

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
LICENCIATURA EN BIOINGENIERÍA MÉDICA
DEPARTAMENTO DE EVALUACIÓN PROFESIONAL



**EFFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO Y
EFICIENCIA DE CARGA EN LA PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS CON R6G**

TESIS
PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOINGENIERÍA MÉDICA

PRESENTA
PLBM. KIMBERLY RONDEROS AYALA
DIRECTOR
DRA. EN C.S LILIANA ARANDA LARA
ASESOR
DR. EN C. BERNARDO PLIEGO RIVERO

TOLUCA, MÉXICO JUNIO 2024

TÍTULO

EFFECTO DEL ULTRASONIDO SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE TAMAÑO Y EFICIENCIA DE CARGA EN LA PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS CON R6G

ÍNDICE

1. Resumen
2. Marco teórico
 - 2.1 Liposomas
 - 2.1.1 Componentes de los liposomas
 - 2.1.1.1 Fosfolípidos
 - 2.1.1.2 Rodamina 6G
 - 2.1.1.3 Phospholipon ® 90G
 - 2.1.2 Clasificación de los liposomas
 - 2.1.3 Métodos de preparación de los liposomas
 - 2.1.4 Aplicaciones de los liposomas
 - 2.2 Homogeneizador ultrasónico
 - 2.2.1 Física del ultrasonido
 - 2.2.2 Transductor
 - 2.2.3 Bioefectos
 - 2.2.3.1 Cavitación acústica
 - 2.2.3.1.1 Cavitación no inercial o estable
 - 2.2.3.1.2 Cavitación inercial o transitoria
 - 2.2.3.2 Fuerzas de radiación
 - 2.2.4 Sonicador
 - 2.2.4.1 OMNI SONIC RUPTOR 400
 - 2.2.5 Nanoemulsificación ultrasónica
 - 2.2.6 Parámetros de sonicación
3. Antecedentes
 - 3.1 Efecto de parámetros en síntesis de liposomas para optimizar el tamaño y distribución
 - 3.2 Síntesis de liposomas con distinto objetivo
 - 3.3 Mecanismos y modelos de formación de liposomas por sonicación
4. Planteamiento del problema
5. Justificación
6. Hipótesis
7. Objetivo general
 - 7.1 Objetivos específicos
8. Metodología
 - 8.1 Previo a la formulación
 - 8.2 Síntesis de liposomas sin R6G
 - 8.3 Síntesis de liposomas con R6G
 - 8.4 Sonicación
 - 8.5 DLS
 - 8.6 Curva de calibración de R6G

8.7 Eficiencia de encapsulación de R6G

9. Resultados

10. Discusiones

11. Conclusiones

12. Bibliografía

13. Anexo: abreviaturas y abreviaciones

1. Resumen

En esta investigación se sintetizaron liposomas, compuestos de fosfatidilcolina, colesterol y polietilenglicol, por el método de hidratación y liposomas con Rodamina 6G por el método simultáneo de etanol, ambas técnicas seguidas de sonicación. La potencia, tiempo de exposición y modo de operación fueron las variables modificadas en la etapa de sonicación. Se utilizó un sonicador de sonda de 20 kHz con micropunta de titanio de 3.5 mm de diámetro. Se evaluó el efecto sobre el tamaño y distribución de partícula (índice de polidispersidad) al modificar la potencia, tiempo de exposición y modo de operación del ultrasonido mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS). En los liposomas cargados con Rodamina 6G se evaluó la eficiencia de encapsulación mediante fluorescencia. Se analizó la eficiencia de carga de R6G en función del tiempo de exposición al ultrasonido y en el modo de operación de la sonda. Los resultados mostraron que la variación en la potencia no influye en la distribución y tamaño de partícula para los liposomas vacíos, en cambio, para los liposomas (R6G) el aumento de potencia causó mayor eficiencia de carga. El tiempo de exposición repercute en la distribución de tamaño y la eficiencia de carga. Además, el modo pulsado mostró mayores índices de polidispersidad y eficiencia de encapsulación, no obstante, las muestras monodispersas se obtuvieron por el modo constante.

2. Marco teórico

2.1 Liposomas

Las nanopartículas son menores a 100 nm de tamaño (1). Distintos tipos de nanopartículas han surgido como transportadores para entrega de fármacos y como herramienta de diagnóstico (1). Por su composición, las nanopartículas pueden clasificarse en: nanopartículas inorgánicas, orgánicas, basadas en lípidos y de polímeros (1).

Las nanopartículas basadas en lípidos (LNPs (ing): nanoparticles based-lipid) son usadas en el campo de la nanomedicina como transportadores de fármacos. Dentro de esta clasificación se encuentran los liposomas, nanopartículas solidas-lipídicas (SLNs (ing): solid lipid nanoparticles), acarreadores de nanoestructura lipídica (NLCs (ing): nanostructured lipid carriers) y nanoemulsionantes (por ejemplo, SNEDDS (ing): self- nanoemulsifying drug delivery systems) (Figura 1) (1,2). Las nanopartículas basadas en lípidos se utilizan para proteger a los fármacos de su degradación *in vivo*, controlar la dosis de liberación del fármaco, modificar la biodistribución en el sitio blanco, además de mejorar la solubilidad y biodisponibilidad del fármaco (3). De las LNPs mencionadas los liposomas son generalmente los sistemas mejor establecidos (2,3).

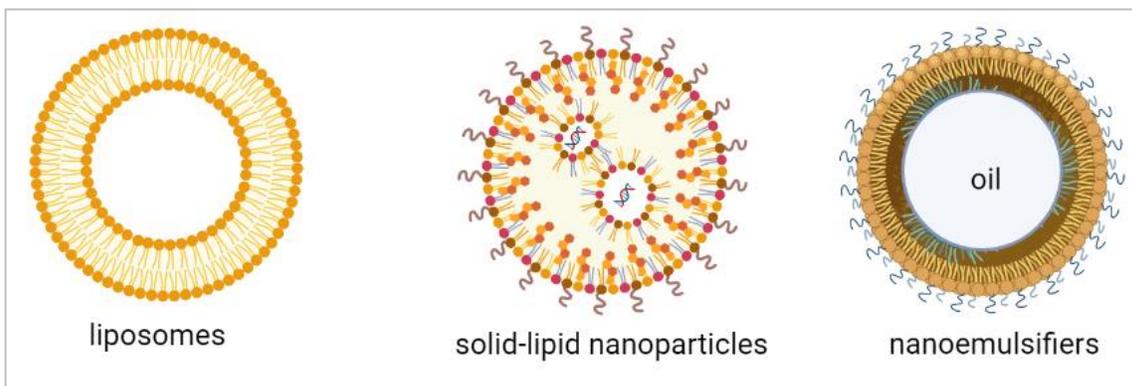


Figura 1. Tipos de nanopartículas basadas en lípidos.

Un ejemplo de los sistemas de liberación de fármacos basados en lípidos han sido las vacunas mediante su habilidad para proteger y liberar antígenos o fármacos basados en ácidos nucleicos (3).

Los liposomas son vesículas artificiales esféricas anfipáticas compuestas de fosfolípidos cuyo tamaño de partícula va de los nanómetros a los micrómetros, consiste en una o más bicapas lipídicas alrededor de un núcleo acuoso (1–6). En su superficie mantiene un nivel de pH casi neutro o cerca al nivel biológico (3). Por sus propiedades hidrofílicas y lipofílicas, los liposomas pueden transportar y liberar compuestos hidrofílicos, hidrofóbicos y anfipáticos (Figura 2) (1,2,6).

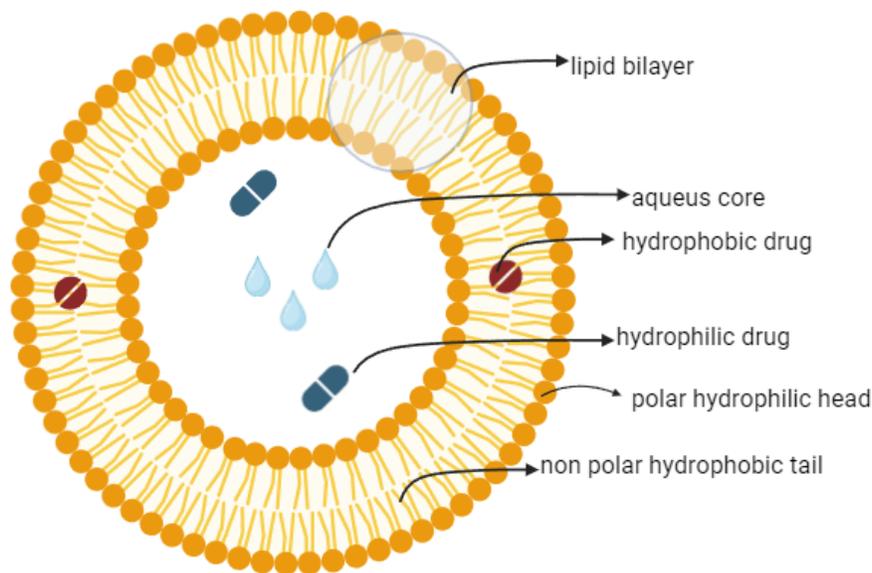


Figura 2. Estructura de los liposomas y la encapsulación de medicamentos hidrofílicos y lipofílicos.

Las propiedades de los liposomas difieren por su composición lipídica, carga en la superficie, tamaño y método de preparación (4,6). Las características de los liposomas son biocompatibilidad, biodegradabilidad, baja toxicidad y capacidad de encapsulación (6). La ventaja de utilizar liposomas como sistema de transporte es evitar la degradación temprana de los medicamentos encapsulados, son resistentes a soluciones alcalinas, por lo tanto, incrementan la dosificación en el tejido blanco (2,3,6). Además, son una opción para la entrega de fármacos dirigida, es decir, con un tejido blanco, resultando una mejor biodisponibilidad y reduciendo efectos colaterales producidos de los sistemas de transporte no dirigidos (3,6). Los

liposomas tienen una estructura similar a la membrana biológica (4). Las vesículas tienen un arreglo de una bicapa de fosfolípidos en un medio polar teniendo la habilidad de incorporar moléculas biológicas (2). El arreglo de los fosfolípidos en las bicapas lipídicas y su capacidad de autoensamblaje les permite a los liposomas ser termodinámicamente estables (3,4). La estabilidad termodinámica a lo largo del tiempo de almacenamiento de los liposomas se asocia con el tamaño de partícula, carga en la superficie y su composición lipídica (2). La habilidad de encapsulación y liberación selectiva (concentración del medicamento en el sitio diana) los convierte en sistemas de administración de fármacos o como transportadores de medicamentos (1,2,6). Ya que, estos permiten un control en su liberación dentro del plasma mejorando la farmacocinética y biodistribución del fármaco (2). La mayoría de los medicamentos involucrados en estudios clínicos ejercen ciertos efectos dependientes de la concentración de éste en el sitio del receptor específico, lo que puede propiciar efectos secundarios. Los medicamentos dirigidos optimizan la cantidad del fármaco en el sitio de interés controlando la velocidad de liberación de este (2). Los medicamentos dirigidos pueden ser entregados por dos mecanismos: pasivo y activo (2). En el mecanismo activo, los sistemas de liberación del fármaco (DDS (ing): drug delivery systems) son dirigidos a la circulación sanguínea y el medicamento es liberado en respuesta natural o propia de nuestro cuerpo contrarrestando las características fisicoquímicas del fármaco o el sistema de transporte del fármaco (2). El efecto de permeabilidad mejorada y retención (EPR (ing): enhanced permeability and retention effect) está relacionado con el tiempo de permanencia del nanotransportador en el torrente sanguíneo. Este tiempo de permanencia se debe también al envolvimiento de la partícula con determinado recubrimiento, por ejemplo, polietilenglicol (PEG). Los DDS dirigidos se han adjudicado para la aplicación en tumores (2). Las nanopartículas con una medida de 10 a 100 nm de diámetro se han encontrado por un periodo más largo de tiempo en el torrente sanguíneo por medio del mecanismo pasivo (2).

Por otro lado, el mecanismo activo utiliza ligandos para células específicas en el nanotransportador o por respuesta al pH de esta, por lo tanto, las nanopartículas buscan dañar únicamente al tejido objetivo. Existen distintas maneras de lograr este

mecanismo, una de ellas es conociendo la naturaleza del receptor para que el fármaco sea específico además de ser una opción para su uso en imagenología (2,7).

2.1.1 Componentes de los liposomas

La elección de los componentes de la bicapa determina la rigidez o fluidez y carga de esta (6). Los liposomas se componen de fosfolípidos, los cuales son biodegradables y biocompatibles mostrando similitud con los lípidos presentes en la membrana biológica celular (3). Los liposomas formados con fosfolípidos insaturados de fuentes naturales son más permeables, pero con bicapas menos estables. Además, forman inmediatamente estructuras cerradas cuando son hidratados en una solución acuosa (Figura 3) (6). También se componen de colesterol con la finalidad de controlar la liberación del medicamento. La presencia de colesterol conforma su estructura, disminuye la fuga del medicamento encapsulado en tejidos no deseados y el riesgo de opsonización del liposoma extendiendo su tiempo de vida en la circulación sanguínea (2).

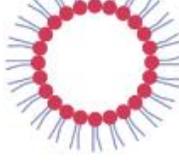
shape	organization	Especies
		Jabones, detergentes, lisofosfolípidos
		Fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, esfingomielina, dicetilfosfato, DODAC.
		Fosfatidiletanolamina, ácido fosfatídico, colesterol, cardiolipina, lípido A

Figura 3. Diferentes formas moleculares de fosfolípidos. Los fosfolípidos más comúnmente usados son de forma cilíndrica las cuales forman una bicapa lamelar en contacto con un medio acuoso. Si se le añade alguno con forma de cono, las propiedades de la bicapa pueden ser alteradas o hacerla más rígida.

Las nanopartículas pueden ser recubiertas por polímeros biodegradables como ácido poliláctico (PLA) y el poliácido láctico-co-glicólico (PLGA), sin embargo, los polímeros no biodegradables muestran mayor biocompatibilidad como el polietilenglicol (PEG) y acetato de polivinilo (PVA); los cuales son aceptados para la fabricación de nanocápsulas. El uso de polímeros en el recubrimiento de liposomas favorece el tiempo de vida de estos en la circulación sanguínea (2). En general, las vesículas liposomales son formadas por un autoensamblaje de los siguientes componentes: fosfolípidos, colesterol y lípidos conjugados con polímeros hidrofílicos (Figura 4) (2).

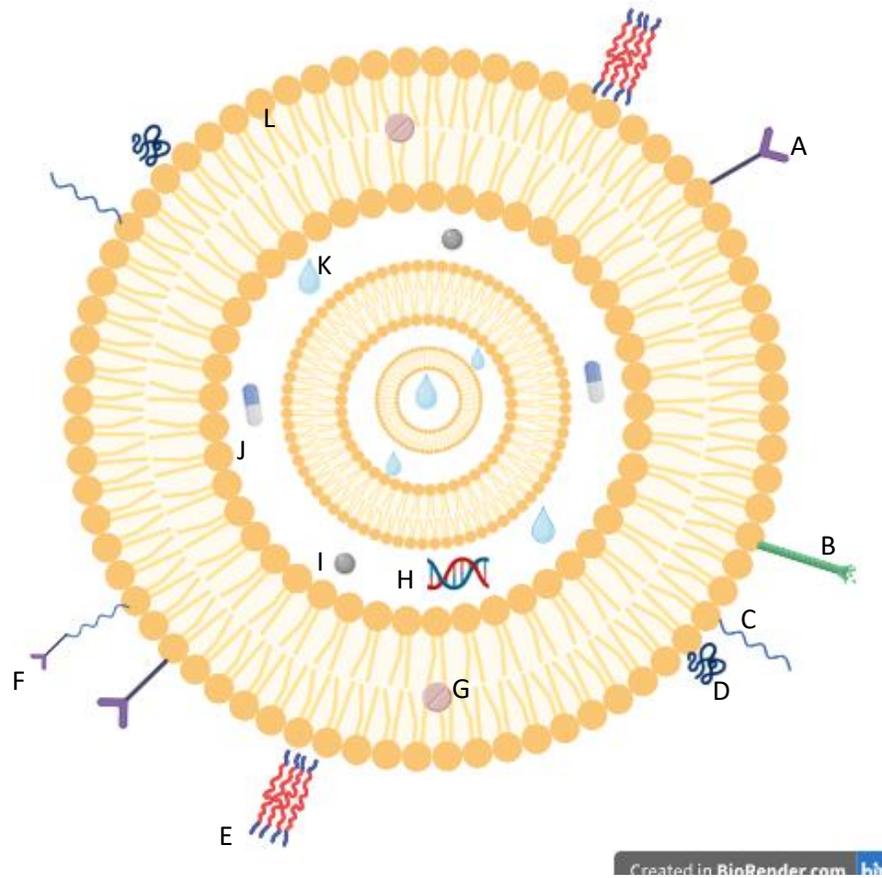


Figura 4. Liposoma multilamelar con posibles modificaciones en su recubrimiento: A) ligando, B) estímulo-respuesta, C) activador de borde, D) péptido, E) polímero, F) péptido unido a ligando, G) medicamento hidrofóbico, H) AND/ARN/siRNA, I) medicamento cristalino, J) medicamento hidrofílico, K) capa acuosa entre cada bicapa lipídica, L) fosfolípido.

Las moléculas encapsuladas con carga permanecen en el núcleo acuoso, mientras que las que no tienen carga se encuentran en la bicapa interactuando con otra molécula sin carga (2).

Los componentes como fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, colesterol, y fosfatidiletanolaminas pegiladas son los materiales más comúnmente usados en la formulación de liposomas para la liberación de fármacos (2). La colina es un grupo polar, consta de una cabeza hidrofílica mientras que el glicerol y fosfato son dos colas hidrofóbicas. El autoarreglo de los fosfolípidos (ya sean naturales o sintéticos) es necesario para la formación de la bicapa (2).

La incorporación del colesterol ayuda a incrementar la distancia entre sí de las cabezas polares, entonces reduce las interacciones entre fuerzas electrostáticas y puentes de hidrógeno, evitando la fuga del fármaco encapsulado en la membrana

(2). Además, mejora la fluidez de la membrana significativamente y la estabilidad de la bicapa (2).

La estabilidad de los liposomas convencionales depende de la selección de fosfolípidos naturales para su preparación (Tabla 1) (2). Los liposomas son de dosificación única, su eficacia depende de la calidad del excipiente y su composición para mantener su estabilidad (2). La temperatura en la fase de transición de los lípidos es un factor que impacta para su selección, y la temperatura depende de la longitud de la cadena acilo del lípido. Los lípidos con mayor longitud en la cadena acilo son principalmente usados por su alta temperatura de transición y ésta se logra por una mezcla de lípidos (2). Una ventaja visible de la aplicación a los liposomas en su composición fosfolípidos fisiológicos es la reducción del riesgo de producir toxicidad crónica o aguda (2).

Tabla 1. Lista de lípidos y fosfolípidos usados para la preparación de liposomas.

Clases de lípidos	Variedad para cada clase de lípidos
Esteroles	Colesterol
Esfingolípidos	Esfingomielina
Lípidos inductores de carga	Bromuro/cloruro de diotadacildimetilamonio (DODAB/C) Dioleoil trimetil amonio propano (DOTAP)
Fosfolípidos naturales	Fosfatidilcolina (lecitina) Fosfatidiletanolamina Fosfatidilglicerol Fosfatidilserina fosfatidilinositol
Fosfolípidos sintéticos	Diestearoil fosfatidilcolina (DSPC) Dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG) Dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) Dipalmitoil ácido fosfático (DPPA) Dimiristoilo fosfatidilcolina (DMPC) Dipalmitoil fosfatidilserina (DPPS)
Fosfolípidos insaturados	Dioleoil fosfatidilcolina
glicoesfingolípidos	Gangliósidos

2.1.1.1 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas ubicuas. La principal característica es su polaridad y forman parte de la clase lipídica de lípidos polares. Sus propiedades bioquímicas y

fisiológicas les permiten poseer la propiedad anfipática, es decir, los fosfolípidos interactúan tanto con los lípidos como con el agua y otros compuestos polares (8). Los fosfolípidos se dividen en dos clases: fosfoglicéridos o glicerofosfolípidos, en los que el alcohol es el glicerol, y esfingolípidos, en los que la esfingosina es el alcohol. Las cargas proporcionadas por la base (positiva) y el fosfato ácido (negativo) forman la cabeza hidrofílica, y las cadenas hidrocarbonadas forman la cola hidrofóbica de los fosfolípidos (8).

2.1.1.2 Rodamina 6G

La variedad de Rodamina (R) son una familia de tintes fluorescentes orgánicos que tienen algunas propiedades como fotosensibilizador (PS) para terapia fotodinámica (TFD). Poseen propiedades como fotoestabilidad a longitudes de onda de los láseres comunes, bajas energías de excitación y emisión, alta absorptividad molar, solubilidad en agua y baja toxicidad en ausencia de la luz (9). Debido que muchos compuestos R son catiónicos a pH fisiológico éstos se acumulan en mayor grado en las mitocondrias de las células tumorales cuya carga negativa neta es mayor que en células normales (9). Sin embargo, los compuestos R no se han considerado previamente útiles como fotosensibilizadores (PS) para terapia fotodinámica (TFD) debido a su baja producción de oxígeno singlete (9).

La rodamina 6G (R6G) también es nombrada rodamina 590, utilizada para su aplicación en láseres y como trazador de fluorescencia. Como colorante en láseres, se disuelve en metanol, etanol y una variedad de solventes orgánicos. En etanol, la absorción de R6G oscila entre 440 nm y 570 nm, con un pico de 530 nm (10). Su espectro de absorción de la R6G es de 525 nm, la longitud de onda de excitación es de 524 nm y de emisión es de 558 nm (9).

2.1.1.3 Phospholipon® 90G (PL90G)

El uso de fosfolípidos mejora la absorción y la biodisponibilidad de sustancias farmacológicas poco solubles en agua. Los fosfolípidos pueden servir como formadores de membranas lipídicas. El PL90G es un fosfolípido insaturado derivado

de soya, compuesto por al menos un 94 % de fosfatidilcolina (PC) (de acuerdo con las características de Lipoid®)(11,12).

La PC juega un papel importante en el tratamiento de la piel al involucrarse en el aumento de ácido hialurónico extracelular (11).

El PL90G es soluble en agua y etanol a 20 °C, mientras que en aceite es soluble entre 50 a 70 °C (12). El PL90G tiene una estructura química específica (Figura 5), su fórmula química es $C_{44}H_{80}NO_8P$, con un peso molecular de 782.08 y una temperatura de transición de fase de aproximadamente 48 °C (13,14).

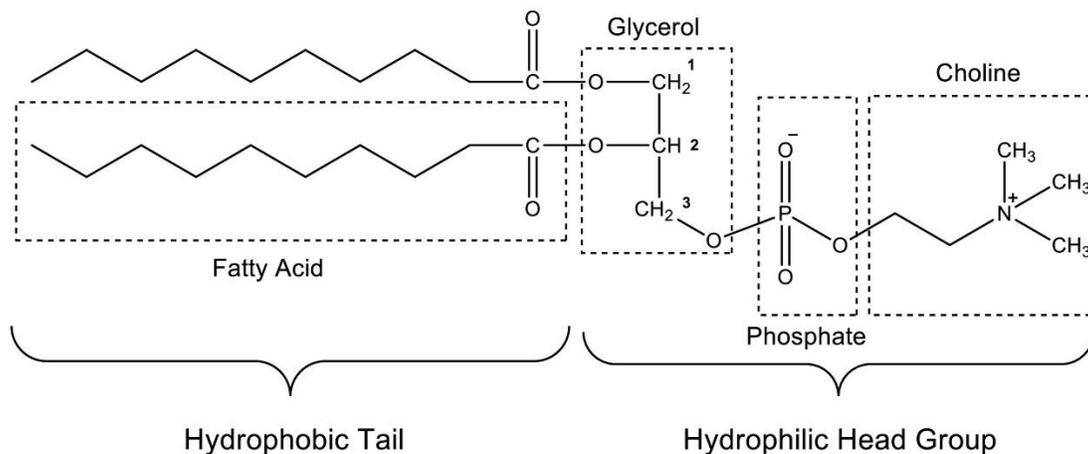


Figura 5. Estructura química del Phospholipon ® 90G.

2.1.2 Clasificación de los liposomas

Los liposomas se pueden clasificar por tamaño y dependiendo el número de bicapas lipídicas: vesículas multilamelares (MLVs (ing): multilamellar vesicles) o vesículas unilamelares (Figura 2). Dependiendo el tamaño de las vesículas unilamelares se clasifican en: vesículas unilamelares pequeñas (SUVs) y vesículas unilamelares grandes (LUVs) (Diagrama 1) (2–4,6).

Los liposomas unilamelares tienen una sola bicapa de fosfolípidos. Los liposomas multilamelares son caracterizados por poseer dos o más bicapas lipídicas concéntricas, y se encuentran en un rango de 2 a 5 μm (Figura 4) (2,4,6). Varias vesículas unilamelares se pueden formar dentro de otras, formando estructuras multilamelares de fosfolípidos separados por una capa de agua (2).

También, los liposomas se pueden clasificar por su carga y composición (2). Por su estructura, los liposomas pueden ser divididos en 4 tipos: convencionales, pegilados, dirigidos mediante ligandos y teranósticos (2).

El liposoma convencional consiste en una bicapa lipídica compuesta de cationes, aniones o fosfolípidos neutrales y colesterol. Sin embargo, estos liposomas han mostrado una salida rápida de la sangre principalmente por opsonización, por lo tanto, posee menor tiempo de vida media (2). La rapidez de su salida se debe a las interacciones físicas de proteínas que circulan en el plasma con los liposomas convencionales y la adsorción de proteínas en la membrana del liposoma (2). Ante esta demanda los liposomas convencionales han sido modificados (2).

Así surgen los liposomas stealth, los cuales presentan modificaciones en la composición de los liposomas convencionales (2). La superficie del liposoma es recubierta por un polímero inerte, biocompatible e hidrofílico, por ejemplo, PEG y quitosano. A estos liposomas se les conoce como liposomas stealth o pegilados (2). La recubierta facilita la prolongación de tiempo de vida dentro del plasma por la reducción de la interacción con proteínas propias de la sangre y evadir la fagocitosis. El polietilenglicol posee una excelente biocompatibilidad, por naturaleza no es iónico, y posee alta solubilidad en un medio acuoso u orgánico (2). La desventaja de estos liposomas es la biodistribución durante la liberación del medicamento en los tejidos (2).

Posteriormente surgen los liposomas dirigidos. Estos liposomas contrarrestan la distribución del fármaco a lo largo del cuerpo. Los liposomas dirigidos se caracterizan por la presencia de membranas funcionales con varias glucoproteínas, polisacáridos o ligandos para receptores específicos. Esto determina la preferencia de su acumulación en tejidos blanco, por lo tanto, se predetermina la liberación del fármaco en tiempo y el espacio objetivo (2).

Los inmunoliposomas utilizan anticuerpos o fragmentos de anticuerpos para liberar el fármaco encapsulado en el tejido o célula diana (2).

Los transferosomas son los liposomas que buscan cruzar la barrera de la piel. Pretende ser una opción para la administración de fármacos con poca permeabilidad traspasando la piel. Se busca modificar la estructura de los liposomas

convencionales produciendo vesículas deformables con alta capacidad de permeabilidad de componentes activos; permitiendo la penetración cutánea (2). Los transferosomas utilizan activadores de borde en su membrana, los cuales son usualmente surfactantes, esta modificación permite a los liposomas deslizarse entre las capas de la piel deformando la vesícula liposomal (2).

Los etosomas están compuestos de fosfolípidos y etanol del 20 al 45%. El tamaño de partícula de estos va desde 10 nm a 10 μ m (2).

Los farmacosomas son complejos de fármacos fosfolipídicos anfipáticos, estos liposomas se forman a través de enlaces covalentes, fuerzas electrostáticas o puentes de hidrógeno y se muestran como una micela ultradelgada o un conjunto hexagonal por su estructura química (2).

Una estrategia para liberar el fármaco encapsulado en el tejido diana es representada por los liposomas estímulo-respuesta. Estos liposomas son sensibles a los cambios de pH o de temperatura, permitiendo la descarga del fármaco ante un cambio en estos parámetros como respuesta al estímulo (2).

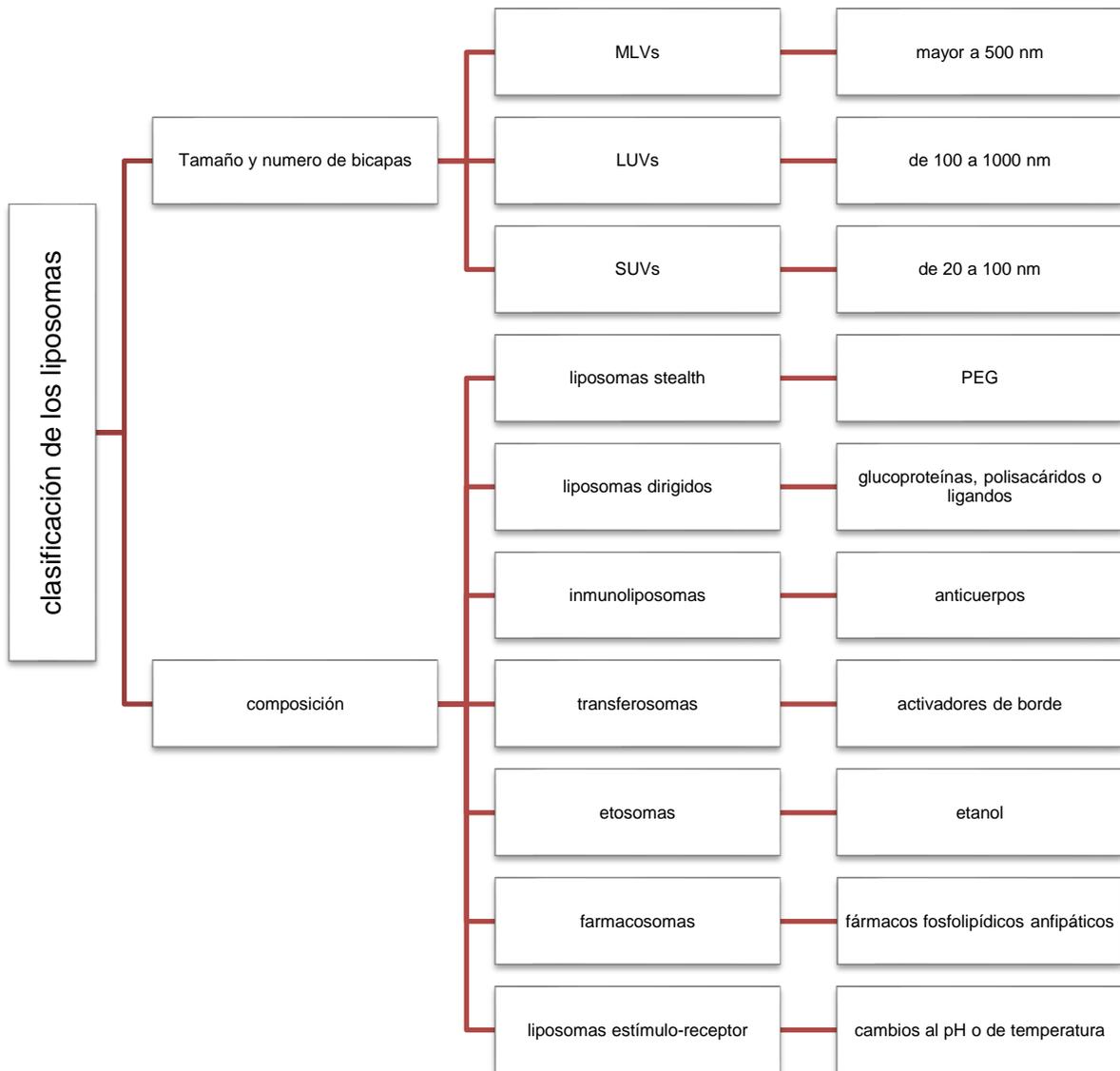


Diagrama 1. Clasificación de los liposomas

2.1.3 Métodos de preparación de los liposomas

La preparación de los liposomas involucra cuatro etapas generalmente (2,6):

1. Secado de lípidos en un disolvente orgánico
2. Dispersión de lípidos en un medio acuoso
3. Separación y purificación de liposomas
4. Análisis del producto final

El medicamento encapsulado puede ser añadido por diferentes métodos: activo o pasivo. Por el método pasivo, el medicamento es encapsulado durante la preparación de liposomas, mientras que en el activo el medicamento se añade después de la formación del liposoma (2,6,15).

Existen tres diferentes métodos pasivos (2,6):

- Método de dispersión mecánica
- Método de dispersión de disolventes
- Método de eliminación del detergente

Los métodos de dispersión mecánica se pueden llevar a cabo por las siguientes técnicas (2,6):

- Sonicación
- Extrusión
- Liposomas congelados-descongelados (CD)
- Hidratación de la película lipídica
- emulsificación
- Extrusión de la membrana

Para este proyecto se utilizó como método de dispersión mecánica la hidratación de la película lipídica y sonicación, en el cual, los lípidos son mezclados y disueltos en un solvente orgánico. El solvente orgánico puede ser utilizado para solubilizar fármacos hidrofóbicos en un medio acuoso y un buffer salino puede ser utilizado para solubilizar moléculas de fármacos hidrofílicos (2,15). El solvente es evaporado y se forma una película lipídica (2,15). La mezcla se coloca en la campana de flujo laminar para remover los residuos del solvente y se coloca una cubierta a la misma con el fin de evitar que entren contaminantes a la mezcla. Posteriormente pasa por el vórtex y dejar reposar la película para hidratarse (15).

En soluciones con altas concentraciones de fosfolípidos anfifílicos se forman espontáneamente bicapas lipídicas alrededor de un núcleo acuoso. Fármacos hidrofóbicos y agentes para imagenología permanecen en la bicapa lipídica,

mientras que los componentes hidrofílicos permanecen en el núcleo acuoso o en la capa intermedia de agua entre las bicapas lipídicas (15). La mezcla es agitada para producir LUVs seguido del proceso de sonicación para obtener SUVs (2,4–6,15). La formación de membrana por ultrasonificación consiste en la mezcla de lípidos derretidos, fármacos y polímeros dispersados uniformemente dentro de una solución acuosa; seguido de sonicación. Posteriormente las nanopartículas formadas son recolectadas para su estudio o medición después de haber pasado por la solidificación y filtración (Figura 6) (2). En algunas investigaciones los parámetros a los que sometió la solución durante la sonicación fueron modificados (temperatura de la solución, tiempo, duración del pulso, entre otros) y no específicos en magnitud para cada experimento. Ya que en algunos la duración de la sonicación fue prolongada hasta obtener, mediante la observación, una mezcla homogénea sin precipitaciones (4).

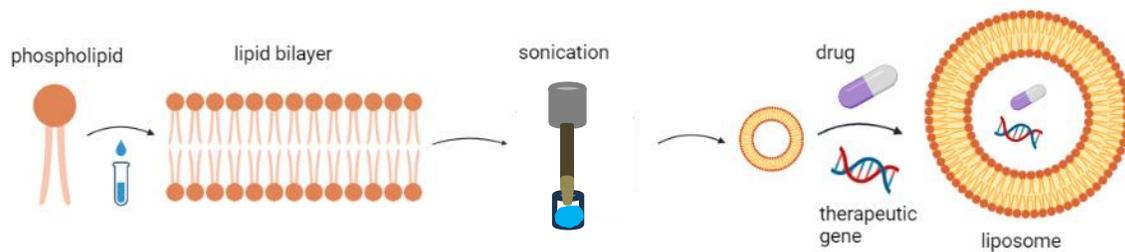


Figura 6. Método de preparación de liposomas por sonicación.

2.1.4 Aplicaciones de los liposomas

Los liposomas tienden a ser relativamente menos tóxicos para aplicaciones biológicas, incluida la administración de fármacos tóxicos y no tóxicos específicos del tejido para diversas enfermedades, como el cáncer (4).

Los fármacos poseen ciertas propiedades como poca solubilidad, determinada vida media y baja biodisponibilidad, estas propiedades los hacen indeseables para las formas de dosificación convencionales. Por lo tanto, el uso de liposomas como transportador de medicamentos o pequeñas moléculas como péptidos, genes y anticuerpos monoclonales lo convierten en un nuevo sistema de liberación de fármacos (2,3).

La propiedad del tamaño en los liposomas beneficia el transporte de agentes quimioterapéuticos como la doxorubicina que tiene un tiempo de vida media más corta que sin el transportador y se acumula fuera del sitio de interés produciendo toxicidad en múltiples órganos. Estos agentes son encapsulados dentro de las vesículas liposomales reduciendo la rapidez de su excreción renal y prolongando su tiempo de vida media en la circulación sanguínea (2).

El uso de los liposomas como nanotransportador de fármacos presenta ventajas por su estructura semejante a la membrana biológica, como la alta biocompatibilidad, protección al fármaco, mayor tiempo de vida media, reduce la toxicidad sistemática e incrementa la eficacia del medicamento administrado (2).

Los liposomas son utilizados como tratamiento oncológico y como diagnóstico de cáncer; incrementando el tratamiento en el sitio de interés y reduciendo la toxicidad fuera del sitio (3).

Por su aplicación terapéutica como nanotransportador, se encuentran distintas vías de administración (2):

- Parenteral: los liposomas se pueden administrar por vía intramuscular, intravenosa o intraperitoneal.
- Oral: esta vía es la más convencional e incrementa el cumplimiento del tratamiento por parte de los pacientes. Esta forma convencional de dosificación presenta limitaciones de primer momento como el metabolismo, de este modo la biodisponibilidad se ve reducida. Los liposomas incrementan la circulación linfática y mejoran la biodisponibilidad del fármaco encapsulado en ellos.
- Pulmonar: los liposomas también son nanotransportadores que pueden ayudar a las nebulizaciones. Los liposomas presentan ventajas como entrega de fármacos a nivel pulmonar por su alta estabilidad, pequeño tamaño de partícula y alta afinidad para controlar la entrega del fármaco en el tejido pulmonar. Su formulación para entrega a nivel pulmonar puede ser por inhaladores como inhaladores de polvo seco, inhaladores presurizados de dosis medidas y nebulizadores.
- Transdermal: en los liposomas, los fosfolípidos tienen un rol eficiente para liberar el medicamento a nivel vascular. Los lípidos mejoran la penetración y difusión del medicamento a través de la piel evitando el proceso del metabolismo. Esto provee

una liberación sostenida de la dosificación del medicamento que tiene poco tiempo de vida media y pobre solubilidad, mejorando la biodisponibilidad de este medicamento.

- Por mucosa: los lípidos usados en la formulación de liposomas no son tóxicos e irritantes, los cuales tienen una afinidad a la membrana de mucosa. Los liposomas proveen una liberación prolongada del fármaco vía vaginal y nasal, esta vía incrementa la retención en el sitio de acción.

2.2 Homogeneizador ultrasónico

2.2.1 Física del ultrasonido

El sonido es energía mecánica transmitida por ondas de presión en un medio de propagación, lo que significa que el sonido existe en forma de partículas que se mueven en un medio (16–18). Las partículas de una onda mecánica toman una forma de onda transversal o longitudinal, moviéndose en el medio (Figura 7). En una onda transversa, el desplazamiento es perpendicular a la dirección de la propagación de la onda. En una onda longitudinal, el desplazamiento es paralelo a la propagación de la onda (16,17,19).

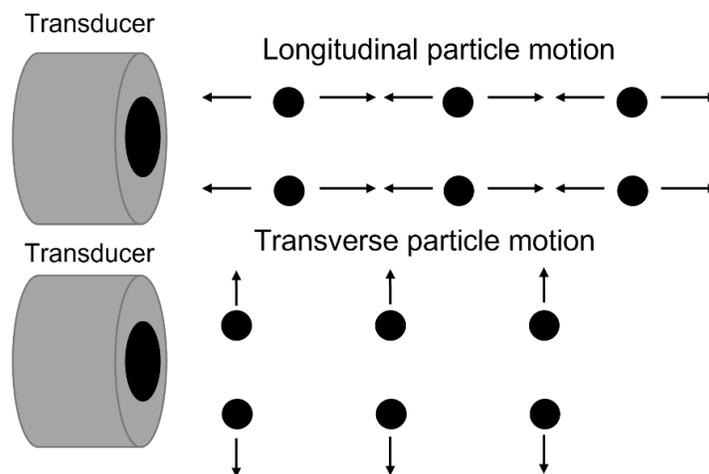


Figura 7. Movimiento ondulatorio de partículas

Las ondas de sonido se mueven longitudinalmente y producen zonas de alta presión y baja presión. En las áreas de alta presión llamada compresión, las ondas de

sonido son comprimidas juntas y en las áreas de baja presión, nombrada rarefacción, las ondas de sonido son separadas (16). Una onda de sonido a una sola frecuencia es comúnmente visualizada como una onda sinusoidal provocando variaciones alternas de presión. Las ondas de sonido son definidas por variables acústicas y caracterizadas por parámetros acústicos (16).

El ultrasonido son ondas mecánicas con frecuencias mayores a 20 kHz. Este puede ser clasificado en alta intensidad (HIU (ing): high intensity ultrasound) que va de 10 a 1000 W/cm², y de baja intensidad que son menores a 1 W/cm² (20).

La presión acústica es definida como la concentración de fuerza por unidad de área, durante la fase de compresión de la onda de sonido. La presión incrementa; mientras que, durante la fase de rarefacción, la presión se reduce. La presión acústica (p) es expresada en pascales [Pa] (19). De esta deriva la amplitud de presión, que es definida como el aumento máximo de la presión en relación con las condiciones ambientales en ausencia de una onda sonora. Es utilizado para especificar la intensidad acústica. La intensidad en un área determinada de un haz de ultrasonido esta dado por la ecuación 1 (21).

$$I = \frac{p^2}{2\rho v} \quad \rho: \text{densidad del medio}, v: \text{velocidad del sonido} \quad \text{Ecuación 1}$$

Así mismo, en la compresión la densidad incrementa, mientras que durante la rarefacción la densidad disminuye (16,19).

$$\rho = \frac{m}{V} \quad m: \text{masa}, V: \text{volumen} \quad \text{Ecuación 2}$$

Con las vibraciones de las partículas en el medio, una parte de la energía de la onda se pierde manifestándose como calor (19).

La producción de sonido requiere una fuente de vibración u oscilación. En un sistema de ultrasonido, la fuente de sonido es el cristal piezoeléctrico. El efecto piezoeléctrico permite a estos cristales vibrar cuando el voltaje eléctrico es aplicado y subsecuentemente crea ondas de sonido. Inversamente, los cristales piezoeléctricos pueden convertir ondas de sonido en energía eléctrica (16).

Las ondas de ultrasonido son conocidas como ondas mecánicas, ya que causan un desplazamiento de su posición normal en un medio elástico, provocando la

oscilación de partículas. El medio posee elasticidad e inercia. La elasticidad es la propiedad de un material para mantener su estado original después de la aplicación de una tensión que causa cierto grado de deformidad transitoria (22).

El periodo (T) es el tiempo que toman las partículas en completar un solo ciclo. En el ultrasonido, el periodo es el tiempo desde un pico, incluyendo un valle, al siguiente pico (16,19). La frecuencia (f) es el número de eventos que ocurren en un tiempo determinado. En el ultrasonido, la frecuencia de una onda es el número de ciclos que ocurren en un segundo (16–19) (Figura 8). La relación periodo y frecuencia es inversamente proporcional (Ecuación 3) (16,19).

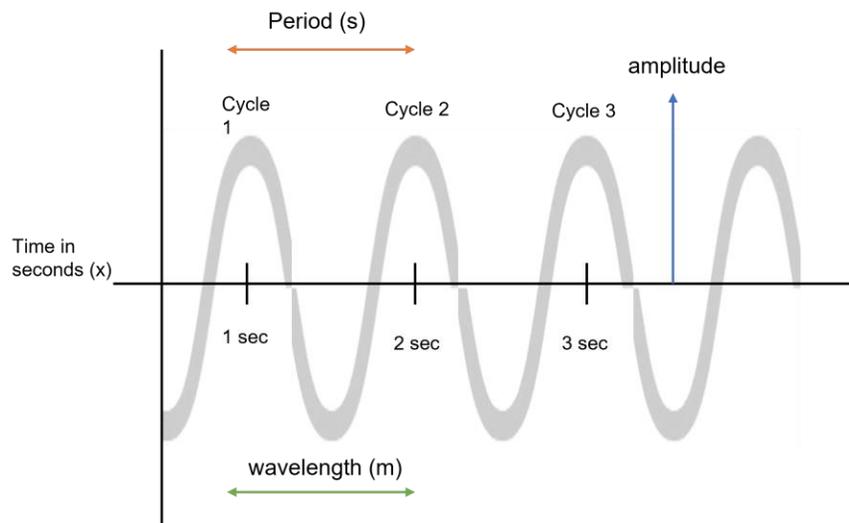


Figura 8. Onda de sonido y sus variables acústicas.

$$f = \frac{1}{T} \quad \text{Ecuación 3}$$

Las ondas de sonido con frecuencias por encima de los 20 kHz son llamadas ultrasónicas (16,18). La distancia entre un pico y el siguiente representa un ciclo, esta es la distancia entre dos puntos la cual representa la longitud de onda (λ)(16,17,19) (Figura 8). El producto de la longitud de onda por la frecuencia da como resultado la velocidad del sonido en un medio, también nombrada velocidad de propagación (Ecuación 4) (16,17). El sonido viaja más rápido en sólidos, que en líquidos o gases (16).

$$v = f\lambda \quad \text{Ecuación 4}$$

Esta ecuación relaciona la velocidad, frecuencia y longitud de onda. Donde a mayor frecuencia menor longitud de onda, y a menor frecuencia mayor longitud de onda (16).

La impedancia acústica es el producto de la presión acústica y la velocidad de partícula, y es determinante para cada material utilizado como medio de propagación (21).

$$z = \rho v$$

Ecuación 5

La amplitud, potencia e intensidad describen la magnitud de la fuerza de la onda de sonido (16). La amplitud es el tamaño de la onda, es decir, la diferencia entre el valor máximo y el valor promedio de la onda (16,17,19). La potencia (P) es la energía [J] generada por unidad de tiempo y es expresado en watts [W] (16,18). La intensidad acústica (I) es la concentración de energía en un área transversal (A) de un haz de sonido (Ecuación 6) (16,18).

$$I = \frac{P}{A}$$

Ecuación 6

La intensidad está directamente relacionada con la potencia, y ambas están relacionadas con el cuadrado de la amplitud de la onda (Ecuación 7 y 8) (16,18).

$$\text{intensidad} \sim \text{amplitud}^2$$

Ecuación 7

$$\text{potencia} \sim \text{amplitud}^2$$

Ecuación 8

2.2.2 Transductor

El transductor del ultrasonido convierte energía eléctrica (voltaje o corriente) en energía acústica e inversamente (16,23,24). Cuando el transductor es usado para generar sonido es llamado proyector, transmisor o fuente. Cuando este es usado para detectar sonido es nombrado receptor. Además, cuando el receptor se sumerge en el agua se refiere como hidrófono (23).

La caracterización de un transductor sumergido en agua es completada cuando se ha medido su rendimiento como proyector y receptor de sonido (cuando se ha

calibrado) (23). El ancho de banda es el rango de frecuencia sobre el cual el proyector puede funcionar efectivamente (23).

Cada transductor emite un pulso (colección de ciclos que viajan juntos) con determinada duración. La duración del pulso es el tiempo desde el inicio de un pulso hasta el final de este, o también conocido como tiempo de transmisión. El tiempo entre el final de un pulso y el inicio del siguiente pulso se conoce como tiempo de reposo (16).

La duración del pulso ultrasónico transmitido en el medio (PD o PW (ing): duration pulse o width pulse) también está dada por el número de ciclos (N_c) multiplicado por el periodo de cada ciclo (Ecuación 9)(19,21).

$$PD = N_c * T \text{ ó } PD = N_c \left(\frac{1}{f} \right) \quad \text{Ecuación 9}$$

El periodo de repetición de pulso (PRP (ing): pulse repetition period) es definido como el tiempo de inicio de un pulso al inicio del siguiente pulso (Figura 9). Éste incluye un tiempo de transmisión más un tiempo de reposo. La frecuencia de repetición de pulso (PRF (ing): pulse repetition frequency) es el número de pulsos en un segundo. Todos los pulsos son de la misma duración, solo el tiempo de reposo cambia (16). En el transductor, la energía acústica se convierte en energía eléctrica durante el tiempo de reposo (16).

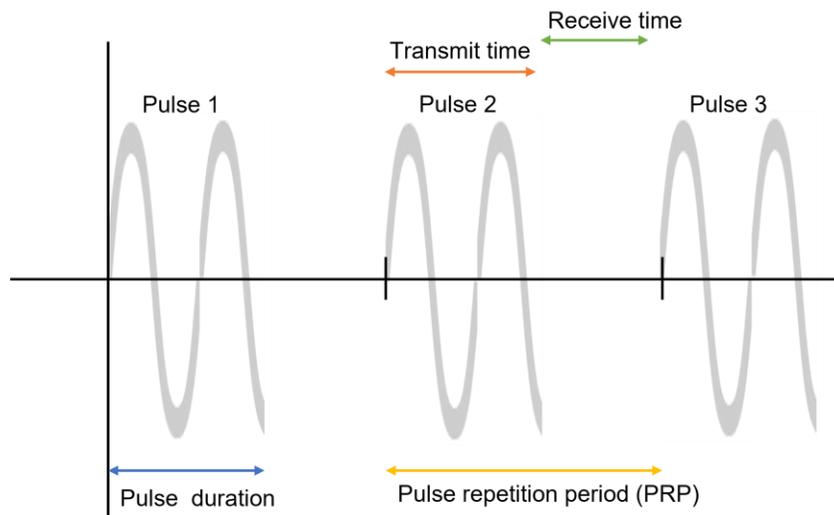


Figura 9. Parámetros de sonido pulsado.

La duración del pulso indica el tiempo que la fuente está realizando trabajo, sin embargo, se desarrolló una expresión para representar el porcentaje del tiempo de trabajo que realmente está realizando. El ciclo de trabajo (DF (ing): duty factor) es equivalente al tiempo de energía transmitida dividido en el tiempo en que el proceso es repetido (Ecuación 10)(19,21).

$$DF = \frac{PD}{PRP}$$

Ecuación 10

En particular el sonificador utiliza un transductor de cristal oscilante estándar, el cual es un disco piezoeléctrico vibrante encapsulado y delgado que genera una señal sinusoidal precisa (25). Estos transductores se utilizan para la medición de presión ultrasónica (24).

2.2.3 Bioefectos

El término bioefecto hace referencia a un cambio biológico no deseado, en el ultrasonido diagnóstico, el cambio es producido en los tejidos interactuando a través de mecanismos físicos. Existen dos tipos de bioefectos, el térmico y mecánico (19,21,26).

De la absorción de ondas ultrasónicas resulta la conversión de energía ultrasónica en calor. Este aumento de temperatura depende de varios factores, incluidas las propiedades del tejido (como el coeficiente de absorción, densidad y perfusión) y los parámetros de exposición al ultrasonido (por ejemplo, frecuencia, amplitud de presión, duración del pulso y factor duty) (26).

La fuerza de radiación, el par de radiación, el flujo acústico, las ondas de choque y la cavitación son mecanismos no térmicos (26,27).

2.2.3.1 Cavitación acústica

Este fenómeno describe la interacción de un campo sonoro con una burbuja de gas, formando y oscilando a la misma, requiriendo la presencia de un cuerpo o núcleo de gas estabilizado (26,27). El radio de equilibrio de una burbuja oscila alrededor de este cuando se expone a un campo acústico (26). Existen varios modelos teóricos para predecir el radio de una burbuja en función del tiempo de exposición, el máximo

tamaño de una burbuja en un campo acústico se produce cuando se expone a su frecuencia de resonancia (26).

2.2.3.1.1 Cavitación no inercial o estable

La cavitación no inercial ocurre cuando una burbuja se expone a un campo acústico y sufre oscilaciones repetitivas alrededor de su radio de equilibrio (26,27). La expansión máxima de una cavidad normalmente no excede el doble de su radio de equilibrio. La respuesta de la burbuja no es lineal y depende de variables como la amplitud de la presión acústica, frecuencia de exposición y el tamaño de la burbuja. Las oscilaciones de las burbujas se pueden amortiguar mediante disipación viscosa, radiación sonora y conducción térmica (26).

El término difusión rectificadora describe el lento crecimiento de una burbuja oscilante, esto se debe al flujo neto de gas hacia la burbuja durante varios ciclos acústicos. Las oscilaciones de las burbujas impulsadas acústicamente generan calor, microturbulencias de flujo cercano y fuerzas de cizallamiento (26,27).

Las interacciones entre burbujas y partículas en un campo sonoro pueden provocar la coalescencia de las burbujas o la atracción de partículas hacia una burbuja oscilante (26).

2.2.3.1.2 Cavitación inercial o transitoria

La cavitación inercial se conoce por la formación y el colapso de microburbujas (19,27). Con una amplitud de exposición determinada, una burbuja puede expandirse más que el doble de su radio inicial y luego colapsar rápidamente hasta una pequeña fracción de su radio inicial. El movimiento de la burbuja no es lineal y el colapso está repercutido por la inercia del medio líquido circundante (26).

Las microburbujas pueden ser completamente fragmentadas o destruidas, lo que conduce a la colección de microburbujas más pequeñas. La implosión está relacionada con el pico de la presión en la fase de rarefacción, durante ésta la presión exterior es menor causando que la burbuja se expanda (Figura 10). Mientras, durante la compresión incrementa la presión externa causando la

contracción de la burbuja, además, incrementando la presión negativa durante la rarefacción propicia un aumento de expansión gradualmente (19).

La cavitación inercial es causada cuando un líquido está sujeto a mayores cantidades de presión donde las burbujas pueden implosionar proporcionando ondas de choque de alta intensidad.

Considerando la nucleación homogénea en materiales líquidos, la presión p exterior a una burbuja de cavitación dada de radio R depende directamente de la presión interior p_B (28).

$$p_B - p = \frac{2\gamma}{R} \text{ donde } \gamma: \text{tensión superficial} \quad \text{Ecuación 11}$$

El tamaño de la burbuja crece si la presión exterior es menor. Incluso para materiales con baja viscosidad la presión exterior debería ser considerablemente baja para que la cavitación sea nucleada y formada, resultando una nucleación heterogénea de burbujas (28). En condiciones de exposición adecuadas, un solo pulso de ultrasonido puede hacer que una burbuja se expanda rápidamente y colapse violentamente. El colapso se ve condicionado por la frecuencia acústica, amplitud de presión y el radio inicial de la burbuja (26).

La presión acústica a la que se produce la transición de no inercial a inercial, debido al aumento de la amplitud de presión acústica, se denomina umbral de cavitación inercial (26). Otro parámetro para determinar la probabilidad de cavitación es el índice mecánico (IM), el cual se basa en el pico de la presión de rarefacción dividido por la raíz cuadrada de la frecuencia acústica (27) Las burbujas que sufren cavitación inercial cerca de límites sólidos pueden colapsar asimétricamente, el cual puede dar lugar a la formación de microfluidos de alta velocidad (26).

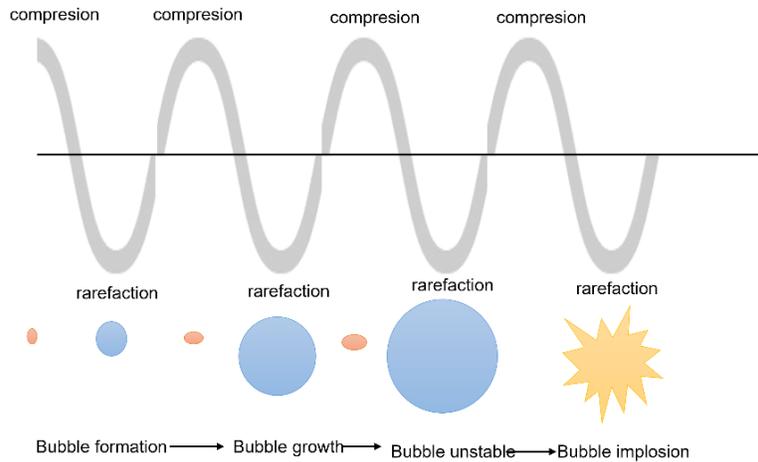


Figura 10. Cavitación ultrasónica

2.2.3.2 Fuerzas de radiación

En un campo acústico la fuerza de radiación actúa sobre un objeto. Esta fuerza resulta de la transferencia de impulso desde el campo sonoro al objeto. La magnitud de la fuerza de radiación depende de las características tanto del campo sonoro como del objeto en el campo (26,27).

Para el caso de una onda plana que normalmente incide sobre un objeto perfectamente absorbente, la fuerza de radiación se describe por la potencia acústica dividida por la velocidad del sonido en el medio de propagación (Ecuación 11). Sin embargo, si el objeto refleja, la fuerza de radiación es el doble que la de un objeto que absorbe (26).

$$Fuerza\ de\ radiación = \frac{P}{v}$$

Ecuación 12

La fuerza de la radiación es el mecanismo subyacente de fenómenos como el torque de radiación, y los efectos de la transmisión acústica (26,27). El par de radiación puede provocar la rotación o el giro de partículas simétricas (26).

La transmisión acústica se produce cuando la propagación del campo acústico en un fluido provoca un aumento en el flujo del fluido (26,27).

La velocidad de la corriente depende de factores que incluyen el coeficiente de absorción, velocidad del sonido, viscosidad cinemática, intensidad, geometría del haz y la propagación no lineal (26). La irradiación ultrasónica conduce a producir presión acústica y consecuentemente microturbulencia acústica (28).

2.2.4 Sonificador

El dispositivo está basado en el uso de ondas ultrasónicas las cuales pueden atravesar células y membranas celulares. Puede haber de dos tipos de sonificador: a) de sonda y b) de baño. Se utiliza para el aislamiento de orgánulos de células vegetales, reducir el tamaño de partícula de nuevos transportadores de entrega de fármacos como liposomas, etosomas, transferosomas, y nanopartículas lipídicas; además para la preparación y formación de nuevos acarreadores de entrega de fármacos (29).

Existen dos métodos para la sonicación, descritos a continuación.

- 1) Sonicación de baño: las vesículas multilamelares son convertidas en vesículas unilamelares más pequeñas. La irradiación ultrasónica es provista a la muestra para reducir el tamaño. El nivel del agua en el sonificador de baño debe mantenerse constante y el dispositivo debe estar cubierto correctamente con la tapa durante el uso de disolventes orgánicos. Para usar este sonificador no se requiere protección auditiva (1, 6). El tiempo de sonicación con este dispositivo varía de lo a 10 a 20 min, generalmente en este método se producirán liposomas largos como MLVs con una amplia distribución del tamaño de partícula (varía de cientos de nanómetros a cientos de micrómetros) (6,15).
- 2) Sonicación de sonda: este dispositivo es usado para una dispersión que requiere alta energía en volúmenes pequeños con alta concentración de lípidos o en consistencia viscosa. La sonicación de sonda provee alta energía a la solución que conduce a la producción de calor causando una reducción en su tamaño de partícula (2,6,15). La punta del sonificador puede liberar titanio dentro de la solución; el titanio puede ser removido por centrifugación antes de su uso. La sonicación de MLVs se logra tomando la solución en el tubo de ensayo y la sonda de 5 a 10 minutos (2,15). La dispersión resultante se centrifuga y las vesículas se sedimentan según su tamaño (2). La sonicación de sonda convierte LUVs y MLVs en SUVs mucho más rápido que por filtración (15).

2.2.4.1 OMNI SONIC RUPTOR 400

El dispositivo OMNI SONIC RUPTOR 400 (Figura 11) es un sistema homogeneizador ultrasónico o comúnmente llamado sonicador por sonda, que cuenta con una unidad de control y el transductor unido a una punta de titanio. La punta de titanio que se utilizó tiene un diámetro de 3.5 mm y una longitud de 25.6 cm, provee alta intensidad acústica y el límite de porcentaje de potencia es del 50 % (30).



Figura 11. OMNI SONIC RUPTOR 400 (30)

2.2.5 Nanoemulsificación ultrasónica

En la interacción de lípidos en un medio acuoso mediante ultrasonido participa la nanoemulsificación ultrasónica.

El proceso de nanoemulsión es dividida en dos principales categorías: de alta y baja energía de emulsificación (20,28). Los dispositivos homogeneizadores ultrasónicos son considerados dispositivos de emulsificación de alta energía (HIU (ing): high intensity ultrasound) por medio de la emulsificación ultrasónica (UE (ing): ultrasonic emulsification) (20,28). Emulsiones preparadas por radiaciones ultrasónicas son un método efectivo para disminuir el tamaño del diámetro (MDDS (ing): mean droplet diameter size) (28). La frecuencia, tiempo de exposición y potencia son los parámetros que se pueden modificar de la emulsificación ultrasónica (28).

Las ondas del ultrasonido pasan a través de un medio acuoso creando compresiones y tensiones de atracción (rarefacción), conduciendo a que las microburbujas de aire se contraigan y se expandan respectivamente (28). Repentinamente las burbujas colapsan resultando un incremento en la potencia de las ondas, lo que conocemos como cavitación (20,28).

El colapso de burbujas de aire puede facilitar la liberación de radicales libres propiciando reacciones químicas. Las oscilaciones y el colapso de burbujas por la cavitación acústica podrían generar varios efectos físicos como la salida rápida de líquidos, calor, aumento de presión acústica, ondas de choque, turbulencia y fuerzas de cizallamiento (20,28). Los efectos físicos del ultrasonido inducidos por cavitación acústica pueden aumentar la ruptura de gotas de aceite, facilitando la formación de emulsiones estables oil-in-water (O/W) con pequeños tamaños de la burbuja (20). Las emulsiones por HIU son preparadas por dos principales pasos, primeramente, de la fase dispersa se forman largas burbujas, posteriormente las fuerzas de cizallamiento y la cavitación acústica generada en el medio pueden romper gradualmente las burbujas largas (20) (Diagrama 2).

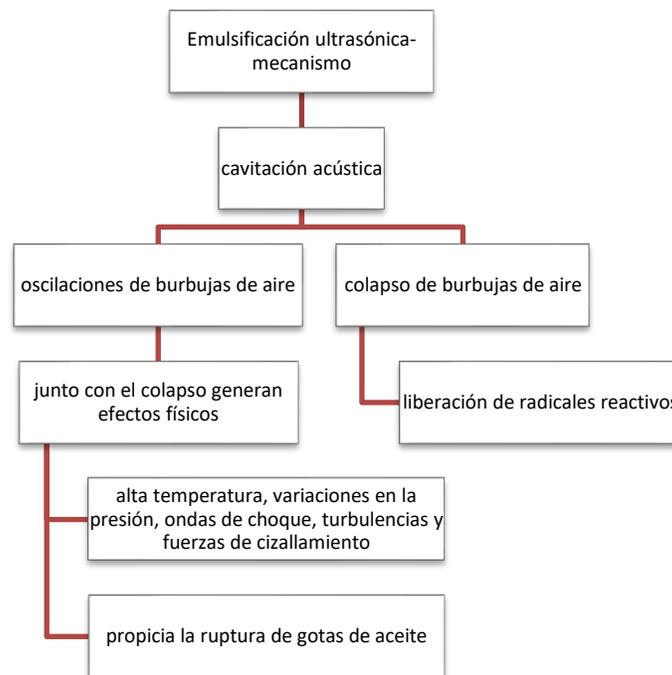


Diagrama 2. Resumen de la nanoemulsificación ultrasónica

Durante la ultrasonificación, el material líquido bajo la oscilación, donde se somete a varios cambios de fuerza y presión, el líquido se fractura y las cavidades o burbujas son creadas. Después las burbujas de cavitación son nucleadas, estas crecen durante la rarefacción (ciclos de baja presión), mientras que durante la compresión se ven aglomeradas y colapsan generando microflujos. Los microflujos tienen la capacidad de producir microturbulencias locales resultando la homogeneización de líquidos multifase o emulsiones (28).

Muchos factores pueden influenciar la eficiencia de cavitación, como la frecuencia del ultrasonido, potencia, temperatura y tensión superficial o viscosidad del medio. Es decir, si la frecuencia incrementa, la potencia necesita ser mayor para mantener una cantidad similar de actividad cavitacional; el ultrasonido a 20 kHz ha mostrado ser útil para generar emulsiones estables a comparación del uso de altas frecuencias (MHz). Además, el incremento de la potencia de sonicación resulta en un incremento de efectos sonoquímicos; al aumento de potencia acústica el tamaño y la población de las burbujas aumenta, lo que podría incrementar fuerzas de cizallamiento generadas en el colapso de burbujas, facilitando la ruptura de gotas de aceite; estos cambios reducen el tamaño de las gotas de aceite, de este modo mejoran la estabilidad de emulsión (20).

2.2.6 Parámetros de sonicación

La frecuencia, amplitud y tiempo de sonicación son los parámetros más determinantes con respecto a la radiación de ondas ultrasónicas a través de una emulsión (28).

- La variación de la frecuencia afecta directamente en el ciclo de presión de cavitación. El aumento de frecuencia resulta en cambios severos de presión y trae altas turbulencias en el medio. Este fenómeno es llamado microturbulencia acústica que causa burbujas continuamente y eclipsa la cavitación acústica a altos niveles de frecuencia y amplitud. El aumento de frecuencia resulta en burbujas de cavitación más pequeñas con una distribución de tamaño más uniforme. Simulaciones y cálculos teóricos

indican que el fenómeno de cavitación incrementa durante un rango específico de frecuencia, dependiendo la emulsión usada (28).

- La potencia emitida al medio es efectiva sobre la presión y debe ser lo suficientemente dominante para proporcionar la energía requerida para la cavitación. Un incremento excesivo de potencia puede obstaculizar la dinámica de las burbujas como impulsar a las burbujas de cavitación a crecer de manera anormal durante la expansión en los semiciclos y puede conducir al debilitamiento de formación de cavitación. Existe una correlación entre la potencia y la frecuencia para balancear el crecimiento de la burbuja. La potencia y frecuencia por encima de los límites puede conducir a efectos no lineales en el crecimiento de la burbuja (28).
- El efecto de la amplitud de vibración es casi el mismo que el de la potencia. De manera que un incremento en la amplitud resulta en un incremento en la potencia y viceversa. Las nanoemulsiones de calidad requieren fuerzas de corte mecánicas severas, esto no sucede a menos que la fluctuación pico-pico (μ_{pp}) de aproximadamente 75-100 μm . En general, los transductores ultrasónicos no tienen una μ_{pp} mayor a 25 μm , por lo tanto, es equipado con un amplificador de ganancia, intensificando la amplitud de vibración y ayudar a que la energía ultrasónica de entrada llegue a todo el medio de manera uniforme. Investigadores han encontrado que si la amplitud de la vibración de la punta del transductor incrementa entonces su tamaño de partícula disminuye considerablemente (28).
- Investigaciones han mostrado que extender el tiempo de sonicación conduce a reducir la polidispersidad de las partículas. Sin embargo, un largo tiempo de sonicación puede conducir a la unión de gotas incrustadas en la bicapa (28).

3. Antecedentes

3.1 efecto de parámetros en síntesis de liposomas para optimizar tamaño y distribución.

D.J Woodbury et al. (2006) (31) reportaron la distribución de tamaño de los liposomas en función del tiempo de sonicación usando tres técnicas diferentes para su caracterización: DLS, microscopía electrónica de transmisión (TEM (ing): *transmission electron microscopy*) y la nistatina/ergosterol. Prepararon liposomas por sonicación, para después pasar a 1 o 2 ciclos de congelación, descongelación y sonicación nuevamente. Utilizaron un sonicador de baño de 80 kHz, modulando la salida del voltaje mediante un transformador, se usó un hidrófono para medir la intensidad del ultrasonido, las muestras fueron expuestas aproximadamente a 0.7 kW/m². Las partículas fuera del rango de 20 a 2000 nm tuvieron poca contribución (< 1 %) a la población total de liposomas. La medida de tendencia central fue la moda, y la polidispersidad como medida de desviación estándar. Los diámetros obtenidos fueron divididos en una población alfa (de orden micrométrico) y beta (de orden nanométrico). Demostraron que los liposomas sonicados generalmente tienen una distribución de tamaño bimodal (Figura 12). Sin embargo, con un mayor tiempo de sonicación, hay una disminución tanto en el diámetro del liposoma como en el índice de polidispersidad, con ello la población alfa se reducía y confirmaron la bimodalidad de los liposomas sonicados mediante técnicas independientes. Sugieren investigar el efecto sobre las fuerzas de cizallamiento y el tamaño del liposoma cambiando la intensidad del ultrasonido o frecuencia, para una producción exitosa con el tamaño deseado ya que resultaría útil en aplicaciones biomédicas. Investigaron cuales son los mecanismos involucrados en la reducción del tamaño de los liposomas por sonicación, como el mecanismo de la fragmentación uniforme (BPF (ing): *bilayer phospholipid fragments*) el cual describe mejor los fenómenos de formación de liposomas por sonicación de alta energía. Sin embargo, la bimodalidad mostrada sugiere que un mecanismo diferente a la fragmentación uniforme está involucrado cuando los liposomas se exponen a la sonicación, como las fuerzas de cavitación, la microturbulencia, las fuerzas de cizallamiento y la teoría coloidal

impulsando a la deformación de su estructura en tubos alargados que posteriormente se separará en pequeñas esferas uniformes. Además, proponen que las fuerzas de radiación son el primer paso para la formación de liposomas del orden nanométrico, seguido de la microturbulencia y fuerzas de corte (Figura 13).

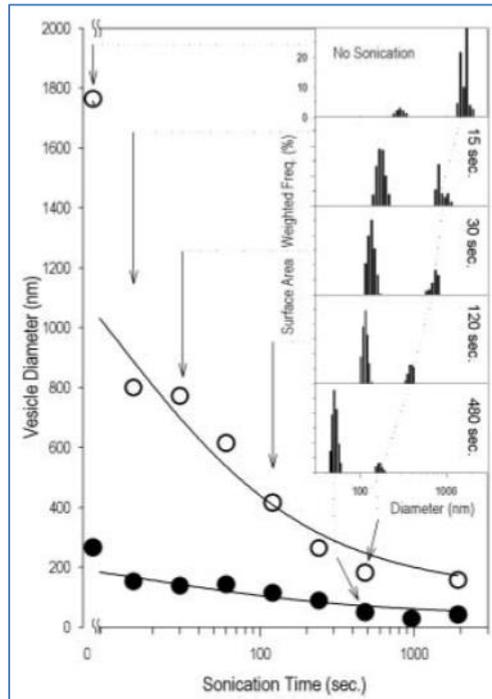


Figura 12. Gráfica de tendencia tiempo de sonicación-tamaño del liposoma (31).

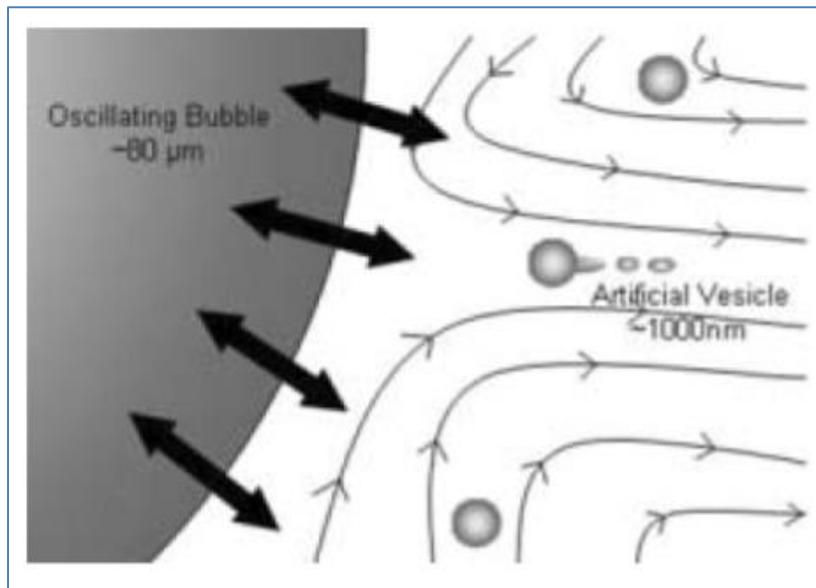


Figura 13. Liposoma entrando en el campo de corte de una burbuja en cavitación (31).

Lapinski et al (2007) (32) investigaron la caracterización física y óptica de liposomas formados por extrusión y sonicación mediante el método de hidratación de la membrana lipídica usando el fosfolípido DOPC, con y sin colesterol. Midieron la morfología física de los liposomas mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) y dispersión de luz dinámica (DLS). El objetivo por evaluar fue el diámetro medio y la distribución de tamaño de los liposomas. Resultando que, a pesar de las diferencias aparentes en el tamaño promedio y la distribución del tamaño, ambos métodos de preparación produjeron liposomas con características similares a escala molecular. Por el método de extrusión, las muestras se extruyeron a través de dos filtros de membrana de policarbonato de 400 nm de diámetro usando una miniextrusora; la suspensión de vesículas preextruidas se extruyó 11 veces a través de dos membranas de policarbonato con un diámetro de poro de 100 nm a temperatura ambiente. Mientras que, sonicaron las muestras por 20 min usando un sonicador de baño. Después, las muestras pasaron por la técnica DLS. Mostraron que los liposomas formados por ambos métodos poseen una estructura unilamelar. Los tamaños finales de las vesículas sonicadas fueron más pequeños que los de la extrusión mostrando una influencia significativa del colesterol en su tamaño por sonicación (Figura 14). También mostraron que ambos métodos resultaron en una población bimodal más pronunciada con colesterol. Por lo que el diámetro y tamaño de los liposomas dependen de la manera en que se preparan, y la organización a escala molecular de las bicapas está determinada por las interacciones entre las especies constituyentes no de la manera en que se forma la bicapa (32).

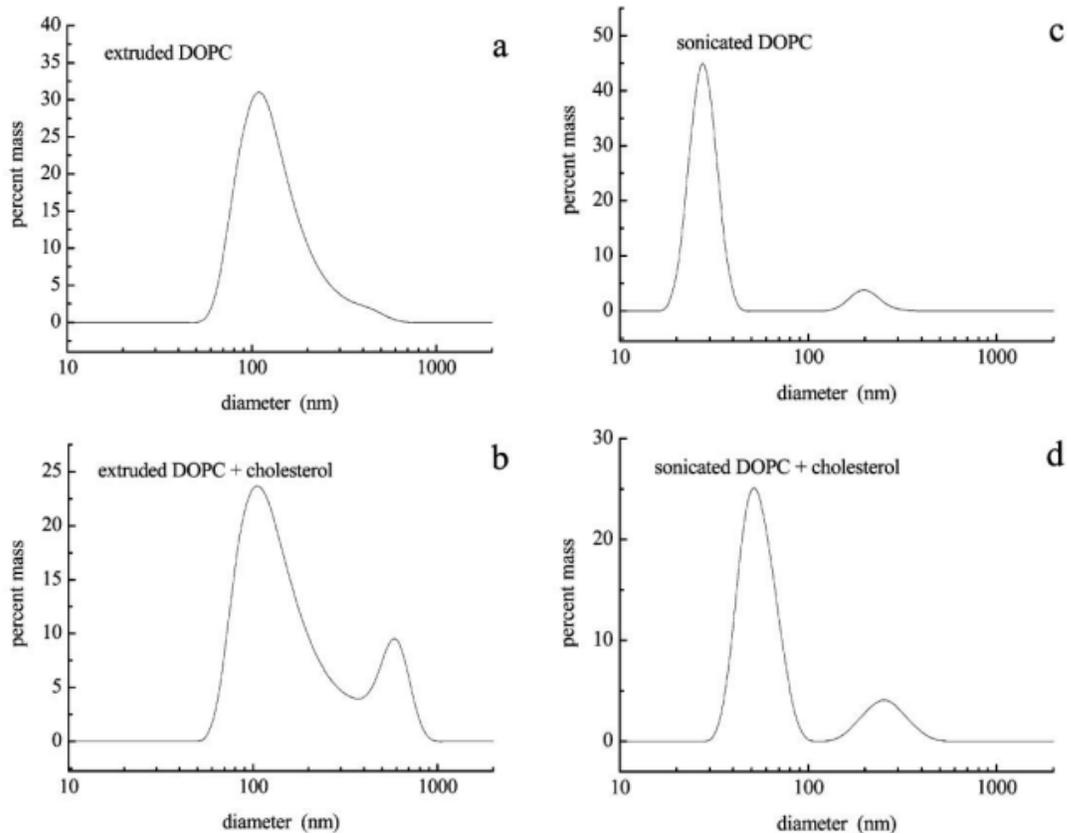


Figura 14. Distribuciones de tamaño obtenidas a partir de DLS, que muestran los diámetros de las vesículas en función de su preparación y composición; a) vesículas DOPC extruidas sin colesterol, b) vesículas extruidas DOPC y colesterol, c) vesículas DOPC sonicadas y d) vesículas sonicadas DOPC y colesterol. Gráficas obtenidas de (32).

T. Yamaguchi et al. (2009) (33) prepararon liposomas por el método de extrusión (10 veces) de 300 nm aproximadamente de diámetro. Posteriormente fueron sonicados (sonicador de baño) a distintas frecuencias y potencias. La potencia ultrasónica se calculó por calorimetría y la distribución de tamaño se obtuvo por DLS. Los resultados mostraron que después de someterse a sonicación se observa una población bimodal, al aumentar el tiempo de sonicación la distribución de tamaño se vuelve más amplia; sin embargo, el tamaño de la partícula disminuye. Con respecto a la potencia, si esta aumenta el tamaño del liposoma se reduce rápidamente. Además, el ultrasonido de baja frecuencia es más eficiente para reducir el tamaño de liposomas. También, sugieren que el tamaño final del liposoma después de la sonicación es determinado por la estabilidad del liposoma mismo, y no por el proceso de formación (33).

R. Silva et al. (2010) (34) investigaron los efectos del ultrasonido como la potencia de entrada, la distancia desde la punta del ultrasonido hasta la base del recipiente y el tiempo de tratamiento sobre la formación de liposomas. Tuvieron como objetivo controlar experimentalmente el conjunto de parámetros para diseñar las características de los liposomas. Estas condiciones se relacionaron con el tamaño, el índice de polidispersidad (PDI) y la carga superficial de los liposomas. Utilizaron DPPC con un sonicador de 20 kHz con una micropunta de 3 mm de diámetro, la potencia se controló como amplitud porcentual (23%, 30% y 40%). La muestra se caracterizó mediante calorimetría de la cual se calculó la energía necesaria para elevar la temperatura, esta energía calorífica mantiene una relación con la intensidad acústica (Ecuación 13). Para la preparación de los liposomas utilizaron el método de hidratación de película lipídica, el tiempo de sonicación fue de 90s a las potencias ya mencionadas, con un ciclo de trabajo del 80% por 3 min, ésta se repitió hasta alcanzar 21 min. Con la ecuación de Marczak (Ecuación 14) obtuvieron el valor de la velocidad del sonido en agua y posteriormente determinaron la longitud de onda. Las muestras pasaron a ser analizadas por la técnica DLS resultando que a mayor tiempo de sonicación se obtiene un menor tamaño de partícula, así como al incrementar la potencia. Además, al 23 % de potencia, tiempo constante y menor distancia entre la punta y la base del recipiente reduce el índice de polidispersidad (Figura 15). Hacen mención que la producción de radicales libres hidroxilos contribuye a la formación de vesículas, debido a que los ultrasonidos pueden promover la hidrólisis y la oxidación de fosfolípidos, a través de los radicales libres producidos en el colapso de las burbujas de cavitación, además las altas temperaturas aceleran la hidrólisis (34).

$$I = \frac{E}{\Delta t * \pi * r^2}$$

donde Δt : tiempo de activación del ultrasonido, πr^2 : es el área de la micro punta Ecuación 13

$$c = 1.402385x10^{-3} + 5.038813T - 5.799136x10^{-2}T + 3.287156x10^{-4}T^3 - 1.398845x10^{-6}T^4 + 2.787860x10^{-9}T^5$$

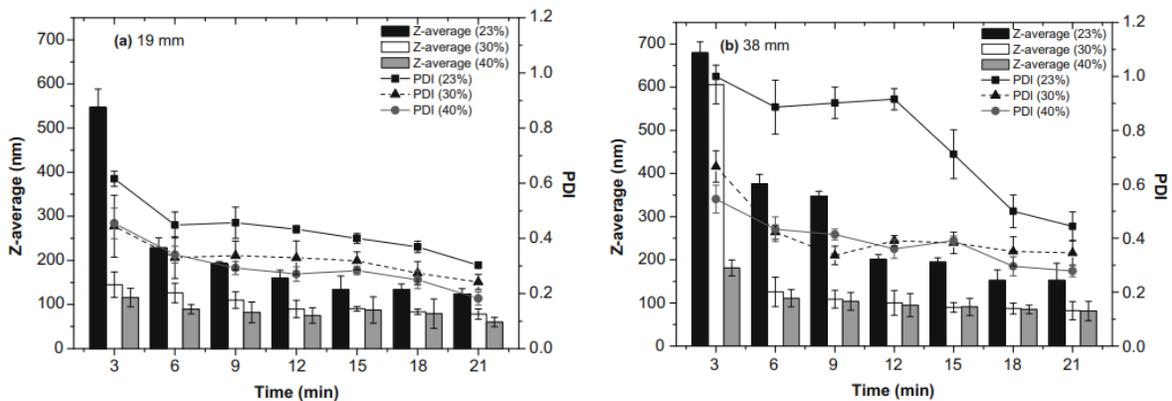


Figura 15. Efecto de la sonicación en tamaños de liposomas usando a) 19 mm de profundidad y b) 38 mm de profundidad, aplicando diferentes amplitudes (23%, 30%, 40%) después de 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 min, a 50°C y pH 7.4. Gráficas tomadas de (34).

Dina Christin Ayuning Putri et al. (2017) (35) buscaron obtener el tamaño del liposoma menor a 100 nm y su distribución de tamaño (<0.3), a través de un diseño factorial con 2 factores y 3 niveles (ANOVA de dos vías) que involucran la temperatura y el tiempo de sonicación en la preparación de liposomas. La caracterización de las partículas se obtuvo mediante el analizador de tamaño de partícula (PSA (ing): particle size analyzer). Los resultados mostraron que tanto la temperatura como el tiempo de sonicación afectan el tamaño de los liposomas producidos (el tamaño se reduce aumentando estos dos valores) pero no en su interacción. Sin embargo, la temperatura, tiempo de sonicación y su interacción no afectan el índice de polidispersidad de los liposomas. Proponen que a una temperatura de 60°C y 30 min de sonicación se pueden producir liposomas con un tamaño inferior a 100 nm. Sugieren que la energía térmica (por encima de la temperatura de transición de fase) puede aumentar la fluidez de las moléculas de los lípidos y las ondas ultrasónicas pueden provocar cambios en su acomodo, además, si el índice de polidispersidad supera lo estimado se debiera a las ondas ultrasónicas aplicadas a la dispersión que no se distribuyeron uniformemente en la muestra (35).

Tabla 2. Artículos científicos donde se evaluó el tamaño o distribución de este a partir de parámetros de sonicación.

Resumen			
artículo	parámetro	tamaño	PDI
Lapinsky et al. (2007)	-Con y sin colesterol -extrusión y sonicación	Características similares	Población bimodal más pronunciada con colesterol
R. Silva et al. (2010)	-potencia -tiempo -distancia	A mayor potencia menor tamaño. A mayor tiempo de sonicación se obtiene menor tamaño.	A menor distancia de la punta del transductor al recipiente se obtiene una población más homogénea.
D.J Woodbury et al. (2006)	-tiempo	A mayor tiempo de sonicación se obtiene menor tamaño	A mayor tiempo de sonicación disminuye la polidispersidad
Dina Christin Ayuning Putri et al. (2017)	-temperatura -tiempo	A mayor temperatura disminuye el tamaño de los liposomas A mayor tiempo de sonicación disminuye el tamaño de liposomas Ambas variables en interacción no afectan el tamaño	La temperatura, tamaño y su interacción no afectan significativamente el índice de polidispersidad
T. Yamaguchi et al. (2009)	-potencia	Al aumentar la potencia reduce el tamaño del liposoma	

3.2 Síntesis de liposomas por sonicación con distinto objetivo

Huang et al. (2010) (36) evaluaron la combinación de un ultrasonificador de baño con microdispensadores de lípidos, solventes orgánicos y buffer para producir nanopartículas liposomales. El tamaño de los liposomas se caracterizó mediante un analizador de tamaño de partículas (NICOMP 370). Los resultados mostraron que los liposomas preparados con ayuda de sonicación redujeron su tamaño significativamente, el tamaño medio de la partícula de los liposomas disminuyó de 150 nm a 50 nm. En conclusión, los dispositivos de microfluidos (dispensadores) en combinación con el ultrasonido podrían ser usadas para producir nanopartículas liposomales con determinada distribución de tamaño (36).

Srikanth et al. (2013) (37) describen un método de formación de liposomas con Phospholipon 90G y PBS 0.1M usando el instrumento *Adaptive Focused Acoustics* (AFA), obteniendo liposomas reproducibles con un PDI alrededor de 0.099 ± 0.0199 y un diámetro de 26.3 ± 0.56 nm (37).

N. S. Awad et al. (2019) (38) sintetizaron liposomas dirigidos stealth con el fin de evaluar la liberación de calceína con la administración del ultrasonido de baja frecuencia. De la caracterización de los liposomas se reportó que el radio entre los liposomas dirigidos y sin ligando no se muestra una diferencia significativa. Así mismo, los liposomas sin PEG no muestran una diferencia significativa en tamaño comparado con los liposomas stealth. Mediante la técnica del microscopio electrónico de transmisión (TEM) se obtuvieron imágenes de los liposomas donde muestra que todos obtuvieron un diámetro menor a 200 nm (38).

M.D. Rieth et al. (2020) (39) prepararon liposomas por el método de hidratación, a distintas concentraciones, seguido de sonicación con un ciclo de trabajo del 20% en un tiempo total de 4 min, este ciclo se llevó a cabo repetidas veces. Después de la sonicación se centrifugaron a 10000 rpm durante 3 min para eliminar los restos de titanio de la sonda. Las muestras se almacenaron durante la noche a 4 °C, posteriormente se analizaron mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC (ing): differential scanning calorimetry) con el fin de evaluar sus propiedades termodinámicas como la temperatura de transición (T_m) de fase de los liposomas. Para todas las muestras, la temperatura de transición principal fue aproximadamente en 41.0 °C. Un pico de transición secundario comienza a aparecer antes del pico principal (38.0 °C). Este pico se vuelve cada vez más perceptible a medida que la concentración de lípidos aumenta, y el tiempo de sonicación también. Postulan que estas temperaturas de transición secundarias representan distintas especies de lípidos que coexisten en solución, pero tienen poco o ningún efecto entre sí. Los lípidos no incorporados y que no fueron eliminados por la centrifugación se asocia a un pico en los 27 °C del termograma. Encontraron que había menos residuos de lípidos no incorporados después de la centrifugación y al aumento del tiempo de sonicación, sin embargo, aún había restos de titanio. La estabilidad térmica es un parámetro importante para considerar en la preparación de mezclas de liposomas. Debe tenerse en cuenta al intentar establecer métodos reproducibles para producir una población bien definida y homogénea con propiedades específicas (39).

N. M. AlSawaf et al. (2021) (40) compararon la composición de los liposomas con liposomas dirigidos (utilizando transferrina: Tf) sobre el tamaño y polidispersidad de estos. También, compararon la liberación y captación de calceína de los liposomas con y sin Tf; ambos sometidos a ultrasonido de baja y alta frecuencia sobre células HeLa. Los liposomas fueron recubiertos por PEG. Los liposomas se sintetizaron por el método de hidratación de la película lipídica usando como disolvente orgánico el cloroformo. Para obtener las vesículas unilamelares, la solución fue sonicada por 2 min y se extruyó tres veces. La curva de calibración de calceína se obtuvo por intensidad de fluorescencia a distintas concentraciones. El tamaño de partícula y polidispersidad de los liposomas dirigidos y no dirigidos se determinó mediante DLS. La amplitud de la potencia fue de 20 %, 25 % y 30 %, de las que partieron para obtener la potencia acústica correspondientes. Por medio de un hidrófono se detectaron las variaciones de presión en el medio y estos eventos fueron reportados en voltaje. La señal se observó con un osciloscopio y fue procesada en MATLAB ®. Las señales de voltaje medidas se convirtieron luego en presión acústica [Pa] usando la ecuación 15, la sensibilidad de voltaje esta dada por la ficha técnica del hidrófono específico (40).

$$P = \frac{V_{rms} [V]}{\text{sensibilidad de voltaje} \left[\frac{[\mu V]}{[Pa]} \right]}$$

donde P : Presión acústica , V_{rms} : Voltaje

Ecuación 15

Posteriormente obtuvieron la intensidad acústica con la ecuación 16 (40).

$$I = \frac{P^2}{Z}$$

donde Z : impedancia acústica

Ecuación 16

Mientras el hidrófono se mantenía a una profundidad constante desde la superficie, la distancia de la sonda se modificaba para producir un mapa acústico 2D. Luego el mapa se usó para determinar la densidad de potencia más alta registrada en las tres amplitudes probadas en este estudio (20 %, 25 % y 30 %). Las intensidades de potencia producidas fueron 6.2, 9 y 10 mW/cm² respectivamente. El análisis estadístico del tamaño y polidispersidad de los liposomas se reportó en promedio y

desviación estándar. El índice de polidispersidad aceptado fue menor al 20% de las mediciones de DLS y un diámetro menor a 200 nm (rango óptimo para producir EPR). Los resultados mostraron que ambos tipos de liposomas se encuentran dentro del rango, fueron estables y mantuvieron su estructura después de 24 h de incubación. El tamaño de las partículas con Tf fueron ligeramente mayor a las partículas control (sin Tf). La finalidad del estudio también fue evaluar el efecto de LFUS pulsado y ultrasonido de alta frecuencia sobre la liberación y captación de calceína en células HeLa a tres distintas potencias, resultando una liberación mayor con el incremento de la potencia. El índice mecánico (MI) es un parámetro para indicar la posibilidad de que ocurra cavitación. La cavitación por colapso ocurre con un índice mecánico mínimo de 0.3, los efectos biológicos se observan en 0.7 y daño tisular ocurre en 1.9. Mostraron que las potencias utilizadas obtuvieron un índice mecánico debajo del umbral de cavitación inercial por lo que adjudican a la cavitación estable el principal evento presente (40).

Obtuvieron el índice mecánico, representado matemáticamente por (40):

$$MI = \frac{P_{neg} [MPa]}{\sqrt{f}}$$

donde P_{neg} : presión negativa

Ecuación 17

La presión negativa en la ecuación 17 depende de la impedancia acústica del medio (Z) y la intensidad acústica. La presión negativa esta dada por la ecuación 18 (40):

$$P_{neg} = \sqrt{2ZI}$$

Ecuación 18

3.3 Mecanismos y modelos de formación de liposomas por sonicación

Richardson et al. (2007) (41) exploraron el rol de la cavitación en la manipulación sobre el tamaño de los liposomas. Utilizaron un lípido extraído de la bacteria *Escherichia coli* y un sonicador de baño. Modularon la salida del voltaje con un transformador generando la variación de la intensidad acústica aplicada y, un factor Duty de 50%. El sonicador utilizado tenía una frecuencia de salida de 8 kHz.

Además, utilizaron un presurizador de aire y un hidrófono, la señal del hidrófono pasaba por un sistema de adquisición y digitalización para después obtener la transformada de Fourier procesada en Matlab®. Como resultado obtuvieron un modelo matemático basado en la ecuación de Rayleigh-Plesset de la dinámica de una burbuja y principios de microturbulencia acústica para estimar las fuerzas de cizallamiento que oscilan en una burbuja. El modelo también predice las intensidades y presiones necesarias del ultrasonido para crear fuerzas de corte suficientes para causar cambios en el tamaño del liposoma. Predijeron el comportamiento dinámico del radio de la burbuja en función del tiempo por cavitación estable a través de la función de Matlab® "Ode 45", de acuerdo con sus resultados estimaron que el movimiento subarmónico y ancho de banda del espectro acústico (causas de la cavitación inercial) no está relacionado con la reducción del tamaño del liposoma. Además, demostraron que el aumento de presión hidrostática inhibe el efecto de sonicación sobre el tamaño de partícula, no obstante, un aumento en la intensidad acústica contrarresta esta inhibición (Figura 16). Sin embargo, obtuvieron distribuciones bimodales de la población. Se reducirá el tamaño promedio de los liposomas a medida que aumenta el tiempo de sonicación. Las vesículas más pequeñas se formarán a baja presión y alta intensidad acústica. Su modelo propone que un liposoma con un radio mayor que el radio crítico se alargará por fuerzas de corte y finalmente se romperá en liposomas con radios más cercanos o por debajo del radio crítico. Concluyeron que la microturbulencia es el principal mecanismo involucrado en el tamaño de los liposomas, éste oscila alrededor de las burbujas creando fuerzas de corte suficientes para reducir el tamaño de los liposomas durante el proceso ultrasónico, y no necesariamente los eventos por cavitación (41).

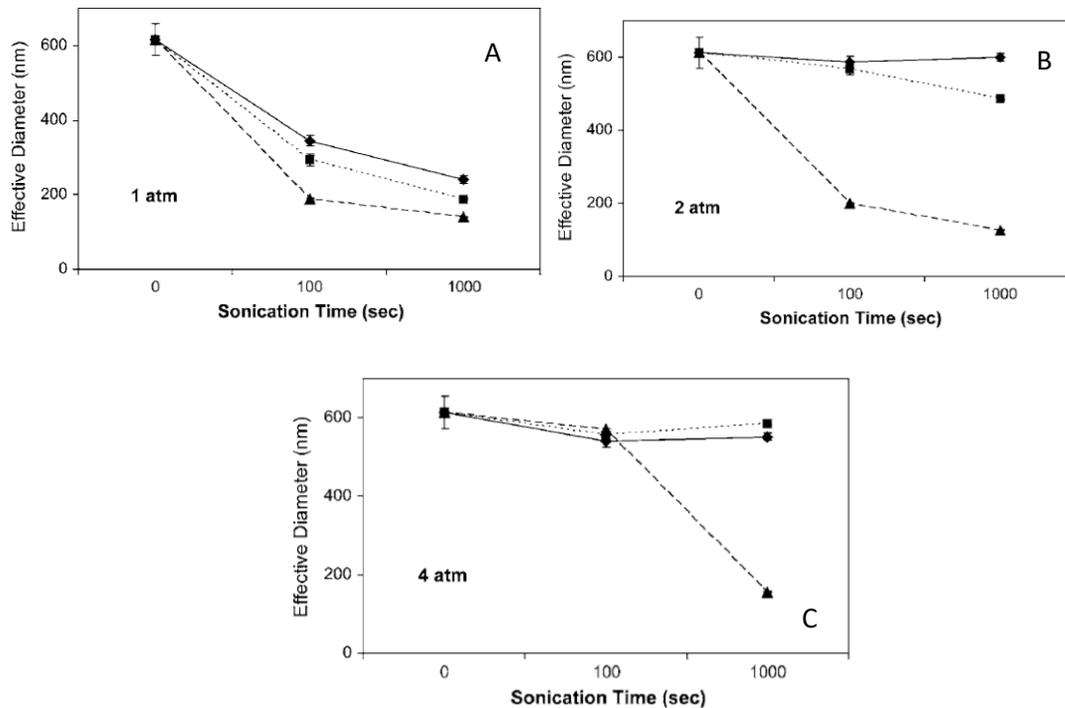


Figura 16. Gráficas tomadas de la referencia (41). A baja \blacklozenge , mediana \blacksquare y alta intensidad \blacktriangle . Diámetros obtenidos en función del tiempo. A) a presión de 1 atm, B) a 2 atm, C) a 4 atm.

Barba et al. (2012) (42) modelaron los mecanismos de ruptura de la bicapa lipídica y la formación esférica de los liposomas en función de la radiación ultrasónica suministrada, con relación a la energía elástica y fenómeno de flexión. Su objetivo fue predecir el tamaño de los liposomas con un modelo matemático en función de la administración de ultrasonido. Se prepararon partículas MLVs por el método de hidratación seguido de sonicación para formar LUVs y SUVs. La sonicación se realizó por intervalos de tiempo (modo pulsado) con el fin de evitar el calentamiento de la muestra y su degradación. Se utilizó el *instrumento VCX 130 PB Ultrasonic Processors of Sonis & Materials* del cual midieron la potencia de salida suministrada. El tamaño de los liposomas se midió mediante espectroscopía de correlación de fotones (PCS). Describieron los mecanismos modelando la termodinámica y cinética del proceso de formación. Desde la termodinámica, explicaron que la energía libre de la bicapa está dada por la energía elástica almacenada en la curvatura de esta y la energía de tensión almacenada en el borde de la bicapa. Describieron la cinética del proceso tomando en cuenta la energía libre y el proceso de flexión. El tamaño de los liposomas es determinado durante el proceso de

producción, debido al suministro de energía. Esta energía suele romper la bicapa lipídica en fragmentos más pequeños, posteriormente estas mismas se cierran formando estructuras esféricas. Explicaron que la energía suministrada a una esfera hace que esta se abra y se aplane, es decir, disminuya la curvatura y aumente el radio. Al administrar energía a un disco plano (caracterizado por un radio de curvatura infinito) la energía ya no se utiliza para disminuir la curvatura sino para romper el disco aplanado dando lugar a fragmentos de bicapa aplanados más pequeños (Figura 17). Los intervalos de tiempo del suministro de energía ultrasónica permitieron fases alternas de ruptura del disco, disipación de calor y flexión de la membrana, además el fenómeno de coalescencia no fue modelado.

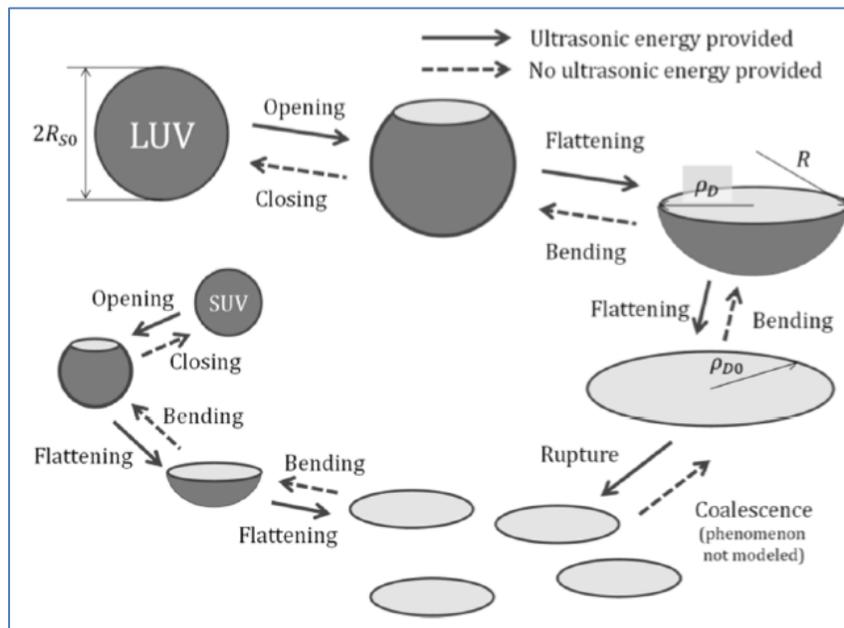


Figura 17. Imagen tomada de la referencia (42). Fenómenos durante la formación de liposomas.

El modelo se basa en el cálculo de la energía libre en la bicapa debido a su curvatura y a los límites de la capa, concluyeron que el suministro de energía por exposición a la sonicación puede provocar la apertura de las vesículas esféricas o la ruptura del disco, sin embargo, el modelo no se considera como una herramienta predictiva. Demostraron a través del modelo que cuanto mayor es la potencia, más rápido se desdobra la esfera, mayor es el número de discos producidos y menor es su tamaño (Figura 18). Probaron un modelo dinámico sobre la curvatura de una bicapa lipídica bajo el efecto de energía ultrasónica, y éste se basó en el cálculo de la energía libre

de la bicapa debido a la curvatura y los límites de la capa para estimar el tamaño de los liposomas. Sin embargo, el modelo no puede definirse como una herramienta predictiva (42).

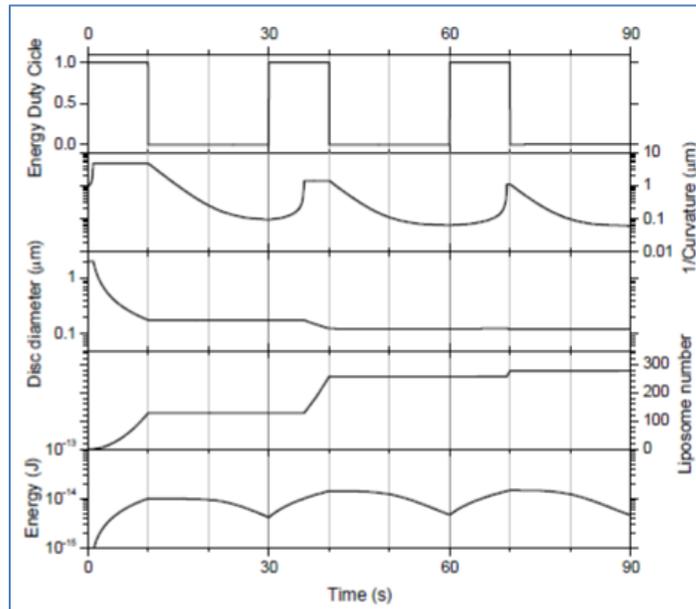


Figura 18. Imagen tomada de la referencia (42). Salida del modelo de cálculo para la prueba simulada.

S.P. Wrenn et al. (2013) (43) menciona que aún no es claro el mecanismo por el cual el LFUS modifica la estructura de la bicapa lipídica. Desarrollaron un modelo teórico para la nucleación de burbujas de gas, en función de las propiedades de la bicapa lipídica. Este modelo contempla la tensión superficial de la bicapa lipídica que ejerce sobre la burbuja. Además, predice que la probabilidad de la nucleación es susceptible al espesor de la bicapa. Resultando que la probabilidad de formación de burbujas estables está relacionada con la sensibilidad experimental de las bicapas bajo LFUS, lo que sugiere que la ruptura de la membrana puede deberse a las burbujas incrustadas que se nuclean en la bicapa (Figura 19). Su modelo parte de la energía superficial de la interacción entre moléculas y el medio, iniciando de una deformación en la bicapa lipídica, esta energía se usó para calcular la nucleación y el crecimiento de las burbujas de gas (43). Se ha descubierto que el LFUS aumenta la permeabilidad de las membranas lipídicas de forma transitoria a través de efectos no térmicos. El tamaño del liposoma, el número de bicapas y sus propiedades se relacionan con las características del ultrasonido (frecuencia e intensidad). Los liposomas cuyo tamaño es parecido a la longitud de onda del

ultrasonido experimentan un gradiente de presión que provoca una fuerza de corte, que puede alterar la estructura en la bicapa (43).

El crecimiento de la burbuja induce a una deformación en el ensamble de los lípidos circundantes, lo que se asocia con una penalización energética que puede expresarse como una tensión superficial efectiva. Entonces para el proceso de nucleación, la formación de burbujas dependerá de la magnitud relativa de la penalización energética debida a la tensión superficial (deformación lipídica) y la ganancia debida a la energía de asociación del gas, expresado en función del grado de sobresaturación (43). Derivaron la energía superficial de una inclusión esférica incrustada en una bicapa lipídica, en función del tamaño de la inclusión y de las propiedades de los lípidos; esta energía superficial se utilizó para calcular la nucleación y crecimiento de las burbujas de gas. La investigación sugiere que aumentar el espesor de la bicapa disminuirá la probabilidad de nucleación de burbujas estables en las bicapas. La nucleación es el mecanismo por el cual el LFUS altera las bicapas (43). Demostraron que LFUS induce poros transitorios en bicapas lipídicas. La membrana absorbe el ultrasonido por debajo de la temperatura de transición. Derivaron un modelo para la formación de burbujas estables (burbujas más grandes que el tamaño crítico) en las bicapas lipídicas. Encontraron que el tamaño de la burbuja es sensible a la sobresaturación y espesor de la bicapa (43).

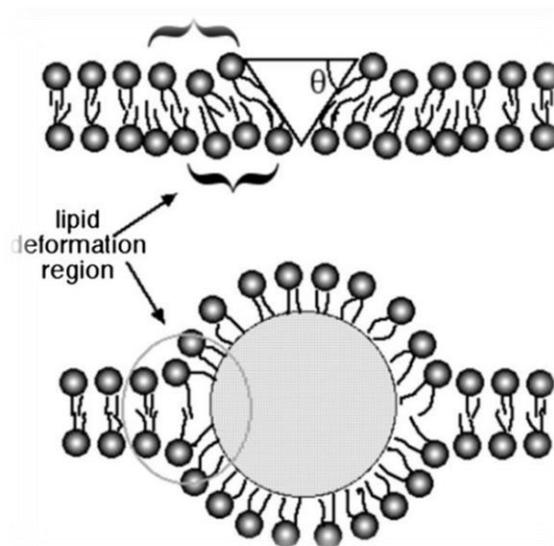


Figura 19. Imagen tomada de la referencia (43). Deformación de la membrana por una inclusión.

4. Planteamiento del problema

El ultrasonido de baja frecuencia se ha utilizado como herramienta para producir liposomas en el orden nanométrico. La interacción de las ondas del sonido con liposomas (p.ej. multilamelares) genera efectos físicos que pueden influir en la tasa de formación, estructura y tamaño de partícula. Los efectos físicos ocurren al manipular parámetros acústicos tales como tiempo de exposición, potencia y factor duty. A la fecha, estos parámetros han sido los más utilizados. Sin embargo, los estudios reportan liposomas con una distribución de tamaño polidispersa. El presente proyecto tiene el objetivo de establecer parámetros acústicos, mediante una sonda acústica, que permitan controlar el tamaño (<100 nm) y distribución (monodisperso) de liposomas, así como optimizar la eficiencia de encapsulación de R6G para su aplicación en el campo de la medicina.

5. *Justificación*

Actualmente los liposomas como sistemas de transporte son los únicos aprobados por la FDA para su uso en humanos. Los métodos de producción de liposomas se basan en la formación de bicapas lipídicas seguido por una fase de hidratación. La etapa de eliminación del solvente requiere varias horas de exposición a vacío. Estos procedimientos dificultan el control de la distribución del tamaño y la eficiencia de encapsulación en liposomas, con una considerable pérdida de componentes activos. Este estudio tiene el objetivo de establecer parámetros acústicos, mediante la aplicación de una sonda acústica en modo continuo, que permita controlar el tamaño (<100 nm), distribución de liposomas (monodisperso), y eficiencia de encapsulación de R6G. La aplicación de la sonda en modo continuo puede favorecer el proceso de formación de liposomas con tamaño nanométrico. La distribución del tamaño de partícula influye en el control de calidad del proceso de producción y el desarrollo de métodos de preparación de liposomas, además, los sistemas polidispersos muestran inestabilidad para su replicación. Distintas investigaciones reportan el uso del sonicador en modo pulsado, no obstante, no había sido evaluado el modo de operación (continuo o pulsado).

6. Hipótesis

Conociendo el impacto en el tamaño de partícula, distribución del tamaño y eficiencia de encapsulación que causan el tiempo de exposición ultrasónica, el modo de operación y la amplitud del pulso sobre los liposomas, puede asumirse que la sonicación optimiza la producción de liposomas por la determinación de dichos parámetros acústicos.

7. Objetivo general

Evaluar el efecto de la amplitud del pulso, tiempo de exposición y modo de operación de ondas de sonido (20 kHz) sobre el tamaño, distribución y eficiencia de encapsulación de liposomas (R6G).

7.1 Objetivos específicos:

- Sintetizar liposomas mediante sonicación manipulando los parámetros acústicos de la sonda.
- Medir el tamaño de partícula y distribución de su tamaño por DLS.
- Determinar la eficiencia de encapsulación de los liposomas con Rodamina 6G.

8. Metodología

8.1 Previo a la formulación

Primeramente, para la esterilización de membranas (14 kDa), se disolvió 0.2507 g de OmniPur® EDTA en 80 ml de agua durante 30 minutos de agitación magnética.

Como buffer se utilizó PBS a 1X. La preparación de los liposomas se realizó de acuerdo con el método de hidratación de la película lipídica seguido de sonicación.

8.2 Síntesis de liposomas sin R6G

Se mezcló en una proporción 1:10 fosfatidilcolina (Phospholipon® 90G), colesterol (Cholesterol-Sigma grade >99%) y PEG 2000 (DSPE-PEG (2000)-NH₂). A esta mezcla se le añadieron 1.5 ml de alcohol isopropílico, 1.5 ml de metanol y 3 ml de cloroformo. Sin embargo, no se administró PEG 2000 a la muestra L11. Las soluciones se agitaron por 1 minuto. Posteriormente se realizó la evaporación de la solución resultando la formación de una membrana lipídica. A la membrana se le añadieron 2 ml de buffer y se mantuvo en agitación magnética a 45 °C por 15 min. El volumen de la mezcla fue de 2 ml, la cual se separó en 1 ml y 1 ml. A cada solución se le añadió 1 ml de buffer pasando por agitación magnética 50 minutos a distintas temperaturas. Después, las muestras pasaron por sonicación, diálisis y almacenamiento a 4 °C para posteriormente realizar el análisis de datos por medio de la técnica DLS.

8.3 Síntesis de liposomas con R6G

El procedimiento siguiente procedimiento se realizó por duplicado. Primero se preparó la mezcla de lípidos donde se diluyeron 1.6 ml de etanol en 0.004

g de P90G (recipiente A), en otro recipiente se preparó CaCl_2 -TRIS-HCL partiendo de 0.0016 g de CaCl_2 y 2.4 ml de TRIS-HCL (recipiente B). A partir de una solución stock 10 mM de Rodamina 6G se preparó una solución Rodamina 6G 1 mM con un volumen final de 1 ml (recipiente C). Se dividió el recipiente B en 2 (1.2 ml y 1.2 ml). Del recipiente C se tomaron 500 μl para diluirse en cada solución de CaCl_2 -TRIS-HCL resultando dos soluciones CaCl_2 -TRIS-HCL-R6G con un volumen final de 1.7 ml cada una. Posteriormente se agregaron 800 μl gota a gota del recipiente A (PC-ETOH) a las soluciones de CaCl_2 -TRIS-HCL-R6G obteniendo un volumen final de 2.5 ml cada una. Debido a que se realizó por duplicado se obtuvieron 4 muestras, las cuales pasaron a sonicación, diálisis, DLS y porcentaje de eficiencia de encapsulación (%EE).

8.4 Sonicación

Al término de la agitación magnética se realizó la sonicación para cada muestra a determinada potencia, tiempo de exposición y ciclo de trabajo (Tabla 3). De un primer ensayo se obtuvieron las muestras L1, L2 y L3 con distintos parámetros de potencia y tiempo de sonicación. Para un segundo ensayo se obtuvieron L4, L5 y L6 con variables como temperatura y ciclo de trabajo. En el tercer ensayo se obtuvo la muestra L7, L8, L9 y L10 teniendo como variable la potencia de sonicación y para L11 la concentración de PEG 2000. Después se sintetizaron las muestras con R6G, del primer ensayo de este se obtuvieron L_R6G_1 el cual no pasó por la fase de sonicación; y las muestras L_R6G_2, L_R6G_3 y L_R6G_4 donde el modo de sonicación fue continuo teniendo como variable el tiempo de sonicación. Para el segundo ensayo con R6G (L_R6G_A, L_R6G_B, L_R6G_C) el modo de sonicación fue pulsado modificando el tiempo de exposición, para la muestra L_R6G_I se modificó la potencia.

8.5 DLS

Después del almacenamiento se tomaron 200 μl de cada muestra para diluirse en 800 μl de buffer salino. De la solución se tomaron aproximadamente 800 μl para colocarse en la celda del dispositivo para ser analizada mediante varias lecturas.

Los datos fueron extraídos del sistema siendo relevante el diámetro [nm], volumen [%] e índice de polidispersidad (Tabla 2). Los valores del diámetro se clasificaron en población A donde se encuentran los tamaños de partícula menores a 200 nm y la población B donde se encuentran los mismos mayores a 200 nm. Para cada población se obtuvo la media y desviación estándar. Además, el índice de polidispersidad de cada lectura se ocupó para obtener la media y desviación estándar.

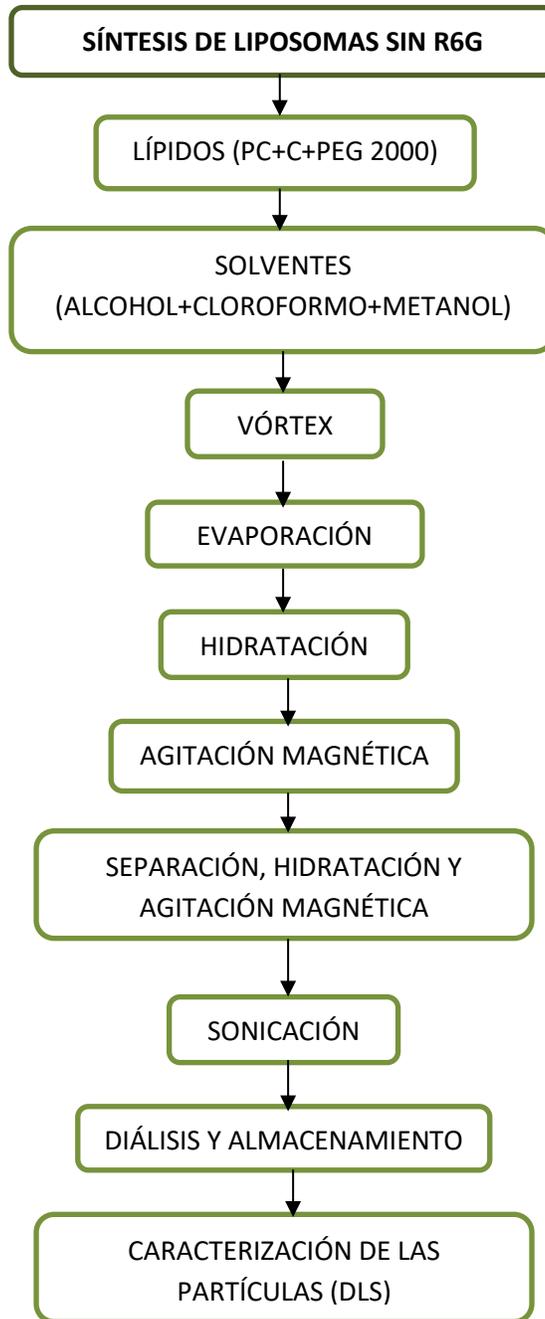
8.5 Curva de calibración de R6G.

Se preparó la solución CaCl_2 - Rodamina 6G, diluyendo 1.2 ml de CaCl_2 en 500 μl de R6G a 1 mM. A partir de esta se prepararon diluciones a 3.13 μM , 2.8 μM , 2.5 μM , 2 μM y 1.5 μM . La curva de calibración se realizó mediante la técnica de intensidad de fluorescencia, se agregaron 200 μl de cada dilución un pozo (por duplicado) de la placa. De los valores obtenidos de la lectura del fluorómetro se obtuvo la media y desviación estándar. Tomando en cuenta estos últimos se obtuvo una relación gráfica entre la intensidad de fluorescencia y la concentración de R6G para posteriormente adquirir la línea de regresión. Se analizó la línea de tendencia con la ecuación de la recta y el coeficiente de determinación.

8.6 Eficiencia de encapsulación de R6G.

De cada muestra de liposomas con Rodamina 6G se tomaron 20 μl , los cuales se llevaron a un volumen de 200 μl . Además, la muestra se diluyó 10 veces (se tomaron 100 μl para colocarse en cada pozo) con el fin de evitar la sobresaturación del detector. Dichos liposomas se sometieron al estudio de

espectroscopia de fluorescencia. A partir de la ecuación de la recta se obtuvo la concentración de Rodamina 6G para cada liposoma.



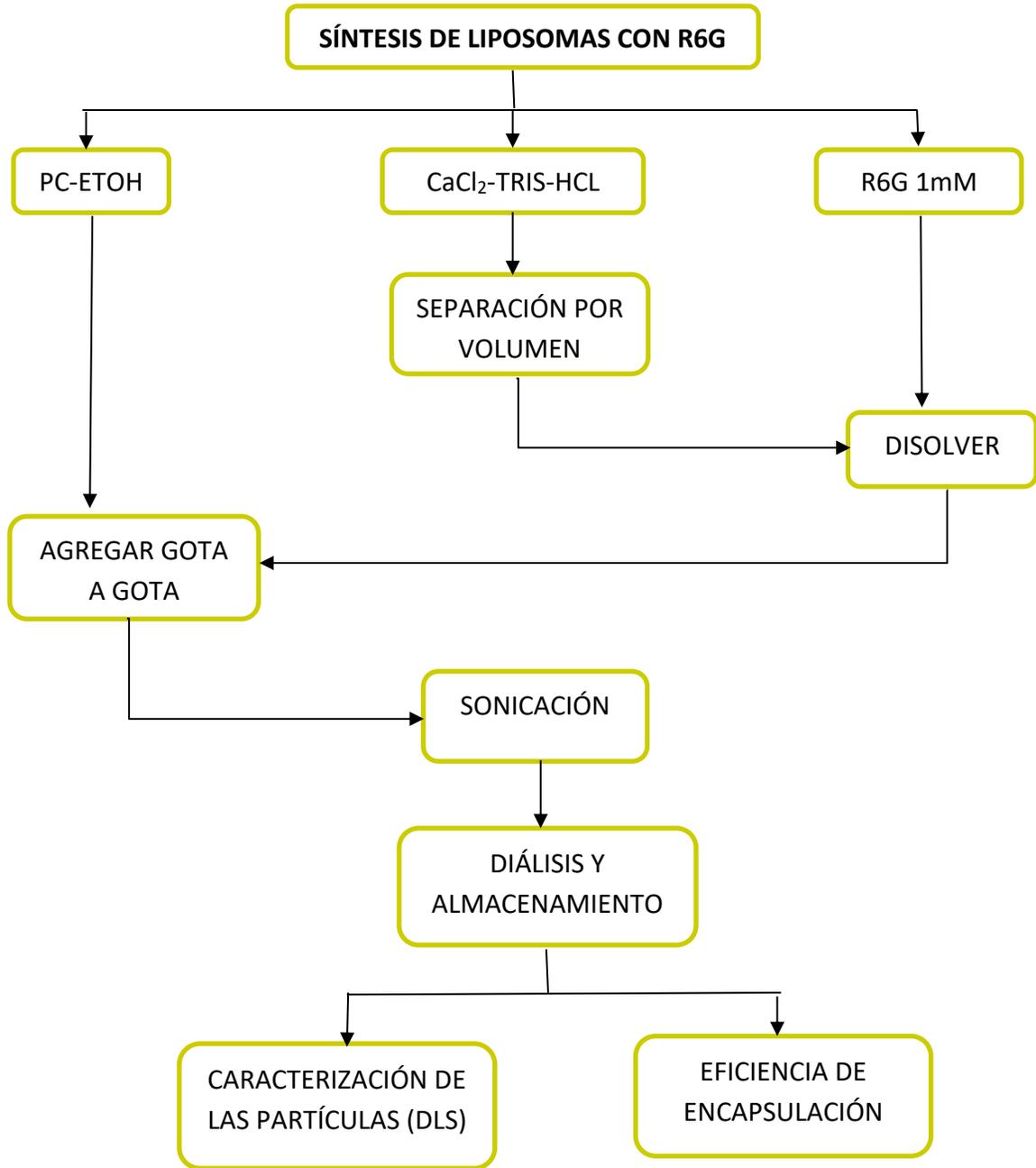


Tabla 3. Parámetros de sonicación

	Muestra	Agitación magnética	Parámetros de sonicación			
		Temperatura [°C]	Potencia [%]	Tiempo [min]	Modo	Ciclo de trabajo [%]
PC+ Ch+ PEG2000	L1	60	30	2	P	20
	L2	TA	20	4	C	N/A
	L3	TA	40	5	P	10
	L4	60	30	4	P	20
	L5	37	30	4	P	20
	L6	60	30	4	P	10
	L7	60	20	2	P	10
	L8	60	40	2	P	10
	L9	60	30	2	P	10
	L10	60	50	2	P	10
PC+Ch	L11	60	30	4	P	10
PC+R6G	L_RG6_1	TA	0	0	N/A	0
	L_R6G_2	TA	20	2	C	N/A
	L_R6G_3	TA	20	3	C	N/A
	L_R6G_4	TA	20	4	C	N/A
	L_R6G_A	TA	20	2	P	20
	L_R6G_B	TA	20	3	P	20
	L_R6G_C	TA	20	4	P	20
	L_R6G_I	TA	30	2	P	20

Abreviaciones: PC (fosfatidilcolina), Ch (colesterol), PEG2000 (polietilenglicol), R6G (Rodamina 6G), PDI (índice de polidispersidad), EE (eficiencia de encapsulación), P (pulsado), C (continuo), TA (temperatura ambiente), N/A (no aplica).

9. Resultados

La tabla 2 muestra la caracterización de las partículas por cada lectura que se obtuvo de la técnica DLS. Los diámetros hidrodinámicos obtenidos se clasificaron en mayor a 200 nm (población B) y menor a 200 nm (población A). Adicional se observa la media y desviación estándar del índice de polidispersidad y de cada población (A o B).

Del primer ensayo que se realizó se observa que para L1 hay una población monodispersa (volumen de cada lectura 100%) y un índice de polidispersidad de 0.6 ± 0.1 , sin embargo, el tamaño de partícula excede los 200 nm con un diámetro promedio de 368.7 ± 9.3 nm de modo que todas las lecturas se encuentran dentro de

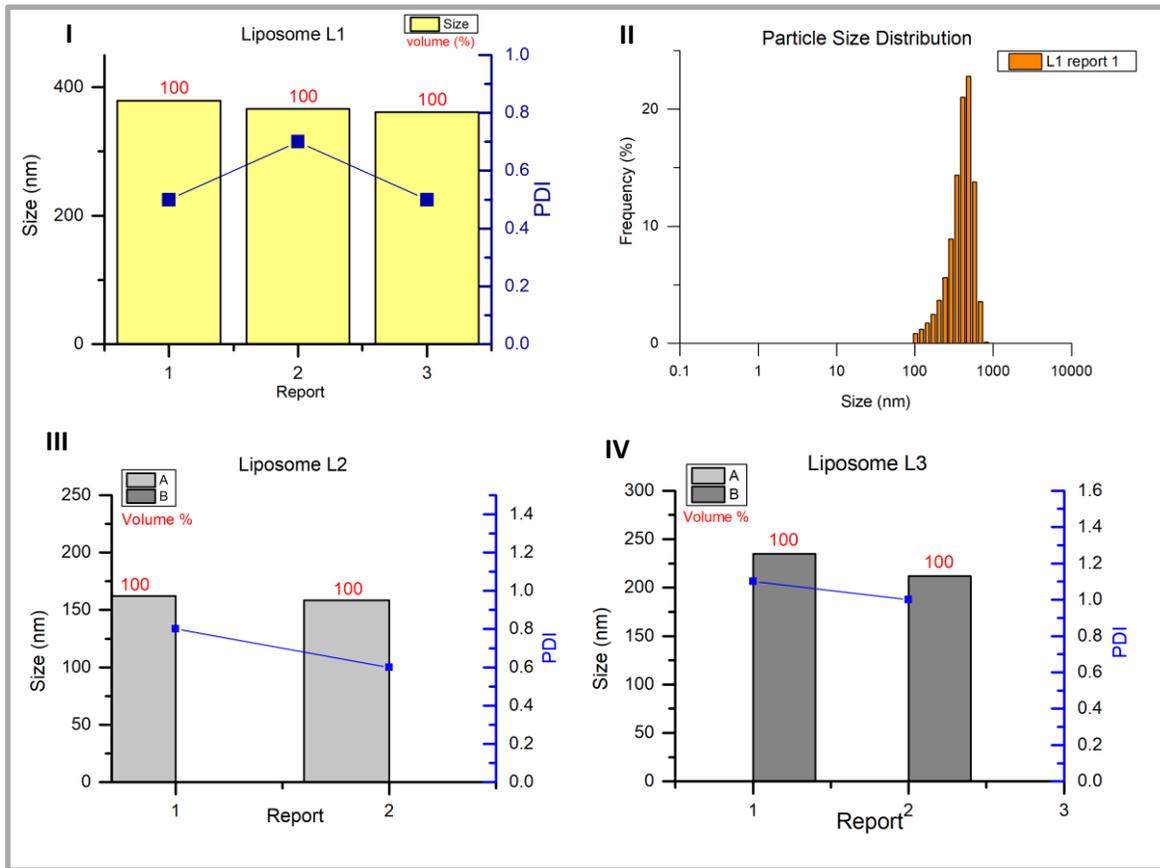
la población B (Gráfica 1). La muestra L2 tuvo un índice de polidispersidad promedio de 0.7 ± 0.1 , con diámetro promedio de la población A de 160.3 ± 2.7 nm. Así mismo se observan los datos obtenidos de la técnica DLS para cada muestra en la tabla 4.

Tabla 4. Tamaño de partícula e índice de polidispersidad resultados de DLS.

Liposoma	lectura	Tamaño de partícula (nm)	volumen (%)	PDI	PDI ($\bar{x} \pm \sigma$)	Tamaño población A (nm) ($\bar{x} \pm \sigma$)	Tamaño población B (nm) ($\bar{x} \pm \sigma$)
Liposomas vacíos							
L1	1	379	100	0.5	0.6±0.1	N/A	368.7±9.3
	2	366	100	0.7			
	3	361	100	0.5			
L2	1	162.2	100	0.8	0.7±0.1	160.3±2.7	N/A
	2	158.4	100	0.6			
L3	1	234.9	100	1.1	1±0.1	N/A	223.5±16.1
	2	212.1	100	1			
L4	1	430	62.6	0.8	1.1±0.3	102.4±4.7	443.8±11.9
		104.5	37.4				
	2	442	72.4	1.1			
		106.5	27.6				
	3	444	74.8	1.1			
		102.8	25.2				
	4	459	78.6	1.4			
		95.7	21.4				
L5	1	439	70.7	0.8	1±0.2	115.9±6.5	435.5±14.8
		124	29.3				
	2	425	78.1	0.9			
		115.4	21.9				
	3	455	77.3	1.2			
		108.2	22.7				
	4	423	74	1.1			
		115.9	26				
L6	1	300	65.6	0.8	0.8	108.6±6.6	312±17
		103.9	34.4				
	2	324	62.4	0.8			
		113.2	37.6				
L7	1	530	85.3	1.3	1.2	113.9±13.2	457.5±102.5
		123.2	14.7				
	2	385	88.6	1.2			
		104.6	11.4				
L8	1	421	79.5	1	1	125.2±1.8	409±17
		123.9	20.5				
	2	397	79.1	1			
		126.5	20.9				
L9	1	402	57	0.5	0.5	136.9±33.7	345.7±79.6
		160.8	43				
	2	289.4	71.5	0.6			
		113.1	28.5				
L10	1	440	45.8	0.6	0.7±0.2	141.1±22.1	425±21.2
		156.7	52.4				
	2	410	68.1	0.8			
		125.4	31.9				

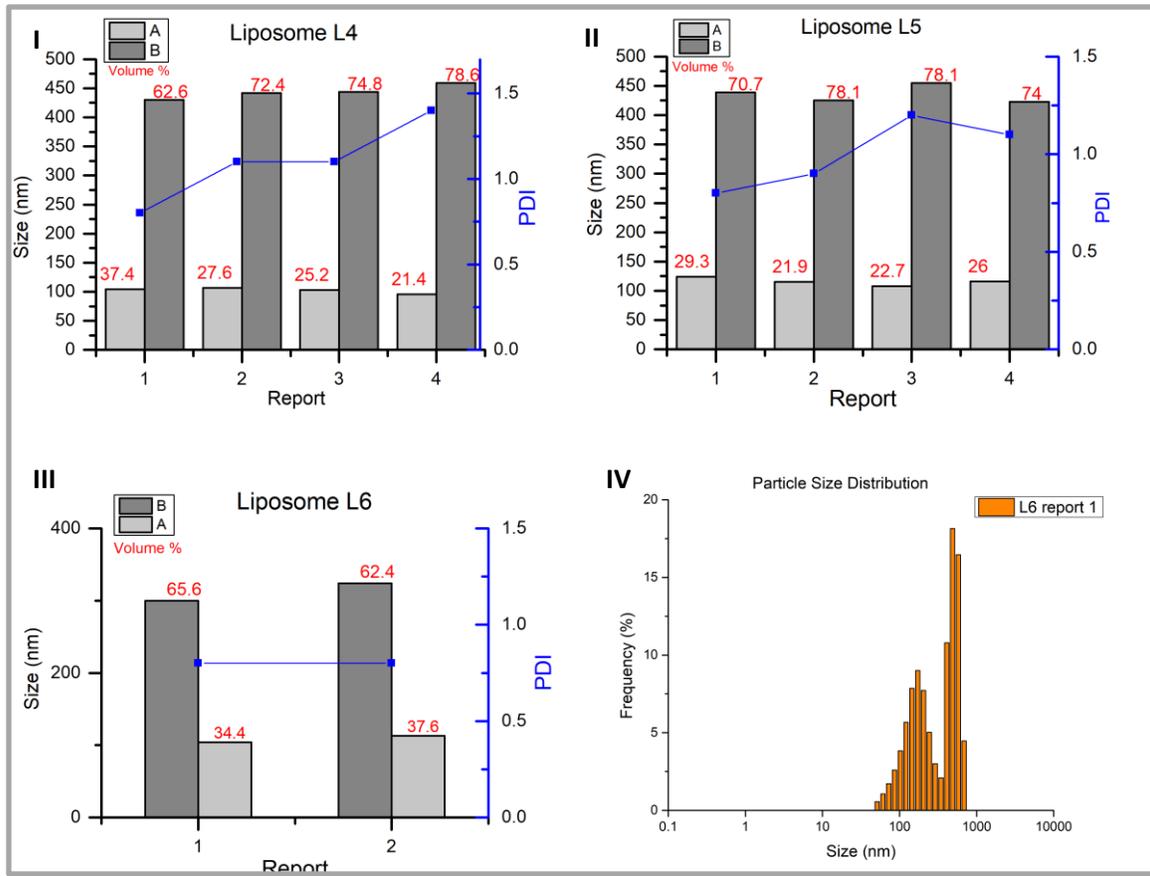
L11	1	451	74.9	0.9	0.8±0.2	141.1±3.2	430±29.7
		143.3	25.1				
	2	409	55.8	0.7			
		138.8	44.2				
Liposomas (R6G)							
L_R6G_1	1	1788	2.4	0.6	0.9±0.2	44.8±5.7	1309.7±521.3
		43.4	97.6				
	2	1387	5.8	0.9			
		51.1	94.2				
	3	754	2.4	1			
39.9		97.6					
L_R6G_2	1	33	100	0.4	1.5±1.1	32.6±0.4	2531.5±2218.2
		2	4100	4.4			
	32.4		95.6				
	3	963	5.1	2.7			
		32.4	94.9				
L_R6G_3	1	31.7	100	0.5	0.5±0.1	32.9±1.7	N/A
	2	34.1	100	0.4			
L_R6G_4	1	1920	7.9	1.7	1.4±0.4	29.6±0.6	1975.5±78.5
		29.17	92.1				
	2	2031	1.6	1.1			
		29.97	98.4				
L_R6G_A	1	1721	8	1.7	2.7±1.5	38.8±10.7	2090±521.8
		31.2	92				
	2	2459	49.9	3.7			
		46.3	50.1				
L_R6G_B	1	1914	10.8	1	1.2±0.3	47.6±5	1396.3±916.6
		338	4				
		51.1	85.2				
	2	1937	22.5	1.4			
		44	77.5				
L_R6G_C	1	1979	15	1.4	1.4	38.2	1979
		38.2	85				
L_R6G_I	1	1914	100	0.4	0.4	N/A	1914

Abreviaciones: PROM (promedio), N/A (no aplica).

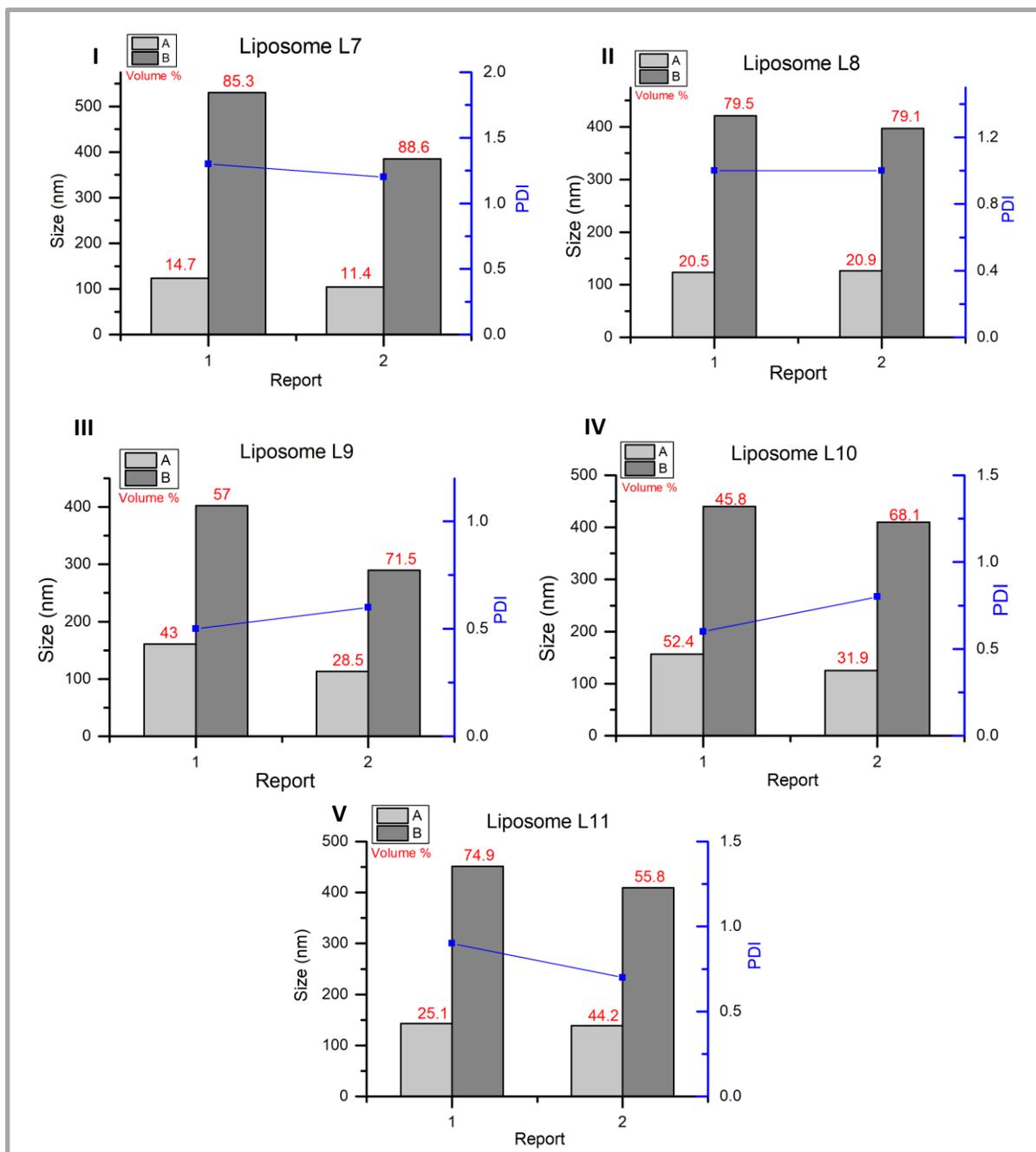


Gráfica 1. Caracterización de partículas del primer ensayo: I) diámetro y PDI de la muestra L1, II) histograma de la lectura 1 para el liposoma L1, III) diámetro y PDI de la muestra L2, IV) diámetro y PDI de la muestra L3.

Las muestras L4, L5 y L6 fueron poblaciones bimodales (Gráfica 2). El índice de polidispersidad para estas muestras fueron 1.1 ± 0.3 , 1 ± 0.2 y 0.8 respectivamente. Para L4 el tamaño de partícula A fue de 102.4 ± 4.7 nm, para L5 fue de 115.9 ± 6.5 nm y para L6 fue de 108.6 ± 6.6 nm. El tamaño de partícula B para la muestra L4 fue de 443.8 ± 11.9 nm, para L5 fue de 435.5 ± 14.8 nm y para L6 fue de 312 ± 17 nm.

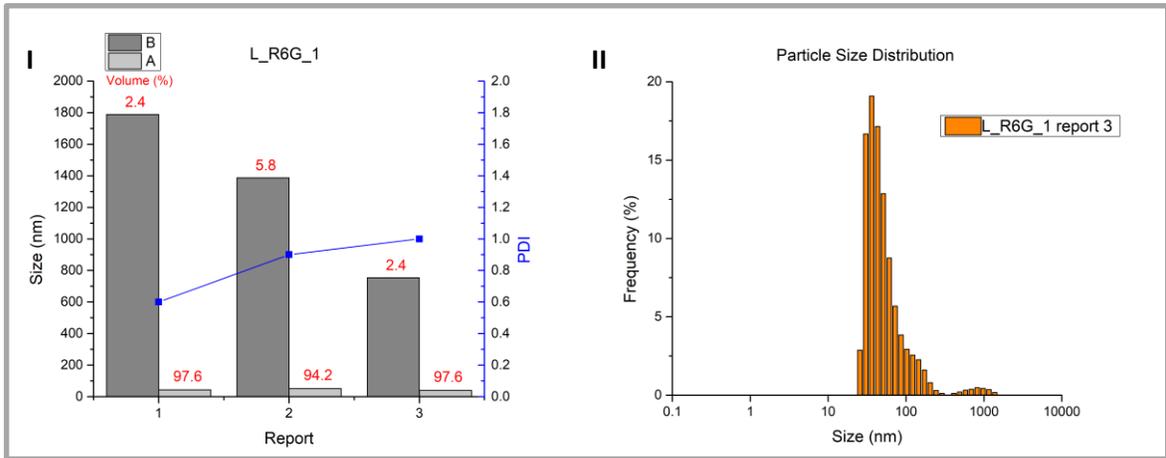


Gráfica 2. Caracterización de partículas del segundo ensayo: I) diámetro y PDI de la muestra L4, II) diámetro y PDI de la muestra L5, III) diámetro y PDI de la muestra L6. IV) histograma para la lectura 1 de la muestra L6.

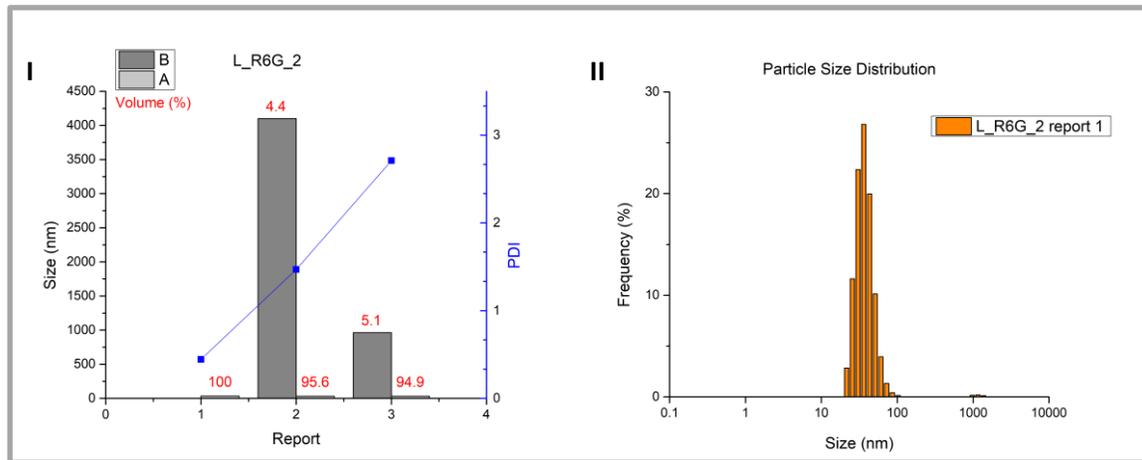


Gráfica 3. Caracterización de partículas del tercer ensayo (diámetro y PDI): I) muestra L7, II) muestra L8, III) muestra L9, IV) muestra L10, V) muestra L11.

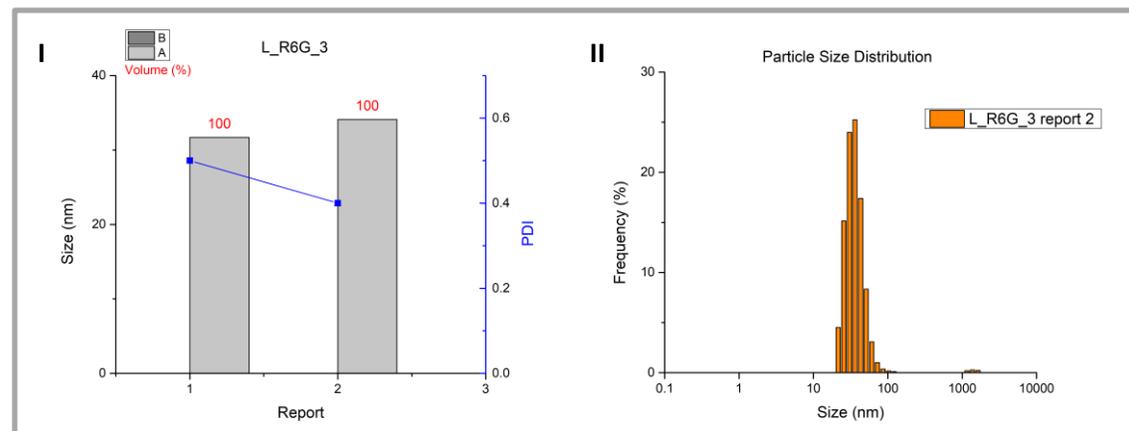
De la muestra L_R6G_1 se obtuvieron diámetros menores a 100 nm con volúmenes mayores al 90 % (Gráfica 4), en la muestra L_R6G_2 una de las tres lecturas tomadas resultó con volumen del 100 % y diámetro de 33 nm (Gráfica 5). También, de la muestra L_R6G_3 dos lecturas resultaron con volúmenes de 100% y diámetros de 31.7 nm y 34.1 nm (Gráfica 6).



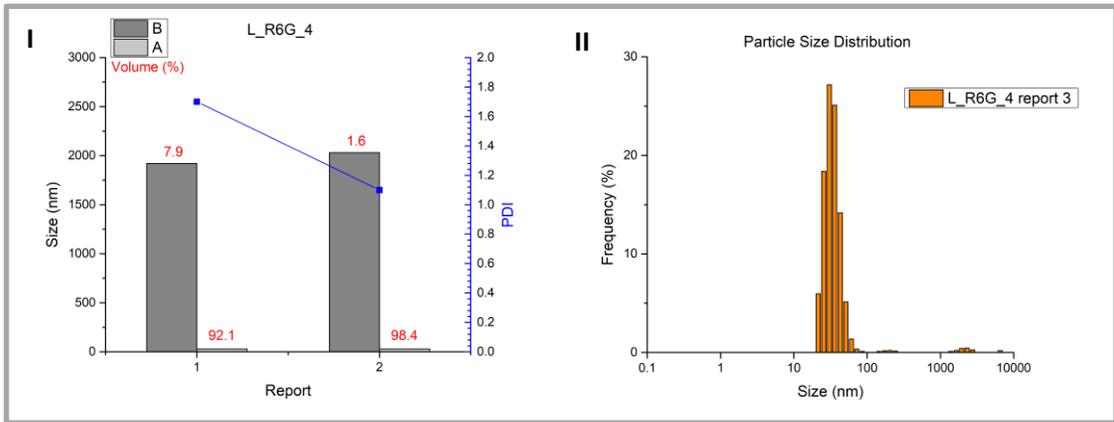
Gráfica 4. I) diámetro y PDI de la muestra L_R6G_1, II) histograma de la distribución de tamaño de partícula para la lectura 3 de la muestra L_R6G_1.



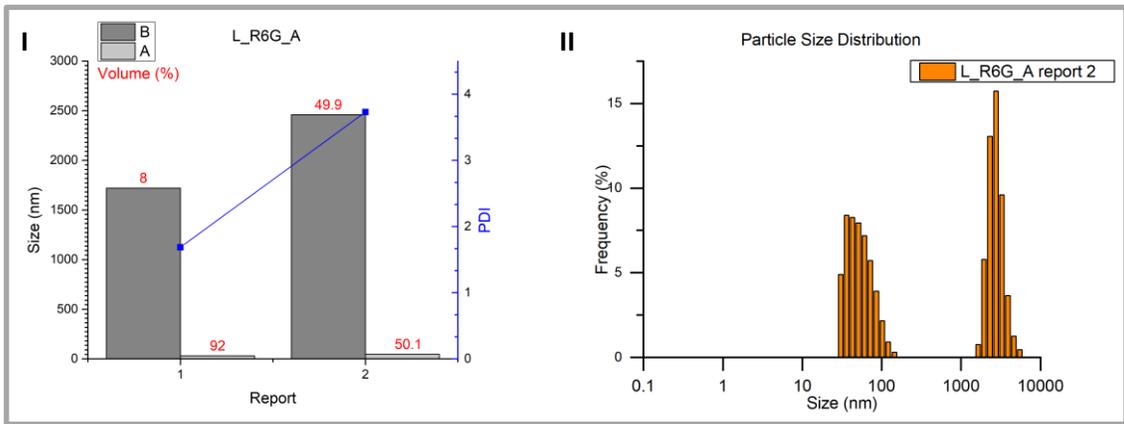
Gráfica 5. I) diámetro y PDI de la muestra L_R6G_2, II) histograma de la distribución de tamaño de partícula para la lectura 1 de la muestra L_R6G_2.



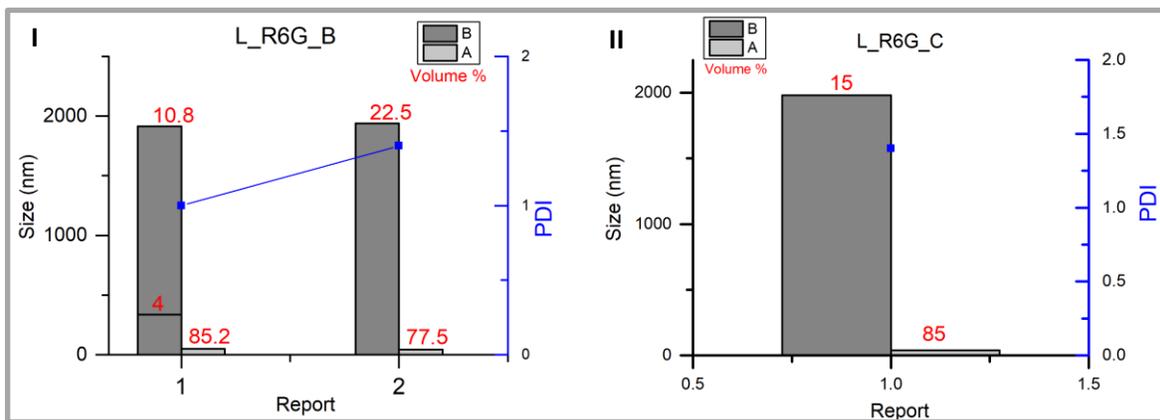
Gráfica 6. I) diámetro y PDI de la muestra L_R6G_3, II) histograma de la distribución de tamaño de partícula para la lectura 2 de la muestra L_R6G_3.



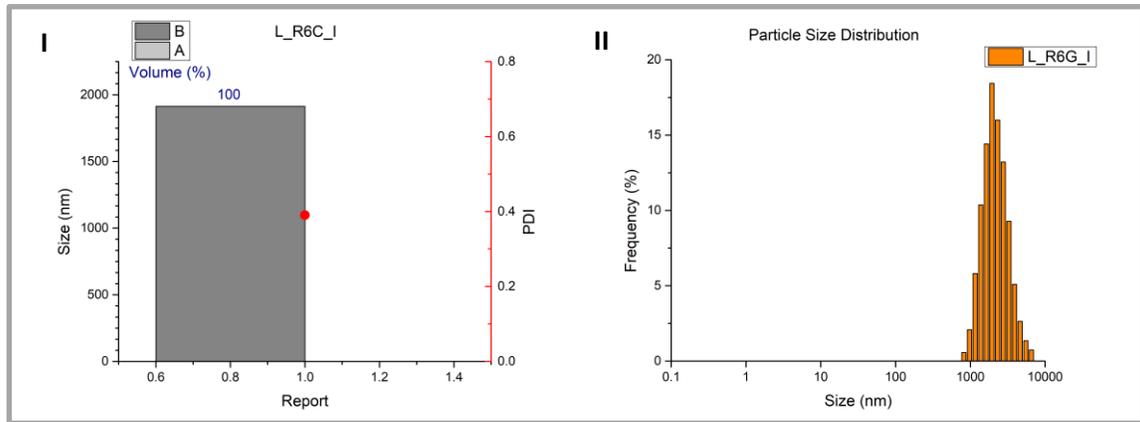
Gráfica 7. I) diámetro y PDI de la muestra L_R6G_4, II) histograma de la distribución de tamaño de partícula para la lectura 3 de la muestra L_R6G_4.



Gráfica 8. I) diámetro y PDI de la muestra L_R6G_A, II) histograma de la distribución de tamaño de partícula para la lectura 2 de la muestra L_R6G_A.



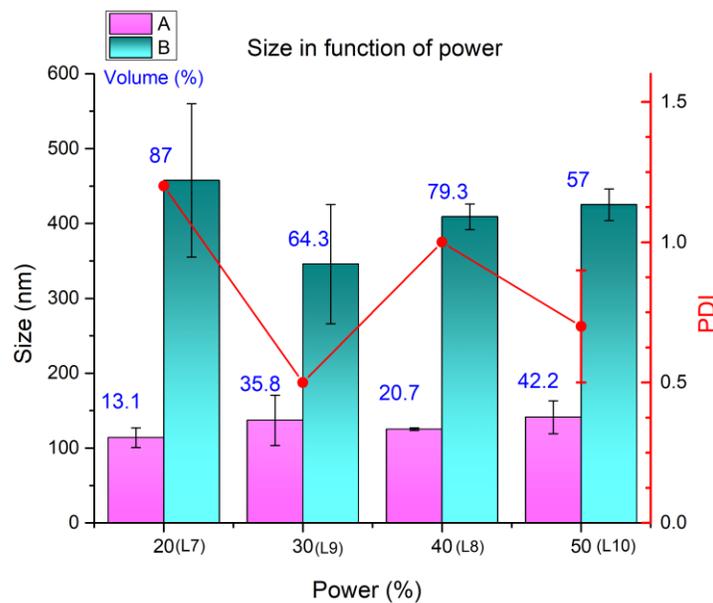
Gráfica 9. Caracterización de partículas para I) L_R6G_B y II) L_R6G_C.



Gráfica 10. I) diámetro y PDI de la muestra L_R6G_I, II) histograma de la distribución de tamaño de partícula L_R6G_I.

Variable: Potencia de sonicación

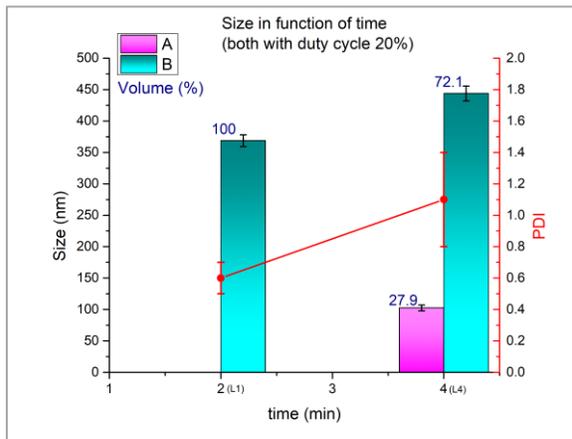
Las muestras L7, L8, L9 y L10 comparten la formulación de fosfatidilcolina, colesterol y PEG 2000, retomando los valores de potencia mostrados en la Tabla 1 y los resultados de DLS (Tabla 2), únicamente difieren en la magnitud de potencia aplicada por el ultrasonido. Sin embargo, el índice de polidispersidad, el tamaño de partícula A y B así como el volumen de cada población no fueron determinantes ante el aumento o disminución de la potencia de sonicación como se muestra en la Gráfica 11.



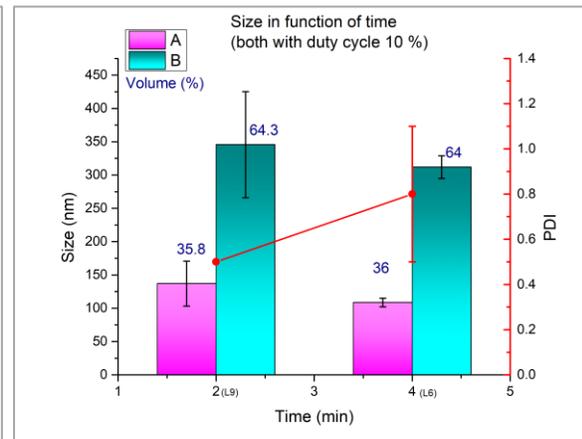
Gráfica 11. Diámetro en función de la potencia ultrasónica.

Variable: Tiempo de sonicación

Las muestras L1 y L4 (ambos con ciclo de trabajo de 20%) tienen como variable el tiempo de sonicación. Se mostraron cambios en el índice de polidispersidad y tamaño de partícula; compartiendo la formulación de fosfatidilcolina, colesterol y PEG 2000, con una potencia al 30 % en modo pulsado y ciclo de trabajo del 20 %, el tamaño de partícula B a 2 min de sonicación fue de 368.7 ± 9.3 nm, mientras que a 4 min fue de 443.8 ± 11.9 nm. No obstante, el índice de polidispersidad fue de 0.6 ± 0.1 a 1.1 ± 0.3 respectivamente, manifestando población A para la muestra L4 (tiempo de sonicación 4 min) de 102.4 ± 4.7 nm (Gráfica 12). Por lo tanto, un aumento en el tiempo de sonicación aumenta el PDI (resultando una población bimodal).



Gráfica 12. Diámetro en función del tiempo de sonicación (para las muestras L1 y L4).

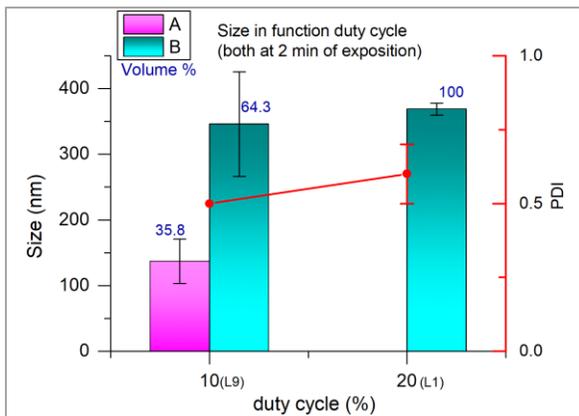


Gráfica 13. Diámetro en función del tiempo de sonicación (para las muestras L6 y L9).

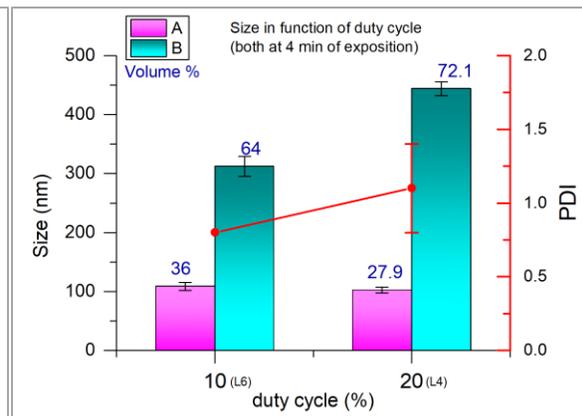
También, entre las muestras L6 y L9 comparten como variable el tiempo de sonicación, a diferencia de la comparación previa, éste se expone a un ciclo de trabajo del 10 % (Gráfica 13). La exposición de las muestras a 2 min resultó en un PDI de 0.5, el diámetro de la población A fue de 136.9 ± 33.7 nm y para la población B fue de 345.7 ± 79.6 nm, mientras que a 4 min la población A fue de 108.6 ± 6.6 nm y la población B de 312 ± 17 nm con un PDI de 0.8. Así como en la comparación anterior (Gráfica 12) el valor de PDI aumentó ante el incremento del tiempo de sonicación.

Variable: ciclo de trabajo

Para las muestras L1 y L9, durante la etapa de sonicación, se utilizó una potencia de 30 % a 2 min con un DF de 0.2 y 0.1 respectivamente (Gráfica 14). El ciclo de trabajo varió de 10 % al 20 %, al aumentar éste aumentó el índice de polidispersidad de 0.5 (PDI de L9) a 0.6 ± 0.1 (PDI de L1), sin embargo, pasó de ser bimodal a tener sólo una población; no obstante, el tamaño de partícula B aumentó de 345.7 ± 79.6 nm a 368.7 ± 9.3 nm.



Gráfica 14. Diámetro y PDI en función del ciclo de trabajo, comparación entre L1 y L9 expuestos a 2 min de sonicación.

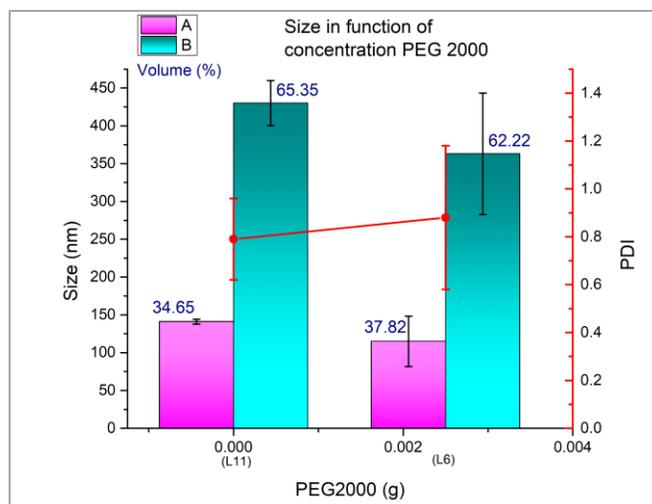


Gráfica 15. Diámetro y PDI en función del ciclo de trabajo, comparación entre L4 y L6 expuestos a 4 min de sonicación.

Así mismo, se realizó la comparación entre L4 y L6 ya que comparten los parámetros de sonicación en potencia (30 %) y tiempo de exposición (4 min) con excepción del ciclo de trabajo, 20 % y 10 % respectivamente (Gráfica 15). Con ciclo de trabajo del 10 % resultó un PDI de 0.8, diámetro A de 108.6 ± 6.6 nm y diámetro B de 312 ± 17 nm; mientras que para el 20 % el índice de polidispersidad fue de 1.1 ± 0.3 , diámetro A de 102.4 ± 4.7 nm y diámetro B de 445.8 ± 11.9 nm. Se observó un aumento del índice de polidispersidad al incrementar el ciclo de trabajo, asimismo aumentó el tamaño de partícula de la población B.

Variable: PEG 2000

El valor de PDI disminuyó de 0.9 ± 0.3 a 0.8 ± 0.2 al retirar de la formulación el PEG 2000 (concentración de 0 g), sin embargo, el tamaño de A y B no disminuyeron (Gráfica 16). Esta comparación se realizó con la muestra L11 y L6.

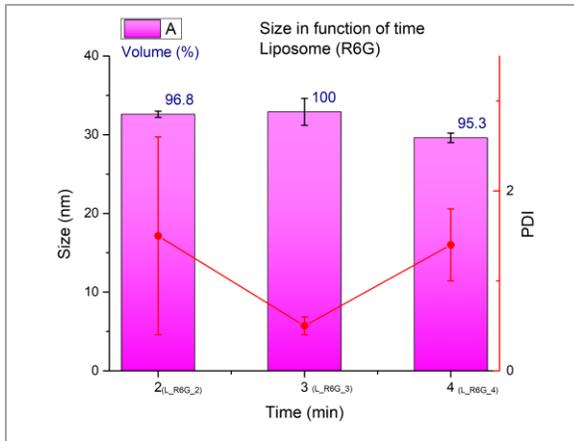


Gráfica 16. Diámetro y PDI en función de la concentración de PEG 2000 (muestras L6 y L11)

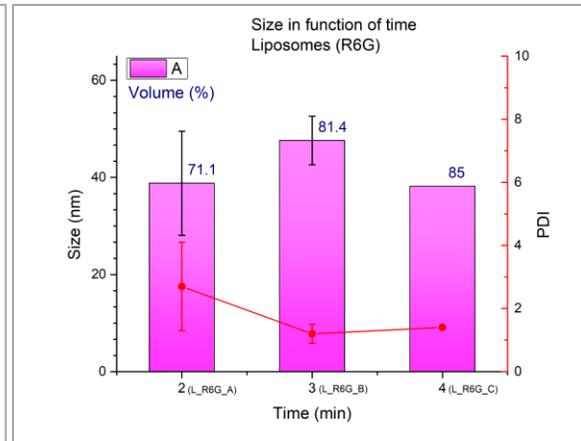
Las siguientes comparaciones se realizaron con muestras compuestas por fosfatidilcolina, y Rodamina 6G, preparadas a partir del método simultáneo con etanol.

Variable: Tiempo de sonicación (modo constante)

De las muestras con Rodamina 6G (L_R6G_2 a L_R6G_4) se tiene como variable el tiempo de sonicación: a 2 min, 3 min y 4 min (Gráfica 17). El índice de polidispersidad a 2, 3 y 4 min fue de 1.5 ± 1.1 , 1.1 ± 1 y 1.4 ± 0.3 respectivamente. Las muestras realizadas por el método simultáneo con etanol resultaron con diámetros de 32.6 ± 0.4 nm (volumen de 96.8 %) para 2 min de sonicación, 32.3 ± 1.6 nm (volumen de 98.3 %) a 3 min y 29.8 ± 0.5 nm (volumen de 94.7 %) a 4 min. En comparación con el método de hidratación, se obtuvieron poblaciones más homogéneas (el volumen de alguna población, ya sea A o B, es mayor al 90 %). Ante el aumento del tiempo de sonicación, en modo constante, el tamaño de partícula disminuyó.



Gráfica 17. Diámetro y PDI en función del tiempo de sonicación (muestras con R6G con modo constante: L_R6G_2, L_R6G_3 y L_R6G_4).



Gráfica 18. Diámetro y PDI en función del tiempo de sonicación (muestras con R6G con modo pulsado: L_R6G_A, L_R6G_B y L_R6G_C).

Variable: Tiempo de sonicación (modo pulsado)

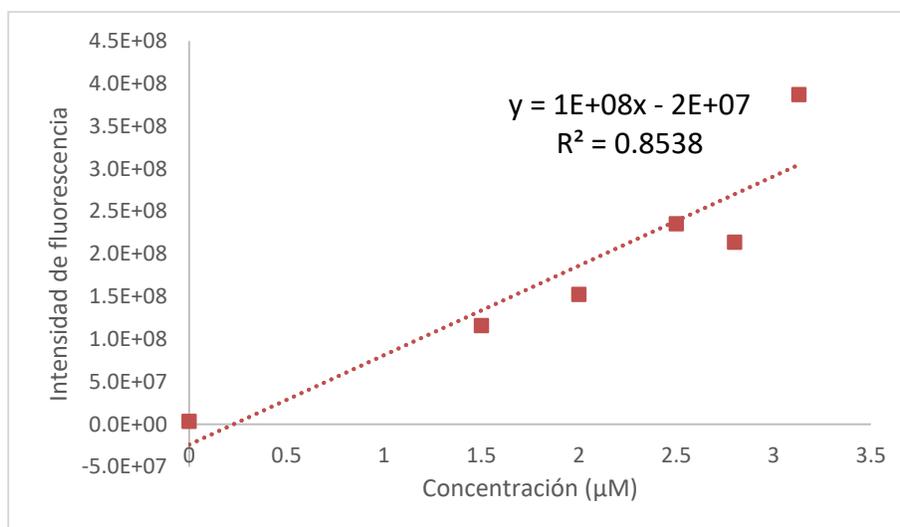
Las muestras L_R6G_A, L_R6G_B y L_R6G_C se sometieron a sonicación bajo las mismas condiciones a excepción del tiempo de exposición. Además, en comparación con las muestras L_R6G_2, L_R6G_3 y L_R6G_4, éstas se sometieron en modo pulsado (Gráfica 18). El volumen de la población A para cada muestra fue menor al 90 % (comparación de la Gráfica 17 y Gráfica 18). No obstante, el índice de polidispersidad se reduce al incrementar el tiempo de sonicación (de 2 a 4 min). Con la potencia al 30 %, en modo constante a 3 min de exposición mostró un diámetro A de 32.9 ± 1.7 nm y un PDI de 0.5 ± 0.1 , resultando una población monodispersa (muestra L_R6G_3).

Eficiencia de encapsulación de Rodamina 6G

La curva de calibración de Rodamina 6G se obtuvo mediante la técnica de intensidad de fluorescencia (por duplicado). Posteriormente se estimó la línea de tendencia que nos proporciona la relación de la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de Rodamina 6G (Gráfica 19). La ecuación de la recta fue:

$$y = 1E + 08x - 2E + 07$$

Ecuación 19



Gráfica 19. Curva de fluorescencia vs. Concentración de Rodamina 6G.

Retomando la tabla 3, el liposoma L_R6G_1 no se sometió a sonicación el cual tuvo una eficiencia de carga de 5.6 ± 0.6 % (Tabla 3). Al liposoma L_R6G_I se le aplicó la potencia del 30 %, a diferencia del resto (compuestos con R6G), resultando con %EE de 20.4 ± 3.7 %, es la muestra con mayor eficiencia de carga. Los liposomas a los que se les aplicó el ultrasonido en modo pulsado (muestras L_R6G_2, L_R6G_3 y L_R6G_4) superaron la eficiencia de encapsulación de los sonicados en modo constante (muestras L_R6G_A, L_R6G_B y L_R6G_C). Los liposomas sonicados en modo pulsado mostraron mayor %EE a medida que aumenta el tiempo de sonicación (Tabla 5).

Tabla 5. Eficiencia de encapsulación en función del tiempo de exposición (DF: factor duty).

Muestra	Tiempo de sonicación (min)	Tamaño de partícula A (nm)	PDI	Eficiencia de carga R6G (%)
Sin sonicación				
L_R6G_1	N/A	44.8 ± 5.7	0.9 ± 0.2	5.6 ± 0.6
Sonicación: modo constante, potencia al 20 %				
L_R6G_2	2	32.6 ± 0.3	1.5 ± 1.1	4.7 ± 0.2
L_R6G_3	3	32.9 ± 1.7	0.5 ± 0.1	6.8 ± 0.3
L_R6G_4	4	29.6 ± 0.6	1.4 ± 0.4	6.5 ± 0.3
Sonicación: modo pulsado, potencia al 20 %, DF de 20 %				
L_R6G_A	2	38.8 ± 10.7	2.7 ± 1.5	10.2 ± 0.8
L_R6G_B	3	47.6 ± 5	1.2 ± 0.3	14.5 ± 1.3
L_R6G_C	4	38.2	1.4	15.7 ± 0.6
Sonicación: modo pulsado, potencia al 30 %, DF de 20 %				
L_R6G_I	2	Población B: 1914	0.4	20.4 ± 3.7

10. Discusiones

De acuerdo con la teoría los fenómenos que se ven involucrados para reducir el tamaño como la fuerza de radiación, cavitación acústica, microturbulencias o microflujo y fuerzas de cizallamiento tuvieron lugar en la formación en el momento en que se introdujo la punta de titanio a la muestra y se aplicó la onda acústica. Investigaciones mostraron que las fuerzas de corte que oscilan alrededor de las burbujas de vapor formadas conllevan al fenómeno de cavitación, éste fenómeno de cavitación es el que permite la nucleación de las partículas resultando en más pequeñas (con radios menores a su radio crítico). Sin embargo, en esta investigación no explora el comportamiento de las partículas ante una onda acústica, no obstante, se examinaron las características de la sonda acústica aplicada a soluciones de lípidos para la formación de liposomas con tamaño menor a 200 nm y distribución de este monodisperso. La variación de potencia no mostró variaciones determinantes en el tamaño (ya sea mayores o menores a 200 nm) o PDI de la que se pueda inferir el impacto que tiene el aumento y disminución de la potencia. Se conoce que la potencia administrada está relacionada con la intensidad acústica y esta a su vez está dada por la presión acústica que caracteriza la amplitud de la onda sonora. Por lo que, al modificar la amplitud de la onda no se observaron resultados que puedan ser predecibles o determinantes para su replicación. Ahora bien, teniendo como variable el tiempo de sonicación, para los liposomas formados por hidratación, las muestras se volvieron más polidispersas (aumentó el índice de polidispersidad). También, ante el aumento del factor duty aumentó el índice de polidispersidad, sin embargo, no define la tendencia del tamaño de las partículas, es decir, las poblaciones A y B variaron de manera no lineal ante los cambios del ciclo de trabajo, no obstante, el factor duty se ve condicionado por la duración del pulso de la onda, por lo tanto, cuan más grande sea el ancho de pulso mayor distribución de tamaño hay entre las partículas. Por otro lado, una reducción en el tamaño de partícula se observó al retirar el polietilenglicol de la formulación. Poblaciones monodispersas resultaron de la aplicación ondas de manera constante, se entiende que la aplicación de esta onda de manera continua vuelve monodispersa la distribución de tamaño de partícula,

además de optimizar su tamaño (menor a 200 nm). Así mismo, aumentar el tiempo de exposición reduce el tamaño hasta alcanzar el mínimo (radio crítico). Con respecto a la eficiencia de carga, a una onda acústica aplicada de manera constante se le adjudica partículas más pequeñas (comparado con el modo pulsado) y a su vez menor concentración de R6G. Mientras que para los liposomas con mayor tamaño almacenan mayor cantidad de R6G. A pesar de la evaluación de los parámetros que definen la onda acústica en interacción con la solución de lípidos aún existe una brecha en la participación de los bioefectos involucrados para la formación de liposomas reproducibles y adecuados (monodispersos y menores a 200 nm de diámetro).

11. Conclusiones

La síntesis de liposomas por sonicación es un método experimental que mostró el beneficio de reducir el tamaño de estos. Sin embargo, la disminución del tamaño en la muestra no fue de manera uniforme para todas las pruebas.

El aumento o disminución en la potencia no mostró variaciones significantes en el tamaño y distribución de este, sin embargo, la %EE aumentó el doble al aumentar 10 % de la potencia.

La variación en el tiempo de exposición no mostró cambios en el tamaño, pero si en la distribución, para los liposomas vacíos el aumento de tiempo causó un mayor PDI. También, la %EE aumentó conforme aumentó el tiempo de sonicación.

Si se administra ultrasonido con potencia del 30 %, en modo constante a 3 min de exposición se obtiene población monodispersa con un diámetro menor a 200 nm. En contraste, por el modo pulsado mostró mayor índice de polidispersidad y %EE.

12. Bibliografía

1. Xu H, Li S, Liu YS. Nanoparticles in the diagnosis and treatment of vascular aging and related diseases. Vol. 7, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2022.
2. Nanocarriers: Drug Delivery System. Nanocarriers: Drug Delivery System. Springer Singapore; 2021.
3. Shah S, Dhawan V, Holm R, Nagarsenker MS, Perrie Y. Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. Vols. 154–155, Advanced Drug Delivery Reviews. Elsevier B.V.; 2020. p. 102–22.
4. Mendez R, Banerjee S. Sonication-based basic protocol for liposome synthesis. En: Methods in Molecular Biology. Humana Press Inc.; 2017. p. 255–60.
5. Yoon YI I., Kwon YS, Cho HS, Heo SH, Park KS oon, Park SG yu, et al. Ultrasound-mediated gene and drug delivery using a microbubble-liposome particle system. Theranostics. 2014;4(11):1133–44.
6. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: Classification, preparation, and applications. Nanoscale Res Lett. 2013;8(1).
7. Nguyen AT, Wrenn SP. Acoustically active liposome-nanobubble complexes for enhanced ultrasonic imaging and ultrasound-triggered drug delivery. Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2014;6(3):316–25.
8. El-Bacha T, Torres AG. Phospholipids: Physiology. En: Encyclopedia of Food and Health. Elsevier Inc.; 2015. p. 352–9.
9. Jiménez-Mancilla NP, Aranda-Lara L, Morales-Ávila E, Camacho-López MA, Ocampo-García BE, Torres-García E, et al. Electron transfer reactions in rhodamine: Potential use in photodynamic therapy. J Photochem Photobiol A Chem. el 15 de marzo de 2021;409.
10. Zehentbauer FM, Moretto C, Stephen R, Thevar T, Gilchrist JR, Pokrajac D, et al. Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc. 2014;121:147–51.
11. Cellular Key for Visible and Measurable Skin Rejuvenation PHOSPHOLIPON[®] 90 G LIPOID P 100, LIPOID H 100 Natural Phospholipids We make beauty natural.
12. pl90G_datasheet.
13. van Hoogevest P. Review – An update on the use of oral phospholipid excipients. Vol. 108, European Journal of Pharmaceutical Sciences. Elsevier B.V.; 2017. p. 1–12.

14. Toronto Research Chemicals. Toronto Research Chemical. Products for innovative research. 2023. PC.
15. D GG, Hongwei Zhang Editors S. Liposomes Methods and Protocols Third Edition Methods in Molecular Biology 2622 [Internet]. Disponible en: <http://www.springer.com/series/7651>
16. Shriki J. Ultrasound physics. Vol. 30, Critical Care Clinics. 2014. p. 1–24.
17. Powles AE, Martin DJ, Wells IT, Goodwin CR. Physics of ultrasound. Vol. 19, Anaesthesia and Intensive Care Medicine. Elsevier Ltd; 2018. p. 202–5.
18. Li Robert Ming-Der Chow Nalini Vadivelu Alan David Kaye J. An Evidence-Based Guide for Medical Practitioners Ultrasound Fundamentals.
19. Ultrasound Physics and Instrumentation 5th Edition Frank R.Miele.
20. Taha A, Ahmed E, Ismaiel A, Ashokkumar M, Xu X, Pan S, et al. Ultrasonic emulsification: An overview on the preparation of different emulsifiers-stabilized emulsions. Vol. 105, Trends in Food Science and Technology. Elsevier Ltd; 2020. p. 363–77.
21. Zagzebski JA. Essentials of Ultrasound Physics. 1st edition. Mosby, editor. United States of America: Mosby ; 1996. 1–220 p.
22. García Leopoldo, Corte Ma. Guadalupe, Jiménez Miguel A. El Ultrasonido Diagnóstico. Trascendental contribución al milenio. Meragraf. Vol. I. México; 2000.
23. Safari A, Koray Akdogan E. Piezoelectric and Acoustic Materials for Transducer Applications 1 2 3. 2008.
24. Crecraft D, Gergely S. Analog Electronics Circuits, Systems and Signal Processing- Butterworth-Heinemann. 2002;
25. Plonus M. Electronics and communications for scientists and engineers. 2001.
26. Dalecki D. Mechanical bioeffects of ultrasound. Vol. 6, Annual Review of Biomedical Engineering. 2004. p. 229–48.
27. Izadifar Z, Babyn P, Chapman D. Mechanical and Biological Effects of Ultrasound: A Review of Present Knowledge. Vol. 43, Ultrasound in Medicine and Biology. Elsevier USA; 2017. p. 1085–104.
28. Modarres-Gheisari SMM, Gavagsaz-Ghoachani R, Malaki M, Safarpour P, Zandi M. Ultrasonic nano-emulsification – A review. Vol. 52, Ultrasonics Sonochemistry. Elsevier B.V.; 2019. p. 88–105.
29. Jain A, Jain R, Jain S. Basic Techniques in Biochemistry, Microbiology and Molecular Biology Principles and Techniques [Internet]. Disponible en: <http://www.springer.com/series/8623>

30. OMNI SONIC RUPTOR 400.
31. Woodbury DJ, Richardson ES, Grigg AW, Welling RD, Knudson BH. Reducing liposome size with ultrasound: Bimodal size distributions. *J Liposome Res.* febrero de 2006;16(1):57–80.
32. Lapinski MM, Castro-Forero A, Greiner AJ, Ofoli RY, Blanchard GJ. Comparison of liposomes formed by sonication and extrusion: Rotational and translational diffusion of an embedded chromophore. *Langmuir.* el 6 de noviembre de 2007;23(23):11677–83.
33. Yamaguchi T, Nomura M, Matsuoka T, Koda S. Effects of frequency and power of ultrasound on the size reduction of liposome. *Chem Phys Lipids.* julio de 2009;160(1):58–62.
34. Silva R, Ferreira H, Little C, Cavaco-Paulo A. Effect of ultrasound parameters for unilamellar liposome preparation. *Ultrason Sonochem.* 2010;17(3):628–32.
35. Putri DCA, Dwiastuti R, Marchaban M, Nugroho AK. OPTIMIZATION OF MIXING TEMPERATURE AND SONICATION DURATION IN LIPOSOME PREPARATION. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Community.* el 30 de noviembre de 2017;14(2):79–85.
36. Huang X, Caddell R, Yu B, James Lee L. Ultrasound-enhanced Microfluidic Synthesis of Liposomes Microfluidic electroporation View project Translation Science of Leukemia-characterization, novel therapeutics, epigenetics View project [Internet]. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/42440857>
37. AFA-Liposome™ Formation: Phospholipon 90G M220 130µL. Disponible en: <http://covarisinc.com/resources/protocols/>
38. Awad NS, Paul V, Mahmoud MS, Al Sawaftah NM, Kawak PS, Al Sayah MH, et al. Effect of Pegylation and Targeting Moieties on the Ultrasound-Mediated Drug Release from Liposomes. *ACS Biomater Sci Eng.* el 13 de enero de 2020;6(1):48–57.
39. Rieth MD, Lozano A. Preparation of DPPC liposomes using probe-tip sonication: Investigating intrinsic factors affecting temperature phase transitions. *Biochem Biophys Rep.* el 1 de julio de 2020;22.
40. AlSawaftah NM, Awad NS, Paul V, Kawak PS, Al-Sayah MH, Hussein GA. Transferrin-modified liposomes triggered with ultrasound to treat HeLa cells. *Sci Rep.* el 1 de diciembre de 2021;11(1).
41. Richardson ES, Pitt WG, Woodbury DJ. The role of cavitation in liposome formation. *Biophys J.* el 15 de diciembre de 2007;93(12):4100–7.
42. Barba AA, Bochicchio S, Lamberti G, Dalmoro A. Ultrasonic energy in liposome production: Process modelling and size calculation. *Soft Matter.* el 21 de abril de 2014;10(15):2574–81.

43. Wrenn SP, Small E, Dan N. Bubble nucleation in lipid bilayers: A mechanism for low frequency ultrasound disruption. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* abril de 2013;1828(4):1192–7.

13. Anexo: Abreviaciones y abreviaturas.

nm: nanómetros

LNPs: nanopartículas basadas en lípidos

SLNs: nanopartículas sólidas-lipídicas

NLCs: acarreadores con nanoestructura lipídica

SNEDDS: sistemas autonanoemulsificantes de entrega de fármacos

DDS: sistema de liberación de fármaco

EPR: efecto de permeabilidad mejorada y retención

PEG: polietilenglicol

PLA: ácido poliláctico

PLGA: poliácido láctico-co-glicólico

PVA: acetato de polivinilo

DODAC: cloruro de dimetildioleilamonio o catión 2OLR.

DOTAP: dioleoil trimetil amonio propano

DSPC: diestearoil fosfatidilcolina

DPPG: dipalmitoil fosfatidilglicerol

DPPC: dipalmitoil fosfatidilcolina

DPPA: dipalmitoil ácido fosfatídico

DMPC: dimiristoilo fosfatidilcolina

DPPS: dipalmitoil fosfatidilserina

R: rodamina

PS: fotosensibilizador

TFD: terapia fotodinámica

R6G: rodamina 6G o rodamina 590

PL90G: phospholipon ® 90G o phospholipon ® 90NG

PC: fosfatidilcolina

MLVs: vesículas multilamelares

SUVs: vesículas unilamelares pequeñas

LUVs: vesículas unilamelares grandes

CD: liposomas congelados-descongelados

p : presión acústica

Pa: Pascal

ρ : densidad

v : velocidad del sonido

m : masa

V : volumen

f : frecuencia

T : periodo

λ : longitud de onda

P : potencia acústica

I : intensidad acústica

A : área de la sección transversal

J: Joules

W: Watts

HIU: ultrasonido de alta intensidad

LFUS: ultrasonido de baja frecuencia

PD o PW: ancho de pulso o duración del pulso

N_c : número de ciclos

PRP: periodo de repetición del pulso

PRF: frecuencia de repetición del pulso

DF: ciclo de trabajo o factor duty

IM: índice mecánico

UE (ing): ultrasonic emulsification /emulsificación ultrasónica

MDDS (ing): mean droplet diameter size / tamaño promedio del diámetro de la burburja

p : presión exterior

R: radio

p_B : presión interior

γ : tensión superficial

kDa: kilodalton

DLS: dispersión dinámica de la luz

E: energía

Δt : Tiempo de activación del ultrasonido

AFA: Adaptive Focused Acoustics

PDI: índice de polidispersidad

PSA: analizador de tamaño de partícula

BPF (ing): bilayer phospholipid fragments / mecanismo de la fragmentación uniforme

DSC (ing): differential scanning calorimetry / calorimetría diferencial de barrido

TEM: microscopio electrónico de transmisión

%EE: eficiencia de encapsulación

