

VESICULAS LIPOSOMALES ESTABILIZADAS CON QUITOSANO: ESTUDIO ELECTROCINÉTICO

S. Madrigal-Carballo^{1*}, G. Porras¹, M. Sibaja¹, J. Vega-Baudrit², A.O. Vila³, F. Molina³

¹) Laboratorio de Polímeros, Universidad Nacional, 86-3000 Heredia, República de Costa Rica. Correo electrónico: smadriga@una.ac.cr

²) Laboratorio Nacional de Nanotecnología, CENAT, 1174-1200 San Jose, Costa Rica

³) Unidad de Investigación de Coloides, Universidad de Valencia, 46100 Burjassot, Valencia, España

Recibido: Marzo de 2009; Aceptado: Octubre de 2009

ABSTRACT

The aim of this work is to prepare stable liposome suspensions coated by chitosan biopolymer by means of the ionic gelation process. Concentrated soybean lecithin suspensions were prepared by the slow swelling under shear method and then diluted with NaCl 10-5 mol/L to make liposomal dispersions ranging 0.1 to 0.5% w/v, with an average mean diameter around 250 nm. Chitosan (180 kDa) solution in HOAc 0.5% v/v ranging 0.010 to 0.250% w/v, were mixed together with the liposome suspensions and the effect of both chitosan and liposome concentration on the electrokinetic behavior of the coated liposomes was analyzed by monitoring the change in ζ -potential and particle diameter. The particle charge changed from -70 mV in the absence of chitosan to +40 mV in the presence of chitosan, indicating complex formation between the anionic liposomes and cationic chitosan molecules. Below a minimum critical chitosan concentration (c_{min}), large aggregates were formed that phase separated within minutes, whose origin was attributed to formation of coacervates. On the other hand, above a maximum critical chitosan concentration (c_{max}), large flocs were formed that sedimented within hours, whose formation was attributed to depletion flocculation. Liposomes coated with chitosan in concentrations between these parameters were stable with time and had better stability to aggregation than uncoated liposomes. This study indicates that chitosan can be used to form biopolymer-coated liposomes with enhanced stability over uncoated liposomes.

Keywords: chitosan, liposomes, ζ -potential, electrokinetics.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es el de preparar suspensiones estables de liposomas recubiertos por quitosano, mediante el método de gelación iónica. Dispersiones concentradas de lecitina de soja fueron preparadas mediante el método de hinchamiento lento bajo cizalla y posteriormente fueron diluidas con una solución de NaCl 10-5 mol/L en un intervalo de concentraciones de 0,1 a 0,5% m/v para obtener suspensiones liposomales con un diámetro medio de partícula cercano a los 250 nm. Soluciones de quitosano (180 kDa) en HOAc al 0,5% v/v en un intervalo de 0,010 a 0,250% m/v, fueron mezcladas con cada una de las dispersiones de liposomas y se estudio el efecto de la concentración de biopolímero y la concentración de liposomas en las propiedades electrocinéticas de las partículas formadas, mediante un seguimiento de la variación en el potencial- ζ y el diámetro promedio de las partículas liposomales recubiertas. La carga de las partículas experimentó un cambio de -70 mV en la ausencia de quitosano, a +40 mV con la adición del biopolímero, indicando la formación del complejo iónico entre la superficie aniónica de las vesículas liposomales y las moléculas policationicas del quitosano. Cuando la concentración de quitosano se mantuvo por debajo de la concentración critica minima (c_{min}), se observo la formación de agregados de partículas que precipitaban rápidamente, lo que se atribuyo a la formación de coacervados. Por otro lado, cuando la concentración de quitosano supero la concentración critica máxima (c_{max}), se observo la formación de grandes flóculos que tienden a sedimentar al transcurrir varias horas, lo que se atribuye a un proceso de agotamiento de floculación. En el intervalo de concentraciones comprendido entre estos dos parámetros, se observo la formación de liposomas recubiertos estables, que

presentaron una menor tendencia a agregarse con el tiempo, como pasa con los liposomas sin recubrimiento. Los resultados de este trabajo demuestran que el quitosano es un biopolímero adecuado para la fabricación y estabilización de liposomas recubiertos.

Palabras clave: quitosano, liposomas, potencial- ζ , electrocinético.

1. INTRODUCCION

El interés en estudiar las interacciones entre liposomas y diferentes tipos de polisacáridos se ha desarrollado principalmente después de que *Hughes* y colaboradores identificaron la presencia de polisacáridos en la superficie celular en el año 1975 [1]. Posteriores estudios [2, 3] se enfocaron en identificar los procesos de agregación inducidos por los polisacáridos sobre liposomas de lecitina de huevo, utilizando pulúlanos, dextranos, hidroxietil almidones y amilopectinas. Los fenómenos de agregación fueron estudiados en función de la temperatura, fuerza iónica y cambios superficiales en los liposomas [4].

Los polisacáridos también se han utilizado como medio de estabilización de sistemas liposomales en la formulación de sistemas de dosificación de principios activos, como sistema de transporte dirigido (“*targeting*”) o inclusive como sistema artificial de emulación de células sanguíneas utilizando carboximetil-quitina como cubierta de liposomas cargados con hemolisatos [5]. Otros estudios conducidos por investigadores en la India utilizaron carboximetil-quitosano con agente estabilizante de liposomas cargados con dapsona; los resultados reportados demostraron la efectividad de estos polisacáridos como agentes estabilizantes de los sistemas liposomales y como modificadores de sus perfiles de liberación de principios activos [6]. Así mismo, recientes investigaciones en nuestro grupo han demostrado mediante estudios reológicos, electrocinéticos e inmunoensayos “*in vitro*”, la efectividad de los liposomas recubiertos con quitosano como sistema de liberación de sustancias activas (proteínas y polifenoles) e inmunoadyuvante en el desarrollo de potenciales vacunas estabilizadas estéricamente [7-9].

Diversos estudios han demostrado la capacidad del quitosano de enlazarse agresivamente a una gran variedad de células mamarias y microbianas [10]. Esta propiedad de enlazado con membranas celulares, parece estar relacionada con la naturaleza catiónica de la estructura de este polielectrolito; por lo cual varios investigadores han utilizado quitosano como agente floculante de suspensiones celulares [11] o como floculador selectivo de desintegrados celulares con alto grado de recuperación [12].

El quitosano cumple con la premisa de ser biocompatible y biodegradable, lo que lo convierte en un buen candidato para la producción de vesículas liposomales estables y bioadhesivas.

Algunos investigadores han desarrollado liposomas bioadhesivos como sistema de liberación tópica de drogas para el tratamiento de heridas y quemaduras, o para su administración en ojos o tumores [13].

Estudios previos han demostrado que el mecanismo de interacción del quitosano con los liposomas esta mediada por una interacción iónica entre los grupos amino cargados positivamente del quitosano y los diacetilfosfatos cargados negativamente en la superficie del liposoma [7-9, 14]. Mediante la combinación de las propiedades del quitosano y las vesículas liposomales, se pretende desarrollar un sistema de dosificación con mayor especificidad y perfiles de liberación prolongada, controlada y localizada [7].

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiales. Todos los reactivos fueron de grado analítico o superior. La lecitina de soja (99% pureza) fue suministrada por *GUINAMA S.L* (Valencia, España). El quitosano (GD 92%, MW $1,63 \times 10^5$ g/mol) fue adquirido en *Microsomas y Biopolímeros S.L. (España)* (distribuido por *Guinama S.L., España*). El cloruro de sodio y el ácido acético glacial fueron adquiridos en *Merck*.

2.2. Preparación de los liposomas recubiertos con quitosano (chitosomas). Los chitosomas fueron preparados a partir de dispersiones concentradas de lecitina de soja (250 g/L) de acuerdo a los procedimientos previamente descritos [8]. Brevemente, se prepararon dispersiones concentradas de lecitina de soja (250 g/L) por el método de hinchamiento lento bajo cizalla [15] en un medio acuoso de NaCl 10^{-5} mol/L [16] y las mismas fueron diluidas utilizando el mismo disolvente acuoso en un intervalo de concentraciones entre 0,10 – 0,50% m/v. Las soluciones de quitosano (0,010 – 0,250 % m/v) fueron preparadas en ácido acético 0,5% v/v y su pH se ajusto a 5,5 con una solución de NaOH 6,0 mol/L. Finalmente los chitosomas fueron preparados mediante la adición lenta bajo vigorosa agitación de las diferentes suspensiones diluidas de liposomas en las cada una de las soluciones de quitosano, manteniendo una relación volumétrica equivalente.

2.3. Diámetro promedio de partícula y potencial- ζ . Para llevar a cabo las mediciones de diámetro promedio de partícula y movilidad electroforética se realizaron diluciones 1:10 de las dispersiones preparadas en el punto anterior, tomando en cuenta las condiciones osmóticas de acuerdo con trabajos previos [16]. Todas las diluciones se realizaron manteniendo la misma fuerza iónica (NaCl 10^{-5} mol/L). Se prepararon cinco muestras para cada formulación de liposomas recubiertos. Las determinaciones se llevaron a cabo en un *Z-Meter Zetasizer 3000 (Malvern*

Instruments, London, UK). Todos los valores de potencial- ζ fueron aproximados mediante la ecuación de *Smoluchowski* utilizando las siguientes constantes: $\epsilon_0 = 8,9 \times 10^{-12} \text{ Fm}^{-1}$ y $\epsilon_r = 79$.

2.4. Visualización de los liposomas recubiertos mediante microscopía confocal. El recubrimiento de los liposomas por parte del quitosano fue confirmado mediante microscopía de fluorescencia utilizando quitosano marcado con fluoresceína. El quitosano fue acomplejado con un marcador fluorescente de acuerdo con las instrucciones suministradas en el kit respectivo (*Alexa Fluor 488 Labeling Kit, Invitrogen/Molecular Probes, Eugene, OR*) y posteriormente mezclado con los liposomas para preparar los sistemas recubiertos de acuerdo con la metodología descrita anteriormente.

Las imágenes fueron adquiridas en un microscopio de fluorescencia marca *Zeiss (Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, Nueva York 10594)*, con filtros de excitación de 450-490 nm y 510-565 nm de emisión) en intervalos comprendidos entre 1-30 minutos.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Influencia de la concertación de quitosano en las propiedades de vesículas liposomales de lecitina de soja estabilizadas estéricamente. Las interacciones entre quitosano y vesículas liposomales de lecitina de soja ($D_{\text{prom}} \sim 250 \text{ nm}$) fueron monitoreadas en función de los cambios en la carga eléctrica y el tamaño promedio de partícula de suspensiones diluidas de liposomas recubiertos con el biopolímero (Figura 1).

El diámetro promedio de partícula en la suspensión liposomal demostró ser altamente dependiente de la concentración de quitosano añadida al sistema (Figura 1A). El diámetro promedio de las partículas liposomales se incrementó de 280 nm para las vesículas sin recubrimiento, hasta 2.350 nm en la presencia de bajas concentraciones de quitosano ($\sim 0,010\% \text{ m/v}$), indicando la formación de estructuras agregadas gigantes. Estos agregados eventualmente sufrieron una separación de fases, formando un precipitado en el fondo del tubo de análisis. El intervalo de concentraciones de quitosano a los que se forman agregados de partículas está asociado a un cambio en la carga superficial de las partículas de entre -70 y 30 mV, lo que sugiere que este tipo de fenómenos de agregación están asociados a los procesos de neutralización de carga o posibles entrecruzamientos. Cuando se alcanzan concentraciones de quitosano superiores al 0,020% m/v, el diámetro promedio de las partículas decrece hasta $\sim 600 \text{ nm}$ donde se alcanza un valor mínimo correspondiente a una concentración de quitosano de 0,0250% m/v. Posteriores adiciones de

quitosano conllevan a incrementos sutiles en el diámetro promedio de partícula, alcanzando una diámetro promedio de partícula ~ 1.000 nm cuando se añade una concentración de biopolímero de 0,200% m/v.

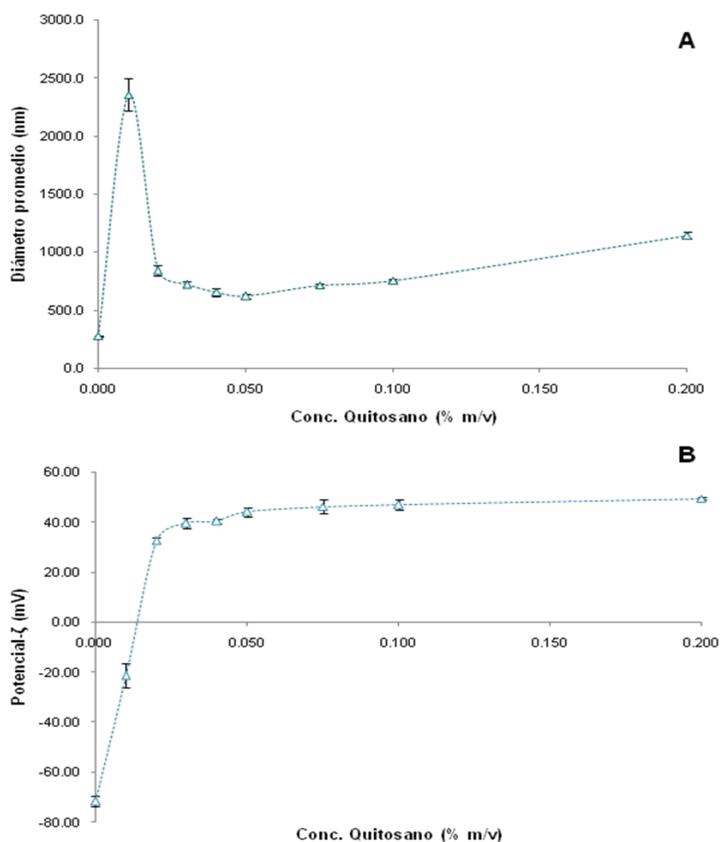


Figura 1. Influencia de la adición de quitosano (0,000-0,200% m/v) a liposomas de lecitina de soja (0,3% m/v) en el diámetro promedio de partícula (A) y el potencial- ζ .

Los valores de potencial- ζ obtenidos indican que los liposomas sin recubrimiento de biopolímero eran altamente aniónicos (-71 mV), mientras que las moléculas de quitosano son altamente catiónicas (+82 mV). La carga superficial de las partículas en la suspensión liposomal (0,3% m/v de lecitina) se ve incrementada de -71 a +49 mV con la adición de quitosano (0,000-0,200% m/v). La carga neta de las partículas fue igual a cero luego de ser recubiertas con una solución de quitosano con una concentración aproximada de 0,014% m/v (Figura 1B), lo que indica que la neutralización de cargas se produce a esta relación de composiciones liposoma-biopolímero. Los cambios observados en la carga superficial sugieren que las moléculas de biopolímero son adsorbidas en la superficie de las partículas liposomales hasta que se alcanza un recubrimiento

completo de la membrana liposomal, lo que previene la adsorción de mas moléculas de biopolímero.

La influencia de las características iniciales de los liposomas en propiedades eléctricas y el diámetro promedio de partícula de los liposomas recubiertos con biopolímero se estudio por medio de las preparación de vesículas liposomales recubiertas en un intervalo de concentraciones de lecitina entre 0,10 y 0,50% m/v, las cuales fueron recubiertas con quitosano en concentraciones entre 0,010 y 0,200% m/v. La variación en el diámetro promedio de partícula y el potencial- ζ de estos sistemas liposomales se muestra en la Figura 2.

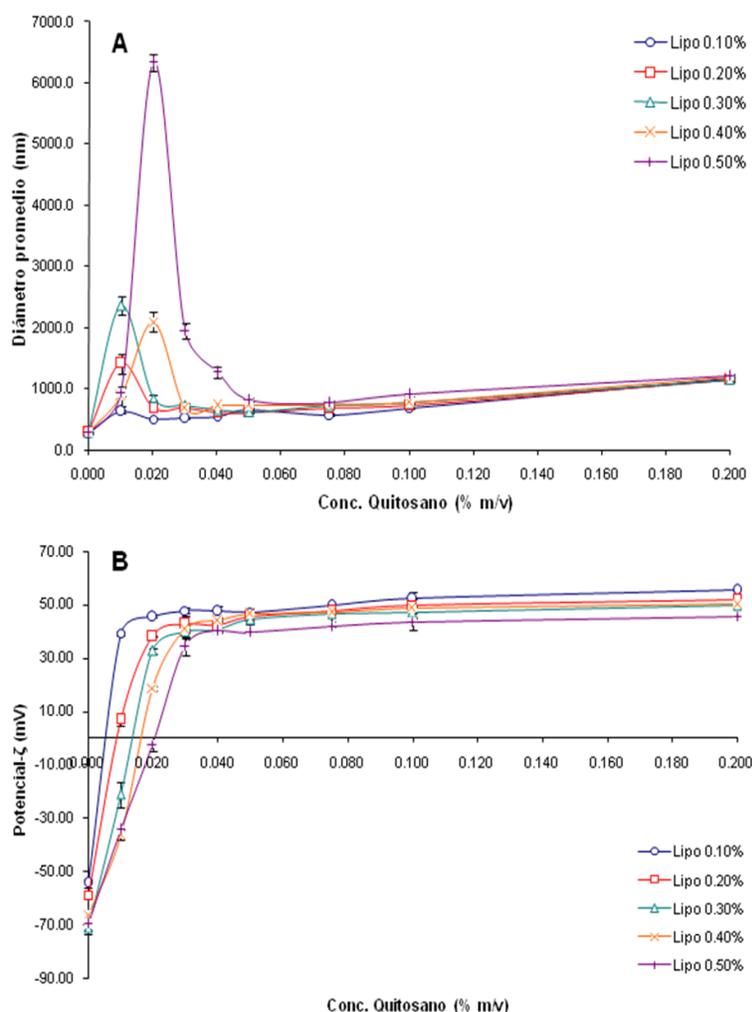


Figura 2. Variación en el diámetro promedio de partícula (A) y el potencial- ζ (B) de liposomas de lecitina de soja (0,1-0,5 % m/v) recubiertos con diferentes disoluciones de quitosano (0,010-0,200 % m/v).

La carga de las vesículas liposomales sufrió un incremento de -70 a +50 mV con el recubrimiento biopolimérico, en función de la concentración inicial de lecitina utilizada. Sin embargo, al incrementar la concentración de lecitina se requiere una mayor concentración de quitosano para ocasionar la inversión de carga de las vesículas. Así mismo, el incremento en la carga superficial de los liposomas se observó a lo largo de un amplio rango de concentraciones de biopolímero. Por ejemplo, para concentraciones de lecitina de 0,10% m/v la carga de las vesículas sufrió un incremento de -40 a +40 mV cuando se incremento la concentración de quitosano de 0,002 a 0,010% m/v, mientras que para una dispersión de liposomas de lecitina al 0,50% se necesitó un incremento de 0,015 a 0,038% m/v en la concentración de quitosano para alcanzar la misma inversión de carga.

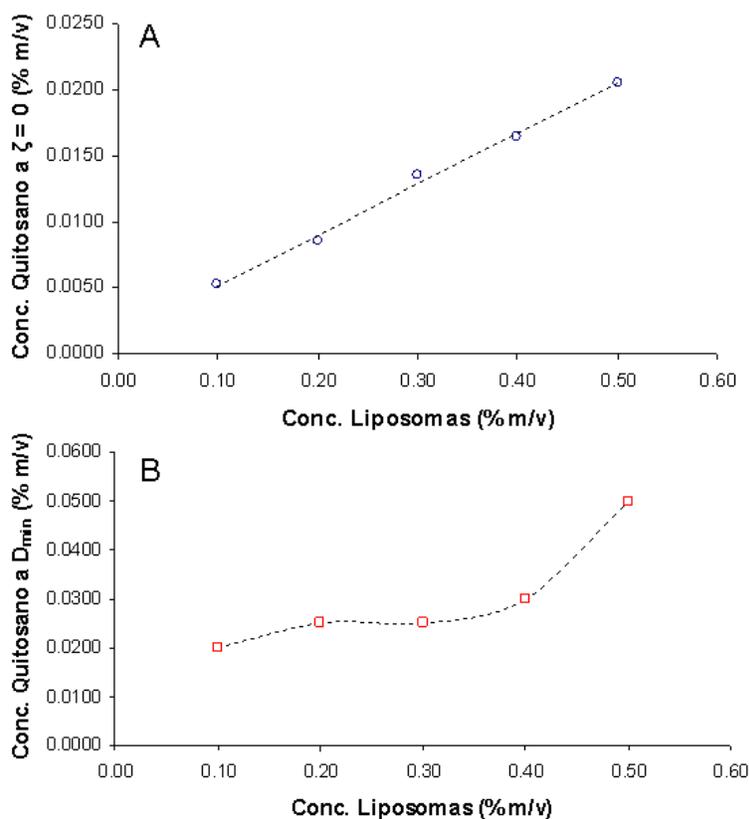


Figura 3. Concentración de quitosano requerida para alcanzar la neutralización de carga ($\zeta = 0$ mV) (A) y el diámetro mínimo de partícula (D_{min}) (B) de liposomas de lecitina de soja ($D_{prom} \sim 250$ nm)

De la misma forma, el intervalo de las concentraciones de quitosano que causan agregación de las vesículas aumenta con el incremento de la concentración de lecitina en los liposomas. El diámetro de los agregados formados a bajas concentraciones de quitosano decrece al reducirse la

concentración de biopolímero. Por ejemplo, dispersiones de lecitina al 0,10% m/v recubiertas con quitosano al 0,010% m/v presentaron diámetros promedio de 500 nm, mientras que al incrementar la concentración del biopolímero hasta 0,200% m/v se obtuvieron partículas con diámetros promedio superiores a los 1.000 nm.

En la Figura 3A se presentan las concentraciones mínimas de quitosano requeridas para neutralizar la carga de cada formulación liposomal, misma que corresponde a la concentración de biopolímero que produce valores de potencial- ζ iguales a 0 mV. La concentración crítica ($C_{\zeta} = 0$) requerida para neutralizar la carga neta de las vesículas liposomales presentó un incremento lineal en función de la concentración de los liposomas ($R^2 = 0,995$). De la misma forma, la concentración crítica de quitosano para producir partículas liposomales recubiertas con un diámetro promedio mínimo ($C_d = \min$) se vio incrementada en función de la concentración de lecitina en los liposomas (Figura 3B).

3.2. Adsorción de quitosano en la superficie de vesículas liposomales. Las interacciones electrostáticas entre partículas y biopolímeros cargados han sido estudiadas extensivamente, pero existen muy pocas investigaciones con respecto a la interacción de estructuras cerradas liposomales con biopolímeros de carga opuesta. La limitación de utilizar biopolímeros cargados de muy bajo o muy alta masa molecular, con el objetivo de formar un recubrimiento alrededor de partículas líquidas o sólidas ha sido explicado previamente en términos de la teoría del mosaico de cargas [17].

Nuestros resultados sugieren que los liposomas interaccionan fuertemente con el quitosano mediante interacciones electrostáticas para formar un variado rango de estructuras dependientes de la proporción de quitosano y liposomas. Según se ha reportado en estudios previos [18-20], la adición de biopolímeros cargados a una dispersión de partículas de carga opuesta producirá un cambio en la carga eléctrica de las partículas, ya sea de positivo a negativo (si las partículas son catiónicas y se añade un biopolímero aniónico) o viceversa (si las partículas son aniónicas y se añade un biopolímero catiónico).

En la Figura 4 se muestra una microscopia confocal de fluorescencia de los liposomas recubiertos con quitosano previamente marcado con fluoresceína. La imagen obtenida demuestra la fuerte asociación entre el quitosano y los liposomas.

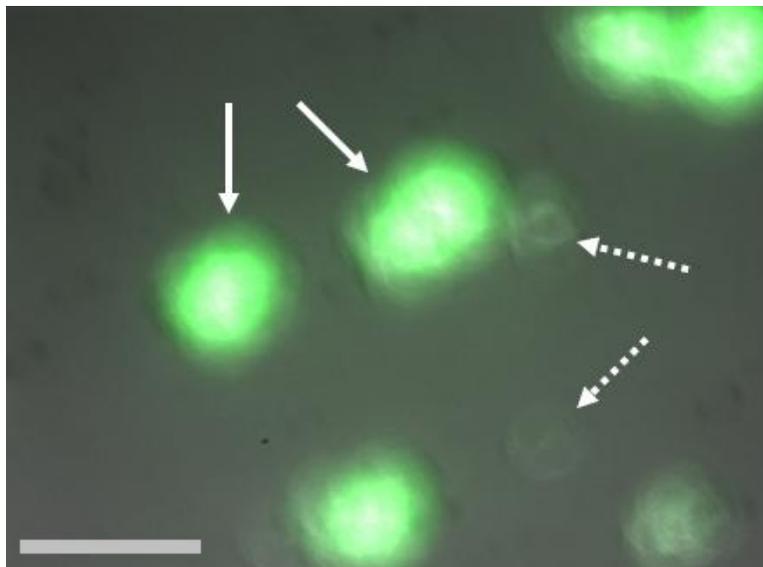


Figura 4. Microscopía confocal de liposomas recubiertos con quitosano marcado con fluoresceína (magnificación 100 x, **—** 1000 nm). Las flechas rellenas señalan partículas liposomales recubiertas con el quitosano fluorescente. Las flechas punteadas señalan partículas liposomales sin recubrimiento.

Las formulaciones estables de liposomas recubiertos con quitosano solamente se lograron preparar a un estrecho rango de concentraciones del biopolímero ($c_{\min} < c < c_{\max}$), mientras que a concentraciones superiores e inferiores a este rango óptimo se obtuvieron agregados liposomales que eventualmente presentaron separación de fases con respecto a la disolución. La concentración mínima de biopolímero necesaria para obtener liposomas secundarios estables puede ser estimada a partir del estudio de la variación del potencial- ζ de los liposomas recubiertos, en función de la concentración de quitosano.

Un modelo empírico ha sido propuesto para calcular la “concentración de saturación” (c_{sat}), que sería la mínima concentración de biopolímero requerida para recubrir las partículas de carga opuesta, mediante el cambio en el potencial- ζ [18, 21]:

$$\zeta_c = \zeta_{\text{sat}} + \zeta_0 - \zeta_{\text{sat}} \exp -3c/c_{\text{sat}} \quad (1)$$

donde $\zeta(c)$ corresponde al potencial- ζ de los liposomas recubiertos con una concentración de quitosano (c), mientras que ζ_0 y ζ_{sat} son las cargas iniciales y de saturación de los liposomas, respectivamente.

Al representar la concentración de saturación de quitosano c_{sat} , en comparación con la concentración de los liposomas presentes en el sistema, se obtuvo una relación lineal ($R^2 = 0,9543$,

como se indica en la Figura 5), que estaría asociado al incremento lineal en el área superficial de los liposomas al aumentar la concentración de lecitina, con lo que se requeriría una mayor cantidad de quitosano para cubrir completamente todos los liposomas.

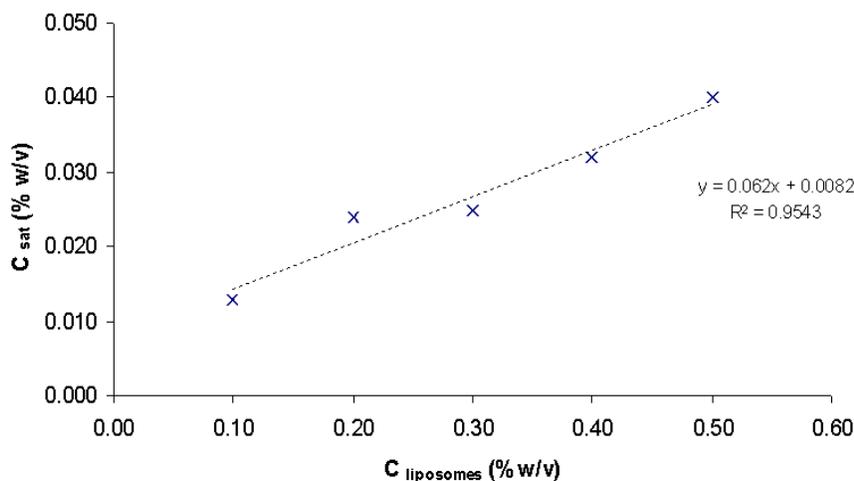


Figura 5. Concentración de saturación de quitosano, calculada a partir del cambio de carga en las formulaciones liposomales de lecitina de soja recubiertas con biopolímero.

A partir de la comparación de los valores de c_{sat} y la concentración de liposomas, puede calcularse otro parámetro, independiente de la concentración de liposomas, conocido como “superficie cubierta a la saturación” (Γ_{sat}), que puede calcularse utilizando una aproximación similar a las propuestas para la formación de emulsiones compuestas por gotas recubiertas por biopolímeros [22]. En el caso de las emulsiones, la superficie cubierta puede calcularse sencillamente como: $\Gamma_{sat} = c_{sat} d_{32}/6\Phi$, donde Φ es la fracción de volumen de la fase dispersa, d_{32} es el tamaño de partícula promedio de las gotas en la emulsión y c_{sat} es la concentración de saturación determinada. Contrario a las gotas de una emulsión, los liposomas están formados por una estructura cerrada tipo núcleo, en donde solamente su “corteza” esta compuesta por material lipídico, lo que dificulta la estimación de la concentración de la fase dispersa a partir de la concentración de lecitina. En el caso de vesículas unilamelares compuestas por fosfatidilcolina, se ha podido determinar un espesor superficial de corteza de aproximadamente 4 nm [23,24]. Si se considera que las dispersiones de lecitina de soja están principalmente compuestas por fosfatidilcolina (> 97%) y que los procesos de formulación de los liposomas (sonicación-congelado-descongelado) conllevan a la obtención de vesículas unilamelares (como lo demuestran las bajas

distribuciones de tamaños, ~ 300 nm); sería posible estimar el área superficial total de los liposomas como:

$$A = 4n\pi r^2 \quad (2)$$

donde n es el número de liposomas y r es el radio promedio de los liposomas. El parámetro n puede ser calculado a partir de la concertación de lecitina $c_{\text{lecitina,total}}$ como:

$$n = \frac{c_{\text{lecitina,total}}}{c_{\text{lecitina,liposoma}}} = \frac{c_{\text{lecitina,total}}}{\frac{4}{3}\pi r^3 - r - \Delta r^3 \cdot \rho_{\text{lecitina}}} \quad (3)$$

donde $c_{\text{lecitina,total}}$ es la concentración de lecitina necesaria para formar una vesícula individual, r es el radio promedio de los liposomas, ρ es la densidad de la lecitina (1,015 g/cm³, T = 25°C) y Δr es el espesor de la membrana liposomal (4 nm); con lo que la superficie recubierta puede expresarse como:

$$r = \frac{c_{\text{sat}}}{A} = 3\rho_{\text{lecitina}} \frac{c_{\text{sat}}}{c_{\text{lecitina,total}}} \frac{r^3 - r - \Delta r^3}{r^2} \quad (4)$$

A partir de los valores de c_{sat} calculados según las ecuaciones anteriores y comparadas con las concentraciones de liposomas se logro obtener una superficie de recubrimiento promedio de 6 ± 3 mg/m² para liposomas con tamaños cercanos a los 250 nm. Estos valores se acercan a los resultados reportados para la absorción de quitosano en gotas lipídicas recubiertas por proteínas de 5 mg/m² [19].

3.3. Estabilidad de liposomas recubiertos con quitosano. La adición de quitosano a los liposomas, en concertación por encima y por debajo de la concertación de saturación, conduce a una desestabilización de las dispersiones liposomales. No esta totalmente claro cuales son los mecanismos de desestabilización, pero las marcadas diferencias estructurales observadas cuando la concentración de quitosano es, ya sea muy baja o muy alta; sugiere que al menos existen dos mecanismos responsables de estos fenómenos.

A concentraciones insuficientes de biopolímero, los liposomas se rompen rápidamente (en cuestión de minutos) para formar un sedimento en el fondo del recipiente contenedor. Este fenómeno puede explicarse debido a que las moléculas aniónicas de los fosfolípidos pueden haberse enlazado a las moléculas catiónicas del quitosano para formar coacervados, en lugar de que las

moléculas de quitosano se enrollen entre ellas mismas alrededor de la superficie de las partículas liposomales. Debido a esto, este mecanismo puede, de alguna manera, diferir del proceso de rompimiento de una emulsión; que se produce debido a la adición de cantidades insuficientes del polímero de carga opuesta [18, 21]. En el caso de las emulsiones, las gotas se agregan rápidamente debido a fluctuaciones de entrecruzamiento y pueden llegar a coalescer producto de la proximidad de unas con otras.

Por el contrario, en la presencia de concentración de biopolímero en exceso, el mecanismo puede estar más asociado a los fenómenos observados para las emulsiones; donde se observarán procesos de agotamiento de floculación [18]. El exceso en la concentración de biopolímero crea un gradiente en la presión osmótica debido a la exclusión de las moléculas poliméricas del entorno inmediato de la superficie de las partículas, que producirá una fuerza atractiva que se vera incrementada a medida que se aumenta la concentración de biopolímero. Cuando se alcancen concentraciones de polímero no adsorbido lo suficientemente altas, el agotamiento en las fuerzas de atracción será suficiente para promover la agregación de las partículas [25]. Varias investigaciones han reportado que este proceso es reversible al diluirse la emulsión o mediante la adición de mas gotas. Así mismo, nuestra investigación ha comprobado que los flóculos de los liposomas agregados se disocian al diluirles con disolvente (además de agitación o sonicación leve), lo que sugiere que la floculación esta efectivamente inducida por estos procesos de agotamiento descritos anteriormente.

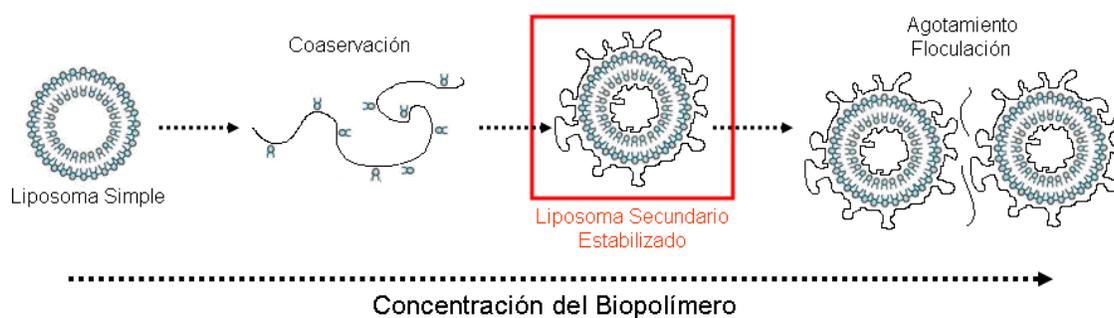


Figura 6. Propuesta para el mecanismo de acción del quitosano en el recubrimiento y estabilización de liposomas, compuesto por etapas de conservación, formación de liposomas secundarios estables y floculación por entrecruzamiento.

En la Figura 6 se muestra el modelo que se sugiere para explicar los fenómenos asociados la inestabilidad observada en los liposomas al ser recubiertos con quitosano.

Finalmente, los liposomas recubiertos con quitosano presentaron un incremento significativo en su estabilidad a largo tiempo, en comparación con los sistemas sin recubrimiento (Figura 7). En general, los liposomas tienen la tendencia de adicionarse para formar estructuras liposomales mayores con el tiempo, que podría, eventualmente, promover la separación de fases del sistema. La geometría molecular de los lípidos polares en la bicapa, usualmente se relaciona con la configuración termodinámicamente más estable, que correspondería a una monocapa plana con curvatura cero [26]. La adición de las vesículas estará asociada a la flexibilidad y ondulaciones naturales de la bicapa y a la ausencia de suficientes fuerzas repulsivas electrostáticas que pudieran prevenir el acercamiento y posterior contacto entre vesículas liposomales. Debido a esto, el incremento en la estabilidad observado en los liposomas recubiertos con quitosano, pudiera estar relacionado con la capa de biopolímero adsorbido en la superficie de los liposomas, que proveería mayores fuerzas repulsivas de interacción (estéricas o electrostáticas) o en su defecto la absorción del biopolímero reduciría las ondulaciones en la membrana de la bicapa inferior.

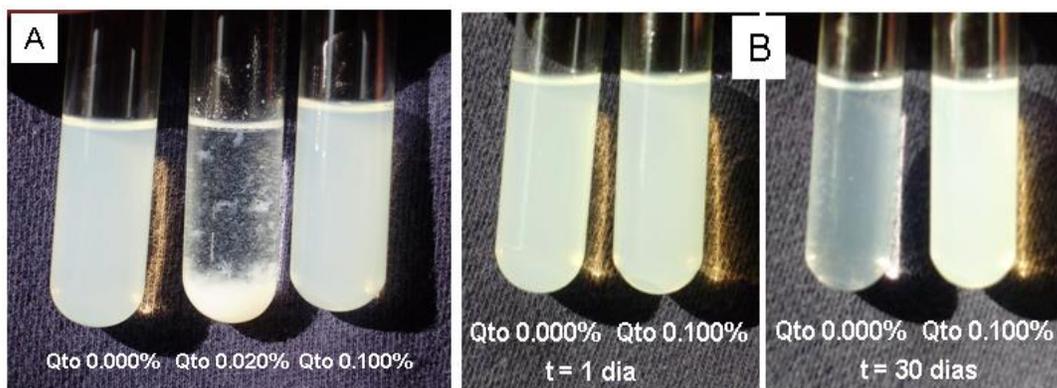


Figura 7. Imágenes de liposomas de lecitina de soja (0,5% m/v, $D_{prom} \sim 250$ nm) recubiertos con diferentes concentraciones de quitosano (0,000-0,100% w/v) (A) y efecto del recubrimiento con quitosano en la estabilidad de las vesículas liposomales después de 30 días ($T = 25^{\circ}C$).

CONCLUSIONES

La carga de las partículas experimentó un cambio de -70 mV en la ausencia de quitosano, a $+40$ mV con la adición del biopolímero, indicando la formación del complejo iónico entre la superficie aniónica de las vesículas liposomales y las moléculas policatiónicas del quitosano. Cuando la concentración de quitosano se mantuvo por debajo de la concentración crítica mínima (c_{min}), se observó la formación de agregados de partículas que precipitaban rápidamente, lo que se

atribuyo a la formación de coacervados. Por otro lado, cuando la concentración de quitosano supero la concentración critica máxima (c_{max}), se observo la formación de grandes flóculos que tienden a sedimentar al transcurrir varias horas, lo que se atribuye a un proceso de agotamiento de floculación. En el intervalo de concentraciones comprendido entre estos dos parámetros, se observó la formación de liposomas recubiertos estables, que presentaron una menor tendencia a agregarse con el tiempo, como pasa con los liposomas sin recubrimiento. Los resultados presentados han permitido demostrar que es posible obtener liposomas recubiertos con biopolímero, mediante la adición de un biopolímero catiónico (quitosano) en una suspensión de liposomas aniónicos (vesículas de lecitina de soja) y un cuidadoso control de sus composiciones en solución. Los liposomas recubiertos presentaron mayor estabilidad que los liposomas formulados sin biopolímero, lo que permite concluir que el proceso de adición electrostática ofrece una alternativa innovadora para modificar las propiedades de los liposomas.

Agradecimientos. Los investigadores desean agradecer al Ministerio de Ciencia y Tecnología (MICIT) y al Consejo Nacional de Rectores (CONARE) de la *Republica de Costa Rica*, por el financiamiento de los proyectos de investigación que permitieron completar este artículo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hughes RC, *Essays Biochem.*, **11**, 1 (1975)
2. Sunamoto J, Iwamoto K, Kondo H, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **94**, 1367 (1980)
3. Iwamoto K, Sunamoto J. *J. Biochem.* **91**, 975 (1982)
4. Sunamoto J, Iwamoto K, Kondo H, *J. Biochem.*, **88**, 1219 (1980)
5. Kato A, Kondo T. En: CG.Gebelein (Ed.) Plenum, Nueva York, EEUU. 1987, p. 299-310
6. Alamelu S, Panduranga RK, *J. Microencapsulation*, **8**, 505 (1991)
7. Madrigal-Carballo S, Sibaja M, Vila AO, Reed J, Molina F, *J. Liposome Res.* (doi: 10.1080/08982100902729436) (2009)
8. Porras G, Vila AO, Molina F, Sibaja M, Madrigal-Carballo S, *Rev. Ibeoram. Pol.*, **9** (6), 538 (2008)
9. Madrigal-Carballo S, Vila AO, Sibaja, M, Reed J, Molina F, *J. Liposome Res.* (doi: 11.987/236599654551089614) (2009)
10. Olsen R, Schwartzmiller D, Weppner W, Winandy R. En G.Skjak-Braek, T.Antonsen, P.Sandorf (Eds.) Elsevier, Londres. 1989, p. 813-828
11. Baran AA, *Colloids Surf. A.: Physicochem. Eng. Asp.*, **31**, 259 (1988)
12. Agerkvist I, Eriksson L, Enfors S, *Enzyme Microb. Technol.*, **12**, 584 (1990)
13. Margalit R, Okon M, Yerushalmi N, Avidor E., *J. Control. Release*, **19**, 275 (1992)
14. Madrigal-Carballo S, Seyler D, Manconi M, Mura S, Vila AO, Molina F, *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects*, **323**, 149 (2008)
15. Alvarez MA, Seyler D, Madrigal-Carballo S, Vila AO, Molina F. *J Colloid Interface Sci.* **309**, 279 (2007)
16. Manconi M, Aparicio J, Seyler D, Vila AO, Figueruelo JF, Molina F, *Colloids Surf., A: Physicochem. Eng. Aspects*, **271**, 102 (2005)
17. Henriksen I, Vhgen SR, Sande SA, Smistad G, Karlsten J, *Int. J. Pharm.*, **146**, 193 (1997)
18. Guzey D, McClements DJ, *Adv. Colloid Interface Sci.*, **130**, 227 (2006)
19. Hong YH, McClements DJ, *Food Biophys.*, **2**(1), 46 (2007)
20. Pallandre S, Decker EA, McClements DJ, *J. Food Sci.*, **72**(9), E518 (2007)

21. Laye C, McClements DJ, Weiss J, *J. Food Sci.*, **73**(5), N7 (2008)
22. Guzey D, McClements DJ, *J. Agric. Food Chem.*, **55**(2), 475 (2007)
23. Huang C, Mason JT, *Proc Nat Acad Sci. EE.UU.*, **75**(1), 308 (1978)
24. Ipsen JH, Ouritsen OG, Bloom M, *Biophys J.*, **57**, 405 (1990)
25. McClements DJ, *Langmuir*, **21**(21), 9777 (2005)
26. Israelachvili J “*Intermolecular and surface forces*”. Academic Press, Londres (1992)