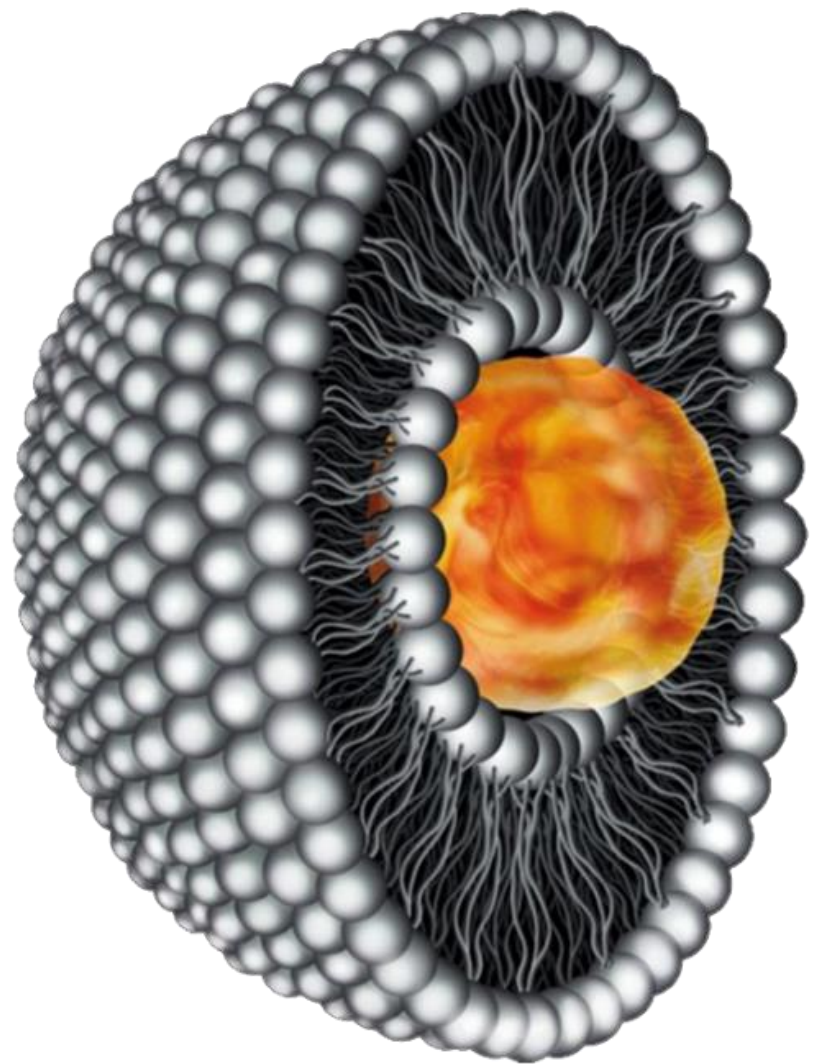


NUEVA ALTERNATIVA A LA CIRUGÍA EN LA QUERATOPATÍA NEUROTRÓFICA.

FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS DE EXTRACTO DE MEMBRANA AMNIÓTICA.



José Luis Rodríguez Ochoa
FACULTAD DE FARMACIA





TRABAJO FIN DE GRADO

NUEVA ALTERNATIVA A LA CIRUGÍA EN LA QUERATOPATÍA NEUROTRÓFICA. FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS DE EXTRACTO DE MEMBRANA AMNIÓTICA.

Alumno: José Luis Rodríguez Ochoa

Tutora: María Luisa González Rodríguez

Doble Grado en Farmacia + Óptica y optometría

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

Fecha de presentación: julio 2019

Lugar de presentación: Facultad de Farmacia

Trabajo de carácter experimental

INDICE DE ABREVIATURAS

- **BCA:** ácido bicinconínico
- **CH:** colesterol
- **CMC:** concentración micelar crítica
- **EA:** estearilamina
- **EE:** eficacia de encapsulación
- **EMA:** extracto de membrana amniótica
- **FC:** fosfatidilcolina
- **hCG:** gonadotropina coriónica humana
- **ID:** índice de deformabilidad
- **LC:** lentes de contacto
- **MMs:** micelas mixtas
- **NaC:** colato sódico
- **NaDC:** desoxicolato sódico
- **NaTC:** taurocolato sódico
- **PDI:** índice de polidispersión
- **PZ:** potencial Z
- **QN:** queratopatía neurotrófica
- **RH:** radio hidrodinámico
- **FEGSEM:** microscopía electrónica de barrido

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- **Figura 1:** Distintos estadios de la QN. Estadios 1 (A), 2(B) y 3(C).
- **Figura 2:** Tratamiento de úlcera corneal con injerto de membrana amniótica.
- **Figura 3:** Esquema de un liposoma.
- **Figura 4:** Representación esquemática de las estructuras formadas por los tensioactivos a distintas concentraciones.
- **Figura 5:** Esquema de reacción del método BCA.
- **Figura 6:** Película lipídica formada en el proceso de elaboración de liposomas por el método TLE.
- **Figura 7:** Dispositivo de extrusión, donde se aprecia el extrusor y la bomba de recirculación del agua.
- **Figura 8:** Microscopio electrónico HITACHI S-5200.
- **Figura 9:** Equipo de permeación utilizado para el estudio in vitro.
- **Figura 10:** Resultados del estudio estadístico de validación.
- **Figura 11:** Cromatogramas obtenidos por HPLC. A la izquierda (A), la muestra de hCG estándar. A la derecha (B), una muestra de EMA.
- **Figura 12:** Concentración de proteínas extraídas en distintas condiciones.
- **Figura 13:** Estabilidad de las proteínas a lo largo del tiempo.
- **Figura 14:** Resultados obtenidos en el DSC de la muestra de EMA.
- **Figura 15:** Concentraciones del EMA control y el sometido a las condiciones de sedimentación de los liposomas.
- **Figura 16:** Lotes elaborados para la etapa de screening.
- **Figura 17:** Lotes elaborados después de ser agitados en vórtex durante 10 segundos.
- **Figura 18:** Muestras de los distintos lotes elaborados tras el proceso de centrifugación, ordenados del 1 al 9 de izquierda a derecha.
- **Figura 19:** Distribución de tamaños de lotes con una única o varias poblaciones. Lotes 9 (A) y 7 (B).
- **Figura 20:** Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta del tamaño con respecto al activador del borde (A), agente de carga usado (B), cantidad de agente de carga (C), y con respecto a la concentración del EMA (D).
- **Figura 21:** Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta del PDI con respecto al activador del borde (A), agente de carga usado (B), cantidad de agente de carga (C), y con respecto a la concentración del EMA (D).

- **Figura 22:** Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta del potencial Z con respecto al activador del borde (A), agente de carga usado (B), cantidad de agente de carga (C), y con respecto a la concentración del EMA (D).
- **Figura 23:** Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta de la EE con respecto al activador del borde (A), agente de carga usado (B), cantidad de agente de carga (C), y con respecto a la concentración del EMA (D).
- **Figura 24:** Características de los lotes elaborados para la etapa de optimización.
- **Figura 25:** Imágenes tomadas de los liposomas mediante FEGSEM.
- **Figura 26:** Perfiles de liberación de las proteínas en los liposomas y en el EMA.
- **Figura 27:** Perfiles de permeación de la hCG en la muestra de liposomas y de EMA.
- **Tabla 1:** Causas de la QN
- **Tabla 2:** Tratamientos actuales en cada estadio de la QN.
- **Tabla 3:** Condiciones ensayadas para determinar las de mayor eficacia de extracción.
- **Tabla 4:** Muestras sometidas a la calorimetría diferencial de barrido.
- **Tabla 5:** Composición de los lotes elaborados para determinar la concentración óptima de NaC.
- **Tabla 6:** Factores analizados en el screening.
- **Tabla 7:** Experimentos correspondientes a la matriz experimental Taguchi L9.
- **Tabla 8:** Combinaciones ensayadas para la optimización.
- **Tabla 9:** Objetivos de la optimización
- **Tabla 10:** Características de los distintos lotes elaborados con cantidades crecientes de NaC sódico.
- **Tabla 11:** Características de los lotes ensayados en el screening.
- **Tabla 12:** Características de los lotes elaborados para la etapa de optimización.
- **Tabla 13:** Composición optimizada y definitiva de la formulación.

1 RESUMEN

INTRODUCCIÓN. La queratopatía neurotrófica (QN) es una enfermedad rara que afecta entre 1-5 de cada 10000 personas. Cursa con la aparición de defectos epiteliales de la córnea, produciendo úlceras y cicatrices, lo que compromete seriamente la visión. El tratamiento en casos graves consiste en un trasplante de membrana amniótica.

OBJETIVO. Desarrollar nuevas formulaciones de extracto de membrana amniótica (EMA) menos agresivas que un trasplante, en forma de liposomas deformables.

MÉTODOS. La cuantificación de proteínas se realizó usando el método del ácido bicinónico (BCA). Las formulaciones de liposomas se elaboraron mediante la técnica TLE (*Thin Layer Evaporation*), partiendo de una composición previa de fosfatidilcolina, colesterol y EMA en tampón HEPES. Para obtener la composición deseada de las vesículas, se realizó un diseño experimental en el que se evaluó el tamaño, el índice de polidispersión (PDI), la carga y la eficacia de encapsulación (EE) obtenidos en función de distintos parámetros. Una vez optimizada la formulación, se realizaron ensayos *in vitro* de liberación y permeación, cuantificando la hCG por HPLC.

RESULTADOS. El método BCA resultó ser lineal, exacto, repetitivo y preciso. Tras la elaboración y caracterización de una serie liposomas con distintas combinaciones en su composición y el análisis a través de una matriz Taguchi, se determinó el efecto de las variables en las características medidas. Atendiendo a los requerimientos de tamaño, PDI, carga y EE, se estableció como composición ideal el desoxicolato sódico (NaDC) como agente deformable, estearilamina como agente de carga en una cantidad de 0.06 mmol y una dilución al 75% del extracto. Esta composición mejoró los comportamientos de liberación y permeación de hCG.

CONCLUSIONES. Este estudio ofrece nuevas posibilidades para mejorar el tratamiento de la QN mediante el uso de formulaciones no invasivas. En un futuro se iniciarán los estudios de eficacia *in vivo*.

PALABRAS CLAVE: queratopatía neurotrófica, liposoma, membrana amniótica.

2 ÍNDICE

1	RESUMEN	1
2	ÍNDICE	2
3	INTRODUCCIÓN.....	4
3.1	QUERATOPATÍA NEUROTRÓFICA	4
3.1.1	<i>HISTOPATOLOGÍA</i>	4
3.1.2	<i>ETIOLOGÍA</i>	4
3.1.3	<i>CLASIFICACIÓN</i>	5
3.1.4	<i>TRATAMIENTO.....</i>	5
3.2	ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS VIA OFTÁLMICA	7
3.2.1	<i>VIAS DE ADMINISTRACIÓN</i>	7
3.3	LIPOSOMAS	8
3.3.1	<i>TRANSFERSOMAS</i>	9
4	OBJETIVOS	10
5	METODOLOGÍA	11
5.1	MATERIALES Y REACTIVOS	11
5.2	EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN.....	12
5.3	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	12
5.3.1	<i>VALIDACIÓN DEL MÉTODO BCA DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</i>	12
5.3.2	<i>CUANTIFICACIÓN POR HPLC.....</i>	14
5.4	EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL POLVO DE PLACENTA	15
5.5	ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS.....	15
5.5.1	<i>TIEMPO.....</i>	16
5.5.2	<i>TEMPERATURA.....</i>	16
5.5.3	<i>CENTRIFUGACIÓN.....</i>	16
5.6	ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES.....	17
5.7	CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS.....	18
5.7.1	<i>ANÁLISIS DIMENSIONAL: TAMAÑO E ÍNDICE DE POLIDISPERSIÓN (PDI)</i>	18
5.7.2	<i>CARGA SUPERFICIAL: POTENCIAL Z (PZ).....</i>	18
5.7.3	<i>EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN (EE)</i>	19
5.7.4	<i>ÍNDICE DE DEFORMABILIDAD (ID)</i>	19
5.7.5	<i>ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE PARTÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE ALTA RESOLUCIÓN (FEGSEM)</i>	20

5.8	DETERMINACIÓN DE LA CMC DEL ÁCIDO CÓLICO	20
5.9	DISEÑO EXPERIMENTAL	21
5.10	OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN	22
5.11	ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	23
5.11.1	ENSAYO DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i>	23
5.11.2	ENSAYO DE PERMEACIÓN <i>IN VITRO</i>	23
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	25
6.1.1	VALIDACIÓN DEL MÉTODO BCA	25
6.1.2	CUANTIFICACION DE hCG POR HPLC.....	25
6.1.3	PORCENTAJE DE LA hCG DENTRO DE LAS PROTEÍNAS TOTALES DEL EMA.....	26
6.2	EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL POLVO DE PLACENTA	26
6.3	ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS.....	27
6.3.1	TIEMPO.....	27
6.3.2	TEMPERATURA.....	27
6.3.3	CENTRIFUGACIÓN.....	28
6.4	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC) DEL ÁCIDO CÓLICO	28
6.5	INFLUENCIA DE LOS FACTORES VARIABLES EN LA FORMULACIÓN	29
6.5.1	INFLUENCIA EN EL TAMAÑO	31
6.5.2	INFLUENCIA EN EL PDI.....	31
6.5.3	INFLUENCIA EN EL POTENCIAL Z	32
6.5.4	INFLUENCIA EN LA EE	33
6.6	OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN	34
6.6.1	INDICE DE DEFORMABILIDAD (ID).....	35
6.6.2	ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE PARTÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO ALTA RESOLUCIÓN (FEGSEM).....	35
6.7	ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	36
6.7.1	ENSAYO DE LIBERACIÓN <i>IN VITRO</i>	36
6.7.2	ENSAYO DE PERMEACIÓN <i>IN VITRO</i>	37
7	CONCLUSIONES.....	37
8	BIBLIOGRAFÍA	38

3 INTRODUCCIÓN

3.1 QUERATOPATÍA NEUROTRÓFICA

La queratopatía neurotrófica (QN) es una enfermedad degenerativa de la córnea que se caracteriza por una hipoestesia o analgesia corneal, producida por un deterioro parcial o total de inervación del trigémino. Esta reducción en la sensibilidad corneal junto a una regeneración epitelial reducida son los sellos distintivos de esta enfermedad y son responsables de la consiguiente descomposición del epitelio corneal, que afecta la salud y la integridad de la película lagrimal, el epitelio y el estroma (Dua et al. 2018). Aunque no existen datos oficiales de su prevalencia, se estima que esta afecta a menos de 5 de cada 10.000 personas (Babayán-Sosa and Baca-Lozada, 2018), por lo que es considerada una enfermedad rara.

Hasta el momento, no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad. Esto supone que la progresiva degeneración con la que cursa puede desembocar en una ceguera permanente para el paciente.

3.1.1 HISTOPATOLOGÍA

Estas alteraciones de la inervación ocular producen distintos cambios de su superficie, favoreciendo la lesión y la ulceración. A nivel de la película lagrimal, se produce un aumento en la cantidad y viscosidad de las secreciones mucosas, además de una disminución de la frecuencia del parpadeo y lagrimeo. A nivel corneal, como consecuencia de una reducción del proceso mitótico, tiene lugar un progresivo adelgazamiento epitelial hasta la pérdida total de la capa descamativa superficial. Adicionalmente, la conjuntiva también se ve afectada, produciéndose una disminución en la densidad de las células caliciformes (Del Campo Carrasco et al., 2012). Por tanto, una córnea neurotrófica es más propensa a la aparición de erosiones, defecto epitelial persistente, disolución corneal, perforación, infección, vascularización y calcificación.

3.1.2 ETIOLOGÍA

Podemos clasificar las causas del daño en la inervación en locales, como la queratitis herpética, o sistémicas, a causa de esclerosis múltiple o diabetes. En la Tabla 1 se recoge un listado completo (Babayán-Sosa and Baca-Lozada, 2018).

INFECCIOSAS	ALT CORNEALES	MEDICAMENTOS TÓPICOS	PARESIA DEL TRIGÉMINO	ENF SISTÉMICAS
<ul style="list-style-type: none"> • Herpes simple • Herpes zóster • Lepra 	<ul style="list-style-type: none"> • Quemaduras • Sobreuso de lentes de contacto (LC) • Distrofias • Cirugías 	<ul style="list-style-type: none"> • Anestésicos tópicos • β-bloqueantes 	<ul style="list-style-type: none"> • Cirugía • Neoplasias • Aneurismas • Trauma • Síndromes congénitos 	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetes mellitus • Déficit de vit A • Esclerosis múltiple

Tabla 1: Causas de la QN

3.1.3 CLASIFICACIÓN

Desde un punto de vista clínico, se diferencian tres estadios fundamentales según la clasificación de Mackie (Figura 1), en los cuales se van produciendo manifestaciones más graves conforme se avanza de una fase a la siguiente (Matsumoto et al., 2004).

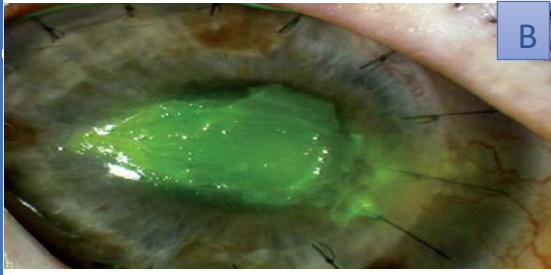

ESTADIO 1	
<ul style="list-style-type: none"> • Tinción rosa de bengala de conjuntiva palpebral inf. • Aumento de la viscosidad de la mucosa lagrimal. • Disminución del tiempo de ruptura de la lágrima • Neovascularización superficial • Punteado corneal 	
ESTADIO 2	
<ul style="list-style-type: none"> • Defecto epitelial, ovalado y en zona central / superior • Defecto rodeado por un borde de epitelio suelto. • Los bordes pueden volverse lisos y enrollados • Edema estromal con pliegues en memb. Descemet. • Actividad inflamatoria de cámara anterior. 	
ESTADIO 3	
<ul style="list-style-type: none"> • Úlcera persistente • Lisis estromal • Perforación 	

Figura 1: Distintos estadios de la QN. Estadios 1 (A), 2(B) y 3(C).

3.1.4 TRATAMIENTO

Los objetivos actuales de la terapéutica radican en evitar la progresión del daño ocular, intentando mantener tanto la estructura como la transparencia de la córnea. Es fundamental por lo tanto que se instaure un tratamiento de forma precoz, ya que una vez que se ha producido el daño, la regeneración corneal está muy comprometida. En la Tabla 2 se recogen clasificadas por estadios las distintas alternativas terapéuticas (Versura et al., 2018).

ESTADIO 1	ESTADIO 2	ESTADIO 3
<p>“Prevenir la ruptura epitelial y mejorar la calidad epitelial”</p> <ul style="list-style-type: none"> • Lágrimas artificiales • Parches oclusivos • Profilaxis de enfermedades que comprometan la superficie ocular 	<p>“Promover la curación del defecto epitelial”</p> <ul style="list-style-type: none"> • Antibióticos tópicos • LC medicamentosas • Suero autólogo • Suero de cordón umbilical 	<p>“Tratamiento quirúrgico en casos que no responden a tto.”</p> <ul style="list-style-type: none"> • Tarsorrafia • Flap conjuntival • Transplante de membrana amniótica.

Tabla 2: Tratamientos actuales en cada estadio de la QN.

La membrana amniótica se compone de una matriz avascular con propiedades antiangiogénicas y antiinflamatorias, considerándose eficaz en la regeneración del epitelio corneal. Es utilizada en oftalmología para el tratamiento de diversas afecciones, tales como úlceras corneales, glaucoma, quemaduras, leucomas, etc., ya que actúa inhibiendo la neovascularización y la fibrosis (Shimmura et al., 2001). Además, se ha recogido en la literatura que al utilizar la membrana amniótica como sustrato para el cultivo de células epiteliales, forman una estructura tridimensional que se asemeja mucho al tejido epitelial de la córnea (Endo et al., 2004).

Los tratamientos actuales con trasplante de membrana amniótica consisten en la aplicación de un fragmento de ésta sobre la superficie ocular, el cual suele fijarse a los tejidos mediante finas suturas, pudiéndose aplicar como recubrimiento o como injerto. En caso de existir defecto epitelial únicamente, sin afectar al estroma, la membrana amniótica se utiliza recubriendo toda la superficie, de manera que los factores de crecimiento que contiene hacen que las células del epitelio se empiecen a regenerar por su parte interna.

Sin embargo, en los casos en que exista una lesión más profunda, con pérdida de estroma, la membrana se injerta en la región carente del mismo. En este caso, las células crecen hasta sustituir a esa membrana, que se va reabsorbiendo progresivamente. Este proceso es más lento y la membrana amniótica induce una opacidad, como se aprecia en la Figura 2, que puede limitar la visión de manera transitoria.



Figura 2: Tratamiento de úlcera corneal con injerto de membrana amniótica.

Para evitar los problemas y limitaciones que suponen los trasplantes con membrana amniótica, tanto en lo referente a la intervención al paciente como en los efectos indeseables que producen en ellos, se han desarrollado estudios en los que se emplean extractos de dicha membrana, habiéndose ampliado su campo de aplicación de la vía tópica sobre piel (Choi et al., 2014) a la vía oftálmica, los cuales son incorporados en la correspondiente forma de administración para uso tópico (Liang et al., 2009).

3.2 ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS VIA OFTÁLMICA

3.2.1 VIAS DE ADMINISTRACIÓN

Las tres vías principales de administración de fármacos por vía ocular son: la periocular, la intraocular y la tópica.

Tanto la vía periocular como la intraocular se basan en la inyección del fármaco, siendo esta inyección en zonas adyacentes a la esclerótica o en la cavidad vítrea, respectivamente. En cambio, la vía tópica radica en el contacto directo entre el fármaco y la superficie ocular.

La vía de elección en este caso sería la tópica, además de por ser la menos invasiva, se trata de la de menor coste, mayor seguridad y la de mejor aceptación por parte de los pacientes, debido a su fácil aplicación.

No obstante, la vía tópica tiene ciertas restricciones debidas a las propias barreras oculares. La córnea constituye el principal obstáculo a la penetración de fármacos administrados por vía oftálmica debido a su impermeabilidad.

Además, junto a la absorción no productiva de la esclerótica, la eliminación rápida de la formulación debido al lagrimeo y el reflejo del parpadeo, hacen que el tratamiento de enfermedades oculares resulte una tarea difícil y poco exitosa cuando se aplican fórmulas convencionales.

También hay que considerar que cierta cantidad instilada es absorbida por la conjuntiva, pasando a la circulación sistémica, sin ejercer su efecto terapéutico en las células diana, incluso pudiendo ocasionar alguna consecuencia indirecta no deseada. La acción enzimática, tanto de la película lacrimal como de la córnea, también contribuirá a la reducción del porcentaje útil del fármaco.

Por otra parte, el epitelio corneal presenta uniones de sellado, como las uniones estrechas o desmosomas, que hacen que resulte impermeable para el paso de sustancias de más de 500 daltons (Hämäläinen et al., 1997) En un estudio realizado se comprobó que, en general, sólo el 1-5% del fármaco instilado es capaz de atravesar las barreras corneales (Urtti, 2006).

Esta deficiente biodisponibilidad, consecuencia de todas las vías de pérdida características de este lugar anatómico, tienen como consecuencia que no se consigan niveles terapéuticos suficientemente altos como para poder tratar determinadas enfermedades oculares.

En general, la mayoría de las formulaciones tópicas oculares se administran en forma de soluciones acuosas. Sin embargo, se caracterizan por tener baja eficacia ya que, aún con frecuentes aplicaciones, resulta difícil conseguir niveles terapéuticos. Con el fin de mejorar la biodisponibilidad y de aumentar el tiempo de contacto, se han desarrollado diferentes estrategias destinadas a la vía tópica ocular. Entre estas estrategias cabe destacar el empleo de sistemas de liberación controlada de fármacos.

Como consecuencia de todo lo anteriormente comentado, se ha planteado reemplazar las técnicas agresivas actuales por formas de administración oculares novedosas, que además de mejorar la técnica en sí, son nuevos sistemas de administración de fármacos con propiedades biofarmacéuticas más favorables y con capacidad para liberar el agente terapéutico de una forma mucho más precisa en el lugar diana en el ojo y, si es posible, de una manera predecible. Entre estos nuevos sistemas, los sistemas coloidales como los liposomas están cobrando en la actualidad un enorme interés (Sociedad Española de Oftalmología et al., 2004).

3.3 LIPOSOMAS

Los liposomas son estructuras vesiculares esféricas compuestas de una bicapa lipídica uni o multilamelar que rodea compartimentos internos acuosos, relativamente impermeable (Figura 3). Estos sistemas han adquirido una gran importancia como nanovehículos debido a su gran capacidad de carga relativa. Este grupo de vesículas lipídicas ha recibido una especial consideración como sistemas transportadores de compuestos terapéuticamente activos, debido a sus características únicas, tales como la capacidad para incorporar fármacos hidrófilos e hidrófobos, biocompatibilidad, baja toxicidad, no activación del sistema inmune y dirigir la liberación de compuestos bioactivos al sitio de acción (González-Rodríguez and Rabasco, 2011).

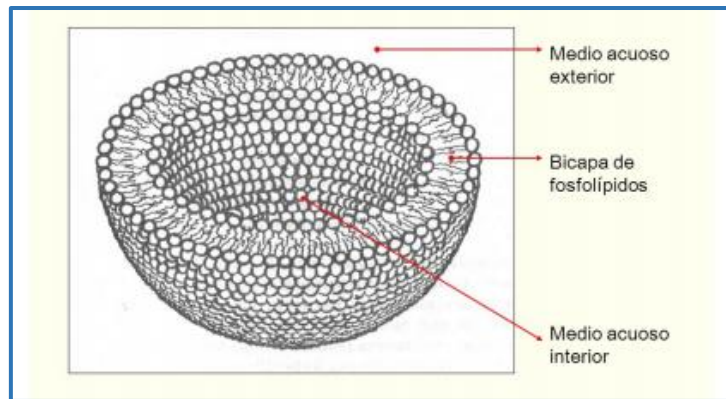


Figura 3: Esquema de un liposoma.

Los liposomas pueden poseer una o varias bicapas fosfolípicas. El tamaño de la vesícula constituye un parámetro crítico que define la vida media de los liposomas en el organismo, y el número y el tamaño de las bicapas afectan la cantidad de carga del fármaco en los liposomas. Además, en base a su tamaño y número de bicapas, los liposomas se agrupan en dos tipos: vesículas unilamelares y vesículas multilamelares.

Estos sistemas de liberación son adecuados para el transporte de proteínas ya que son biocompatibles, inertes biológicamente, poco inmunogénicos, tienen escasa toxicidad, tamaño adecuado y núcleo acuoso (Laouini et al., 2013).

Recientemente, se han empleado los liposomas con proteínas para el tratamiento de varias patologías, como el cáncer de vejiga (Vila-Caballer et al., 2016), tratamiento de las cicatrices hipertróficas con papaína (Chen et al., 2017), para la terapia de infecciones vaginales por el Virus del Papiloma Humano con interferón alfa-2b (Jøraholmen et al., 2017), o para la disolución de los trombos mediante administración de Activador Tisular del Plasminógeno recombinante (Hsu and Chen, 2017).

3.3.1 TRANSFERSOMAS

Entre los liposomas, los denominados liposomas ultradeformables o transfersomas, gracias a la combinación de los fosfolípidos con activadores del borde en su composición, presentan una bicapa que es capaz de moldearse a temperatura ambiente. Esto les permite atravesar las membranas biológicas sin llegar a romperse, evitando la liberación espontánea de su contenido (Arroyo García, 2017).

Estos activadores del borde que confieren esta actividad tan interesante son, por lo general, tensioactivos que reducen la tensión superficial de los líquidos. Uno de los factores a tener en cuenta a la hora de trabajar con activadores del borde es que, superada una determinada concentración, conocida como concentración micelar crítica (CMC), no sólo se agregan al resto de lípidos formando parte de la estructura de la bicapa, sino que empiezan a constituir por sí mismos distintos tipos de vesículas, conocidas como micelas mixtas (MMs), como afirmó Schubert (2003) en sus estudios y como se recoge en la Figura 4.

Es importante resaltar que el valor de CMC no es fijo para cada sal biliar, ya que aspectos como la temperatura, fuerza iónica, existencia de impurezas o el pH del medio influyen significativamente en el valor obtenido (Ventura et al., 2014).

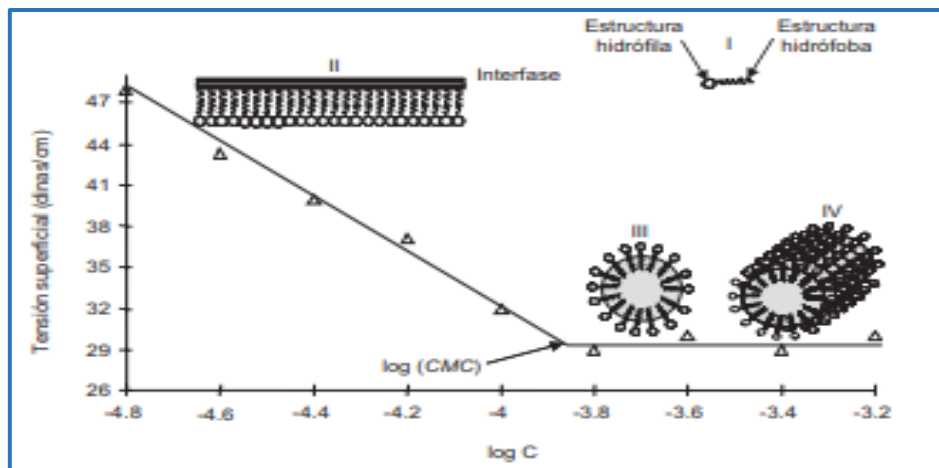


Figura 4: Representación esquemática de las estructuras formadas por los tensioactivos a distintas concentraciones (Islas et al., 2010) I) Monómero; II) por debajo de la CMC, el tensioactivo se integra en la bicapa en forma de monómero; III) por arriba de la CMC, los monómeros se agregan formando micelas; IV) a concentraciones mucho mayores a la CMC se organizan en forma de superestructuras cilíndricas y de otros tipos.

4 OBJETIVOS

Teniendo en cuenta los antecedentes anteriormente descritos en cuanto a la dificultad e invasividad del injerto de membrana amniótica y las ventajas que ofrecen los liposomas como sistemas de administración de fármacos por vía oftálmica, el objetivo general del presente trabajo de investigación fue la formulación de liposomas de EMA para su posterior uso en el tratamiento de la QN.

Para conseguir este objetivo general se definieron los siguientes objetivos parciales:

1. Poner a punto de métodos de cuantificación de las proteínas presentes en EMA por espectrofotometría UV-visible y por HPLC.
2. Caracterizar el EMA.
3. Estudiar la estabilidad de las proteínas en las diferentes condiciones de elaboración de los liposomas.
4. Diseñar, elaborar y caracterizar diferentes formulaciones de liposomas para vehicular el EMA.
5. Obtener una formulación optimizada y realizar estudios de caracterización.
6. Analizar el comportamiento de la formulación optimizada en ensayos de liberación y permeación *in vitro*.

5 METODOLOGÍA

5.1 MATERIALES Y REACTIVOS

- Acetona (Panreac, Barcelona)
- Acetonitrilo (Panreac, Barcelona)
- Agua Milli-Q® (Milli-Q® Advantage, Millipore)
- Bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB) (Sigma-Aldrich, Barcelona)
- Cloroformo (Panreac Química, Barcelona)
- Colato sódico (NaC) (Sigma-Aldrich, Barcelona)
- Colesterol (CH) (Sigma-Aldrich, Barcelona)
- Desoxicolato sódico (NaDC) (Sigma-Aldrich, Barcelona)
- Estándar de ovoalbúmina (Sigma-Aldrich, Barcelona)
- Polvo liofilizado de gonadotropina coriónica humana (Sigma-Aldrich, Barcelona)
- Estearilamina (EA) (Fluka-Biochemika, Suiza)
- Fosfatidilcolina (FC) (Sigma-BioChemika, Alemania)
- Kit para determinación de proteínas Ácido Bicinconínico (Sigma-Aldrich, Barcelona)
- Metanol (Panreac, Barcelona)
- Polvo de placenta: Placenta acetone powders Human (Sigma-Aldrich, Barcelona)
- Taurocolato Sódico (NaTC) (Sigma-Aldrich, Barcelona)
- Tampón HEPES pH 7.4 (Panreac Química, Barcelona)
- Tampón fosfato: hidrógeno fosfato de sodio y dihidrógeno fosfato de sodio (Panreac Química, Barcelona)

5.2 EQUIPOS E INSTRUMENTACIÓN

- Agitador magnético (Ret Basic IKA®- WERKE)
- Calorímetro diferencial de barrido (DSC, Setaram 131)
- Bala de nitrógeno (Alphagaz)
- Balanza analítica de precisión (Explorer®Pro)
- Baño de ultrasonidos (VWR Ultrasoniccleaner)
- Baño termostatzado (Raypa ICI_200)
- Bomba de vacío (Millipore)
- Bomba peristáltica (RaininDynamax RP-1)
- Centrífuga (Eppendorf Centrifuge 5804 R)
- Equipo de HPLC (Hitachi Elite LaChrom)
- Equipo de permeación (SES EmbH Analyssysteme)
- Espectrofotómetro UV-visible (Agilent 8453)
- Extrusor (LIPEX TM Thermobarrel Extruder)
- Homogeneizador ultrasónico (Ultrasonic Processor UP100H)
- Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución (Hitachi S-5200)
- pH-metro (Crison pH-meter Basic 20+)
- Rotavapor (BüchiRotavapor R-210 con Büchi Heating Bath B- 491)
- Vórtex (Atom Atomixer)
- Zetasizer Nano ZS (Malvern Zetasizer)

5.3 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

A lo largo del presente estudio, se cuantificaron las proteínas mediante dos métodos: el método del ácido bicinonínico (BCA) para proteínas totales, y por HPLC para la gonadotropina coriónica humana (hCG). Para conocer qué porcentaje representaba la hCG, se cuantificó una muestra de EMA por triplicado por ambos métodos.

5.3.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO BCA DE CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Para determinar el contenido proteico del EMA se empleó el método BCA.

El fundamento de este método consiste en la reacción entre las proteínas con iones Cu^{2+} en un medio básico. Esta reacción da lugar a iones Cu^+ , los cuales al reaccionar con el BCA dan lugar a un complejo coloreado púrpura cuyo máximo de absorbancia se encuentra a 562 nm. Este pico de absorbancia permitió determinar la concentración de proteínas mediante espectrofotometría UV-visible (Figura 5).

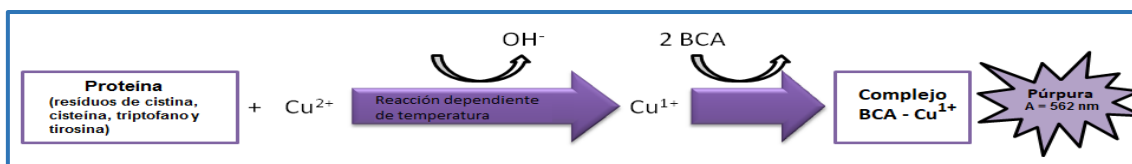


Figura 5: Esquema de reacción del método BCA.

Para el procedimiento de cuantificación, se añadieron 100 μL de muestra y 2 mL de reactivo previamente preparado (1:50 sulfato de cobre + 49:50 ácido bicinconónico). Las muestras se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$ y en agitación durante 30 minutos. Posteriormente, se midió su absorbancia a 562 nm en el espectrofotómetro UV-visible.

La validación del método se llevó a cabo realizando estudios estadísticos de:

Linealidad. La linealidad es la capacidad del método de prueba para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un rango dado.

Para su determinación, se prepararon distintas diluciones de proteína estándar de concentraciones 0.3, 0.45, 0.6, 0.75 y 0.9 mg/mL por triplicado y se representaron frente a los valores de absorbancia obtenidos para cada concentración. A continuación, se evaluó por el método de regresión de mínimos cuadrados y el coeficiente de correlación (r).

Mínimo detectable y mínimo cuantificable. El límite de detección (LOD) se define como la concentración más baja de un analito en una muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada. El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración más baja de un analito en una muestra que se puede cuantificar con resultados aceptables.

Para ello, se prepararon diluciones de la solución estándar, de concentraciones 0.03, 0.15, 0.3, 0.48 y 0.6 mg/mL, por triplicado. Tras cuantificar la absorbancia de cada dilución, se calculó el factor de respuesta de cada una dividiendo el valor de absorbancia por el de concentración. Tras calcular la media y la desviación estándar de los factores de respuesta, se definieron los niveles de confianza y se representaron junto a los factores de respuesta de cada muestra frente a su concentración. La concentración más baja dentro de los niveles de confianza se fijó como LOQ.

Como LOD se fijó la concentración más pequeña que diese un valor de absorbancia 10 veces mayor que el ruido del espectrofotómetro, independientemente de que fuese cuantificable.

Exactitud. Este parámetro se define como la capacidad de medir un valor cercano a la magnitud real y fue estudiada mediante experimentos de recuperación. Estos experimentos se realizaron agregando cantidades conocidas a las soluciones de placebo. La recuperación se realizó a tres niveles: 50, 100 y 150% de la concentración estándar de proteína, siendo el 100% 0.6 mg/mL.

Cada nivel se determinó por triplicado. Luego se analizaron las soluciones y se calculó el porcentaje de recuperación a partir de la recta de calibrado. Asimismo, se calculó el promedio de los porcentajes de recuperación, así como su desviación estándar relativa (RSD).

El porcentaje de recuperación promedio debe estar dentro de los criterios de aceptación de 98.0 a 102.0%. Además, la RSD debe ser inferior al 2.0%.

Precisión. La precisión de un método se define como la concordancia entre los resultados de pruebas realizadas independientemente. La precisión proporciona una indicación de los errores aleatorios y se puede dividir en repetibilidad y precisión intermedia.

La repetibilidad implica el análisis de las repeticiones por el mismo analista. Este parámetro se divide en: repetibilidad de inyección y repetibilidad de análisis.

Repetibilidad de inyección. Se basa en la repetición de la medida de una misma muestra en un día dado. Para ello, se realizaron 10 medidas de una solución de concentración 0.9 mg/mL, calculando la media y la RSD de estas. Se considera el parámetro como válido si el valor de la RSD es menor de 2.

Repetibilidad de análisis. Este ensayo se ha realizado con diferentes concentraciones de solución estándar de proteínas (0.3, 0.6 y 0.9 mg/mL). Se cuantificaron las absorbancias por triplicado, calculando medias y RSD en porcentaje de cada concentración. El parámetro es validado si el valor medio de las RSD es menor de 2.

Precisión intermedia: Para la evaluación de la precisión intermedia, se realizó una repetibilidad adicional para comparar los resultados obtenidos por los diferentes operadores en dos días diferentes. Cada estudio de repetibilidad se realizó analizando dos inyecciones de dos soluciones estándar de concentración 0.6 mg/mL. El tratamiento de los datos se llevó a cabo de la misma forma que la repetibilidad del análisis.

5.3.2 CUANTIFICACIÓN POR HPLC

Se siguió el método descrito por Pithadia et al. (2015) con ciertas modificaciones para la cuantificación de la hCG, proteína presente en el EMA.

El análisis por HPLC fue llevado a cabo utilizando un equipo Hitachi Elite LaChrom. Se utilizó una columna Zorbax SB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm). El flujo se fijó en 1 mL/min y el volumen de inyección en 20 µL. La fase móvil estaba constituida por tampón fosfato sódico (pH 7.0, 0.05 mM) y acetonitrilo, en proporción 87.5:12.5 % v/v.

Para la correcta detección, se requirió un tratamiento previo de la hCG. Para ello, se tomaron 350 µL de muestra en un eppendorf y se le adicionaron 700 µL de acetona. Las muestras se agitaron en vórtex durante 10 min y se centrifugaron a 4000 rpm/4°C/10 min. Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la hCG en 200 µL de tampón HEPES 7.4. Este volumen se filtró usando filtros de acetato de celulosa (Pierce™ Spin Cups - Cellulose Acetate Filter) adaptados en eppendorf y centrifugando en las mismas condiciones. Finalmente, las muestras fueron trasvasadas a un vial de HPLC con inserto incorporado.

5.4 EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL POLVO DE PLACENTA

Para efectuar el proceso de extracción de las proteínas del polvo de placenta, se utilizó un homogeneizador ultrasónico usando como buffer de homogenizado HEPES pH 7.4, isotonicado con NaCl 150 mM.

Se realizó la extracción de 40 mg de polvo de placenta en 2 mL de HEPES por duplicado, usando el procesador durante dos tiempos distintos (30 s y 60 s) para comprobar el efecto del tiempo sobre la eficacia de la extracción. Posteriormente, la muestra se centrifugó en 2 condiciones distintas, de nuevo, 3000 rpm/4 °C/10 minutos y 8000 rpm/4 °C/10 minutos para comprobar qué condiciones permiten una mayor extracción. Las proteínas totales de las 4 alícuotas fueron cuantificadas por el método BCA. Las muestras tratadas se recogen en la Tabla 3.

	Tiempo de sonicación (s)	Velocidad de centrifugación (rpm)
1	30	3000
2	60	3000
3	30	8000
4	60	8000

Tabla 3: Condiciones ensayadas para determinar las de mayor eficacia de extracción.

Una vez centrifugada la muestra, se recogió el sobrenadante y se conservó a 4 °C en nevera.

Las posteriores extracciones se realizaron a las condiciones fijadas y almacenando los sobrenadantes en un único tubo falcon con el fin de utilizar en todos los ensayos un EMA con la misma concentración de proteínas.

5.5 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS

Se evaluó la estabilidad de la proteína frente a las condiciones de elaboración y caracterización de los liposomas. Estos ensayos incluyeron estabilidad frente al tiempo, a la temperatura y la centrifugación.

5.5.1 TIEMPO

Se cuantificó una vez por semana durante un mes la concentración de proteínas de las cuatro extracciones realizadas para el estudio de extracción, utilizando el método BCA.

5.5.2 TEMPERATURA

Para el estudio de estabilidad frente a la temperatura, el método de cuantificación con BCA no es válido, ya que tanto la estructura macromolecular de la proteína y cuatro aminoácidos específicos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación de color en muestras de proteínas cuando son ensayadas con este método. Esto implica que, aunque las proteínas se encuentren desnaturalizadas, el BCA seguirá reaccionando con estos aminoácidos formando el complejo coloreado.

Por ello, se llevó a cabo la técnica descrita por Cueto et al. (2003) para la determinación de temperatura de desnaturalización de proteínas, utilizando un calorímetro diferencial de barrido (DSC Setaram 131).

El análisis se realizó con un gradiente de temperatura de 1 °C/min, en un rango de temperatura desde 30 °C hasta 90 °C. Después se enfrió rápidamente la muestra hasta los 30 °C y se dejó estabilizar a esa temperatura durante 5 minutos. En la Tabla 4 se recogen las muestras que fueron sometidas al ensayo, así como la muestra usada como control. El EMA se desnaturalizó sometiéndolo a 80 °C durante 30 minutos.

Muestra Problema	Muestra Control	Peso muestra (mg)
Polvo de Placenta	Aire	7.5
HEPES	HEPES	8.4
EMA	HEPES	7.7
EMA Desnaturalizado	HEPES	7.8

Tabla 4: Muestras sometidas a la calorimetría diferencial de barrido.

5.5.3 CENTRIFUGACIÓN

Para evaluar si las proteínas permanecían estables a las condiciones de centrifugación necesarias para hacer precipitar los liposomas y poder así cuantificar el sobrenadante en la determinación de la eficacia de encapsulación (EE), se realizó una extracción la cual se separó en dos alícuotas.

Una de ellas se cuantificó inmediatamente por el método BCA y la otra se sometió a centrifugación (8000 rpm/4 °C/60 min) y se cuantificó. Posteriormente, se compararon ambos valores.

5.6 ELABORACIÓN DE LAS FORMULACIONES

Para la elaboración de los liposomas, se empleó la técnica de evaporación en capa fina o Bangham (TLE, *Thin Layer Evaporation*), ampliamente utilizada por González-Rodríguez et al. (2016) con el fin de obtener una elevada EE del EMA, así como buenas características físicas de las vesículas.

En primer lugar, se procedió a la formación de una película constituida por los materiales lipídicos, que posteriormente darán lugar a la bicapa del liposoma. Para ello, se añadieron 87.95 mg de FC, 10.44 mg CH, sal biliar y agente de carga (cantidad según formulación) a un matraz de fondo redondo de 50 mL. La mezcla de lípidos se disolvió en 8 mL de cloroformo/metanol (50:50).

A continuación, se sometió la disolución a un proceso de rotaevaporación de los disolventes en el rotavapor a 58 °C hasta crear una fina película (Figura 6). Durante esta fase fue fundamental asegurarse de que el disolvente se evaporase de forma homogénea en toda la superficie, evitando la cristalización de los componentes y la formación de burbujas. La película se mantuvo a presión reducida durante 24 horas para asegurar la completa evaporación del disolvente.



Figura 6 Película lipídica formada en el proceso de elaboración de liposomas por el método TLE.

Posteriormente, se hidrató la película con la fase acuosa, constituida por el EMA en un tampón HEPES (pH 7.4). La función del HEPES es mantener los liposomas a un pH similar al del ojo e isotonicado con NaCl 150 mM.

Para la formación de las vesículas, se sometió la mezcla a 5 ciclos de en agitar en vórtex (1 minuto) y calentar a 58°C (5 minutos). Se obtuvieron de esta forma los liposomas, que se envasaron rápidamente en viales de vidrio y almacenados a 4° C en oscuridad hasta su posterior uso.

5.7 CARACTERIZACIÓN DE LAS VESÍCULAS

5.7.1 ANALISIS DIMENSIONAL: TAMAÑO E INDICE DE POLIDISPERSIÓN (PDI)

El tamaño de las vesículas se determinó por espectroscopía de correlación fotónica. Esta técnica calcula el radio hidrodinámico (RH) de las partículas que se encuentran suspendidas en un medio y, de este modo, el tamaño de dichas partículas, así como el índice de polidispersión (PDI).

El PDI es un parámetro que aporta información sobre la homogeneidad de la muestra. Toma valores en un rango de 0-1, siendo más homogénea cuando menor es el valor. Valores elevados permiten detectar que las poblaciones son heterogéneas o que existen más de una población, siendo esto de especial importancia a la hora de observar la aparición de MMs por exceso de activador de borde.

El equipo utilizado fue el Zetasizer Nano ZS que va a medir la distribución de los tamaños. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

5.7.2 CARGA SUPERFICIAL: POTENCIAL Z (PZ)

Las propiedades eléctricas de la superficie de los liposomas pueden tener gran influencia sobre la estructura de la bicapa, su fluidez e incluso su estabilidad durante el almacenamiento.

Además, juega un papel importancia en la farmacodinamia de las formulaciones. En el caso de la formulación que nos ocupa, al contar la córnea con una carga superficial negativa, un valor positivo de la formulación favorecería la penetración y el tiempo de permanencia de esta (Law et al., 2000; Rabinovich-Guilatt et al., 2004).

Por otro lado, cuando los liposomas poseen una carga neutra, resulta inevitable que durante el almacenamiento se produzca el fenómeno de la agregación, pudiendo evitarse fácilmente introduciendo portadores de carga en la mezcla lipídica, de forma que se produzcan repulsiones electrostáticas entre los liposomas.

El potencial zeta (ζ) es una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión. La movilidad electroforética refleja el grado de movimiento de coloides en dispersión bajo la influencia de un potencial eléctrico aplicado a través de ella y expresa la carga neta efectiva sobre la superficie de las vesículas.

El equipo utilizado fue un Zetasizer Nano ZS que va a medir la distribución de cargas superficiales de las partículas. Las medidas fueron realizadas por triplicado.

5.7.3 EFICACIA DE ENCAPSULACIÓN (EE)

Este parámetro refleja la cantidad en porcentaje de la proteína que se ha internalizado en las vesículas. Esta se determinó de forma indirecta, cuantificando la cantidad de proteínas existente en el medio y teniendo en cuenta la cantidad de proteína que se añadió.

Para determinar la fracción no encapsulada, las muestras se sometieron a centrifugación en condiciones de 8000 rpm/4 °C/60 min/. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se cuantificó mediante el método del BCA.

Por diferencia con el total de proteínas adicionado, que era conocido por la cuantificación del EMA y por el volumen añadido en cada lote, se determinó la fracción encapsulada y se representó en forma de porcentaje frente al total añadido.

5.7.4 INDICE DE DEFORMABILIDAD (ID)

Uno de los parámetros más relevantes a la hora de caracterizar transfersomas es el índice de deformabilidad. Para la determinación de este factor, se hizo pasar la formulación optimizada de liposomas por una serie de poros de diámetro conocido con el fin de observar la capacidad de estos de recuperar su forma y tamaño una vez atravesados, evitando romperse y liberar el fármaco.

Para ello, se diluyó la dispersión hasta 1.5 % p/v de lípidos y se extruyeron las vesículas a través de un filtro de membrana de policarbonato de 800 nm en un extrusor (LIPEX™ Thermobarrel Extruder), como se muestra en la Figura 7, bajo flujo de nitrógeno (González-Rodríguez et al., 2012). El ID se calculó determinando el flujo (J) de la muestra a través del filtro y la relación del tamaño vesicular obtenido y el tamaño del poro.

Para la determinación del flujo se hizo atravesar la formulación previamente tratada con el filtro de 800 nm por uno de 100 nm (rp) aplicando una presión de 290 psi durante 10 minutos. Posteriormente, se midió el tamaño promedio de los liposomas una vez extruidos (rv) utilizando el equipo Zetasizer nano (Malvern Instruments, Reino Unido). El ensayo se realizó por duplicado. El ID se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$ID = J \times \left(\frac{rv}{rp}\right)^2$$

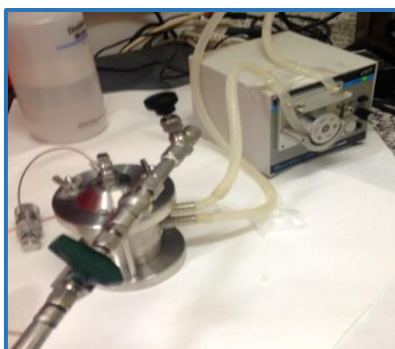


Figura 7: Dispositivo de extrusión, donde se aprecia el extrusor y la bomba de recirculación del agua.

5.7.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE PARTÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE ALTA RESOLUCIÓN (FEGSEM)

La caracterización morfológica superficial de la formulación optimizada de liposomas fue evaluada mediante FEGSEM. Para ello se utilizó un microscopio electrónico HITACHI S-5200, el cual posee un detector de electrones que permite la observación de la superficie de la muestra (Figura 8).



Figura 8: Microscopio electrónico HITACHI S-5200.

La muestra fue previamente tratada diluyendo 500 μL de ésta en 2.5 mL de tampón HEPES. Posteriormente se depositó en un soporte de silicio y se dejó secar al aire durante una noche. Al día siguiente fueron recubiertas con platino mediante *sputtering*, con el fin de transformarlas en superficies conductoras.

5.8 DETERMINACIÓN DE LA CMC DEL ÁCIDO CÓLICO

Como se ha descrito anteriormente, para la obtención de transfersomas se adicionó a la mezcla lipídica un activador del borde, en este caso se utilizaron 3 tipos distintos de sal biliar, a saber: colato Na^+ (NaC) desoxicolato Na^+ (NaDC) y taurocolato Na^+ (NaTC).

Para determinar la cantidad máxima de sal biliar que pudiese usarse sin que se superase la CMC, se prepararon 5 lotes de liposomas con concentraciones crecientes de ácido cólico (Tabla 5).

N.º LOTE	FC (mM)	CH (mM)	HEPES (mL)	NaC (mM)
L1	36.67	9	3	3
L2	36.67	9	3	6
L3	36.67	9	3	12
L4	36.67	9	3	25
L5	36.67	9	3	73.3

Tabla 5: Composición de los lotes elaborados para determinar la concentración óptima de NaC.

Posteriormente, se midieron en el Zetasizer Nano ZS los parámetros de tamaño, PDI, carga superficial y se midió la transmitancia en el espectrofotómetro, haciendo previamente un barrido para determinar la longitud de onda de máxima transmitancia.

5.9 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se aplicó esta herramienta estadística en la realización del *screening* que permitiera determinar la composición óptima de la formulación, identificando aquellos factores influyen y en qué medida sobre las respuestas evaluados. El estudio se planificó con el software DOEpack.

Para ello, se fijaron cuatro factores con tres niveles dentro de cada uno según se muestra en la Tabla 6 y se seleccionó una matriz L9 Taguchi. Se generaron de esta forma 9 experimentos, recogidos en la Tabla 7 que se realizaron por duplicado. Para evaluar los resultados se caracterizaron las formulaciones en tamaño, PDI, potencial Z y EE.

FACTOR	Nivel 1	Nivel 2	Nivel 3
ACTIVADOR DEL BORDE	NaC	NaDC	NaTC
AGENTE DE CARGA	Ninguno	EA	DDAB
CANTIDAD AGENTE DE CARGA	0.02	0.04	0.06
CONCENTRACIÓN EMA	50%	75%	100%

Tabla 6: Factores analizados en el *screening*.

	Activador Borde	Agente de Carga	Cantidad del agente de carga (mmol)	Concentración EMA (mg/mL)
1	NaTC	Sin	0.02	0.125
2	NaTC	EA	0.04	0.187
3	NaTC	DDAB	0.06	0.25
4	NaC	Sin	0.04	0.25
5	NaC	EA	0.06	0.125
6	NaC	DDAB	0.02	0.187
7	NaDC	Sin	0.06	0.187
8	NaDC	EA	0.02	0.25
9	NaDC	DDAB	0.04	0.125

Tabla 7: Experimentos correspondientes a la matriz experimental Taguchi L_9 .

La evaluación de los efectos producidos por la modificación de las variables se realizó mediante análisis ANOM. Estos prueban si las medias de los tratamientos difieren de la media general (también conocida como media principal).

5.10 OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN

Una vez evaluados los resultados obtenidos en el cribado, se seleccionaron cuatro combinaciones para seleccionar de entre ellas la composición óptima, siendo los factores de activador de borde y cantidad de agente de carga los que varían. Los factores de agente de carga utilizado y concentración del EMA permanecieron fijos. Estas cuatro combinaciones se recogen en la Tabla 8, las cuales se elaboraron por duplicado y se caracterizaron.

	Activador Borde	Cantidad del agente de carga (mmol)
A	NaC	0.04
B	NaC	0.06
C	NaDC	0.04
D	NaDC	0.06

Tabla 8: Combinaciones ensayadas para la optimización.

Los objetivos de la optimización en cada una de las variables se recogen en la tabla 9.

Variable	Objetivo
Tamaño	800 nm
PDI	Mínimo
Potencial Z	Máximo Positivo
EE	Máximo

Tabla 9: *Objetivos de la optimización.*

5.11 ENSAYOS *IN VITRO*

Todos los ensayos recogidos en este apartado se realizaron sobre réplicas de la composición ideal de los liposomas determinadas en el apartado anterior. La cuantificación de las muestras se realizó determinando la hCG mediante HPLC y extrapolando las proteínas totales.

5.11.1 ENSAYO DE LIBERACIÓN *IN VITRO*

Para el ensayo de liberación de las proteínas de los liposomas se utilizó el método de diálisis. El ensayo se realizó por duplicado sobre muestras de liposomas y del EMA sin tratar.

Para ello se introdujo un 1mL de cada muestra en una bolsa de diálisis (Spectra/por membrana MWCO: 12—14000, Spectrum Laboratories, EE. UU.), previamente hidratada, y los extremos fueron sellados con clips de diálisis. Estas bolsas se sumergieron en 50 mL de solución de lágrima artificial (NaHCO₃ 0.218% p/p, NaCl 0.678% p/p, CaCl₂·2H₂O 0.0084% p/p, KCl 0.138% p/p) en agitación a 37°C, simulando así las condiciones biológicas.

Se tomaron alícuotas de 0.5mL, reponiendo posteriormente el volumen, a 0, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos. Posteriormente se cuantificó la hCG por HPLC.

5.11.2 ENSAYO DE PERMEACIÓN *IN VITRO*

El ensayo de permeación *in vitro* se llevó a cabo en celdas de difusión de Franz dispuestas en un equipo de permeación, como se muestra en la Figura 9.

Para replicar las condiciones del epitelio corneal se utilizaron membranas sintéticas de nitrato de celulosa de 0.2 μm (47 mm de diámetro, área de difusión de 3.14 cm²) las cuales fueron previamente hidratadas en solución HEPES pH 7.4 durante 1 hora. Posteriormente, fueron impregnadas en gelatina (12% p/v) con la finalidad de simular el elevado contenido proteico del estroma, capa principal de la córnea (González-Andrades et al., 2019). Los compartimentos receptores se llenaron con 16 mL de solución de lágrima artificial (NaHCO₃ 0.218% p/p, NaCl 0.678% p/p, CaCl₂·2H₂O 0.0084% p/p, KCl 0.138% p/p) y se mantuvieron a 37 °C en agitación continua.

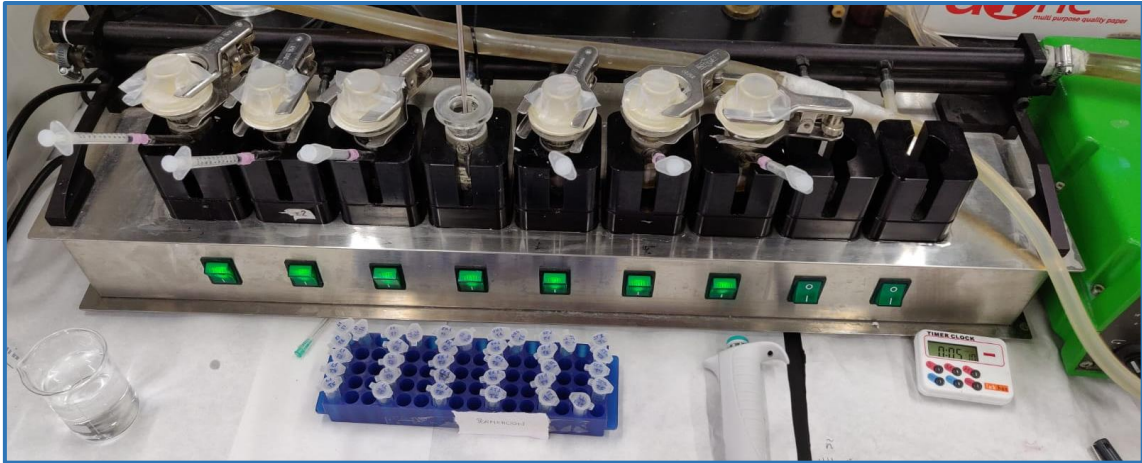


Figura 9: Equipo de permeación utilizado para el estudio in vitro.

Se ensayaron por duplicado muestras de liposomas y EMA, colocando 1 mL de cada muestra sobre la membrana en el compartimento receptor, sellándolo con parafilm para evitar la pérdida de humedad.

A intervalos de tiempo predeterminados (30, 60, 120, 240, 360 y 1440 minutos) se tomaron alícuotas de 1 mL, reponiendo posteriormente el volumen. Posteriormente se cuantificó la hCG por HPLC. La cantidad acumulada media de hCG permeada por unidad de superficie de la membrana se representó en función del tiempo.

Así, se calculó la tasa (pendiente de la parte lineal del gráfico) dividida por el área disponible para difusión (A), generando el coeficiente de permeabilidad (P).

$$P = \frac{dQ}{dt} \cdot A \cdot Cd$$

A = área de difusión (3.14 cm²); dQ/dt = cantidad de fármaco / tiempo; Cd = Concentración de fármaco en el compartimento donador. El flujo (J) se calculó de la siguiente manera:

$$J = P \cdot Cd$$

6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

6.1.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO BCA

A la vista de los resultados (Figura 10), el método resultó ser lineal en el rango de 0.3 a 0.9 mg/mL, fijándose el mínimo cuantificable en 0.15 mg/mL y el mínimo detectable en 0.03. Los valores de RSD obtenidos no superaron en ninguno de los casos el límite establecido, por lo que se determinó que el método es exacto y preciso (cumple los estudios de repetibilidad de inyección, de análisis y de precisión intermedia). Se cumplen así las condiciones de validación de un método analítico (González Hernández, 1996).

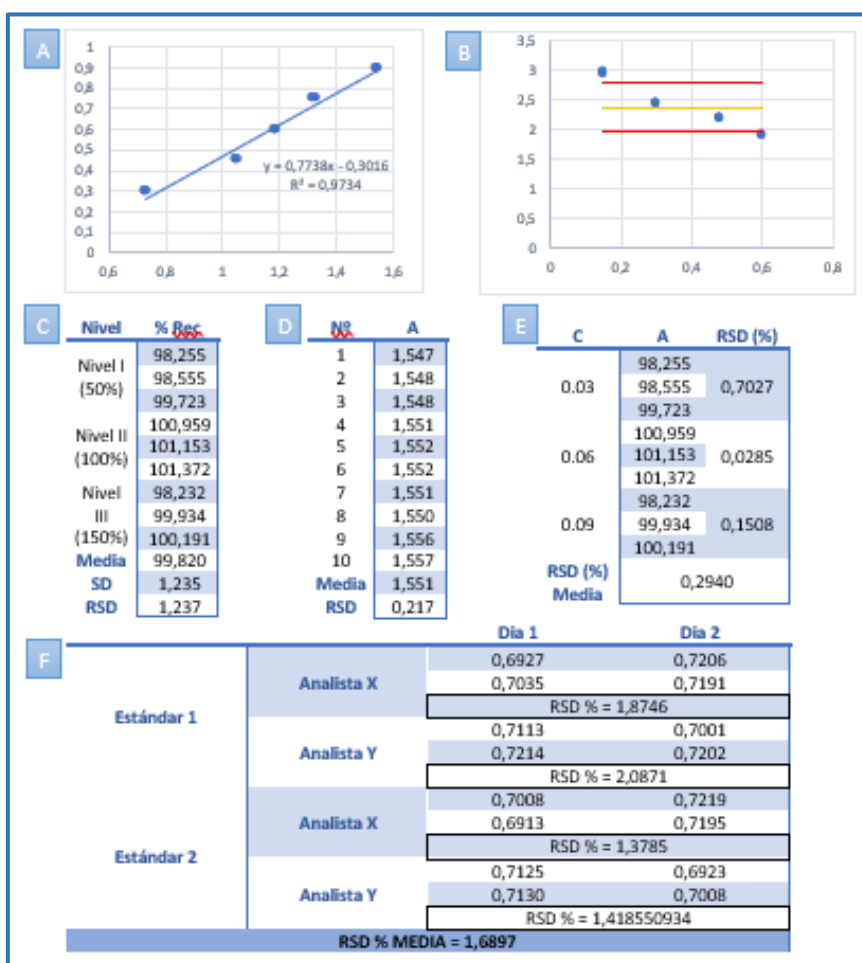


Figura 10: Resultados del estudio estadístico de validación. Linealidad (A), mínimo detectable y mínimo cuantificable (B), exactitud(C), repetibilidad de inyección(D), repetibilidad de análisis (E) y precisión intermedia(F).

6.1.2 CUANTIFICACION DE hCG POR HPLC

Se ha puesto a punto un método sencillo por HPLC, como se describió en el apartado de Metodología, para cuantificar la hCG en los ensayos de liberación y permeación.

En la Figura 11 se recogen imágenes de los cromatogramas obtenidos del estándar de hCG (A) y de una muestra del EMA (B). Se observa que la hCG es perfectamente detectable en el EMA, eluyendo ésta entre 2.30 y 2.34 minutos y mostrando un máximo de absorbancia en 265 nm.

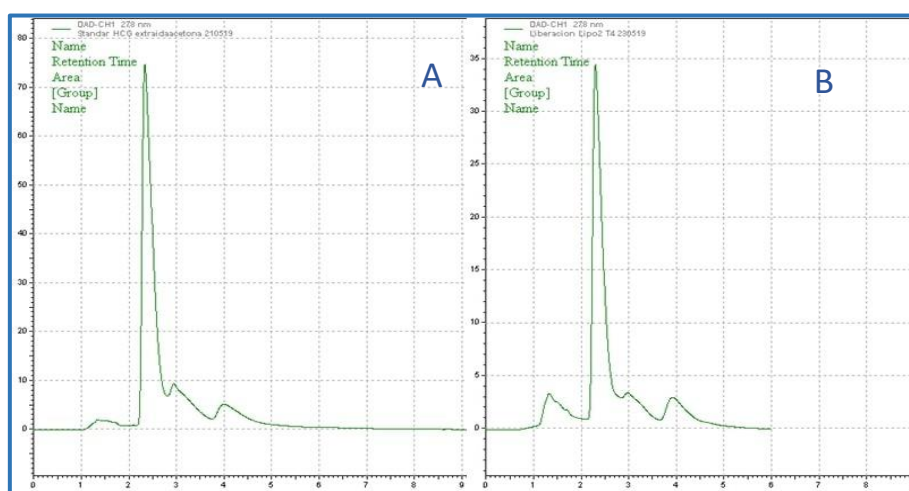


Figura 11: Cromatogramas obtenidos por HPLC. A la izquierda (A), la muestra de hCG estándar. A la derecha (B), una muestra de EMA.

Para la cuantificación de las distintas muestras, se compararon las áreas de los distintos picos con el área del pico obtenido en el estándar (647252), de concentración conocida (1.075 µg/mL).

6.1.3 PORCENTAJE DE LA hCG DENTRO DE LAS PROTEÍNAS TOTALES DEL EMA

Tras cuantificar por triplicado tanto las proteínas totales como la hCG del EMA, se determinó que ésta representaba un 7.846 % de las proteínas totales. Verificar que la hCG es una de las proteínas presentes en EMA como corroboran autores como Harada y Hershman (1978) permitió extrapolar la cantidad de proteínas totales existentes en las muestras de los ensayos de liberación y permeación, donde el elevado volumen de los reservorios donde se tomaba la muestra impedía utilizar de forma correcta el método BCA.

6.2 EXTRACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL POLVO DE PLACENTA

En este apartado, se evaluó la influencia de distintos factores que pudieran afectar a la extracción de las proteínas totales, del polvo de placenta comercial. De ellos, se seleccionaron las condiciones que repercutieron en una extracción más favorable.

En la Figura 12 se puede apreciar cómo el aumento del tiempo de sonicación afecta considerablemente a la concentración de proteínas extraídas, disminuyéndola. Esto podría deberse a que la sonicación induce la precipitación de las proteínas, reduciendo así la cantidad solubilizada recuperada (Krishnamurthy et al., 2000). La velocidad de centrifugación no parece afectar a la cantidad extraída.

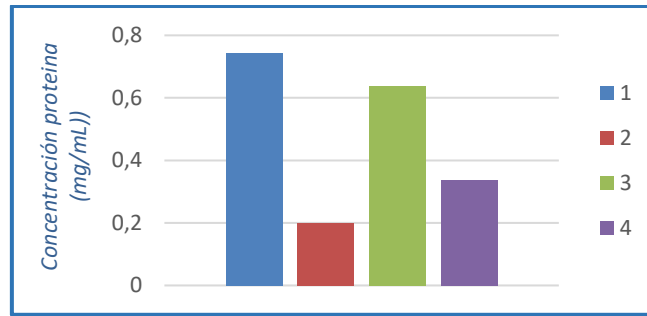


Figura 12: Concentración de proteínas extraídas en distintas condiciones.

A la vista de los resultados obtenidos, las condiciones de extracción se fijaron en 30 segundos de sonicación y centrifugación a 3000 rpm/4 °C/ 10 min.

6.3 ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS PROTEÍNAS

6.3.1 TIEMPO

Tal y como se observa en la Figura 13, las condiciones de conservación son las apropiadas para una solución de proteínas (Mobility, 2018).

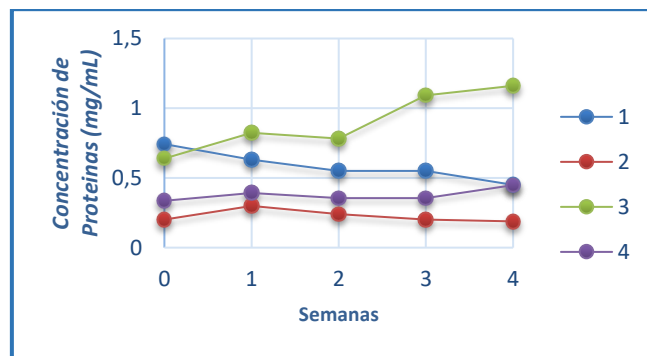


Figura 13: Estabilidad de las proteínas a lo largo del tiempo.

6.3.2 TEMPERATURA

En la Figura 14 se recogen los termogramas correspondientes a las muestras de EMA control (A) y sometido a 80 °C durante 30 min. Se aprecia que los picos típicos de la desnaturalización de las proteínas (Cueto et al., 2003) no comienzan a aparecer hasta los 70° C.

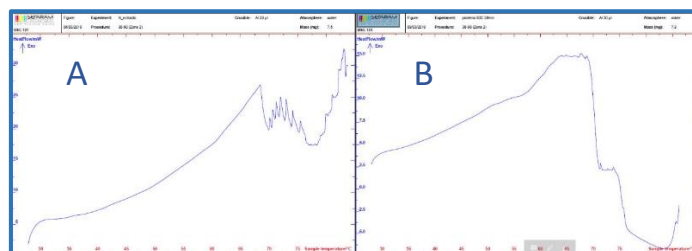


Figura 14: Resultados obtenidos en el DSC de la muestra de EMA. A la izquierda, la muestra sin someter a ningún tipo de tratamiento (A), se pueden observar varios picos que representan la desnaturalización de las proteínas presentes entre los 70 y 75°C. En la imagen de la derecha, la muestra de EMA sometida a baño maría a 80°C durante 30 minutos (B). Se puede apreciar cómo no aparecen los picos al encontrarse las proteínas ya desnaturalizadas.

Dado que en el proceso de elaboración de los liposomas por TLE la temperatura máxima que se requiere es de 58 °C (González-Rodríguez et al., 2016), el método es adecuado para trabajar con proteínas.

6.3.3 CENTRIFUGACIÓN

La determinación de proteínas de ambas muestras demostró que la centrifugación a estas condiciones no disminuye la cantidad de proteína recuperada en las condiciones de trabajo para determinar la EE (Figura 15).

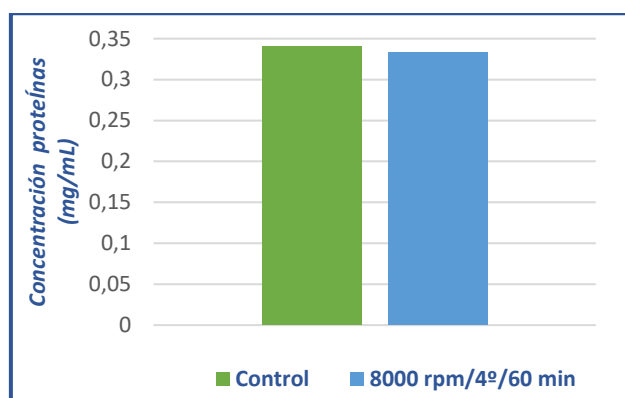


Figura 15: Concentraciones del EMA control y el sometido a las condiciones de sedimentación de los liposomas.

6.4 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MICELAR CRÍTICA (CMC) DEL ÁCIDO CÓLICO

Este estudio se planteó con idea de determinar la cantidad de activador del borde (sal biliar) a usar en la elaboración de los liposomas, tal que se asegurara su incorporación en la bicapa y no la formación de micelas.

Para ello, se llevó a cabo la determinación de la transmitancia de las muestras en el espectrofotómetro, estableciéndose el máximo en 657 nm. A partir de ahí, se determinó el porcentaje de transmitancia de cada uno de los lotes a esa longitud de onda. Los resultados obtenidos mostraron un incremento del valor de transmitancia a medida que aumentó la cantidad del colato. Ello puede deberse a la formación de micelas que, al tener un menor tamaño que los liposomas, interfieren menos en el paso de la luz (Svarc et al., 2012).

Asimismo, cuando se evaluaron los tamaños de las muestras coloidales, se pudo observar cómo a concentraciones mayores de 6 mM deja de obtenerse una única población, detectándose al menos dos poblaciones distintas en los lotes elaborados con una concentración de NaC de 12 mM o mayor, como se recoge en la Tabla 10. Esto se debe a que al superarse la CMC aparecen las MMs, las cuales poseen tamaños muy dispersos (Schubert, 2003).

Con respecto al potencial Z, conforme se aumenta la cantidad de NaC, éste adquiere un valor más negativo, como es lógico al tener carga negativa la sal biliar.

	RH (nm)		PDI		PZ (mV)		Transmitancia (%)	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
L1	1042.7	± 70.7	0.102	± 0.103	-7.7	± 0.5	7.3	± 0.03
L2	815.6	± 31.4	0.232	± 0.028	-8.7	± 0.2	12.69	± 0.06
L3	1189.9	± 129.8	0.280	± 0.082	-10.8	± 0.3	18.55	± 0.06
	229.0	± 113.0						
L4	457.9	± 4.4	0.297	± 0.005	-9.6	± 0.1	31.97	± 0.14
	5305.3	± 58.5						
L5	1264.3	± 98.4	0.374	± 0.080	-14.5	± 0.2	36.09	± 0.05
	15.1	± 13.2						

Tabla 10: Características de los distintos lotes elaborados con cantidades crecientes de NaC sódico.

A la vista de los resultados obtenidos, se fijó en 6 mM la concentración de activador del borde que se utilizará en los distintos lotes, concentración que permitía la incorporación de la sal biliar en la bicapa sin formación de MMs.

6.5 INFLUENCIA DE LOS FACTORES VARIABLES EN LA FORMULACIÓN

Una vez establecida la cantidad de sal biliar a incorporar en la formulación, se continuó el trabajo evaluando la influencia que determinados factores de formulación podrían afectar a las características de los sistemas coloidales obtenidos.

Como se muestra en la sección de metodología, se seleccionaron cuatro factores a tres niveles (Tabla 6), cuya matriz experimental correspondió a una L9 Taguchi (Tabla 7).

En las Figuras 16 y 17 pueden observarse una de las réplicas que se elaboraron de cada lote para esta etapa, recogiendo en la Tabla 11 las características de cada uno.



Figura 16: Lotes elaborados para la etapa de screening.

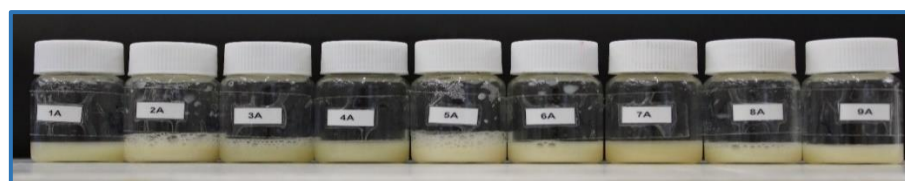


Figura 17: Lotes elaborados después de ser agitados en vórtex durante 10 segundos. Se puede observar cómo los lotes donde se habían separado las fases vuelven a estabilizarse tras una simple agitación.

	RH (nm)		PDI		PZ (mV)		EE (%)	
	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ	\bar{x}	σ
1	634.9	± 136.8	0.384	± 0.0016	- 9.66	± 0.91	41.48	± 10.97
2	1415.0	± 50.9	0.220	± 0.0026	+ 26.50	0	68.78	± 5.74
3	578.6	± 2.3	0.536	± 0.016	+ 24.05	± 1.34	-	-
4	908.7	± 22.7	0.229	± 0.069	- 9.03	± 0.64	58.60	± 5.78
5	1156.8	± 447.2	0.355	± 0.187	+ 28.05	± 1.34	27.11	± 13.23
6	1332.5	± 89.8	0.206	± 0.001	+ 13.05	± 1.34	64.06	± 8.47
7	1067.0	± 8.5	0.152	± 0.057	- 8.61	± 0.96	58.68	± 4.29
8	1992.0	± 647.5	0.050	± 0.018	+ 12.47	± 6.70	81.86	± 2.60
9	564.85	± 137.8	0.580	± 0.073	+ 12.00	± 3.12	-	-

Tabla 11: Características de los lotes ensayados en el screening.

La caracterización de todos los lotes fue posible excepto en los lotes 3 y 9, los cuales presentaron muchas poblaciones de tamaño y se desestabilizaban con facilidad. Además, tras la centrifugación necesaria para el cálculo de la EE, los liposomas no precipitaron por lo que no se pudo caracterizar este parámetro en ellos, como se aprecia en la Figura 18. Esto puede ser debido a la formación de MMs, que poseen un menor tamaño y, por lo tanto, no precipitan en las mismas condiciones que los liposomas (Liu et al., 2019). La distribución de tamaños que se muestra en la Figura 19 y los valores elevados de PDI apoyan esta hipótesis. Los lotes 1 y 8, aunque también presentaban 2 poblaciones, no sufrieron este problema.



Figura 18: Muestras de los distintos lotes elaborados tras el proceso de centrifugación, ordenados del 1 al 9. Se puede observar como en los lotes 3 y 9 liposomas no precipitaron, lo cual hizo imposible la separación del sobrenadante, necesaria para la determinación de la EE.

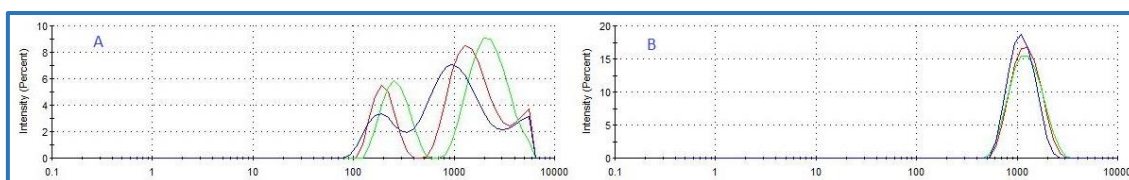


Figura 19: Distribución de tamaños de lotes con una única o varias poblaciones. Lotes 9 (A) y 7 (B).

A continuación, se procederá a la exposición de los resultados obtenidos en el tratamiento del *screening* del diseño experimental. Para determinar qué factores eran significativos en cada una de las variables, se establecieron unos límites de confianza, superior (UDL) e inferior (LDL), de forma que cuando un valor se encuentra fuera de ese margen se considera que ese factor es influyente en la respuesta evaluada.

6.5.1 INFLUENCIA EN EL TAMAÑO

Los gráficos ANOM referentes al tamaño de los liposomas mostraron que el tamaño era significativamente menor al usar NaTC como activador del borde (Figura 20). Ello se debe a que al formar MMs y ser estas de menor tamaño, el tamaño medio de las poblaciones es menor.

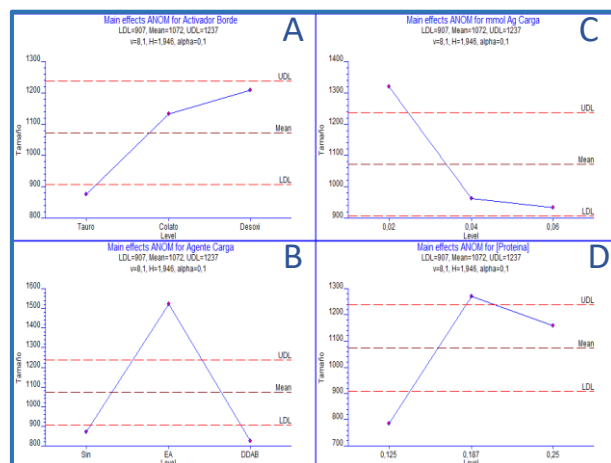


Figura 20: Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta del tamaño con respecto al activador del borde (A), agente de carga usado (B), cantidad de agente de carga (C), y con respecto a la concentración del EMA (D).

En cambio, no se observaron diferencias significativas entre NaC y NaDC.

Por otra parte, el agente de carga que influyó de forma más significativa en el tamaño obtenido es la EA, obteniéndose con ésta el mayor tamaño. Esto es posiblemente debido al elevado peso molecular de esta, que contribuye a la obtención de vesículas de mayor tamaño al interponerse en la bicapa (Arroyo García, 2017).

La cantidad de agente de carga y la concentración de proteínas no influyeron significativamente en los valores de tamaño obtenidos.

6.5.2 INFLUENCIA EN EL PDI

En el estudio ANOM sobre el PDI (Figura 21), se observó que el uso de NaTC como activador del borde aumentó significativamente el valor de este, lo cual parece ser debido a que la cantidad ensayada de NaTC supera la CMC, obteniéndose MMs (Schubert, 2003).

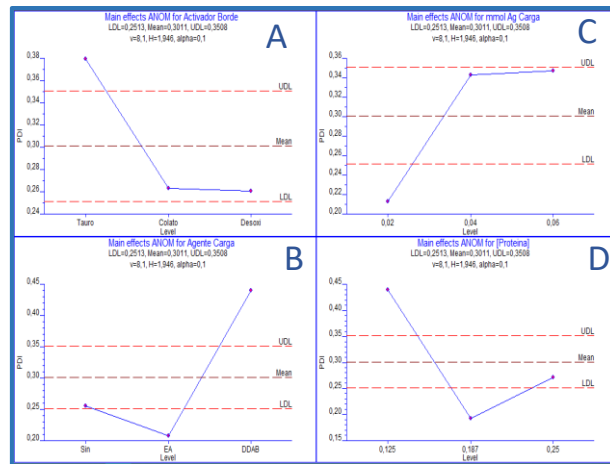


Figura 21: Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta del PDI con respecto al activador del borde (A), agente de carga usado (B), cantidad de agente de carga (C), y con respecto a la concentración del EMA (D).

De nuevo, no se observan diferencias significativas entre NaC y NaDC para este parámetro. El agente de carga más idóneo parece ser la EA, ya que es la que permite obtener un menor valor de forma significativa. La cantidad de agente de carga que permitió obtener un menor valor fue el menor nivel ensayado, pero como se detalla en el apartado 6.5.3, este no interesa por no proporcionar un valor de potencial Z adecuado. Entre los otros dos niveles no existen diferencias significativas. Por último, respecto a la concentración de proteínas, el nivel intermedio (0.187 mg/mL) es el que proporciona un menor PDI de forma significativa.

6.5.3 INFLUENCIA EN EL POTENCIAL Z

El activador del borde que obtuvo un mayor valor de potencial de forma significativa fue el NaTC, siendo el que menos el NaDC (Figura 22).

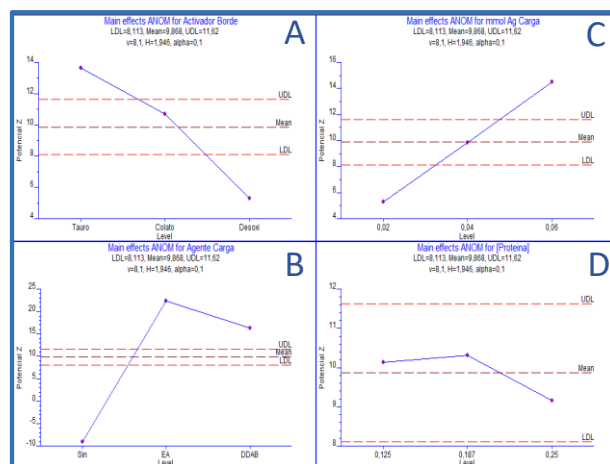


Figura 22: Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta del potencial Z con respecto al activador del borde (A), agente de carga usado (B), cantidad de agente de carga (C), y con respecto a la concentración del EMA (D).

Se observa también la existencia de diferencias significativas entre el uso de todos los niveles de agente de carga, al ser uno de los niveles la ausencia de agente de carga y poseer uno de los elementos básicos formadores de la bicapa (FC) una carga negativa, y EA y DDAB ser de naturaleza catiónica. Asimismo, se aprecia con claridad una relación lineal entre la cantidad de agente de carga añadida y el potencial Z obtenido como también observaron Carrión et al. (1997). Con respecto a la EE no existen diferencias significativas entre los niveles ensayados.

6.5.4 INFLUENCIA EN LA EE

Como se recoge en la Figura 23, el resultado más revelador en las gráficas ANOM de la EE es la relación lineal inversa existente entre la cantidad de agente de carga y la EE obtenida, creando así un conflicto de objetivos, ya que se buscan potencial y EE máximos y estos tienen tendencias contrarias al aumentar la cantidad.

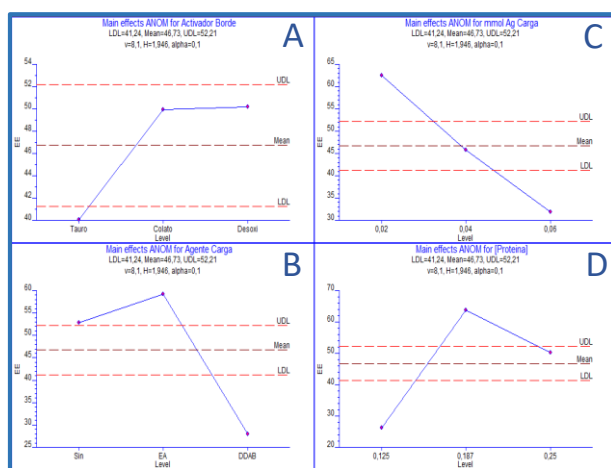


Figura 23: Gráficos ANOM correspondientes a la respuesta de la EE con respecto al activador del borde (A), agente de carga usado (B), cantidad de agente de carga (C), y con respecto a la concentración del EMA (D).

Por otro lado, se observa que NaTC proporcionó el menor valor de EE de forma significativa y que no existen diferencias entre NaC y NaDC.

La EA mostró también ser el agente de carga más indicado al destacar la EE obtenida con ella, siendo el nivel intermedio de concentración de proteínas el que presentó un mayor valor de EE.

Ante todos los resultados obtenidos anteriormente, y a modo de resumen, se decidió fijar el agente de carga en EA, ya que permitió obtener los mejores resultados en PDI, Z y EE, y la concentración de proteínas en 0.187 mg/mL. Los factores de activador del borde y cantidad de agente de carga se fijarían en un posterior estudio de optimización, descartando los factores de NaTC y 0.02 mmol, respectivamente.

6.6 OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN

Una vez descartado el NaTC como sal biliar y la cantidad de 0.02 mmol para los estudios posteriores, se realizó una batería de cuatro experimentos con las combinaciones de NaC y NaDC, a 0.04 y 0.06 mol.

En la Tabla 12 se detallan los resultados de la caracterización de los lotes elaborados para la optimización:

	RH (nm)		PDI		PZ (mV)		EE (%)	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
A	596.9	± 108.8	0.468	± 0.187	+ 25.06	± 3.37	76.64	± 2.47
B	598.2	± 58.8	0.357	± 0.147	+ 28.50	± 3.75	59.67	± 29.58
C	879.5	± 169.7	0.268	± 0.086	+ 21.50	± 3.56	76.83	± 22.24
D	813.9	± 52.1	0.093	± 0.033	+ 26.95	± 2.90	75.44	± 7.23

Tabla 12: Características de los lotes elaborados para la etapa de optimización.

En adición a estos resultados, cabe destacar que en los lotes 1 y 2 se detectaron MMs, haciéndose patente este hecho por la distribución de tamaños y los valores de PDI elevados, como se puede apreciar en la Figura 24. Por este motivo estos lotes fueron descartados, quedando la decisión entre los lotes 3 y 4 y, por lo tanto, fijándose como activador del borde el NaDC.

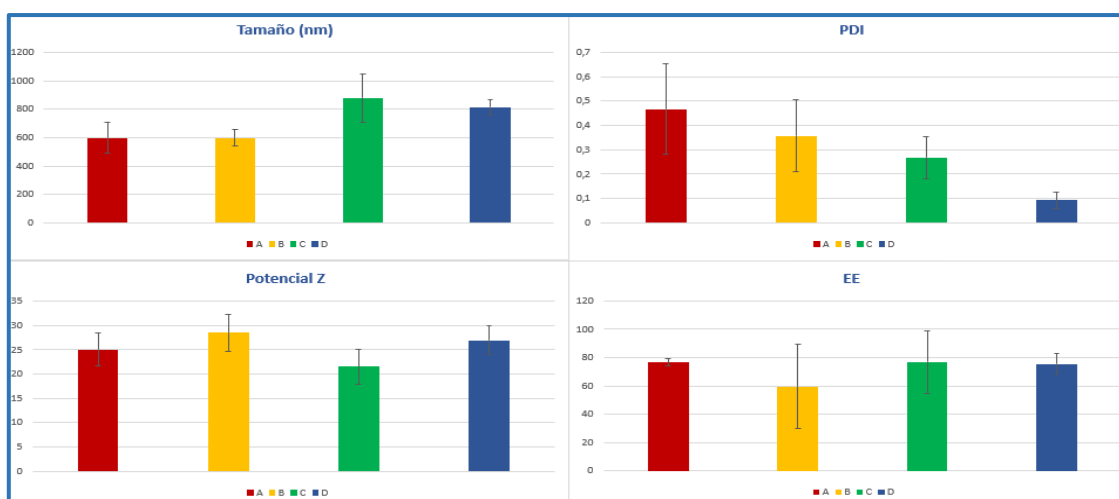


Figura 24: Características de los lotes elaborados para la etapa de optimización.

Como quedó patente en el estudio ANOM, al aumentar la cantidad de agente de carga, el potencial Z obtenido aumenta de forma lineal como afirman Villasmil-Sánchez et al. (2010). Esto, junto a que los resultados de EE obtenidos en ambos lotes fueron similares, hicieron que la cantidad añadida en los lotes definitivos fuese el nivel más alto, 0.06 mmol.

Por tanto, la composición definitiva se fijó en (Tabla 13):

FUNCIÓN	COMPONENTE	COMPOSICIÓN CUANTITATIVA
Componentes básicos de la bicapa	FC	0.11 mmol
	CH	0.027 mmol
Activador del borde	NaDC	0.018 mmol
Agente de carga	EA	0.06 mmol
Fase acuosa	HEPES 7.4	3 mL
Principio activo	EMA	0.187 mg/mL

Tabla 13: Composición optimizada y definitiva de la formulación.

Las características del lote óptimo son las detalladas en la Tabla 12, lote D.

6.6.1 INDICE DE DEFORMABILIDAD (ID)

El ID es un parámetro único y crucial de los transfersomas, que permite diferenciarlos de los liposomas convencionales. La elasticidad conferida por el activador del borde les permite atravesar diámetros de poro mucho menores que sus propios radios. A nivel biológico, esto se traduce en una capacidad para atravesar las membranas biológicas reduciendo el riesgo de romperse, liberando el fármaco encapsulado durante el proceso de penetración (Chen et al., 2016). El valor de ID obtenido para la formulación optimizada fue de 4.38 ± 0.4 , lo que demuestra la elevada flexibilidad de las vesículas.

6.6.2 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE PARTÍCULAS MEDIANTE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE BARRIDO ALTA RESOLUCIÓN (FEGSEM)

En las microfotografías tomadas mediante FEGSEM (Figura 25) se puede apreciar la esfericidad de los sistemas lipídicos, confirmando naturaleza vesicular.

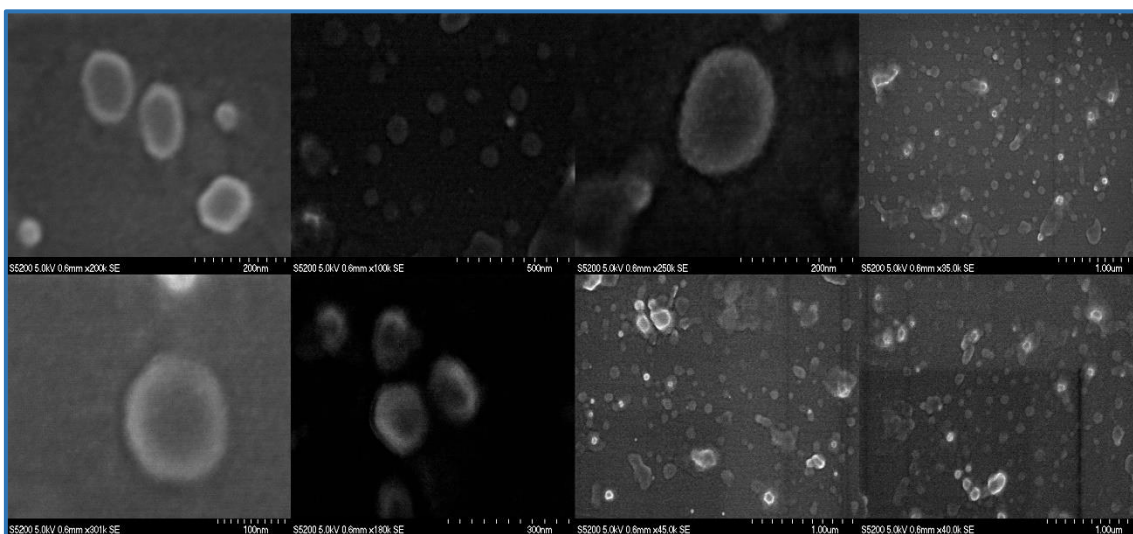


Figura 25: Imágenes tomadas de los liposomas mediante FEGSEM.

Con respecto al tamaño, según la escala están en un rango de 100 a 200 nm. Este no corresponde con los calculados en la caracterización del lote óptimo, debido a que, en el tratamiento de la muestra, al dejarse secar, los liposomas reducen su tamaño. Esto ya se había observado en nanopartículas de naturaleza lipídica por Dubes et al. (2003). Además, se puede observar la presencia de una extensa población de liposomas aislados.

6.7 ENSAYOS IN VITRO

6.7.1 ENSAYO DE LIBERACIÓN IN VITRO

La finalidad del ensayo de liberación fue demostrar que los liposomas liberaban la hCG de forma gradual, de forma que la administración no se produjera de una forma puntual y descontrolada.

Para obtener los perfiles de liberación, se representó el porcentaje de hCG liberada de los liposomas frente al tiempo, utilizando como control el EMA solución (Figura 26). Se consideró el 100 % la cantidad de proteínas añadida expresada en hCG, es decir 0.0176 mg. De esta representación podemos obtener las siguientes conclusiones.

Queda patente que la liberación a partir del EMA, proteínas en solución, fue más rápida que en los liposomas, alcanzándose el máximo liberado a los 90 minutos, mientras que en los liposomas no se alcanza hasta los 180.

Además, se observa cómo la liberación a partir de los liposomas se produce en dos etapas, una inicial más rápida hasta los 90 min, donde se libera la hCG no encapsulada, seguida de una liberación más progresiva de la encapsulada, alcanzando la liberación total a los 180 min. Con esto queda demostrada la capacidad de los liposomas de controlar la liberación de la hCG, como se ha reportado ya en otros estudios (Vivian Saez et al., 2000).

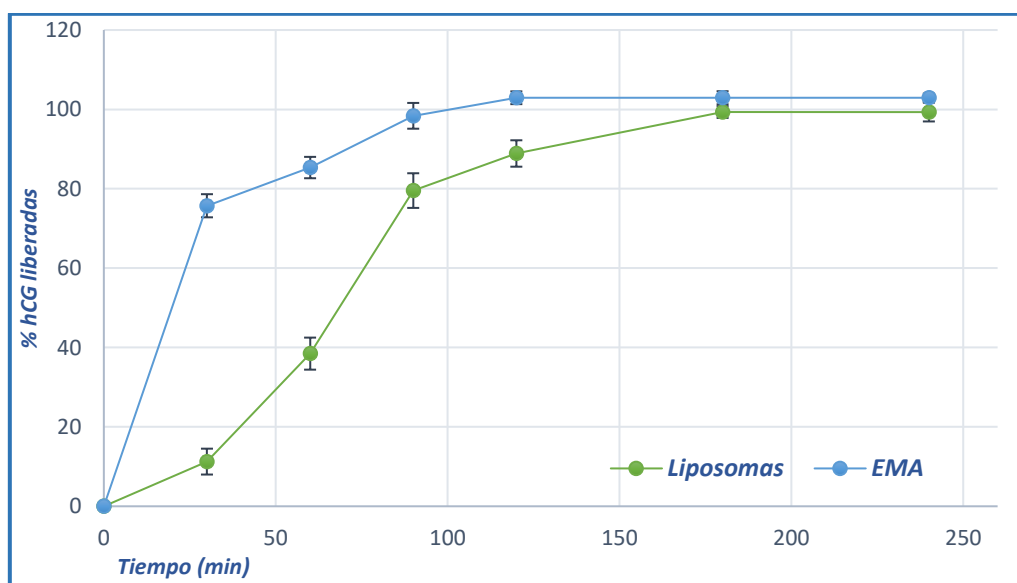


Figura 26: Perfiles de liberación de las proteínas en los liposomas y en el EMA.

6.7.2 ENSAYO DE PERMEACIÓN IN VITRO

La finalidad del presente ensayo fue demostrar que, vehiculando el EMA en los liposomas, la permeación de éste a través de las membranas biológicas mejora respecto a la administración del EMA en solución. Para obtener los perfiles de permeación, se representó la cantidad de hCG permeada en microgramos por unidad de superficie frente al tiempo, tanto de la muestra de liposomas como del EMA solución. Estos se representan en la Figura 27.

De los perfiles obtenidos podemos obtener la conclusión de que la encapsulación del EMA favorece considerablemente la permeación de hCG (Schaeffer and Krohn, 1982; Cevc and Blume, 1992). La cantidad total de hCG permeada fue de 17.04 μg , un 96.72 % de la cantidad total añadida, siendo de tan solo el 46.08% (8.12 μg) la cantidad permeada en el EMA solución.

Sin embargo, habría que tener en cuenta que en las celdas donde se realizó el ensayo de permeación, en las muestras de EMA solución se observó la aparición de burbujas de aire a partir del minuto 240, por lo que las condiciones de permeación podrían haberse visto modificadas.

Las tasas de permeación (P) fueron para los liposomas y para el EMA 26.72 y 7.00 respectivamente, y sus flujos (J) 0.01795 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$ y 0.00308 $\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{cm}^{-2}$.

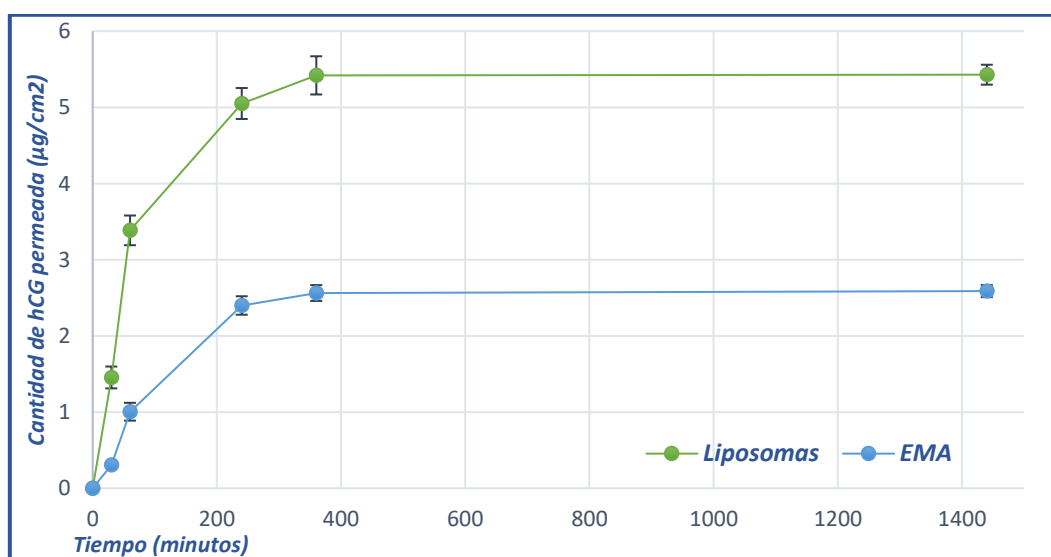


Figura 27: Perfiles de permeación de la hCG en la muestra de liposomas y de EMA.

7 CONCLUSIONES

- I. Se validó el método BCA por espectrofotometría UV-visible para cuantificar las proteínas totales en nuestras condiciones de estudio, permitiéndonos de esta forma asegurar la integridad de las proteínas en los sucesivos estudios. Para los ensayos *in vitro* fue necesaria la cuantificación mediante HPLC, por lo que para futuras investigaciones este método debería validarse.

- II. Mediante diseño experimental, se determinó una composición óptima para la formulación, alcanzando unas características apropiadas para una futura administración oftálmica.
- III. Los resultados de los estudios *in vitro* fueron prometedores, quedando patente que la encapsulación de EMA permite controlar la liberación de hCG y mejorar considerablemente sus perfiles de permeación.
- IV. A la vista de los resultados obtenidos, se plantea la continuación del estudio en cultivos celulares y modelos animales, para de esta forma evaluar la eficacia *in vivo*.

8 BIBLIOGRAFÍA

1. Arroyo García, Carmen Martina. 2017. "Evaluación de Nanosistemas Lipídicos Para Coadministración de Maleato de Timolol y Acetazolamida: Nueva Propuesta En El Tratamiento Del Glaucoma." : 1. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=150321> (June 12, 2019).
2. Babayán-Sosa A and Baca-Lozada O. 2018. "Epiteliopatía Corneal Por Alteración Sensitiva: Queratitis Neurotrófica Corneal Epitheliopathy Due to Sensitive Impairment: Neurotrophic Keratopathy." *Rev Mex Oftalmol* 92(3): 117–22. www.rmo.com.mx (June 9, 2019).
3. Del Campo Carrasco Z, Gil Arnal MA, BruixTudó AM. 2012. "Superficie Ocular y Cornea." *Superficie Ocular y Córnea* 9: 7. www.editorialglosa.es (June 9, 2019).
4. Carrión EJ, de La Maza A, Parra JL, Ing F 1997. The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. <https://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/6424/Article03.pdf?sequence=1&isAllowed=y> (June 13, 2019).
5. Cevc G and Blume G. 1992. "Lipid Vesicles Penetrate into Intact Skin Owing to the Transdermal Osmotic Gradients and Hydration Force." *BBA - Biomembranes* 1104(1): 226–32. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000527369290154E> (June 13, 2019).
6. Chen H et al. 2016. "The Potential Use of Novel Chitosan-Coated Deformable Liposomes in an Ocular Drug Delivery System." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 143: 455–62. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927776516302168> (June 6, 2019).
7. Chen YY et al. 2017. "A Novel Elastic Liposome for Skin Delivery of Papain and Its Application on Hypertrophic Scar." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 87: 82–91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28040601> (June 10, 2019).
8. Choi YK et al. 2014. "Amniotic Membrane Extract-Loaded Double-Layered Wound Dressing: Evaluation of Gel Properties and Wound Healing." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 40(7): 852–59. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23621769> (June 9, 2019).
9. Cueto M, Dorta MJ, Munguía O, Llabrés M. 2003. New Approach to Stability Assessment of Protein Solution Formulations by Differential Scanning Calorimetry. *International Journal of Pharmaceutics* 252. http://www.thermalcal.com/_documents/pdfs/Protein_stability_DSC.pdf (May 25, 2019).
10. Dua H.S. et al. 2018. "Neurotrophic Keratopathy." *Progress in Retinal and Eye Research* 66: 107–31. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350946217301210> (June 9, 2019).
11. Dubes A et al. 2003. "Scanning Electron Microscopy and Atomic Force Microscopy Imaging of Solid Lipid Nanoparticles Derived from Amphiphilic Cyclodextrins." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 55(3): 279–82. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641103000201> (June 6, 2019).
12. Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S. 2004. "Human Amniotic Membrane, Like Corneal

- Epithelial Basement Membrane, Manifests the A5 Chain of Type IV Collagen." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 45(6): 1771. <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.03-0952> (June 9, 2019).
13. González-Andrades M, Argüeso P, Gipson I. 2019. "Corneal Anatomy." In Springer, Cham, 3–12. http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-01304-2_1 (May 25, 2019).
 14. González-Rodríguez ML et al. 2016. "Deformability Properties of Timolol-Loaded Transfersomes Based on the Extrusion Mechanism. Statistical Optimization of the Process." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 42(10): 1683–94. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03639045.2016.1165691> (May 20, 2019).
 15. González-Rodríguez ML and Rabasco AM. 2011. "Charged Liposomes as Carriers to Enhance the Permeation through the Skin." *Expert Opinion on Drug Delivery* 8(7): 857–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21557706> (June 9, 2019).
 16. González-Rodríguez ML et al. 2012. "Applying the Taguchi Method to Optimize Sumatriptan Succinate Niosomes as Drug Carriers for Skin Delivery." *Journal of Pharmaceutical Sciences* 101(10): 3845–63. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022354915313873> (May 20, 2019).
 17. González Hernández R. 1996. "Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos". *Revista Cubana de Farmacia* 30(1). [Centro Nacional de Información de Ciencias Médicas.]. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75151996000100009 (June 13, 2019).
 18. Hämäläinen KM et al. 1997. "Characterization of Paracellular and Aqueous Penetration Routes in Cornea, Conjunctiva, and Sclera." *Investigative ophthalmology & visual science* 38(3): 627–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9071216> (June 9, 2019).
 19. Harada A and Hershman JM. 1978. "Extraction of Human Chorionic Thyrotropin (Hct) from Term Placentas: Failure to Recover Thyrotropic Activity." *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 47(3): 681–85. <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jcem-47-3-681> (June 13, 2019).
 20. Hsu HL and Chen JP. 2017. "Preparation of Thermosensitive Magnetic Liposome Encapsulated Recombinant Tissue Plasminogen Activator for Targeted Thrombolysis." *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 427: 188–94. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304885316327354> (June 10, 2019).
 21. Islas D, Jiménez S, Medina A, Noel J, Rodríguez G. 2010. "Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos". *Rev. Int. Contam. Ambient* 26. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rica/v26n1/v26n1a6.pdf> (May 26, 2019).
 22. Jøraholmen MW, Basnet P, Acharya G, Škalko-Basnet N. 2017. "PEGylated Liposomes for Topical Vaginal Therapy Improve Delivery of Interferon Alpha." *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 113: 132–39. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641116304349> (June 10, 2019).
 23. Krishnamurthy R, Lumpkin JA, Sridhar R. 2000. Inactivation of Lysozyme by Sonication under Conditions Relevant to Microencapsulation. *International Journal of Pharmaceutics* 205 www.elsevier.com/locate/ijpharm (May 26, 2019).
 24. Laouini A. et al. 2013. "Preparation of Liposomes: A Novel Application of Microengineered Membranes—From Laboratory Scale to Large Scale." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 112: 272–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23999143> (June 9, 2019).
 25. Law SL, Huang KJ, Chiang CH. 2000. "Acyclovir-Containing Liposomes for Potential Ocular Delivery. Corneal Penetration and Absorption." *Journal of Controlled Release* 63(1–2): 135–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10640587> (May 26, 2019).
 26. Liang L et al. 2009. "Amniotic Membrane Extraction Solution for Ocular Chemical Burns." *Clinical & Experimental Ophthalmology* 37(9): 855–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20092594> (June 9, 2019).

27. Liu X et al. 2019. "Adsorption and Desorption of U(VI) on Different-Size Graphene Oxide." *Chemical Engineering Journal* 360: 941–50. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S138589471830617X> (June 13, 2019).
28. Matsumoto Y et al. 2004. "Autologous Serum Application in the Treatment of Neurotrophic Keratopathy." *Ophthalmology* 111: 1115–20. [https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420\(04\)00133-2/pdf](https://www.aaojournal.org/article/S0161-6420(04)00133-2/pdf) (June 9, 2019).
29. Mobility, Sustainable. 2018. "TECHNICAL RESOURCE." (October). www.piercenet.com (May 26, 2019).
30. Pithadia AB et al. 2015. "Bioanalytical Method Development and Validation of HCG (Human Chorionic Gonadotropin)." *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 7(7): 390–96. <https://pdfs.semanticscholar.org/1647/bb863bb31422d81f6df27bd8f3c4895bc792.pdf> (May 22, 2019).
31. Schaeffer HE and Krohn DL. 1982. "Liposomes in Topical Drug Delivery." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 22(2): 220–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7056633> (June 13, 2019).
32. Schubert R. 2003. "Liposome Preparation by Detergent Removal". *Methods in Enzymology* 367: 46–70. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687903670059> (May 20, 2019).
33. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. 2001. "Antiinflammatory Effects of Amniotic Membrane Transplantation in Ocular Surface Disorders." *Cornea* 20(4): 408–13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11333331> (June 9, 2019).
34. Sociedad Española de Oftalmología. ELS, M de la Fuente, and B Seijo Rey. 2004. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología* 79. Sociedad Española de Oftalmología. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-66912004000400002 (June 11, 2019).
35. Svarc FE, Ranocchia RP, Arnejo N. 2012. "La química de la perfluorodecalina potenciales usos en química cosmética." <https://www.researchgate.net/publication/274072852> (June 12, 2019).
36. Urtti A. 2006. "Challenges and Obstacles of Ocular Pharmacokinetics and Drug Delivery." *Advanced Drug Delivery Reviews* 58(11): 1131–35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17097758> (June 9, 2019).
37. Ventura J et al. 2014. "Síntesis y caracterización de surfactantes derivados de sales biliares, éteres corona, adamantanos y cadenas hidrocarbonadas". <https://core.ac.uk/download/pdf/75994196.pdf> (May 30, 2019).
38. Versura P et al. 2018. "Eye and Brain Dovepress Neurotrophic Keratitis: Current Challenges and Future Prospects." <http://dx.doi.org/10.2147/EB.S117261> (June 9, 2019).
39. Vila-Caballer M et al. 2016. "A PH-Sensitive Stearoyl-PEG-Poly(Methacryloyl Sulfadimethoxine)-Decorated Liposome System for Protein Delivery: An Application for Bladder Cancer Treatment." *Journal of Controlled Release* 238: 31–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27444816> (June 9, 2019).
40. Villasmil-Sánchez S et al. 2010. "Positively and Negatively Charged Liposomes as Carriers for Transdermal Delivery of Sumatriptan: In Vitro Characterization." *Drug Development and Industrial Pharmacy* 36(6): 666–75. <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03639040903419640> (June 12, 2019).
41. Vivian A, Hernández JR, Peniche C. 2000. "Microesferas Para La Liberacion de Proteínas y Péptidos." <https://elfosscentiaa.cigb.edu.cu/PDFs/Biotecnol Apl/2007/24/2/BA002402RV098-107.pdf> (June 13, 2019).