposome solution. *Biochim. Biophys. Acta* **555**, 316-336.

Schinzel, R. y Burger, K. J. (1986). A site-specific endonuclease activity in *Halobacterium halobium*. *FEMS Microbiol. Lett* **37**, 325-329.

Schleifer, K. H. y Stackebrandt, E. (1985). Evolution of Prokaryotes. London: Academic Press.

Schleifer, K. H., Steber, J. y Mayer, H. (1982). Chemical composition and structure of the cell wall of *Halococcus morrhuae*. *Zentralbl. Bakteriol.*

Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe C **3**, 171-178.

Schmid, G. y Böck, A. (1982). The ribosomal protein composition of the archaeobacterium *Sulfolobus*. *Mol. Gen. Genet.* **185**, 498-501.

Schnabel, H., Palm, P., Dick, K. y Grampp, B. (1984). Sequence analysis of the insertion element ISH1.8 and of associated structural changes in the genomes of phage Φ H of the archaeobacterium *Halobacterium halobium*. *EMBO J.* **3**, 1717.

Schneider, M. (1978). Progrès récents dans la préparation de liposomes. *Labo. Pharma. Probl. Tech.* **281**, 907.

Schramlova, J., Blazek, K., Bartackova, M., Otova, B., Mardesicova, L., Zizkovsky, V., Hulinsky, V. y Hulinska, D. (1997). Electron microscopic demonstration of the penetration of liposomes through skin. *Folia Biologica* **43**, 165-169.

Schreirer, H. y Bouwstra, J. (1994). liposomes and niosomes as drug carriers: dermal and transdermal drug delivery. *J. Controlled Release* **30**, 1-15.

Seegerer, A., Langworthy, T. A. y Stetter, K. O. (1988). *Thermoplasma acidophilum* and *Thermoplasma volcanium* sp. nov. from solfatara fields. *System. Appl. Microbiol.* **10**, 161-171.

Seijo, B. (1990). Los liposomas. En *Modernos métodos de administración de*

medicamentos, pp. 39-122. Editado por J. L. Vila, B. Seijo, M. J. Alonso y D. Torres. Madrid: Farmaindustria.

Seijo, B., Gutierrez de Rubalcava, C. y Vila Jato, J. L. (1992). Liposomas para la administración tópica. *Industria Farmacéutica*, 85-91.

Shao, J. y Ma, J. K. H. (1997). Characterization of mannosylphospholipid liposome system for drug targeting to alveolar macrophages. *J. Drug Deliv. Target. Ther. Agents* **4**, 43-48.

Sharata, H. H. y Katz, K. H. (1996). Liposomes. *International Journal of Dermatology* **35**, 761-769.

Shobert, B. y Lanyi, J. K. (1982). Halorhodopsin is a light-driven chloride pump. *J. Biol. Chem.* **257**, 10306-10313.

Sioud, M., Forterre, P. y De Redondo, A. M. (1987). Effects of the antitumor drug VP16 (etoposide) in the archeobacterial *Halobacterium* GRB 1,7kb plasmid in vivo. *Nucl. Acid. Res.* **15**, 8217-8234.

Smallbone, B. W. y Kates, M. (1981). Structural identification of minor glycolipids in *Halobacterium cutirubrum*. *Biochim. Biophys. Acta* **665**, 551-558.

Sorokine, I., Ben-Mahrez, K., Nakayama, M. y Kohiyama (1991). Enzymology and genetics of an alpha-like DNA polymerase from *Halobacterium halobium*. En

General and Applied Aspects of Halophilic Microorganism, pp. 313-319. Editado por F. Rodríguez-Valera. New York: Plenum Press.

Sprott, G. D., Ekiel, I. y Dicaire, C. (1990). Novel, acid-labile, hydroxydiether lipid cores in methanogenic bacteria. *J. Biol. Chem.* **265**, 13735-13740.

Sprott, G. D., Tolson, D. L. y Patel, G. B. (1997). Archaeosomes as novel antigen delivery systems. *FEMS Microbiology Letters*, 17-22.

Sprott, G. D., Dicaire, C. J., Gurnani, K., Deschatelets, L. y Krishnan, L. (2004). Liposome adjuvants prepared from the total polar lipids of *Haloferax volcanii*, *Planococcus* spp. and *Bacillus firmus* differ in ability to elicit and sustain immune responses. *Vaccine* **En prensa**.

Sprott, G. D., Sad, S., Fleming, P., Dicaire, C. J., Patel, G. B. y Krishnan, L. (2003). Archaeosomes varying in lipid composition differ in receptor-mediated endocytosis and differentially adjuvant immune responses to entrapped antigen. *Archaea* **1**, 151-164.

Sprott, G. D., Brisson, J.-R., Dicaire, J., Pelletier, A. K., Deschatelets, L. A., Krishnan, L. y Patel, G. B. (1999). A structural comparison of the total polar lipids from the human archaea *Methanobrevibacter smithii* and *Methanosphaera stadtmanae* and its relevance to the adjuvant activities of their liposomes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 275-288.

Stoye, I., Schröder, K. y Müller-Goymann, C. C. (1998). Transformation of a liposomal dispersion containing ibuprofen lysinate and phospholipids into mixed micelles- physico-chemical characterization and influence on drug permeation through excised human stratum corneum. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **46**, 191-200.

Strauss, G. (1989). Liposomes: from theoretical model to cosmetic tool. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **40**, 51-60.

Striasne, S. J. (1978). Human skin: moisturizing mechanism and natural moisturizers. *Cosm. & Toil.* **93**, 37-41.

Stryer, L. (1976). Introducción a las membranas biológicas. En *Bioquímica*, pp. 227. Editado por E. Reverté. Barcelona.

Suárez, S., González-Rothi, R. J., Schreier, H. y Hochaus, G. (1998). Effect of dose and release rate on pulmonary targeting of liposomal triamcinolone acetone phosphate. *Pharm. Res.* **15**, 461-465.

Subov, N. N. (1931). Oceanographical tables commissariat of agriculture of URSS. Moscow: Hydro-Meteorological committee of URSS. Oceanographical Institute of URSS.

Sud, I. J., Chou, D. L. y Feingold, D. S. (1979). Effects of free fatty acids on liposome susceptibility to imidazol antifungals. *Antimicrob. Agents Chemother* **15**,

706-711.

Suzuki, K. y Sakon, K. (1990). The applications of liposomes to cosmetics. *Cosm. & Toil.* **105**, 65-78.

Szoka, F. C. y Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **75**, 4194-4198.

Taber, H. (1980). Vitamin K metabolism and vitamin K dependent proteins. Editado por M.D. Baltimore: University Park Press.

Teissie, J., Prats, M., Lemassu, A., Stewart, L. C. y Kates, M. (1990). Lateral proton conduction in monolayer of phospholipids from extreme halophiles. *Biochem.* **29**, 59-65.

Thongthai, C. y Suintanalert, P. (1991). Halophilicities in Thai fish sauce (Nam Pla). En *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*, pp. 381-388. Editado por F. Rodríguez-Valera. New York: Plenum Press.

Thongthai, C., Mc Genity, T. J., Suintanalert, P. y Grant, W. D. (1992). Isolation and characterization of an extremely halophilic archaeobacterium from traditionally fermented Thai sauce (nam pla). *Lett. Appl. Microbiol.* **14**, 111-114.

Tindall, B. J. (1990). A comparative study of the lipid composition of

Halobacterium saccharovorum from various sources. *Syst. Appl. Microbiol.* **13**, 128-130.

Torrado, J. J. y Cadórniga, R. (1989). Nuevos sistemas de administración de medicamentos. Vectorización. *CIF* **8**.

Torreblanca, M., Rodríguez-Valera, F., Juez, G., Ventosa, A., Kamekura, M. y Kates, M. (1986). Classification of non-alkaliphilic halobacteria based on numerical taxonomy and polar lipid composition and description of *Haloarcula* gen. nov. and *Haloferax* gen.nov. *Syst. Appl. Microbiol.* **8**, 89-99.

Touitou, E., Dayan, L., Bergelson, L., Godin, B. y Eliaz, M. (2000). Ethosomes- novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. *J. Controlled Release* **65**, 403-418.

Trincone, A., Nicolaus, B., Lama, L., De Rosa, M., Gambacorta, A. y Grant, W. D. (1990). The glycolipid of *Halobacterium sodomense*. *J. Gen. Microbiol.* **136**, 2327-2331.

Trincone, A., Trivellone, L. E., Nicolaus, B., Lama, L., Pagnotta, E., Grant, W. D. y Gambacorta, A. (1993). The polar lipid composition of *Halobacterium trapanicum*. *Biochim. Biophys. Acta*.

Trüper, H. G. y Galinski, E. A. (1986). Concentrated brines as habitats for microorganisms. *Exp* **42**, 1182-1187.

Trüper, H. G., Severin, J., Wohlfarth, A., Muller, E. y Galinski, E. A. (1991). Halophily, taxonomy, phylogeny and nomenclature. En *General and Applied Aspects of Halophilic Microorganisms*, pp. 3-7. Editado por F. Rodríguez-Valera. New York: Plenum Press.

Tsujimoto, K., Yorimitsu, S., Takahashi, T. y Ohashi, M. J. (1989). Revised structure of a phospholipid obtained from *Halobacterium halobium*. *Chem. Soc. Chem. Commun*, 668-670.

Upasani, V. N., Desai, S. G., Moldoveanu, N. y Kates, M. (1993). Membrane polar lipids of haloalkaliphiles from hypersaline environments in India. *J. Gen. Microbiol.*

Uster, P. S. (1987). Liposome- based vehicles for topical delivery. *Liposome technology* **16**, 327-347.

Valenta, C., Wanka, M. y Heidlas, J. (2000). Evaluation of a novel soya-lecithin formulations for dermal use containing ketoprofen as a model drug. *J. Controlled Release* **63**, 165-173.

Vasson, M. P., Colombat, A., Madelmont, J. C., Moreau, M. F., Godeneche, D. y Delattre, J. (1981). Etude comparative de l'encapsulation dans les liposomes de nitroso-ureas. En *Premier congrès europ* *2?ende Biopharmacie et Pharmacocinetique*, pp. 381. Clermont- Ferrand.

Vemuri, S. y Rhodes, C. T. (1995). Encapsulation of a water soluble drug in a liposome preparation: Removal of free drug by washing. *Drug Development and Industrial Pharmacy* **21**, 1329-1338.

Ventosa, A. y Nieto, J. J. (1995). Biotechnological applications and potentialities of halophilic microorganisms. *W.J. Microbial. Biotechnol.* **11**, 85-94.

Ventosa, A., E., Q., Rodriguez-Valera, F., Ruiz-Berraquero, F. y Ramos-Cormenzana, A. (1982). Numerical taxonomy of moderately Gram negative rods. *J. Gen. Microbiol.* **128**, 1959-1968.

Virtanen, J. A., Ruonala, M., Vauhkonen, M. y Somerharju, P. (1995). Lateral organization of liquid-crystalline cholesterol-dimyristoylphosphatidylcholine bilayers. Evidence for domains with hexagonal and centered rectangular cholesterol superlattices. *Biochemistry* **34**, 11-568-11581.

Wade, A. y Weller, P. J. (1994). En *Handbook of pharmaceutical excipients*, pp. 267-268. Londres: The pharmaceutical press.

Wagner, G., Hartmann, R. y Oesterhelt, D. (1978). Potassium uniport and ATP synthesis in *Halobacterium halobium*. *Eur. J. Biochem.* **89**, 169-179.

Walsky, A. (1994). Gas vesicles. *Microbiol. Rev.* **58**, 94-144.

Wang, Q., Cao, X., Wang, J., Zhang, W., Tao, Q. y Ye, Y. (2000). Macrophage activation of lymphoma-bearing mice by liposome-mediated intraperitoneal IL-2 and IL-6 gene therapy. *Chinesse Medical Journal* **113**, 281-285.

Weisser, J. y Trüper, H. G. (1985). Osmoregulation in a new haloalkaliphilic *Bacillus* from the Wadi Natrum (Egypt). *Syst. Appl. Microbiol.* **6**, 7-11.

Wertz, P. W. y Downing, D. T. (1989). Stratum corneum: biological and biochemical considerations. En *Transdermal Drug Delivery*, pp. 1-22. Editado por M. Dekker Inc.

Wester, R. C., Maibach, H. I. y Bucks, D. A. (1984). In vivo percutaneous absorption of paraquat from hand leg, an forearm of humans. *J. Toxicol. Environm. Health* **14**, 759-762.

Wieland, F., Lechner, J. y Sumper, M. (1982). The cell wall glycoprotein of Halobacteria: structural, functional and biosynthetic aspects. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. Reihe C* **3**, 161-170.

Wieland, F., Dompert, W., Bernhardt, G. y Sumper, M. (1980). Halobacterial glycoprotein saccharides contains covalently linked sulphate. *FEBS Lett* **120**, 110-114.

Woese, C. R. (1977). A comment on methanogenic bacteria and the primitive ecology. *J. Mol. Evol* **9**, 369-371.

Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.*, 221-271.

Woese, C. R. y Fox, G. E. (1977). Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5088-5090.

Woese, C. R., Magrum, L. J. y Fox, G. E. (1978). Archaeobacteria. *J. Mol. Evol* **11**, 245-252.

Woese, C. R., Kandler, O. y Wheelis, M. L. (1990). Towards a natural system of organisms: proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria* and *Eukarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 4576-4579.

Wohlrab, W., Lachamann, U. y Lasch, J. (1989). Penetration of lecithin from hydrocortisone-containing liposomes into human skin. *Dermatol. Monatsschr.* **175**, 344-347.

Wohlrab, W. y Lasch, J. (1987). *Dermatologica* **174**.

Xu, W. L. y Doolittle, W. F. (1983). Structure of the archaeobacterial transposable element ISH 50. *Nucl. Acid. Res.* **11**, 4195.

Yadav, J. S. P. (1981). Salt affected soils and their management in India. *Agrokemia Es Talaytan* **30**.

Yatvin, M. B. y Lelkes, P. I. (1982). Clinical prospects for liposomes. *Med. Phys.* **9**, 149-175.

Yoshida, M., Matsubara, K., Kudo, T. y Horikoshi, K. (1991). *Actinopolyspora mortisvallis* sp. nov., a moderately halophilic actinomycete. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**, 15-20.

Yu, H. y Liao, H. M. (1996). Triamcinolone permeation from different liposome formulations through rat skin in vitro. *International Journal of Pharmaceutics* **127**, 1-7.

Zahran, H. H., Moharram, A. M. y Mohammad, H. A. (1992). Some ecological and physiological studies on bacteria isolated from salt-affected soils of Egypt. *J. Basic. Microbiol.* **32**, 405-413.

Zahran, H. H., Ahmad, M. S. y Afkar, E. A. (1995). Isolation and characterization of nitrogen-fixing moderate halophilic bacteria from saline soils of Egypt. *J. Basic. Microbiol.* **35**, 269-275.

Zalipsky, S., Hansen, C. B., Oaks, J. M. y Allen, T. M. (1996). Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of poly(2-oxazoline)-grafted liposomes. *J. Pharm. Sci.* **85**.