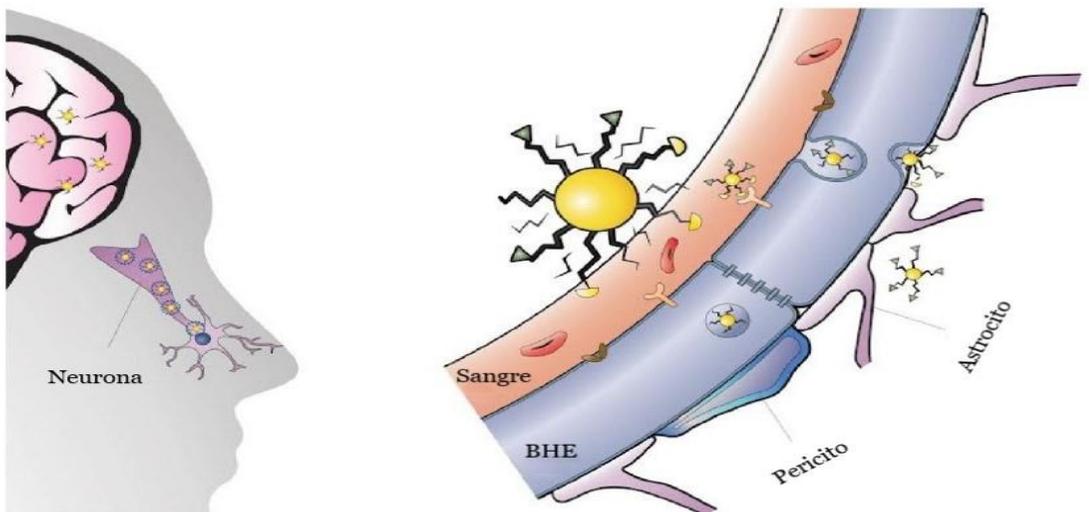




TESIS DOCTORAL

DISEÑO DE SISTEMAS NANOPARTICULARES LIPÍDICOS PARA VECTORIZACIÓN AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL: NUEVAS PROPUESTAS DE ADMINISTRACIÓN



Elena García Esteban
Sevilla, 2018



FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: galenica@us.es
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

Memoria presentada por Elena García Esteban para optar al Título de Doctora por la
Universidad de Sevilla

Fdo.: Elena García Esteban

Vº Bº

Los directores del trabajo

Fdo.: Dra. Mª Luisa González Rodríguez
Doctora en Farmacia
Catedrática de Universidad
Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica

Fdo.: Dra. Mª José Cózar Bernal
Doctora en Farmacia
Departamento de Farmacia y Tecnología
Farmacéutica

Fdo.: Dr. Antonio M. Rabasco Álvarez
Doctor en Farmacia
Catedrático de Universidad
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica



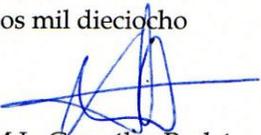
C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: galenica@us.es
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, Doctora en Farmacia, Catedrática de Universidad del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla, MARÍA JOSÉ CÓZAR BERNAL, Doctora en Farmacia, y ANTONIO MARÍA RABASCO ÁLVAREZ, Doctor en Farmacia, Catedrático de Universidad, del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICAN: Que la memoria de investigación titulada “**Diseño de sistemas nanoparticulares lipídicos para vectorización al Sistema Nervioso Central: Nuevas propuestas de administración**”, elaborada por la Licenciada en Farmacia Doña Elena García Esteban, ha sido realizada bajo su dirección y reúne los requisitos para su defensa pública ante el tribunal que ha de juzgarla.

Para que conste, y a petición de la interesada, firman el presente en Sevilla, a veintiuno de septiembre de dos mil dieciocho


Fdo.: M.L. González Rodríguez


Fdo.: M.J. Cózar Bernal


Fdo.: A.M. Rabasco Álvarez



C/ Profesor García González, 2
41012 Sevilla (España)
Teléfono: 954 55 67 26
E-mail: galenica@us.es
<http://departamento.us.es/tecnofarma/>

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

MARÍA LUISA GONZÁLEZ RODRIGUEZ, Directora del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla,

CERTIFICA: Que la memoria de investigación titulada “**Diseño de sistemas nanoparticulares lipídicos para vectorización al Sistema Nervioso Central: Nuevas propuestas de administración**”, realizada por Doña Elena García Esteban, ha sido dirigida por los doctores María José Cózar Bernal, Antonio María Rabasco Álvarez y la profesora que suscribe, habiéndose realizado en este departamento, cumpliendo con todas la normas vigentes.

Sevilla, a 21 de septiembre de 2018,



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y
TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Fdo.: Dra. María Luisa González Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Parece que esto llega a su fin. Bien digo parece, porque si algo me ha enseñado esta Tesis Doctoral es que todo puede ponerse “muy negro” cuando menos lo esperas. Me ha enseñado que los caminos de rosas no existen, que quién algo quiere algo le cuesta y que para alcanzar mis metas tengo que luchar, que con constancia y esfuerzo puedo conseguir lo que me proponga. Gracias por esta lección, sé que me servirá para afrontar todo lo que me depare la vida.

Quiero agradecer a todas y cada una de esas personas que me han apoyado y animado para que no tirara la toalla cuando las fuerzas flaqueaban, y a todas aquellas que han hecho más fácil este duro camino.

A mis tutores, María Luisa González Rodríguez, Antonio María Rabasco Álvarez y María José Cózar Bernal por la oportunidad que me han brindado formando parte de su grupo de investigación. Su dedicación y guía han sido fundamental para finalizar con éxito la tesis que tienen en sus manos. Gracias por la dedicación y todos los buenos momentos vividos.

A todos mis compañeros del grupo de investigación: Carmen, Oliva, Nabila, Ana y Sergio, por acompañarme en todo momento en este camino, por estar ahí en los momentos de agobio y desazón, por las largas horas frente al HPLC y por los miles de momentos de risas vividos.

No olvido a aquellos compañeros con los que comenzó esta aventura: Carlitos, Diego, Lina, Calogero, Chiara, Atilio y muchos otros que han ido pasando a lo largo de estos años: Ana Novak, David, Francesca. Gracias a todos por hacer más amenas las horas de laboratorio y por haber tenido la oportunidad de vivir esta experiencia con vosotros.

A todos los compañeros del departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, por todas las horas pasadas en sus instalaciones colaborando con el buen clima de trabajo y el compañerismo.

Al departamento de Bioquímica, especial mención a Ana Espinosa y Nabil Hajji, por su gran aportación en los estudios de cultivos celulares. Gracias por aportar vuestros conocimientos y por el interés mostrado en este proyecto.

A mis padres, Jose María y Rosario por el apoyo incondicional en todo momento, por escucharme y animarme a seguir adelante en los momentos difíciles. Por enseñarme a ser constante en todos mis propósitos.

A Julián, mi compañero de viaje, por apoyarme en todos mis proyectos por transmitirme su alegría y optimismo, por hacer fácil lo que parece imposible y por demostrarme que juntos podemos conseguir todo lo que nos propongamos. Gracias por estar siempre ahí.

Muchas gracias a todos por hacer posible que esta tesis llegue a su fin.

ÍNDICE GENERAL

PRÓLOGO	1
INTRODUCCIÓN GENERAL	3
BLOQUE I. Funcionalización de liposomas para vectorizar moléculas activas a nivel del Sistema Nervioso Central.....	19
BLOQUE II. Diseño, desarrollo y caracterización de nanosistemas lipídicos de levodopa administrados por vía intranasal para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.....	101
BIBLIOGRAFÍA	327
ANEXO I.....	375
ANEXO II.....	375
ABREVIATURAS.....	385
PUBLICACIONES.....	392

PRÓLOGO

Las enfermedades neurodegenerativas están adquiriendo un gran protagonismo en los últimos tiempos, debido al envejecimiento de la población, su alta prevalencia y el elevado coste social que suponen.

A pesar de los grandes avances realizados en los últimos años en el diseño de sistemas de administración de fármacos capaces de acceder al Sistema Nervioso Central, continúa siendo un desafío el desarrollo de un sistema de vectorización de fármacos a nivel cerebral, debido a los problemas que presenta la barrera hematoencefálica para poder ser atravesada.

Debido a esto, el presente trabajo de investigación está centrado en el diseño, desarrollo y caracterización de sistemas lipídicos para vectorizar fármacos hacia el Sistema Nervioso Central mediante diferentes mecanismos de transporte activo y pasivo que permitan el acceso del fármaco a través de esta barrera. Estos sistemas permiten la administración del fármaco mediante técnicas no invasivas, favoreciendo el direccionamiento del fármaco al lugar de acción, pudiéndose reducir la dosis de administración, así como sus efectos adversos.

En el bloque I se ha diseñado un sistema lipídico que permitiría la vectorización de fármacos a nivel cerebral mediante un mecanismo de transporte activo o transporte mediado por receptor. Se trata del desarrollo de inmunoliposomas, constituidos por liposomas que contienen el fármaco incluido en el interior y a su vez se encuentran anclados a un anticuerpo monoclonal, el cual se unirá a un receptor específico de las células endoteliales de la barrera hematoencefálica. Este sistema de vectorización va a permitir que fármacos incapaces de atravesar esta membrana cerebral, se unan a receptores específicos de las células endoteliales cerebrales y transporten el fármaco hacia el cerebro mediante endocitosis mediada por receptor.

En el bloque II se ha diseñado un sistema lipídico que permite la vectorización de levodopa a nivel cerebral mediante la administración intranasal de insertos liofilizados mediante un mecanismo de transporte pasivo, que permita el acceso directo del fármaco desde la cavidad nasal hasta el Sistema Nervioso Central, con una futura posible aplicación en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson.

INTRODUCCIÓN GENERAL

ÍNDICE INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS.....	7
1.2. PROBLEMAS EN LA VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS A NIVEL DEL SNC.....	8
1.3. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA	8
1.3.1. Localización y composición.....	8
1.3.2. Función fisiológica.....	11
1.3.3. Mecanismos de transporte de fármacos hacia el SNC	11
1.4. ESTRATEGIAS PARA ADMINISTRAR FÁRMACOS A NIVEL CEREBRA.....	12
1.4.1. Técnicas invasivas.....	13
1.4.2. Técnicas no invasivas.	14
1.5. ACTUALIDAD EN LA INVESTIGACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON.....	17

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Diferentes regiones del cerebro afectadas según la enfermedad neurológica.....	7
Figura 2. Representación esquemática de los componentes de la BHE.....	9
Figura 3. Mecanismos de transporte de moléculas hacia el SNC.....	11
Figura 4. Representación esquemática de las estrategias para la administración de fármacos hacia el SNC.	13

1.1. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

Las enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Alzheimer y la enfermedad de Parkinson, representan un problema de gran importancia en el ámbito social, médico y económico, ya que su prevalencia está aumentando en los últimos años. Constituyen actualmente, junto con las enfermedades del sistema circulatorio y el cáncer, la principal causa de mortalidad (García-Ramos y cols., 2016).

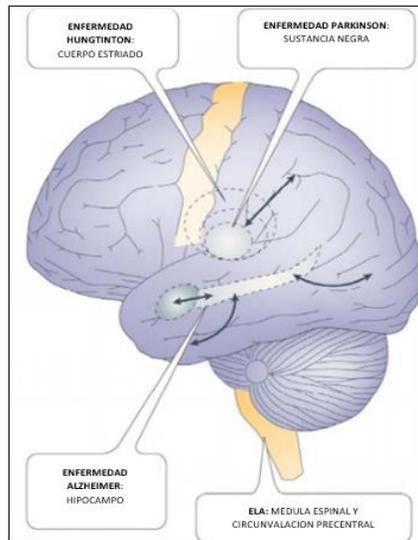


Figura 1. *Diferentes regiones del cerebro afectadas según la enfermedad neurológica (López-Barneo, 2012).*

Este tipo de enfermedades se caracteriza por una disminución de células neurológicas en diferentes partes del cerebro (Zarranz, 2004). En la figura 1 se señalan las principales regiones donde se cree que tienen su origen algunas de estas enfermedades, como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, Huntington y esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Aunque, generalmente, la etiología de estas enfermedades es conocida, la administración de fármacos capaces de alcanzar el Sistema Nervioso Central (SNC) sigue siendo un desafío, debido principalmente a los problemas que presenta la barrera hematoencefálica (BHE) para ser atravesada, constituyendo esto un reto en investigación.

1.2. PROBLEMAS EN LA VECTORIZACIÓN DE FÁRMACOS A NIVEL DEL SNC

El cerebro es un órgano muy delicado y vulnerable que se encuentra altamente protegido gracias a diversos mecanismos, impidiendo así el paso de sustancias extrañas. Estos mecanismos de defensa hacen que muchos fármacos sean ineficaces en el tratamiento de enfermedades cerebrales, debido a su incapacidad de acceso al SNC (Misra y cols., 2003).

En concreto, este órgano se encuentra protegido de los agentes externos por tres barreras: la BHE, la barrera sangre-líquido cefalorraquídeo y la barrera sangre-aracnoides. A su vez, estas barreras limitan el transporte de fármacos a su interior. Como la BHE es la de mayor superficie, puede considerarse como la barrera más importante para el transporte de moléculas activas al cerebro (Misra y cols., 2003; Loch-Neckel y Koeppe, 2010). Se ha demostrado que sólo pequeñas moléculas, con un peso molecular inferior a 600 Dalton pueden atravesar la membrana mediante un proceso de transporte paracelular o transcelular, dependiendo de su lipofilia (Pardridge, 1999). Por el contrario, fármacos de peso molecular más elevado (superior a 600 Dalton), como proteínas, péptidos o ADN, no son capaces de hacerlo (Pardridge, 2002).

1.3. LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

1.3.1. Localización y composición

La BHE es una barrera membranosa única que separa el tejido cerebral de la sangre, localizándose en la interfase de ambos (Misra y cols., 2003).

Está constituida por una monocapa de células endoteliales unidas entre sí por uniones estrechas, así como por los pies de los astrocitos, neuronas perivasculares y pericitos (figura 2). Estas células, junto con la membrana basal, conforman la “unidad neurovascular” y son las responsables de la integridad de la BHE (Weiss y cols., 2008).

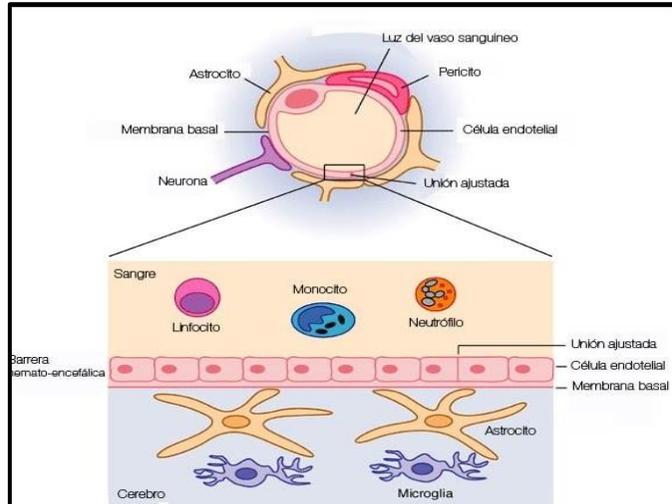


Figura 2. Representación esquemática de los componentes de la BHE (<http://www.guiasdeneuro.com.ar/wpcontent/uploads/2009/03/barrera.jpg>).

El elemento clave que determina las propiedades de la BHE son las células endoteliales, que comparten una serie de características morfológicas y funcionales que las diferencian de los endotelios del resto de los vasos y explican la propiedad de aislamiento sanguíneo del tejido nervioso. Estas características son:

- Ausencia de poros intracelulares y de vesículas pinocíticas.
- Se encuentran estrechamente unidas y existen bandas o zonas *occludens*, que cierran herméticamente el espacio intercelular impidiendo cualquier comunicación con el espacio extracelular vascular.
- Elevado número de mitocondrias por cada célula endotelial, que indica una elevada actividad metabólica con relación a otros endotelios.
- Existencia de una lámina basal simple que rellena el espacio entre el endotelio y los pies gliales o astrocitos (Pascual-Garvi y cols., 2004).

El hecho de que las células se encuentren fusionadas previene el transporte paracelular de las moléculas entre las células endoteliales. Tres moléculas de naturaleza proteica son las que intervienen fundamentalmente en la composición

de estas uniones: claudinas, ocludinas y moléculas de adhesión a las uniones, siendo mantenidas por otras proteínas citoplasmáticas (Nakagawa y cols., 2009). Además de estas estructuras de unión, las células endoteliales cerebrales disponen de otras moléculas de adhesión celular, que se localizan cerca de la región basolateral, denominadas cadherinas, y que interactúan unas con otras cuando está presente el ión calcio (Cózar-Bernal y cols., 2012).

Las células endoteliales del cerebro se encuentran altamente polarizadas y muestran una baja actividad pinocítica, pero presentan diferentes mecanismos de transporte activo que favorecen la homeostasis en el cerebro. Asimismo, estas células también contienen altas concentraciones de P-glicoproteína, una proteína ATP-dependiente que transporta un amplio rango de fármacos fuera del cerebro e inhibe la penetración de moléculas de elevado peso molecular (superior a 400 Dalton) e hidrofóbicas hacia el interior del mismo por transporte activo desde la sangre (Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

Adicionalmente, existe una membrana basal, constituida por colágeno tipo IV, fibronectina y laminina, que forma un revestimiento alrededor del endotelio. También se identifica una capa discontinua de pericitos, células en forma de araña cuyas prolongaciones citoplasmáticas siguen su curso circunferencial alrededor del capilar (Fernández y cols., 2011).

Se conoce que los capilares sanguíneos cerebrales se encuentran envueltos por unas prolongaciones citoplasmáticas aplanadas de un tipo de células gliales llamadas astrocitos. Dichas células, con forma de estrella, presentan múltiples prolongaciones que poseen expansiones similares a los pies aplanados y que envuelven vasos sanguíneos y sinapsis (Bernacki y cols., 2008).

Gracias a la interacción entre los astrocitos y la lámina basal del capilar, las células endoteliales se adhieren entre sí mediante uniones estrechas y sellan el espacio extracelular cerebral impidiendo el paso de moléculas o proteínas que estén por encima de un valor determinado de peso molecular (Rubin y Staddon, 1999).

1.3.2. Función fisiológica

Su principal función es mantener la homeostasis de las neuronas y las células gliales del cerebro, es decir, mantener un medio extracelular estable para que sea posible la transmisión sináptica.

La BHE es la responsable de que no haya interferencias en la transmisión sináptica entre neuronas mediante el intercambio de moléculas e iones entre la sangre y el espacio extracelular. Además, esta barrera permite el aislamiento del espacio extracelular con respecto a la sangre, ya que ésta experimenta cambios continuos en su composición, y bloquea el acceso de sustancias tóxicas endógenas o exógenas (Pascual-Garvi, 2004).

1.3.3. Mecanismos de transporte de fármacos hacia el Sistema Nervioso Central

La BHE es permeable a moléculas pequeñas y lipofílicas, como el oxígeno, dióxido de carbono y nicotina, mientras que moléculas de elevado tamaño, superiores a 400-600 Dalton, no pueden atravesarla espontáneamente por difusión, sino que deben hacerlo a través de sistemas de transporte específicos o por sistemas de endocitosis mediados por receptor (por ejemplo: leptina, transferrina o insulina). Como ejemplos de transportes específicos encontramos los sistemas usados para transporte de glucosa y aminoácidos esenciales (Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

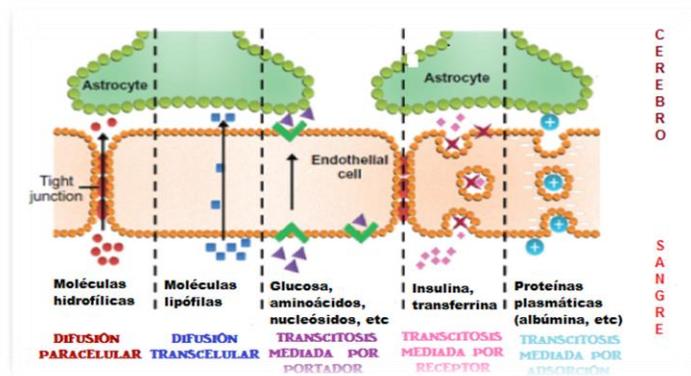


Figura 3. Mecanismos de transporte de moléculas hacia el SNC (Ramos-Cabrer y cols., 2013).

Como se observa en la figura 3, existen diferentes mecanismos de transporte para que las moléculas puedan acceder al cerebro, destacando la difusión paracelular, difusión transcelular, transporte mediado por portadores, transcitosis mediada por receptor y transcitosis mediada por adsorción.

La **difusión paracelular** es utilizada por moléculas de naturaleza hidrófila, de pequeño tamaño molecular y que puedan difundir a través de las uniones estrechas presentes en las células endoteliales (Ballabh y cols., 2003).

Por su parte, las moléculas lipófilas de pequeño tamaño molecular (< 400 Dalton) utilizan la **difusión transcelular** para entrar en el cerebro (Boer y Gaillar, 2007).

El mecanismo de **transcitosis mediada por portador** lo aprovechan pequeñas moléculas como glucosa, aminoácidos y bases púricas con el fin de proveer de nutrientes al cerebro. Dichos portadores forman parte de las estructuras de membrana y son altamente selectivos para dichas moléculas.

Los procesos de **transcitosis mediada por receptor o por adsorción** son los únicos mecanismos por los cuales moléculas de gran tamaño molecular, como anticuerpos y proteínas, pueden acceder al Sistema Nervioso Central (Pardridge, 2005).

1.4. ESTRATEGIAS PARA ADMINISTRAR FÁRMACOS A NIVEL CEREBRAL

Para las moléculas que no pueden ser transportadas por los mecanismos explicados en el apartado anterior, existen diferentes estrategias que permiten la entrada de fármacos al cerebro para el tratamiento de ciertas patologías (Khan y cols., 2017).

Como queda recogido en la figura 4, se han investigado una amplia variedad de estrategias para permitir la vectorización y liberación de fármacos a nivel cerebral.



Figura 4. Representación esquemática de las estrategias para la administración de fármacos hacia el SNC (Poupot y cols., 2018).

Globalmente, se barajan dos estrategias principales, basadas en técnicas invasivas y técnicas no invasivas.

1.4.1. Técnicas invasivas

Como se recoge en la figura 4, una de las alternativas dentro de las técnicas invasivas consiste en la administración directa de una **inyección intraparenquimatosa** de la sustancia deseada (Ramos-Cabrer y Campos, 2013). El principal inconveniente de este método es el coeficiente de difusión limitado de las moléculas, asociado al lento movimiento de los componentes en el cerebro. Se recuerda que la difusión del fármaco a nivel cerebral depende de la concentración en biofase del fármaco liberado desde su formulación, el peso molecular, la liposolubilidad, la polaridad y la afinidad por los tejidos (Groothuis, 2000). Otra técnica está basada en el uso de implantes, como bombas osmóticas o dispositivos convencionales mejorados para la infusión continua del fármaco (Loch-Neckel y Koep, 2010).

Existe la posibilidad de que en lugar de atravesar la barrera, se realice una **alteración de la BHE**, produciendo una interrupción de forma temporal de la

misma mediante la apertura de las uniones estrechas de las células endoteliales. La interrupción transitoria se puede lograr usando sustancias osmóticamente activas, como manitol, arabinosa u otras soluciones hipertónicas. Esta técnica se usa en la práctica clínica diaria para la liberación de quimiorreceptores en pacientes con tumores cerebrales. Sin embargo, la apertura de la barrera es un procedimiento peligroso, ya que puede causar cambios hidroelectrolíticos y suprimir los mecanismos que regulan la entrada de sustancias, permitiendo el paso de sustancias tóxicas al cerebro (Loch-Neckel y Koeep, 2010; Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

Estas técnicas, en muchos casos, implican cirugía, son invasivas, arriesgadas y no se pueden utilizar cuando el fármaco tiene que llegar a zonas críticas del cerebro. Por esta razón, se continúa hoy avanzando en el desarrollo de métodos alternativos no invasivos en los que el fármaco acceda al cerebro sin alterar la BHE.

1.4.2. Técnicas no invasivas

La primera opción se centró en la **modificación química de los fármacos**, en la cual se modifica su estructura química para facilitar el paso a través de la membrana (por ejemplo, la adición de cadenas alifáticas para incrementar su lipofilia) (Chen y cols., 2004).

Otra posibilidad es el uso de **profármacos**, es decir, moléculas que en su estado inicial no son activas, pero cuando atraviesan la BHE sufren una transformación química o enzimática y se vuelven activos (Lambert, 2000).

La **administración intranasal** constituye una alternativa emergente entre las técnicas no invasivas, que permite el paso de grandes moléculas cargadas hacia el cerebro (Born y cols., 2002; Khan y cols., 2017). Estudios recientes han revelado el éxito de administrar oxitocina por vía intranasal en el tratamiento del autismo, mejorando el comportamiento social y emocional de los individuos autistas (Guastella y cols., 2010). Asimismo, Shingaki y cols. (2010) han demostrado que la administración intranasal de metotrexato produce una reducción de los tumores

cerebrales en un 80%, haciendo que esta vía sea una opción atractiva para la administración de fármacos a nivel cerebral.

Otra forma de vectorizar un fármaco a nivel cerebral consiste en la formulación de **nanopartículas**, que se obtienen a partir de polímeros o lípidos, y pueden incorporar cantidades relativamente elevadas de molécula activa en su estructura para ser liberadas en el SNC. El uso de nanopartículas permite el acceso de principios activos que normalmente no atraviesan esta membrana, enmascarando así sus características fisicoquímicas mediante la encapsulación de estos sistemas. El uso de nanopartículas está adquiriendo gran relevancia en el tratamiento de las enfermedades del SNC como gliomas, enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Saraima y cols., 2016) debido a su gran capacidad para vectorizar fármacos hacia el lugar de acción, reduciendo así la toxicidad y los efectos secundarios (Koo y cols., 2006). Neves y cols. (2016) incluyeron la molécula resveratrol, químicamente inestable, en nanopartículas recubiertas con apolipoproteína E para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer favoreciendo la vectorización del fármaco hacia el SNC. Por otro lado, a través de la realización de estudios *in vivo* se ha demostrado la capacidad de las nanopartículas para mantener la integridad del fármaco.

La **terapia génica cerebral** se basa en la introducción de ácidos nucleicos en el tejido nervioso, cuya expresión pueda resultar de utilidad terapéutica. Mediante la terapia génica no invasiva, este material genético se introduce indirectamente por vía sanguínea, evitando su inyección directa en el parénquima cerebral y el daño de la BHE. Este tipo de terapia supone nuevas y excitantes perspectivas para el tratamiento de numerosas enfermedades neurológicas, para las cuales no existen tratamientos farmacológicos efectivos. Los estudios ya realizados en animales resultan altamente prometedores y es probable que, en los próximos años, den lugar a procedimientos de terapia génica útiles y seguros para su uso en pacientes (Brito-Armas y cols., 2011). La terapia génica ha sido aplicada en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En cultivos primarios de neuronas piramidales de hipocampo de rata se ha sobreexpresado la proteína calbindina D28K, obteniéndose

altos rendimientos. Esta proteína es capaz de unirse al ión calcio modulando sus concentraciones citoplasmáticas. La sobreexpresión de esta proteína confirió protección a los cultivos frente a estímulos citotóxicos como el fragmento 25-35 del péptido beta-amiloide (Kook y cols., 2014). Para la enfermedad de Parkinson se ha empleado la terapia sustitutiva con levodopa y los implantes de células dopaminérgicas. Así, las células hiperactivas del núcleo subtalámico son consideradas como células diana para la inserción del gen de la descarboxilasa glutámica ácida (GAD), responsable de la producción del neurotransmisor inhibitorio GABA, obteniéndose como resultado un funcionamiento más normal de la actividad de la red cerebral (Bartus y cols., 2014). También se han realizado estudios *ex vivo*, con trasplantes de células capaces de producir dopamina o de secretar factores de crecimiento o neurotrofinas (BDNF, GDNF) que actúan como agentes neurotróficos, activando rutas de supervivencia celular en las neuronas afectadas (Pasquarelli y cols., 2017).

Una de las propuestas más versátil y atractiva para la liberación de fármacos hacia el parénquima cerebral implica el uso de **inmunoliposomas**, los cuales están constituidos por un fármaco encapsulado en el interior de un liposoma, al cual se encuentra anclado mediante conjugación a un ligando, que en este caso va a ser un anticuerpo monoclonal, que se unirá a un receptor específico localizado en las células endoteliales de la BHE (Groothuis, 2000; Cózar-Bernal y cols., 2012).

Se trata de un transporte mediado por receptores, los cuales se unen a ligandos de receptores específicos endógenos o anticuerpos monoclonales (mAb) anclados en la superficie del portador, de manera que son capaces de atravesar la BHE como verdaderos "**Caballos de Troya moleculares**" (Pardridge, 2007; Gabathuler, 2010; Pardridge, 2017). Este mecanismo de endocitosis mediado por receptor es la vía de entrada de moléculas al tejido cerebral. En el proceso, la unión ligando-receptor puede producirse por la conjugación directa del fármaco al ligando, o bien utilizar un sistema vector que encapsule al fármaco, y acoplar el ligando en la superficie exterior de dicho vector. El desarrollo de inmunoliposomas tiene gran relevancia en la terapia contra el cáncer, debido a su capacidad para vectorizar el fármaco hacia

el lugar de acción. Kuesters y cols. (2010) desarrollaron liposomas catiónicos funcionalizados con el anticuerpo monoclonal recombinante, bevacizumab, empleado en el tratamiento del cáncer colorrectal metastásico combinado con 5-fluorouracilo, produciendo la inhibición de la angiogénesis y el crecimiento tumoral. El desarrollo de inmunoliposomas en el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas es un campo prometedor en vías de desarrollo. Autores como Loureiro y cols. (2015) han desarrollado inmunoliposomas constituidos por liposomas pegilados, funcionalizados con dos anticuerpos para el suministro de fármacos hacia el cerebro, demostrando su capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

Esta prometedora estrategia para dirigir fármacos al cerebro y así contribuir al desarrollo de tratamientos efectivos para enfermedades del SNC se ha llevado a cabo en este proyecto de investigación y se irá describiendo detalladamente a lo largo de la memoria presentada.

1.5. ACTUALIDAD EN LA INVESTIGACIÓN EN LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

Debido al incremento de las enfermedades neurodegenerativas en los últimos años son numerosos los estudios realizados en la actualidad para paliar este problema de gran índole. La nanotecnología y los sistemas de administración de fármacos nanométricos se siguen desarrollando intensamente, mostrando resultados favorables en el campo de la neuroprotección. El diseño de sistemas de administración de fármacos capaces de atravesar la BHE y actuar en la enfermedad de Parkinson ha sido estudiado ampliamente en los últimos años. Haney y cols. (2015) han desarrollado un nuevo sistema de administración de fármacos basado en exosomas cargados de catalasa, enzima con elevada capacidad antioxidante, para tratar la enfermedad de Parkinson. En sus estudios se detectó una cantidad considerable de exosomas en el cerebro de los ratones con EP tras su administración por vía intranasal, proporcionando un significativo efecto neuroprotector. Zeevalk y cols. (2010) desarrollaron liposomas que contienen glutatión y se observó que era eficaz en el mantenimiento del glutatión intracelular

y producía neuroprotección de las células neuronales mesencefálicas. También se han diseñado nanopartículas lipídicas sólidas capaces de encapsular bromocriptina para evaluar su efecto antiparkinsoniano. Estas nanopartículas mostraron una liberación prolongada del fármaco durante 48 horas, dando un resultado favorable en ratas hemiparkinsonianas (Esposito y cols., 2008). También se han formulado nanopartículas de quitosano encapsuladas con bromocriptina mediante el método de gelificación iónica para aplicación intranasal (Md y cols., 2014). Se observó que la degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas en ratones tratados con haloperidol se revirtió con nanopartículas de quitosano cargadas con bromocriptina y se encontró que era efectiva en el tratamiento de la EP (Md y cols., 2014). Se observó que el suministro cerebral de estas nanopartículas se mejoró después de la conjugación de nanopartículas. El efecto terapéutico de la administración nasal de nanopartículas conjugadas con péptido de urocortina se demostró mediante el aumento del suministro cerebral en ratas hemiparkinsonianas (Wen y cols., 2011). Se formularon nanopartículas mucoadhesivas de quitosano cargadas con hidrocloreuro de ropinirol para la administración intranasal de fármacos para el tratamiento de la EP. Después de la administración intranasal de nanopartículas de quitosano cargadas con hidrocloreuro de ropinirol, se logró un perfil de liberación sostenida después de aproximadamente 18 h y se observó una acumulación cerebral mejorada en comparación con la solución de clorhidrato de ropinirol (Jafarih y cols., 2014). Loureiro y cols. (2015) desarrollaron una formulación de liposomas unidos a un anticuerpo modificado, con capacidad para unirse activamente a un receptor de la BHE, liberando el fármaco justo en la proximidad de los receptores para proporcionar la penetración del fármaco en el cerebro.

BLOQUE I

**FUNCIONALIZACIÓN DE LIPOSOMAS PARA VECTORIZAR
MOLÉCULAS ACTIVAS A NIVEL DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL**

ÍNDICE BLOQUE I

1. INTRODUCCIÓN.....	27
1.1. MECANISMOS DE TRANSPORTE ACTIVO DE FÁRMACOS HACIA EL SNC.....	29
1.1.1. Transcitosis mediada por adsorción	29
1.1.2. Transcitosis mediada por receptor	30
1.1.2.1. Receptor de transferrina.....	31
1.1.2.2. Receptor de insulina.....	31
1.1.2.3. Receptor de lipoproteínas.....	31
1.2. INMUNOLIPOSOMAS	32
1.2.1. Estructura de los inmunoliposomas	33
1.2.1.1. Liposomas.....	33
1.2.1.2. Anticuerpos monoclonales.....	36
1.2.2. Funcionalización de liposomas	37
1.2.3. Ventajas de los inmunoliposomas.....	41
1.2.4. Inconvenientes de los inmunoliposomas	41
1.3. ACTUALIDAD EN LA APLICACIÓN DE INMUNOLIPOSOMAS	42
2. OBJETIVOS	45
3. MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.1. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS Y MODIFICACIÓN SUPERFICIAL	51
3.1.1. Síntesis de PE-MPB.....	51
3.1.1.1. Secado de disolventes	52
3.1.1.2. Revelado de placas TLC.....	52
3.1.1.3. Purificación de lípidos.....	54

3.1.2. Elaboración de liposomas	55
3.1.2.1. Eliminación de rodamina no encapsulada.....	57
3.1.3 Extrusión de liposomas	57
3.1.4. Caracterización de liposomas.....	58
3.1.4.1. Tamaño de los liposomas.....	58
3.1.4.2. Carga superficial de los liposomas.....	59
3.1.4.3. Análisis morfológico.....	60
3.1.5. Método Stewart	61
3.2. TIOLACIÓN DE LA PROTEÍNA CON SATA.....	63
3.2.1. Purificación de la proteína tiolada y almacenamiento	64
3.2.2. Eficacia de tiolación: método Ellmann	64
3.3. CONJUGACIÓN DE LA PROTEÍNA AL LIPOSOMA.....	65
3.3.1. Desprotección de los grupos sulfhidrilo.....	66
3.3.2. Microscopía de barrido láser confocal (CLSM)	67
3.3.3. Espectroscopía de infrarrojo (IR).....	68
3.3.4. Microanálisis de azufre.....	68
3.3.5. Estabilidad de los inmunoliposomas	69
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	71
4.1. ELABORACIÓN Y MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS LIPOSOMAS....	73
4.1.1. Estrategias para modificar la superficie de los liposomas	73
4.1.2. Síntesis de PE-MPB.....	74
4.1.3. Caracterización de los liposomas.....	78
4.1.3.1. Tamaño de los liposomas.....	78

4.1.3.2. Carga superficial de los liposomas.....	80
4.1.3.3. Análisis morfológico.....	80
4.1.4. Método de Stewart	81
4.2. EFICACIA DE TIOLACIÓN DE LA PROTEÍNA	83
4.3. CONJUGACIÓN DE LA PROTEÍNA AL LIPOSOMA.....	86
4.3.1. Microscopía de fluorescencia.....	87
4.3.2. Microscopio de barrido láser confocal.....	88
4.3.3. Espectroscopía IR	91
4.3.4. Microanálisis de azufre (S).....	93
4.4. ESTABILIDAD DE LOS INMUNOLIPOSOMAS	94
5. CONCLUSIONES	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la acción de un fármaco a nivel sistémico y posterior vectorización al órgano afectado	32
Figura 2. Representación gráfica de la estructura de un fosfolípido y disposición de la bicapa lipídica	34
Figura 3. Estructura de un liposoma.....	35
Figura 4. Representación esquemática de los diferentes tipos de liposomas en función del tamaño y número de bicapas.....	35
Figura 5. Estructura de la Ig G.....	36
Figura 6. Representación de la tecnología Caballo de Troya Molecular.....	38
Figura 7. Representación de la estructura química de Caballo de Troya Molecular.....	39

Figura 8. Representación de un liposoma tras anclar un anticuerpo monoclonal a su superficie preparado para su unión con receptores de la BHE.....	40
Figura 9. Síntesis de PE-MPB.....	51
Figura 10. Representación de la cromatografía en capa fina en la que aparece una placa TLC (fase estacionaria) inmersa en el eluyente (fase móvil).....	53
Figura 11. Representación de la cromatografía en columna.	54
Figura 12. Imagen del rotavapor empleado en la preparación de liposomas.....	56
Figura 13. Representación de la rodamina no encapsulada expulsada de la membrana (izquierda) y representación de la membrana de diálisis que contiene los liposomas (derecha).....	57
Figura 14. Imagen del extrusor Lipex® Thermobarrel.....	58
Figura 15. Representación de la reacción de tiolación del anticuerpo monoclonal.....	63
Figura 16. Representación esquemática de la reacción de conjugación del liposoma funcionalizado con maleimida al anticuerpo tiolado.....	65
Figura 17. Desprotección de grupos sulfhidrilos presentes en la proteína tiolada con exceso de hidroxilamina.....	66
Figura 18. Comparación entre SMPB y SPDP. Esta figura muestra las diferencias en la reacción y en el tipo de unión que se forma entre PE-MPB y PE-PDP.....	73
Figura 19. Progreso de síntesis PE-MPB a distintos tiempos. A: 2 horas; B: 3 horas; C: 4 horas.....	75
Figura 20. Representación en placa TLC de PE, SMPB y PE-MPB.....	76
Figura 21. Representación de las 14 placas TLC correspondientes a cada uno de los viales obtenidos tras el proceso de purificación del lípido.....	77
Figura 22. Distribución de tamaño del lote de liposomas. A: Sin extruir; B: Extruido.....	79

Figura 23. Fotografía de liposomas de rodamina (900 nm).....	81
Figura 24. Muestras para la realización de la recta patrón.....	81
Figura 25. Recta de calibrado método Stewart.....	82
Figura 26. Representación esquemática de distintas estrategias para la tiolación de una proteína.....	85
Figura 27. Imágenes correspondientes al acoplamiento liposomas-Ig G. A: Microscopio óptico; B: Microscopio de fluorescencia.....	87
Figura 28. Micrografías de liposomas anclados a Ig G tomadas con microscopio de barrido láser confocal.....	90
Figura 29. Espectro IR de liposomas libres y liposomas anclados a Ig G realizados a temperatura ambiente y a 120 °C.....	92
Figura 30. Diferencias de grupos carbonilo entre liposomas libres y liposomas anclados al anticuerpo.....	93
Figura 31. Imagen al microscopio óptico de liposomas liofilizados. A: Trehalosa en la fase acuosa; B: Trehalosa en medio externo.....	95

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de las soluciones para diseñar la recta patrón del método Stewart.....	62
Tabla 2. Tamaño vesicular e índice de polidispersión (IP), lote extruido (E) y sin extruir (SE).....	78
Tabla 3. Potencial z de la muestra de liposomas sin extrusión (SE) y extruidos (E).....	80
Tabla 4. Valores de absorbancia a 412 nm.....	85
Tabla 5. Datos de la proporción de azufre obtenido en PE y en PE-Ig G.....	93

INTRODUCCIÓN

1.1. MECANISMOS DE TRANSPORTE ACTIVO DE FÁRMACOS HACIA EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

La vectorización de fármacos a nivel cerebral mediante el desarrollo de sistemas transportadores capaces de atravesar la BHE implica un mecanismo de transporte activo que permita el acceso del fármaco en el lugar de acción. Entre los mecanismos de transporte activo cabe destacar:

1.1.1. Transcitosis mediada por adsorción

Este mecanismo se inicia por la unión de sustancias de naturaleza policatiónica a las membranas de las células endoteliales mediante interacciones electrostáticas inespecíficas. Ello es debido a que la membrana plasmática de los capilares cerebrales se encuentra cargada negativamente a pH fisiológico debido a la presencia de proteoglicanos, mucopolisacáridos, glucolípidos y glucoproteínas que contienen sulfatos y ácidos siálicos. El transporte por adsorción se produce como resultado de una interacción electrostática entre la parte del péptido cargada positivamente y la membrana de la célula endotelial cargada negativamente. Este tipo de transporte es saturable y no específico. Debido a estas propiedades, el transporte mediado por adsorción se ha estudiado exhaustivamente como estrategia para mejorar la administración de péptidos y proteínas en el cerebro, siendo las moléculas que penetran en la BHE por adsorción, sobre todo, proteínas catiónicas como la albúmina, avidina, etc. (Jones y Shusta, 2007).

Originalmente, se desarrollaron nanopartículas cationizadas de albúmina capaces de administrar fármacos y péptidos al parénquima cerebral (Lu y cols., 2007). En un estudio, Liu y cols. (2014), desarrollaron nanopartículas constituidas por un núcleo hidrofóbico que contenía ciprofloxacino y una cubierta hidrofílica con PEG. Este sistema, capaz de atravesar la BHE mediante transcitosis mediada por adsorción, actuó a nivel neuronal, disminuyendo los niveles de infección cerebral. Posteriormente, se desarrollaron péptidos cargados positivamente con menos de 30 aminoácidos que fueron capaces de acceder a través de las membranas celulares mediante transcitosis mediada por adsorción (Chen y Liu, 2012).

Sin embargo, como la transcitosis mediada por adsorción solo depende de la atracción electrostática entre la parte del péptido (cargada positivamente) y la membrana de la célula endotelial (cargada negativamente), entraña una limitación en la especificidad tisular. La falta de especificidad tisular supone la vectorización del fármaco hacia órganos o tejidos no deseados, así como una disminución de la concentración terapéutica de fármaco a nivel cerebral. Por ello, todos estos factores deben ser evaluados antes de implantar clínicamente este mecanismo de transporte (Allhenn y cols., 2012).

1.1.2. Transcitosis mediada por receptor

Es el transporte más específico, ya que implica la unión de un ligando a un receptor específico localizado en la membrana del endotelio cerebral. Para que esta unión se produzca, el ligando induce una modificación en la proteína receptora, ya sea por una reacción de reticulación o por un cambio conformacional de la molécula del receptor, generando el proceso de endocitosis hacia el interior celular. En este mecanismo, la vesícula endocítica se recubre de clatrina. A continuación, la invaginación se libera de las clatrina y se fusiona, formando un endosoma, el cual se acidifica, ocasionando la disociación del ligando del receptor. El endosoma que contiene el ligando en su interior, puede fusionarse con los lisosomas citoplasmáticos, procediéndose entonces a la degradación de su contenido (Skarlatos y cols., 1995). Alternativamente, el endosoma puede ser transportado hacia la región basolateral de la célula; en este caso, por un mecanismo de exocitosis, el contenido es expulsado de la célula. En este proceso, la unión ligando-receptor puede producirse por la conjugación directa del fármaco al ligando, o bien utilizar un sistema vector que encapsule el fármaco, y acoplar el ligando en la superficie exterior de dicho vector.

Este mecanismo es empleado en el transporte de péptidos endógenos como insulina, factores de crecimiento y transferrina (Dennis y Watts, 2012).

A continuación, se exponen los receptores comúnmente implicados en el transporte mediado por receptores.

1.1.2.1. Receptor de transferrina (Tfr)

Este receptor media la transcitosis del hierro unido a la transferrina a través de las células endoteliales del cerebro (Gunawan y cols., 2011). Debido a la asociación que existe entre la acumulación de hierro y el daño celular, este receptor es el mejor caracterizado. Durante mucho tiempo se ha considerado que la acumulación de hierro desempeña un papel importante en el proceso de degradación del tejido cerebral en muchas enfermedades neurodegenerativas (Volkel y cols., 2004).

El receptor de transferrina (Tfr) está ampliamente caracterizado en la administración de fármacos, ya que ha demostrado ser una vía de captación celular eficiente de fármacos contra el cáncer (Chang y cols. 2009). Autores como Chen y Liu (2012) han centrado su investigación en el diseño de nanovesículas unidas a transferrina capaces de transportar fármacos de gran tamaño.

1.1.2.2. Receptor de insulina

Este receptor juega un papel importante en la diabetes y la obesidad. Su densidad y sensibilidad se pueden alterar durante la progresión de ciertas patologías, como la enfermedad de Alzheimer. Frolich y cols. (1998) informaron que la densidad del receptor de insulina del cerebro se incrementaba en pacientes con la enfermedad de Alzheimer. También demostraron que los mediadores patológicos de la enfermedad de Alzheimer como el péptido amiloide- β ($A\beta$) también podía competir por la unión de insulina al receptor insulínico, interfiriendo con el metabolismo de la insulina y conduciendo a problemas en la utilización de glucosa por parte del cerebro en enfermos de Alzheimer (Xie y cols., 2002). Estos estudios indicaban la necesidad de emplear con precaución el uso de receptores insulínicos en el tratamiento de enfermedades cerebrales, ya que se puede provocar una alteración en el metabolismo de la insulina, afectando a la utilización de la insulina por parte del cerebro.

1.1.2.3. Receptores de lipoproteínas

Estos receptores actúan como receptor de la proteína precursora beta amiloide, apolipoproteína E y alfa-2-macroglobulina, todas ellas genéticamente vinculadas a

la enfermedad de Alzheimer (Chen y Liu, 2012). Se ha sugerido que como los receptores de lipoproteínas inhiben el proceso inflamatorio, la expresión de estas lipoproteínas puede estar asociada con el proceso inflamatorio propio de las enfermedades cerebrales como la enfermedad de Alzheimer, Parkinson y encefalitis.

1.2. INMUNOLIPOSOMAS

En patologías cerebrales, como la enfermedad de Parkinson, se encuentran afectadas células específicas como son las neuronas dopaminérgicas de la sustancia negra (figura 1 A). Así, cuando se realiza la administración de un fármaco a nivel sistémico, éste se reparte por todo el organismo con la esperanza de que una cantidad suficiente llegue al tejido que lo requiera (figura 1 B). Sin embargo, en muchos casos, la administración sistémica de fármacos es ineficiente y muchas de estas moléculas terminan en una zona donde no se necesita, o bien, se favorece su excreción, estando a veces acompañada de efectos secundarios perjudiciales para el paciente. Debido a esto, es importante la investigación de nuevas estrategias que faciliten la acción del fármaco en el lugar de la patología, minimizando su presencia en otros tejidos donde que no es necesario. Este concepto es conocido como vectorización activa de fármacos (figura 1 C).

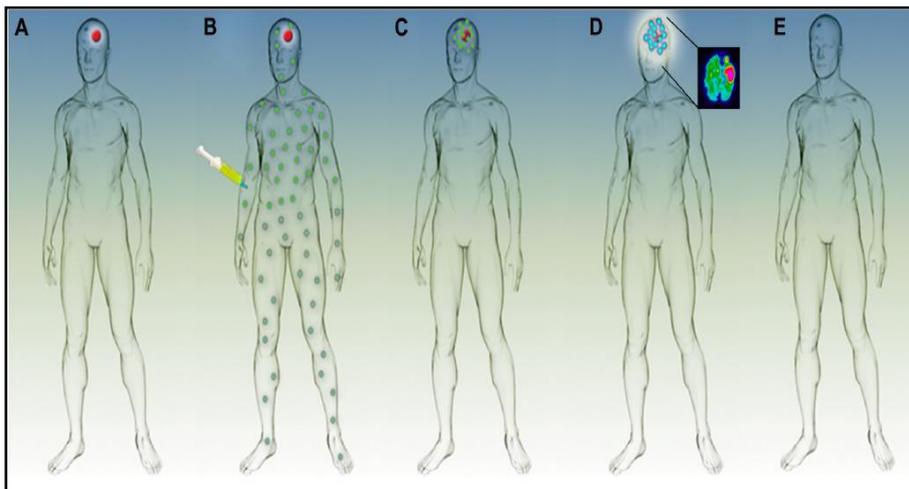


Figura 1. Representación de la acción de un fármaco a nivel sistémico y posterior vectorización al órgano afectado (Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

En la actualidad, en la vectorización activa de fármacos a nivel cerebral, se está trabajando en el diseño de los denominados inmunoliposomas, utilizando un anticuerpo o fragmento del mismo como ligando, así como una vesícula lipídica como sistema transportador. El proceso de vectorización con este tipo de liposomas podría dividirse globalmente en dos fases: la primera en la cual las vesículas circulan desde su lugar de administración hasta llegar a la célula endotelial, y la segunda, o fase efectora, que incluye la unión específica del inmunoliposoma al receptor presente en las células receptoras y posterior liberación del contenido en el interior celular (figura 1 D) (Pinheiro y cols., 2011).

Tras la internalización del fármaco en el lugar de la lesión, conseguimos que el tratamiento sea más efectivo y se reduzcan sus efectos secundarios (figura 1 E) (Ramos-Cabrer y Campos, 2013).

Por tanto, este sistema de vectorización va a permitir que fármacos incapaces de atravesar la BHE, se unan a receptores específicos de las células endoteliales cerebrales y transporten el fármaco al interior del cerebro mediante endocitosis mediada por receptor (Sauer y cols., 2005; Schnyder y Huwyler, 2005; Pardridge, 2018).

1.2.1. Estructura de los inmunoliposomas

Los inmunoliposomas están formados por liposomas conjugados con anticuerpos monoclonales.

1.2.1.1. Liposomas

Los liposomas como sistemas transportadores de fármacos suscitan un gran interés desde hace algunos años. La primera vez que se habló de liposomas fue en 1965, cuando Bangham y su equipo de investigación determinaron su carácter de membrana lipídica que encierra un determinado volumen, relacionándolo con las membranas biológicas (Veatch y Keller, 2005).

Los liposomas son vesículas esféricas que contienen una o varias bicapas concéntricas de fosfolípidos, que encierran un compartimento acuoso.

Los componentes fundamentales de los liposomas son los fosfolípidos. Tienen la propiedad de adoptar espontáneamente la configuración en bicapas cuando se encuentran en un medio acuoso. Esta propiedad se debe a que los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, es decir, poseen un extremo polar o hidrofílico que se orienta hacia la fase acuosa y un extremo no polar o hidrofóbico, que rechaza la fase acuosa y se orienta hacia el interior de la bicapa (Villasmil, 2010).

Como se observa en la figura 2, la “cabeza” es polar o hidrofílica y está compuesta por un grupo fosfato funcionalizado y una molécula de glicerol esterificada con dos ácidos grasos que conforman la “cola” apolar e hidrofóbica.

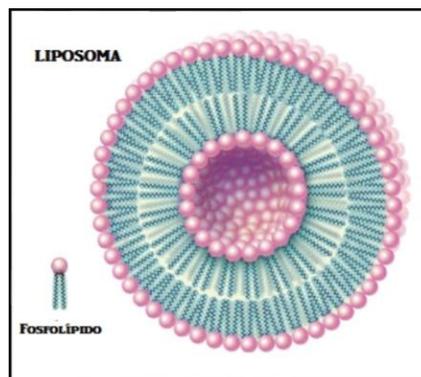


Figura 2. Representación gráfica de la estructura de un fosfolípido y disposición de la bicapa lipídica (<http://web.usal.es/~rororo/pract2/paginas/composicion1.htm>).

Como se puede observar en la figura 3, las colas hidrofóbicas de los fosfolípidos forman las bicapas y los grupos polares se orientan hacia la cavidad acuosa interna y hacia la solución extravesicular. Así, los liposomas pueden contener una (unilaminares) o más bicapas (multilaminares) concéntricas.

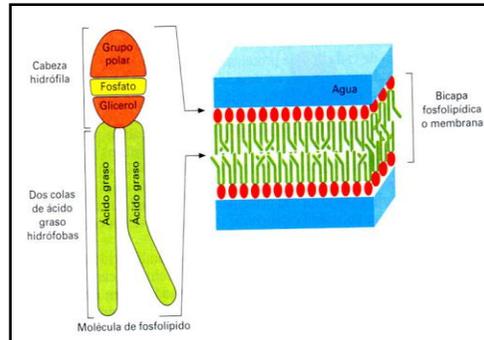


Figura 3. Estructura de un liposoma

(www.britannica.com/EBchecked/media/92244/Phospholipids.com).

Según su tamaño y número de bicapas, los liposomas se clasifican en (figura 4):

- Vesículas multilaminares (MLV_s): compuestas por varias bicapas con un tamaño que oscila entre 100-1000 nm.
- Vesículas unilaminares pequeñas (SUV_s): compuestas por una única bicapa lipídica con un tamaño que oscila entre 20-100 nm.
- Vesículas unilaminares grandes (LUV_s): compuestas por una única bicapa con un tamaño superior a 100 nm.

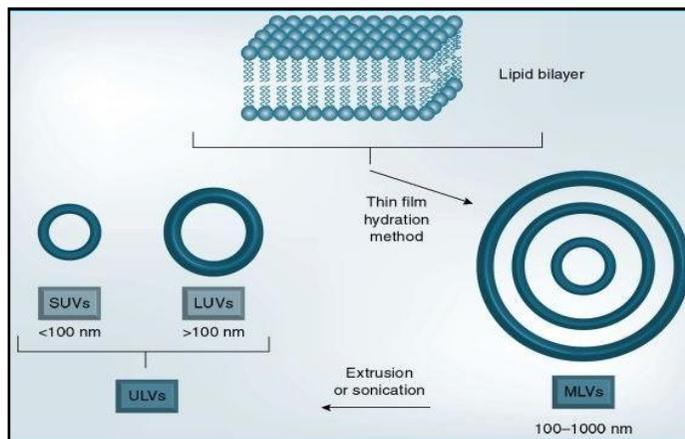


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes tipos de liposomas en función del tamaño y número de bicapas (http://www.medscape.com/viewarticle/752329_4).

1.2.1.2. Anticuerpos monoclonales

Los anticuerpos monoclonales (AMC) son versiones sintéticas de las proteínas del sistema inmune (anticuerpos), diseñadas para unirse a una estructura específica, en este caso, a los receptores que se encuentran en las células endoteliales de la BHE (Goding, 1986).

Existen diversos tipos de inmunoglobulinas empleados en la vectorización de fármacos, pero en el presente trabajo se ha seleccionado la inmunoglobulina G (Ig G) como modelo de AMC (Hermanson, 2008).

Ig G es una molécula tetramérica formada por dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) unidas mediante puentes disulfuro, dando a la molécula una característica estructura en forma de Y (Padlan, 1994).

En la figura 5 se aprecia la estructura de la Ig G. Constituida por los brazos, denominados fragmentos Fab, están formados por la región variable (V) y la constante (C), siendo V la que le confiere especificidad de unión con el antígeno (Harlow y Lane, 1988). La base de la molécula, conocido como fragmento Fc, le confiere la antigenicidad y es responsable de que la molécula sea reconocida por otros componentes del sistema inmune (Hermanson, 2008).

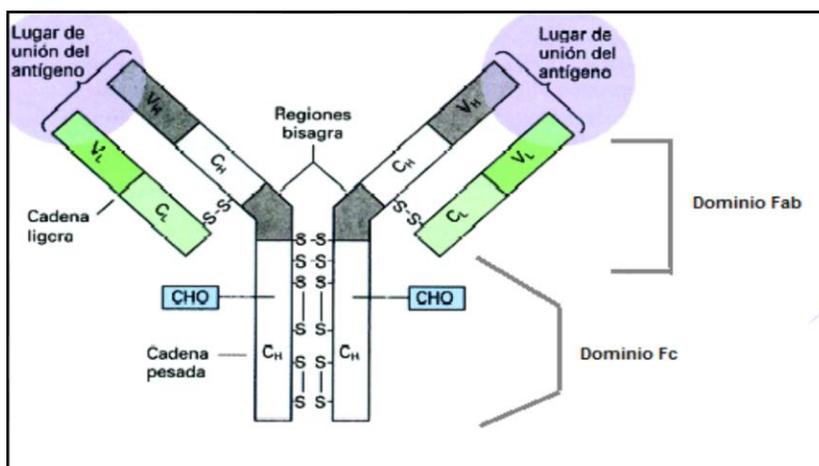


Figura 5. Estructura de la Ig G (Hermanson, 2008).

Este anticuerpo monoclonal, por un lado, se ancla a los fosfolípidos que conforman el liposoma, y por el otro extremo, reconocerán a un receptor específico de la enfermedad objeto del tratamiento, que se encuentra localizado en las células endoteliales de la BHE, permitiendo así el paso del fármaco que ejercerá su acción (Hermanson, 2008).

1.2.2. Funcionalización de liposomas

Como se ha referido en apartados anteriores, las moléculas de gran tamaño, como proteínas, anticuerpos monoclonales o ARN, no pueden ser transportadas a través de la BHE.

Los liposomas por sí solos tampoco van a poder alcanzar el sistema nervioso central. Sin embargo, anclando un liposoma con el fármaco encapsulado en su interior a un anticuerpo monoclonal, éste se unirá a un receptor específico de la BHE y así se conseguirá que el fármaco acceda al cerebro por transcitosis mediada por receptor (Pardridge, 2017).

La vectorización activa de los liposomas a nivel cerebral se lleva a cabo generalmente tras la conjugación de ligandos a la superficie de los mismos, los cuales permiten una interacción específica con las células endoteliales de la BHE. Entre las distintas alternativas de ligandos, una de las más aceptadas en la actualidad consiste en el diseño de los denominados inmunoliposomas, utilizando un anticuerpo o fragmento del mismo como ligando, así como una vesícula lipídica como sistema transportador tanto para moléculas hidrófilas como lipófilas (Cózar-Bernal y cols., 2012).

El proceso de vectorización con este tipo de liposomas podría dividirse globalmente en dos fases: la primera en la cual las vesículas circulan desde su lugar de administración, que normalmente será la vía intravenosa, hasta llegar a la célula endotelial, y la segunda, o fase efectora, que incluye la unión específica del inmunoliposoma al receptor presente en las células receptoras y posterior liberación del contenido en el interior celular (Manjappa y cols., 2010).

En la primera etapa hay que evitar el proceso de opsonización, por el cual las opsoninas plasmáticas del sistema retículo-endotelial reconocen y fagocitan a los liposomas, siendo éstos rápidamente retirados de la circulación tras su administración intravenosa, como ya demostró Patel (1992) en sus investigaciones. La modificación superficial de los liposomas con polímeros hidrófilos como polietilenglicol (PEG) favorece la permanencia de las vesículas en circulación durante un tiempo más prolongado (Schnyder y Huwyler, 2005; Loureiro y cols., 2015).

En la segunda etapa de vectorización, se encuentran implicados anticuerpos monoclonales (AMC) denominados peptidomiméticos y experimentan un proceso de transporte mediado por receptor a través de la BHE. El anticuerpo monoclonal se une a un epitopo exofacial que se localiza sobre el receptor, y que es espacialmente eliminado del sitio de unión del ligando endógeno. Dicha unión permite al anticuerpo monoclonal ser transportado a través de la membrana cerebral, actuando el complejo formado (AMC-receptor) como un caballo de Troya molecular (MTH) que transporta cualquier fármaco o material genético incorporado (Visser y cols., 2005).

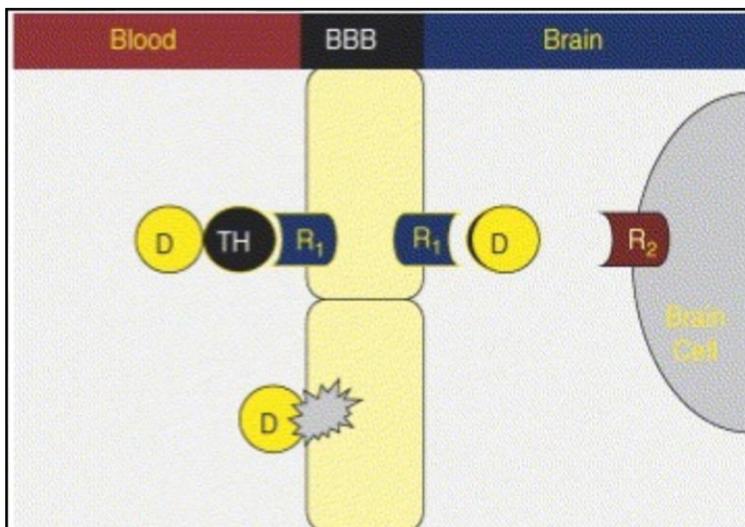


Figura 6. Representación de la tecnología Caballo de Troya Molecular (<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489206001172.htm>).

En la figura 6 se representa gráficamente el fármaco (D) encapsulado en el liposoma. El “Caballo de Troya” (TH) se une a un receptor específico (R_1) localizado en las células endoteliales de la BHE, alcanzando el receptor del cerebro (R_2), donde ejercerá el efecto farmacológico deseado. Sin la tecnología del “Caballo de Troya”, el fármaco no es capaz de atravesar la membrana, por lo que no ejercerá su acción farmacológica en el cerebro (Shusta, 2007).

Esta tecnología MTH (figura 7) se construye a partir de lípidos o fosfolípidos conjugados con cadenas de PEG dispuestas en la superficie de los liposomas, estabilizando e incrementando el tiempo de permanencia de los mismos en plasma. Una pequeña fracción de las moléculas de PEG (1 - 2%) porta un grupo funcional terminal de maleimida, el cual se encargará de la conjugación de la superficie del liposoma con los ligandos de vectorización tiolados. En este complejo sistema, el ligando actúa como el denominado “Caballo de Troya Molecular” y es direccionado hacia el transportador o receptor endógeno localizado en la BHE, como el de insulina o de transferrina (Pardridge, 2003; Zhang y cols., 2003; Boado, 2007; Boado y cols., 2007; Xia y cols., 2007).

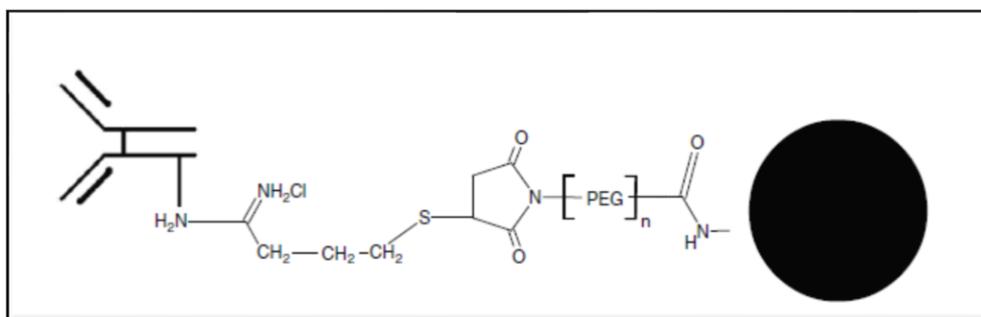


Figura 7. Representación de la estructura química de Caballo de Troya Molecular (Ulbrich y cols., 2009).

El grupo funcional maleimida se incluye porque permite la conjugación mediante enlaces covalentes de un anticuerpo monoclonal tiolado vía unión tioéter estable.

Asimismo, la presencia de grupos sulfhidrilos en una molécula se considera como una interesante estrategia de funcionalización. Habitualmente, la frecuencia de estos grupos en anticuerpos o proteínas es escasa (o inexistente) comparado con

otros grupos funcionales como aminas o carboxilatos. El uso de entidades químicas reactivas con grupos sulfhidrilos puede modificar únicamente ciertos sitios dentro de una molécula diana. Dicha modificación incrementaría enormemente la capacidad de mantener la actividad tras la conjugación, especialmente en proteínas sensibles como enzimas (Boado, 2011).

Para que el liposoma funcionalizado (figura 8) tenga la capacidad de atravesar la BHE y actuar a nivel cerebral, se deben anclar los grupos sulfhidrilo al anticuerpo monoclonal. Para ello, se hará reaccionar con un reactivo donador de grupos -SH como es la N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA).

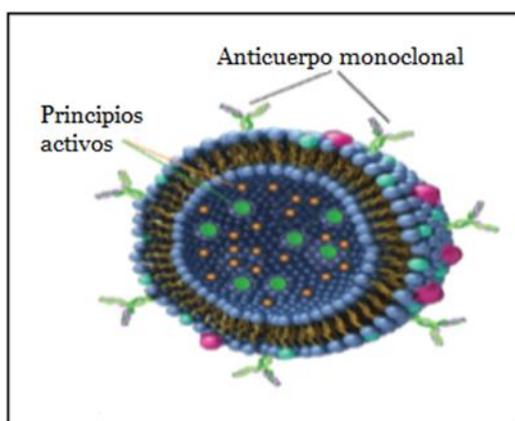


Figura 8. Representación de un liposoma tras anclar un anticuerpo monoclonal a su superficie preparado para su unión con receptores de la BHE (Boado y cols., 2011).

El grupo éster NHS terminal de SATA reacciona con los grupos amino del anticuerpo monoclonal para formar una unión amida estable. La molécula modificada contiene entonces un grupo sulfhidrilo protegido que puede ser almacenado sin sufrir degradación. A continuación, este complejo puede ser desprotegido cuando se necesite para la siguiente reacción de conjugación, mediante la adición de un exceso de hidroxilamina (Torchilin y Weissig, 2007).

Una vez desacetilado el complejo, se procederá a su incubación junto con los liposomas en una proporción determinada durante toda la noche a 4 °C conjugando así el ligando con los liposomas para poder ser reconocidos y anclados a los

receptores de transferrina localizados en las células endoteliales de la BHE (Cózar-Bernal y cols., 2012).

1.2.3. Ventajas de los inmunoliposomas

Como sistemas transportadores de fármacos, los liposomas son considerados sistemas de vectorización muy útiles, debido a su alta biodegradabilidad y a su ausencia de toxicidad. Además, parámetros como dimensiones, componentes y modificaciones que sufren en su estructura cuando se formulan con determinadas moléculas son fácilmente controlables (González-Rodríguez y cols., 2007; 2011).

Otra ventaja adicional de estos sistemas lipídicos es la capacidad que tienen para encapsular grandes cantidades de agentes, tanto de naturaleza lipófila como hidrófila, así como la capacidad que presentan para aislar el fármaco del medio a su paso por el organismo, protegiéndolo de acciones enzimáticas.

La mayor ventaja de los inmunoliposomas es la posibilidad de dirigir el fármaco al lugar deseado debido a la alta especificidad y afinidad que presenta el anticuerpo anclado en superficie por el antígeno, modificando la distribución del mismo en el organismo. De manera indirecta van a reducir los efectos secundarios de los mismos (Sauer, 2005).

Otra de las ventajas del uso de esta tecnología es que la entrada del fármaco al cerebro no le confiere daño a la BHE, evitando así posibles efectos neuropatológicos crónicos y vasculopatías cerebrales que se originarían en caso de daño en la membrana (Sakamoto e Ido, 1993; Allen y Moase, 1996).

1.2.4. Inconvenientes de los inmunoliposomas

A pesar de las ventajas que ofrecen estos sistemas de administración de moléculas activas, los liposomas no están exentos de problemas, sobre todo los relacionados con la escasa estabilidad de las formulaciones. Los fosfolípidos que conforman los liposomas presentan una estructura estable, pero pueden autooxidarse. Esta peroxidación lipídica puede verse favorecida por la presencia de luz, metales y pH elevado. Por todo esto, una vez elaborados los liposomas deben mantenerse en

recipientes de color opaco y en condiciones de refrigeración (Clares-Naveros, 2003).

Los liposomas presentan una corta semivida biológica, ya que son rápidamente eliminados del organismo al ser reconocidos por las opsoninas de sistema retículo-endotelial. Este problema puede solventarse con la incorporación de cadenas de polietilenglicol a la superficie del liposoma (Uster y cols., 1996).

Uno de los grandes problemas que presenta esta innovadora tecnología es su coste, ya que supone un elevado gasto tanto en investigación como en su comercialización debido a los escasos estudios que hay hoy en día, aunque se ha comprobado que la relación coste-eficacia es bastante elevada.

1.3. ACTUALIDAD EN LA APLICACIÓN DE INMUNOLIPOSOMAS

Hoy en día, las enfermedades neurológicas suponen un gran problema a nivel médico, social y económico, debido al progresivo envejecimiento de la población. Por otra parte, el aumento de la esperanza de vida conlleva la aparición de patologías asociadas a la edad, como son las enfermedades neurodegenerativas, destacando la enfermedad de Parkinson o de Alzheimer. Otro enfoque para la administración de fármacos hacia el cerebro consiste en el desarrollo de la tecnología del “Caballo de Troya”, consistente en el uso de liposomas modificados unidos a anticuerpos de transferrina. Dado que las células endoteliales del cerebro expresan receptores de transferrina, esta estrategia es potencialmente aplicable al tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas (Spuch y Navarro, 2011).

De Luca y cols. (2015) han desarrollado liposomas cargados con epigallocatequina-3-galato, un antioxidante natural, funcionalizados con el anticuerpo anti-transferina OX26 y anti-sinucleína, como estrategia para cruzar la BHE en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. Los resultados demostraron como los inmunoliposomas diseñados favorecieron el acceso del fármaco al cerebro atravesando las células endoteliales cerebrales.

Otra de las patologías que actualmente está en auge es el cáncer, la cual supone un gran reto en investigación, debido a los problemas que se plantean a la hora de

atacar exclusivamente a las células cancerígenas y reducir los efectos secundarios de los tratamientos quimioterápicos. Se están investigando cada vez más la eficacia de los tratamientos mediante el uso de terapias no invasivas, superando de este modo las limitaciones del fármaco para acceder hasta el tumor (Martínez-Bedoya, 2012). Con esta finalidad se utilizan los liposomas en terapia antitumoral (Suzuki y cols., 2008). Se estudian como vehículos para el transporte de fármacos hacia los tumores y mediante el uso de inmunoliposomas se vectorizan los fármacos hacia los receptores tumorales. Asimismo, con los inmunoliposomas se consigue que el fármaco llegue a la célula tumoral en concentraciones citotóxicas y al mismo tiempo reduce los efectos secundarios, ya que no van a atacar a las células sanas (Allhenn y cols., 2012).

OBJETIVOS

El objetivo general que se persigue en el bloque I de la presente Tesis Doctoral consiste en desarrollar sistemas vesiculares funcionalizados para que, tras ser administrados por vía intravenosa, conseguir una vectorización selectiva del fármaco a nivel cerebral mediante un mecanismo de transporte activo basado en la tecnología del “Caballo de Troya Molecular”. Más específicamente, se propone el desarrollo de inmunoliposomas conjugados con una proteína modelo (Ig G-FITC) que permitan la liberación intracelular de las moléculas bioactivas en el cerebro. Se diseñarán prototipos de sistemas vesiculares con la capacidad de interactuar y penetrar la barrera hematoencefálica.

Para conseguir este propósito se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1. Obtener un lípido sintético maleimidofenil butiril fosfatidiletanolamina (PE-MPB) mediante la introducción del grupo funcional maleimida (SMPB).

Objetivo 2. Diseñar y elaborar liposomas mediante la técnica TLE conteniendo en su formulación el fosfolípido sintetizado junto a otros fosfolípidos que, según una exhaustiva revisión bibliográfica, son los más adecuados para obtener liposomas capaces de atravesar la barrera hematoencefálica.

Objetivo 3. Caracterizar los liposomas elaborados en cuanto a tamaño vesicular, índice de polidispersión, potencial zeta, y eficacia de acoplamiento Ig G-liposomas.

Objetivo 4. Introducir grupos sulfhidrilo en la proteína (Ig G) para que sea efectiva la unión del liposoma a la proteína, constituyendo de esta forma el inmunoliposoma (liposoma-Ig G).

Objetivo 5. Mejorar la estabilidad de los sistemas coloidales para que sean formulaciones estables en el tiempo y se conserven con las mismas características con las que fueron elaboradas manteniendo sus propiedades hasta el final.

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y equipos empleados en el presente bloque se encuentran desglosados en el Anexo I.

Este trabajo de investigación se ha desarrollado en tres partes:

3.1. ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS Y MODIFICACIÓN SUPERFICIAL

3.1.1. Síntesis de PE-MPB

Como se ha referido en el apartado de introducción, el objetivo de este bloque es funcionalizar liposomas capaces de atravesar la BHE para así liberar el contenido de activo en su lugar de acción. Entre otras, una interesante estrategia para ello consiste en introducir grupos sulfhidrilo, ya que es escasa la presencia de estos grupos en anticuerpos o proteínas (Manjappa y cols., 2011). Para ello, fue necesario elaborar los liposomas con un lípido portador de un grupo maleimida. Este grupo funcional se incluye en la formulación de este tipo de vesículas porque va a permitir la conjugación de los liposomas a la proteína (Ig G) mediante un enlace tioéter irreversible, muy estable (Béduneau y cols., 2007). Este lípido va a ser sintetizado como primer objetivo de este trabajo.

En primer lugar, se hizo reaccionar la L- α -fosfatidiletanolamina (PE) con el compuesto éster del ácido 4-(4-maleimidofenil) butírico N-hidroxisuccinimidil (SMPB), para obtener nuestro fosfolípido sintético PE-SMPB, tal como se recoge en la figura 9.

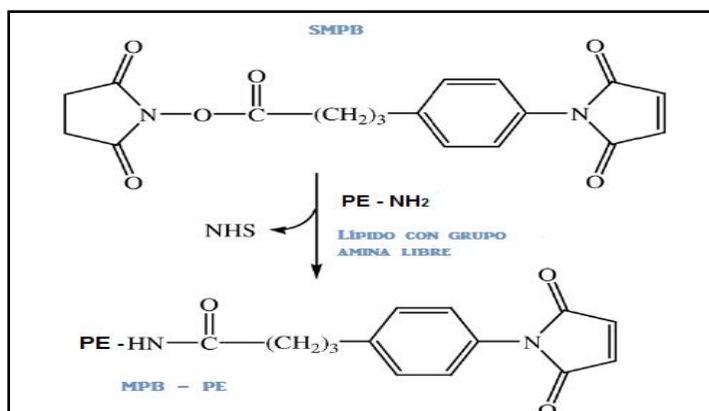


Figura 9. Síntesis de PE-MPB.

Para ello se prepararon dos soluciones, una de PE en cloroformo seco (1:100 v/v) y otra de SMPB (1:33 v/v) en metanol seco. Ambas se mezclaron y se añadieron 30 μmol (3 mg) de trietilamina (TEA) que actúa como catalizador de la reacción, siendo ésta la responsable de que se produzca más rápidamente.

La mezcla se mantuvo en agitación durante aproximadamente 2 horas en atmósfera de nitrógeno controlada, impidiendo la entrada de oxígeno en el sistema. Transcurrido el tiempo, se comprobó que la reacción había finalizado, mediante cromatografía en capa fina (TLC).

3.1.1.1. Secado de disolventes

Para llevar a cabo la síntesis de MPB-PE es necesario utilizar cloroformo y metanol secos. Para obtener estos productos, se procedió al secado de los disolventes por rotaevaporación, mediante la cual se realiza una destilación a vacío, permitiendo la rápida evaporación del agua y recuperando en el matraz colector el cloroformo o metanol purificados. El procedimiento a seguir consistió en añadir cloroformo o metanol en el matraz de destilación con un poco de sílica, que contribuye a la absorción del agua de estos disolventes. El baño termostático se calentó a 60 °C para desecar cloroformo y a 65 °C para metanol con ayuda de una bomba de vacío hasta que no quedara disolvente alguno en el matraz de destilación. Una vez finalizado el proceso, se recogió el disolvente del matraz colector y se envasó en un recipiente hermético.

3.1.1.2. Revelado de placas TLC

El seguimiento de la síntesis de PE-MPB se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (TLC, *Thin layer chromatography*), técnica que permitió estudiar cómo desaparecían los reactivos de la reacción a favor de la aparición del producto, o lo que es lo mismo, permite conocer cuándo ha finalizado el proceso de síntesis.

La fase estacionaria estuvo constituida por una capa uniforme de un absorbente (sílica gel) superpuesta sobre una placa de aluminio que actúa como soporte. Esta placa cromatográfica, de naturaleza polar, será inmersa verticalmente en un

eluyente apolar, formado por la mezcla cloroformo/metanol/agua Milli-Q® en la proporción 65:25:4, constituyendo ésta la fase móvil.

Se sembraron en la placa alícuotas de PE y SMPB como controles, y el lípido sintético PE-MPB, para determinar que la reacción de síntesis tuvo lugar. Posteriormente, se introdujo verticalmente dicha placa en el recipiente que contenía la fase móvil y se tapó para que el eluyente ascendiera por capilaridad (figura 10). Una vez que el eluyente había ascendido hasta la línea trazada en la parte superior, se extrajo del recipiente y se dejó secar. El revelado de las placas se llevó a cabo con una solución de molibdeno amónico (Martin y Papahadjopoulos, 1982).



Figura 10. Representación de la cromatografía en capa fina en la que aparece una placa TLC (fase estacionaria) inmersa en el eluyente (fase móvil). (www.waters.com/waters/es_ES/HPLC/nav.10048919.locale=es_ES).

La polaridad del compuesto con el que se trabaja es importante, ya que los compuestos más polares quedarán más retenidos puesto que se absorben más por la fase estacionaria, mientras que los no polares se eluyen con más facilidad.

Si la reacción no tiene lugar completamente, se puede añadir más trietilamina, prolongando el tiempo en atmósfera de nitrógeno.

Una vez completada la reacción (no queda PE libre en el medio), se procedió a evaporar la mezcla en rotavapor, eliminando de este modo los restos de disolventes y obteniendo así el nuevo lípido sintético seco. Posteriormente, este lípido se resuspendió en 500 μ L de cloroformo y se hizo pasar la solución por una columna de ácido silícico con el fin de eliminar los restos de TEA y obtener lípidos sintéticos purificados (Loughrey y cols., 1990).

3.1.1.3. Purificación de lípidos

Para purificar los lípidos sintetizados, se recurrió a la cromatografía en columna mediante el uso de columnas de ácido silícico, ya que la cromatografía es una técnica de separación de compuestos, en la que los componentes de una mezcla pueden ser identificados o purificados.

El objetivo de realizar este ensayo fue obtener lípidos sintéticos puros y eliminar la TEA empleada. Así, la TEA queda retenida en la fase estacionaria y los lípidos puros eluyen con el disolvente. Esta técnica cromatográfica se empleó para separar la PE-MPB de la TEA, ya que no es recomendable que este compuesto permanezca mucho tiempo en contacto con los lípidos (Loughrey y cols., 1990).

El dispositivo desarrollado se detalla en la figura 11 y está constituido por una jeringa de plástico de 5 mL, que actúa como soporte de la fase estacionaria. Ésta fue sellada interiormente con lana de vidrio para que el contenido quede retenido. A continuación, se añadieron 5 mL de cloroformo y 2 g de ácido silícico muy lentamente, para que el sólido vaya cayendo por gravedad, evitando la formación de burbujas. Como resultado del proceso, se formó una especie de gel que constituye la fase estacionaria (Torchilin y cols., 2007).

Con ayuda de otra jeringa, se añadió el eluyente, regulando su paso con la llave 1, de manera que hay un flujo constante entre el eluyente que va entrando en contacto con la fase estacionaria y el eluyente que va saliendo.

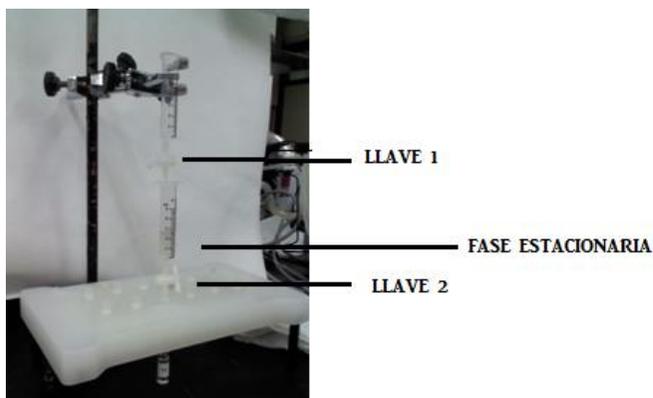


Figura 11. Representación de la cromatografía en columna.

Una vez empacada la columna, se añadió el lípido sintetizado (PE-MPB) y posteriormente, se lavó con 4 mL de cloroformo.

A continuación, y basándonos en referencias bibliográficas (Torchilin, 2007), se llevaron a cabo cuatro eluciones con distintas proporciones de cloroformo/metanol (4:0,25 (v/v), 4:0,5 (v/v), 4:0,75 (v/v) y 4:1 (v/v)), incrementando la polaridad sucesivamente, las cuales fueron recogidas en distintos viales. Éstos fueron revelados en placas TLC para localizar el lípido sintetizado que se utilizará posteriormente en la elaboración de los liposomas.

3.1.2. Elaboración de liposomas

Los liposomas fueron elaborados utilizando la técnica de evaporación en capa fina o método Bangham (TLE, *Thin Layer Evaporation*) obteniendo vesículas multilaminares.

Para elaborarlos, se añadieron los siguientes componentes lipídicos:

- Fosfatidilcolina de huevo (PC)
- Colesterol
- Fosfatidilglicerol de huevo (PG)
- Maleimidofenil butiril fosfatidiletanolamina (PE-MPB)

La relación molar utilizada de cada uno de los componentes fue 6,5:2,6:0,8:0,1 habiéndose seleccionado ésta según recogimos de trabajos realizados por otros autores (Van Rooy y cols., 2011).

Siguiendo la técnica de elaboración, en primer lugar, se procedió a la formación de la película lipídica. Para ello, se pesaron en un matraz de fondo redondo los componentes lipídicos (balanza de precisión, *Explorer Pro*) y se disolvieron en 8 mL de cloroformo, constituyendo la fase orgánica de los liposomas.

Seguidamente, se procedió a su evaporación hasta crear una fina película lipídica. Este proceso se llevó a cabo en un rotavapor (*Büchi rotavapor R-210 con Büchi Heating Bath B-491*) a una temperatura de 58 °C, temperatura superior a la temperatura de transición de los lípidos. Es necesario trabajar por encima de la

temperatura de transición de los lípidos porque, de lo contrario, la estructura de los fosfolípidos de membrana permanecería en estado cristalino, con lo que la bicapa no presentaría las características de rigidez e impermeabilidad necesarias para la encapsulación eficaz de los fármacos.

El disolvente ha de eliminarse de forma homogénea en toda la superficie de la película, con el fin de evitar cristalizaciones de los componentes.

La película obtenida se hidrató con la fase acuosa, como es lo habitual en todo proceso de elaboración de liposomas (Schinid y Thieme, 1989). En este caso, la fase acuosa estuvo constituida por una disolución de Rodamina B en Hepes (0,3 mg/mL). La Rodamina B se añadió en este estudio por ser un marcador fluorescente que permitirá observar la morfología de los liposomas en el microscopio de fluorescencia (figura 12).



Figura 12. *Imagen del rotavapor empleado en la preparación de liposomas.*

Una vez que la película fue hidratada, se sometió a 5 ciclos de agitación en vórtex durante 1 minuto intercalados con 5 minutos en baño termostatzado a 58 °C hasta la obtención de un preparado de color rosáceo opalescente en el que se encuentran dispersos los liposomas.

La realización de estos ciclos de vórtex da lugar a la reducción del tamaño medio de los liposomas (Villasmil y cols., 2011). Finalmente se conservaron a 4 °C hasta su posterior uso.

3.1.2.1. Eliminación de rodamina no encapsulada

Una vez elaborados los liposomas, se dejaron durante toda la noche en frigorífico a 4 °C. Transcurrido este tiempo, se procedió a eliminar la rodamina B que no ha sido encapsulada, mediante un proceso de diálisis.

Para ello, se hidrató una membrana de diálisis *MW 12-14,000* de unos 5 cm de longitud en tampón fosfato pH 7,6 durante 30 minutos. En su interior se introducen los liposomas sintetizados y se depositan en tampón fosfato pH 7,6 manteniéndose en agitación magnética a 4 °C durante toda la noche. Es necesario realizar este proceso en frío con el fin de que las vesículas se vuelvan rígidas y evitar que se libere el fármaco de su interior.

Al finalizar el ensayo se observó el medio de color rosado (figura 13) debido a la rodamina no encapsulada que migra hacia el exterior.



Figura 13. Representación de la rodamina no encapsulada expulsada de la membrana (izquierda) y representación de la membrana de diálisis que contiene los liposomas (derecha).

3.1.3 Extrusión de liposomas

Las vesículas multilaminares obtenidas tras la eliminación de la rodamina no encapsulada se sometieron a un proceso de extrusión con la finalidad de reducir el tamaño de los liposomas, así como obtener una distribución de tamaños homogénea.

El proceso se realizó empleando un extrusor *LIPEX™ Thermobarrel Extruder*, (figura 14), que es un dispositivo de acero inoxidable que emplea nitrógeno para aplicar presiones moderadas (generalmente 100 - 800 psi), forzando de esta forma

el paso de las vesículas a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro definido. La presión empleada fue de 600 psi y se utilizaron filtros de policarbonato de 0,8 μm y 0,4 μm , a través de los cuales se hizo pasar la muestra 3 veces por cada uno de ellos.



Figura 14. Imagen del extrusor Lipex® Thermobarrel.

Este equipo dispone de adaptadores que permiten conectarlo a un sistema de recirculación de agua termostatzada mediante una bomba peristáltica (*Rainin Dynamax RP-1*), que permite trabajar a 60 °C, posibilitando la extrusión de lípidos con temperaturas de transición de fase (gel - líquido cristalino) superiores a la temperatura ambiente, ya que los lípidos en estado de gel no extruirían.

3.1.4. Caracterización de liposomas

3.1.4.1. Tamaño de los liposomas

El tamaño de las vesículas se determinó por espectroscopía de correlación fotónica. Esta técnica analiza la intensidad de la luz dispersada en intervalos de tiempo de milisegundos, de forma que es el movimiento browniano de las partículas el que origina la amplitud del espectro, la cual está relacionada con el tamaño y la forma de las partículas. También denominada *Dynamic Light Scattering*, esta técnica permite calcular el radio hidrodinámico de las partículas suspendidas o dispersadas, y su índice de polidispersión, el cual es indicativo de la distribución de tamaños presentada por la muestra. El equipo utilizado fue un *Zetasizer Nano ZS* (*Malvern Instruments*).

El índice de polidispersión (IP) es un parámetro que hace referencia a la homogeneidad/heterogeneidad de la muestra analizada, con respecto a sus dimensiones. Representa una medida de la diferencia del tamaño que suele tener la mayoría de los liposomas analizados en función de su diámetro medio. En la práctica, cuanto mayor es el IP, mayor será la diferencia entre el tamaño medio de la población de liposomas analizada y, por tanto, más heterogéneas serán las vesículas. Así, un valor elevado de IP (0,8 - 1) es indicativo de una muestra heterogénea, mientras que un valor bajo de IP ($< 0,2$) indicará una elevada homogeneidad de las vesículas en cuanto a sus dimensiones.

Las medidas se efectuaron por triplicado. Para ello, las muestras de liposomas a analizar fueron diluidas con tampón Hepes pH 7,4 en una proporción 1:20.

3.1.4.2. Carga superficial de los liposomas

Las propiedades eléctricas de la superficie de los liposomas pueden tener gran influencia sobre la estabilidad física de la dispersión coloidal, durante su almacenamiento y en su posterior interacción con las células.

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

Este parámetro resulta de especial interés en los preparados coloidales, ya que constituyen un importante indicador de la estabilidad física de la dispersión. Según la teoría DLVO, un sistema será estable en una solución electrolítica simple cuando las fuerzas de repulsión entre dos partículas sean mayores a sus fuerzas de atracción de Van der Waals.

Para determinar la carga superficial de los liposomas, se introdujeron 3 mL de la dispersión liposomal en un equipo Zetasizer Nano ZS, donde se calculó el potencial zeta (ζ) a partir de la movilidad electroforética (μ), empleando la ecuación de Smoluchowsky (Bertolotto y cols., 2006):

$$\zeta = \mu\eta/\varepsilon$$

donde η es la viscosidad del medio y ε la constante dieléctrica.

La dispersión de liposomas atraviesa una serie de canalículos hasta el interior de una célula fotoeléctrica en donde se soporta una diferencia de potencial. Allí, los liposomas migran hasta el electrodo de carga opuesta. La velocidad de migración de las vesículas se calcula en función de la variación de la frecuencia de la luz de un rayo láser que difracta al chocar con los liposomas en movimiento por el campo eléctrico (movilidad electroforética).

El equipo cuenta con un software de control que permite crear un entorno de trabajo personalizado donde se definen las variables de control (presión de aire en bar, porcentaje de vibración de la bandeja, etc.) para cada tipo de ensayo.

Las medidas han sido realizadas a una dispersión de liposomas tampón Hepes pH 7,4 (1:20) por triplicado.

3.1.4.3. Análisis morfológico

Para verificar la formación de los liposomas e identificar su estructura, las muestras obtenidas se observaron utilizando un microscopio óptico *Olympus BH-2*. Para ello, la dispersión de los liposomas obtenidos se observa con el objetivo de 40x, regulando la intensidad de la luz, la potencia de aumento del objetivo y la distancia del objetivo a la muestra.

Además, para observar la morfología, los liposomas se marcaron con rodamina, que al tener propiedades fluorescentes permitían su visualización con el microscopio de fluorescencia. El equipo utilizado fue una unidad *Olympus BX61* equipada con 4 láseres Kriptón/ Helio-Neón rojo/ Helio-Neón verde y diodo. Presenta una óptica de 4x, 10x, 20x y 40x. El software *Olympus Fluoview* permite la obtención y el procesamiento de las imágenes. El programa *DPController* controla la cámara CCD acoplada al microscopio para tomar microfotografías por epifluorescencia, de campo claro, o DIC.

Para estudiar la muestra, se preparó una dilución 1:3 y se colocó en un portaobjetos al que previamente se le añadió una fina capa de una sustancia fijadora para que al observar la imagen los liposomas no se muevan y dificulten la toma de la fotografía. Se cubre con un cubreobjetos y se sella con laca con el fin de evitar el desplazamiento de los liposomas en el medio acuoso y facilitar su observación.

3.1.5. Método Stewart

Este método se utiliza para la determinación de fosfolípidos y permite cuantificar la cantidad de fosfolípidos (PE y PE-MPB) que se mantienen en la formulación tras todos los procesos realizados.

Los fosfolípidos tienen la capacidad de formar un complejo con el ferrotiocianato amónico. Este método tiene la ventaja de que no interfieren los fosfatos inorgánicos y es inactivo frente al fosfatidilglicerol.

Para llevar a cabo este ensayo, se prepararon una solución de ferrotiocianato amónico 0,1 M y una solución estándar de 0,1 mg/mL de fosfatidiletanolamina en cloroformo. A partir de ellos se preparó una recta patrón según la tabla 1. Las muestras se centrifugan durante 5 minutos, a 1000 rpm y 25 °C, y se determinó la absorbancia del sobrenadante a 464 nm.

La determinación de la concentración de fosfolípidos en la muestra problema, se realizó añadiendo 3,8 mL de cloroformo y 4 mL de ferrotiocianato a una alícuota de liposomas, centrifugándose a continuación y determinando el valor de absorbancia. Una vez medida la absorbancia de la muestra problema, se interpoló ese valor en la recta patrón obteniendo así los mg de fosfolípidos presentes en los liposomas elaborados.

Tubo Nº	V (mL) estándar	V (mL) cloroformo	V (mL) ferrocianato
0	0,0	4	4
1	0,2	3,8	4
2	0,4	3,6	4
3	0,8	3,2	4
4	1,2	2,8	4
5	1,6	2,4	4
6	2	2	4

Tabla 1. Composición de las soluciones para diseñar la recta patrón del método Stewart.

3.2. TIOLACIÓN DE LA PROTEÍNA CON SATA

La presencia de grupos sulfhidrilo en una molécula es considerada una interesante estrategia de funcionalización por la escasa presencia de estos grupos en anticuerpos o proteínas. Además, esta modificación incrementa la capacidad de mantener la actividad tras la conjugación (Manjappa y cols., 2011).

En el apartado correspondiente a la síntesis de PE-MPB, se ha incluido el grupo funcional maleimida en la formulación de liposomas mediante su unión a la fosfatidiletanolamina porque va a hacer posible la conjugación del liposoma con un anticuerpo tiolado mediante enlace tioéter (Cózar-Bernal y cols., 2012; 2015).

Por tanto, una vez elaborados los liposomas con el fosfolípido sintetizado portador del grupo funcional maleimida, se procedió a la tiolación del anticuerpo monoclonal, en este caso una inmunoglobulina G-FITC (Ig G-FITC).

La tiolación se utiliza para unir proteínas (anticuerpos monoclonales) a los liposomas mediante grupos sulfhidrilo. Estos grupos sulfhidrilo pueden añadirse a

la proteína externamente, aportando grupos reactivos extra en la molécula. Sin embargo, si la proteína posee puentes disulfuro endógenos, se pueden utilizar como precursores de los grupos sulfhidrilo necesarios para la reacción de tiolación, que es lo que ocurre con Ig G (Torchilin y cols., 2007).

Un reactivo versátil para introducir grupos sulfhidrilo en proteínas es el éster del ácido S-acetiltioglicólico N-hidroxisuccinamida (SATA). Como se puede observar en la figura 15, el grupo éster NHS terminal de SATA reacciona con el grupo amino del anticuerpo monoclonal para formar una unión amida estable. La molécula modificada contiene un grupo sulfhidrilo protegido que puede ser almacenado sin sufrir degradación (Duncan y cols., 1983; Cózar-Bernal y cols., 2015).

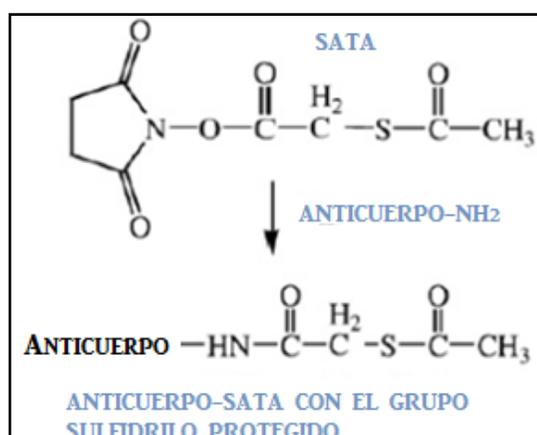


Figura 15. Representación de la reacción de tiolación del anticuerpo monoclonal.

Para proceder a la tiolación de la proteína, se añadió una disolución de SATA en DMF (25 mg/mL) a una disolución de Ig G-FITC en tampón fosfato pH 7,6 (5 mg/mL) en una relación molar mínima 1:4 Ig G-FITC:SATA, manteniéndolo en agitación y en atmósfera de nitrógeno durante 40 minutos aproximadamente. Los grupos sulfhidrilos son susceptibles de oxidarse y formar puentes disulfuro. Para prevenir estas uniones entre grupos azufre, es necesario eliminar el oxígeno e intercambiarlo por gas nitrógeno (Hermanson, 2008).

3.2.1. Purificación de la proteína tiolada y almacenamiento

Una vez se ha producido la reacción, se procedió a eliminar el SATA remanente sin reaccionar. Para ello, se introdujo la solución en una membrana de diálisis *MW 12-14,000* previamente hidratada y se cerró herméticamente con dos pinzas, siguiendo el mismo procedimiento al descrito en el apartado 2.1.2.1 de la presente memoria.

El sistema se introdujo en un vaso de precipitado con tampón fosfato pH 7,6 como medio receptor y se mantuvo en agitación magnética a 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente se extrajo el contenido de la membrana de diálisis y se eliminó el medio en el que estaba disuelto, procediendo finalmente al liofilizado de la proteína en un liofilizador *Telstar® Cryodos -80*. La proteína liofilizada se almacenó a -20 °C hasta su uso.

3.2.2. Eficacia de tiolación: método Ellmann

Este método se empleó para cuantificar la eficacia de tiolación de la proteína, en este caso, Ig G-FITC. La reacción de acoplamiento se cuantificó utilizando el conocido reactivo de Ellmann (RES), también denominado DTNB (5,5'-ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico), que es un compuesto soluble en agua que se utiliza para cuantificar los grupos sulfhidrilo libres existentes en una disolución. Este reactivo reacciona con los grupos sulfhidrilo libres para dar una mezcla de 2-nitro-5-tiobenzoico (TNB), en forma de ácido y como disulfuro.

El TNB es un compuesto coloreado que presenta un coeficiente de extinción molar elevado en el rango del visible (14150 M^{-1} a 412 nm, pH 8,0), por lo que se podrá cuantificar por espectrofotometría UV-visible (*Agilent 8453*).

Para determinar la eficacia de tiolación se prepararon una solución tampón RB y una solución del reactivo Ellmann. Como muestra control se preparó una solución que contenía 50 μL de RES junto a 2,75 mL de tampón RB. La muestra problema se preparó añadiendo 250 μL de la IgG-FITC tiolada a 50 μL de RES y 2,5 mL de tampón RB. Las muestras se dejaron incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos. Previo a esta etapa, es necesario desproteger los grupos sulfhidrilo de la proteína

para que sea posible la conjugación (este proceso será detallado en los siguientes apartados).

Para calcular la concentración de grupos sulfhidrilo en la muestra se aplicó la siguiente ecuación:

$$C = \text{Abs} / \epsilon * l$$

siendo ϵ el coeficiente de extinción molar ($14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), C la concentración (M) y l la anchura de la celda (cm). Las medidas se realizaron a 412 nm.

3.3. CONJUGACIÓN DE LA PROTEÍNA AL LIPOSOMA

Una vez modificada la superficie de los liposomas introduciéndole el grupo funcional maleimida con la modificación del lípido y se ha tiolado el anticuerpo monoclonal, se procedió a desproteger los grupos sulfhidrilo de la proteína para que fuera posible la conjugación de ambas partes. De esta manera, se obtuvo el liposoma funcionalizado listo para reconocer un receptor localizado en la BHE y ejercer su acción farmacológica (figura 16).

La síntesis de estos fosfolípidos funcionalizados se trata de un proceso algo tedioso, ya que sólo un porcentaje de los grupos funcionales expuestos a la superficie de los liposomas está disponible para el acoplamiento de moléculas al ligando (Martin y Health, 1990).

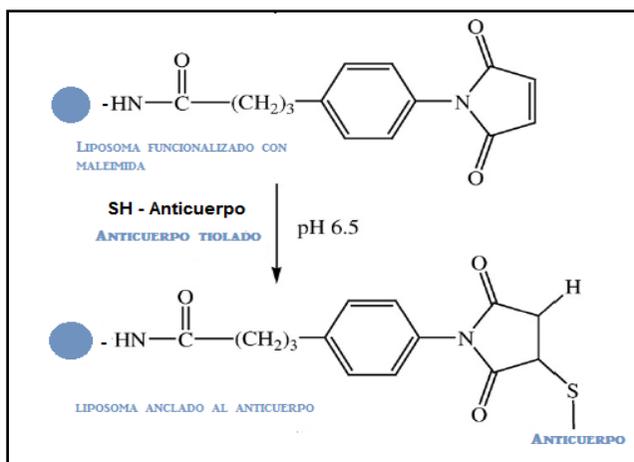


Figura 16. Representación esquemática de la reacción de conjugación del liposoma funcionalizado con maleimida al anticuerpo tiolado.

3.3.1. Desprotección de los grupos sulfhidrilo

Cuando se modifica la proteína con el reactivo SATA, los grupos sulfhidrilo van a estar protegidos con el fin de evitar su degradación. Para que sea posible la conjugación de liposomas con el anticuerpo monoclonal, es necesario desproteger estos grupos funcionales de la Ig G-FITC para que queden libres y puedan anclarse a los liposomas.

En este caso, el átomo de azufre no se introduce como un enlace disulfuro, sino como un tioéster, que se puede desbloquear con hidroxilamina, como se muestra en la figura 17. Como la presencia de hidroxilamina no compite con la formación de dichos puentes, no es necesario retirar este compuesto del preparado antes de añadir la proteína a los liposomas (Manjappa y cols., 2011).

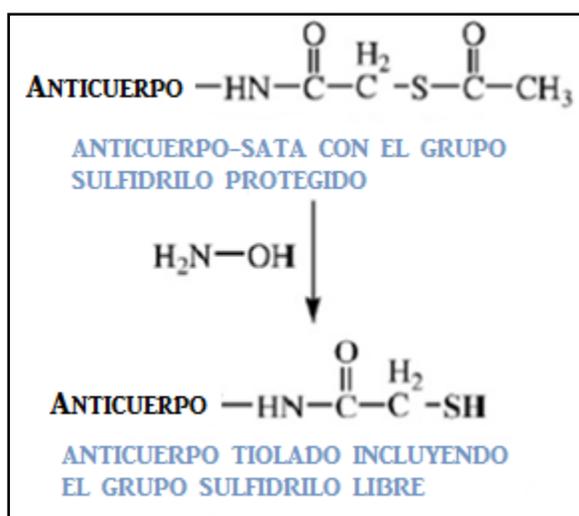


Figura 17. Desprotección de grupos sulfhidrilos presentes en la proteína tiolada con exceso de hidroxilamina.

Para desproteger los grupos sulfhidrilo que derivará en la conjugación, se reconstituyeron 2 mg de Ig G-FITC liofilizada en tampón fosfato pH 7,6 y se añadieron 10 μL de hidroxilamina 0,1 M. Para generar los grupos sulfhidrilo en una relación molar SH/proteína 3/1, se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos en atmósfera de nitrógeno. Posteriormente, se añadieron 100 μL de

liposomas funcionalizados y se dejó en agitación durante toda la noche bajo atmósfera de nitrógeno.

Una vez llegado a este punto, se procedió a caracterizar el complejo sistema sintetizado, con el fin de verificar su correcta formación.

Así, se estudiará la eficacia del acoplamiento Ig G-liposomas mediante técnicas de IR, microanálisis de azufre (S) y microscopía de barrido láser confocal.

3.3.2. Microscopía de barrido láser confocal (CLSM)

El microscopio confocal de barrido se basa en la obtención de imágenes utilizando el fenómeno de fluorescencia. Éste fenómeno es idéntico al explicado en el apartado 2.1.4.3 pero, además, permite capturar planos ópticos de la muestra, de forma que se pueda hacer una reconstrucción tridimensional de la misma (www.cnb.csic.es/fotonica/Diferencias.htm).

Para poder observar la morfología de los liposomas obtenidos por TLE, se procedió al marcaje de los mismos con rodamina, añadiéndola en la fase acuosa de las vesículas. Para observar la eficacia de acoplamiento del anticuerpo monoclonal al liposoma, se empleó una inmunoglobulina G unida al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) que presenta fluorescencia y se comporta como una luz microscópica.

Para estudiar la muestra, los inmunoliposomas liofilizados se reconstituyeron diluyendo la dispersión en Hepes (1:10 v/v). El preparado resultante se colocó en un portaobjetos cubierto con un cubreobjetos y sellado con laca para minimizar el movimiento de las vesículas en el medio acuoso y facilitar su observación. Finalmente, se observó al microscopio en los 3 planos espaciales x, y, z.

El equipo utilizado para estudiar la morfología de estos sistemas vesiculares y la eficacia de encapsulación fue una unidad *Leica TCS SP* equipada con láser *Krypton-Argón-Helio/Neón* montada sobre un microscopio invertido *Leica Lens* con magnificaciones de 10, 20 y 40x, así como un objetivo de inmersión *HCX PLAN APO Leica Lens (0.85 multi-immersion objective)* que proporciona una magnificación

óptica de 63 y 100x. Para lograr la excitación de la sonda fluorescente se utilizó la línea de excitación 494 nm para FITC y 540 nm para la rodamina, produciéndose la emisión de la señal a 520 nm en el caso de FITC y 570 nm para la rodamina (Shaner y cols., 2004).

Las imágenes se obtuvieron utilizando los canales de fluorescencia y de luz transmitida. La magnificación óptica del equipo puede ser ampliada mediante un zoom electrónico, que fue utilizado cuando el tamaño de la muestra así lo aconseja. El zoom electrónico rinde magnificaciones de hasta 32x sobre la máxima magnificación óptica.

3.3.3. Espectroscopía de infrarrojo (IR)

Este tipo de espectroscopía se basa en la absorción de la radiación infrarroja por las moléculas en vibración. En una molécula, todos los átomos vibran alrededor de la distancia interatómica media.

Esta técnica se aplica de forma cualitativa para la identificación de determinados grupos funcionales de nuestra molécula que presentará bandas características en determinadas regiones del espectro.

Para preparar la muestra, se elaboró una pastilla de KBr. Para ello, se mezcla perfectamente un miligramo de los liposomas liofilizados finamente pulverizados, con aproximadamente 100-300 mg de KBr en polvo. La mezcla se homogeneizó en un mortero. Posteriormente, se presionó la mezcla en un troquel especial entre 700 y 1000 kg/cm² hasta obtener un disco transparente. A continuación, el disco se colocó en la trayectoria del haz del instrumento para su examen espectroscópico. En este caso, el equipo empleado ha sido un *Jasco FT/IR-6200 IRT-5000*.

3.3.4. Microanálisis de azufre

El análisis elemental es una técnica instrumental que es capaz de proporcionar el contenido de carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre presente en una muestra homogénea. Esta técnica se basa en la oxidación completa de la muestra, que tiene lugar a 1000 °C en oxígeno puro. Los productos que resultan de la combustión son

separados y analizados de diferente manera según el equipo empleado (Harris, 2001).

El resultado final es la cantidad de C, H, N y S que contiene la muestra expresada en porcentaje respecto a su peso total.

El equipo empleado fue un analizador elemental de C, H, N y S *Leco CNHS-932*, que cuenta con detectores independientes de IR de estado sólido no dispersivo para C, H y S y de conductividad térmica para N. Presenta un automuestreador automático para 50 muestras y PC interno de control con pantalla *Touchscreen*.

El tiempo de análisis son unos 3 minutos y el tamaño de la muestra debe ser unos 2 mg.

En este caso, se ha determinado el porcentaje de azufre presente en los inmunoliposomas, que ha permitido estimar la eficacia de acoplamiento entre la Ig G y la PE de los liposomas. Para ello, se sometieron a combustión muestras de 2 mg de PE libre liofilizada y 2 mg de inmunoliposomas con la Ig G anclada en el *Leco CNHS-932* para obtener el porcentaje de azufre presente en cada una de ellas.

3.3.5. Estabilidad de los inmunoliposomas

Los inmunoliposomas usados como sistemas transportadores de fármacos deben ser estables durante periodos suficientemente largos de tiempo que, como mínimo, han de ser 2 años, como cualquier producto farmacológico (Winden y cols., 1998).

Una estrategia para optimizar la estabilidad de estas formulaciones durante su almacenamiento es la liofilización. El uso de la liofilización para aumentar la estabilidad de los liposomas se basa en dos consideraciones:

- El eliminar el agua de las muestras va a prevenir la hidrólisis de los liposomas, que es uno de los mecanismos de degradación más importante de este tipo de formulaciones.
- Otros procesos fisicoquímicos de degradación se van a ver retardados por la baja movilidad molecular del liofilizado (Zuidam y cols., 2007).

El objetivo de esta fase del estudio fue analizar si los inmunoliposomas eran resistentes a la liofilización. Para ello, tras planificar ensayos previos con muestras de liposomas blanco, se prepararon a continuación dos lotes de liposomas; uno de ellos se formuló introduciendo crioprotector en la fase acuosa y el otro se elaboró por el método tradicional y una vez constituidos, se le añadió el crioprotector. Como es bien sabido, los crioprotectores son unas sustancias que separan las vesículas cuando se congelan, formando una matriz amorfa. Así, previenen la fusión de las vesículas e inhiben el daño que pueda producir la cristalización del agua o las sales.

La trehalosa ha demostrado ser el crioprotector más eficaz a la hora de inhibir el crecimiento de partículas de liposomas durante el proceso de liofilizado (Chaudhury y cols., 2011). Por ello, se procedió a añadir trehalosa dihidrato (*Fluka*, USA) al 20% p/v como crioprotector, en una proporción liposoma/crioprotector 1:5.

Ambos lotes fueron congelados en nitrógeno líquido y, a continuación, se introdujeron en liofilizador *VirTis BenchTop 2K* a $-57\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 1 mtorr de presión. Se dejaron durante 24 horas en el liofilizador y transcurrido ese tiempo, se observaron los lotes al microscopio óptico.

En caso de obtener resultados favorables tras su visualización al microscopio, se procedería a aplicar la misma técnica sobre los liposomas de rodamina anclados al anticuerpo monoclonal.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. ELABORACIÓN Y MODIFICACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS LIPOSOMAS

4.1.1. Estrategias para modificar la superficie de los liposomas

El objetivo principal de este bloque ha sido anclar una proteína modelo (inmunoglobulina G) en la superficie de los liposomas. Como se ha visto en el apartado 2.1.1. de Materiales y Métodos, el primer paso para lograr el objetivo ha sido elaborar liposomas funcionalizados capaces de reaccionar con un grupo tiol de la proteína (figura 18). Estos lípidos pueden ser funcionalizados por distintos mecanismos, siendo los más comunes la reacción con el grupo reactivo éster del ácido 4-(4-maleimidofenil) butírico N-hidroxisuccinimida (SMPB) o con el grupo reactivo N-succinimidilpiridilditiopropionato (SPDP) (Hansen y cols., 1995; Torchilin, 2007; Manjappa y cols., 2011).

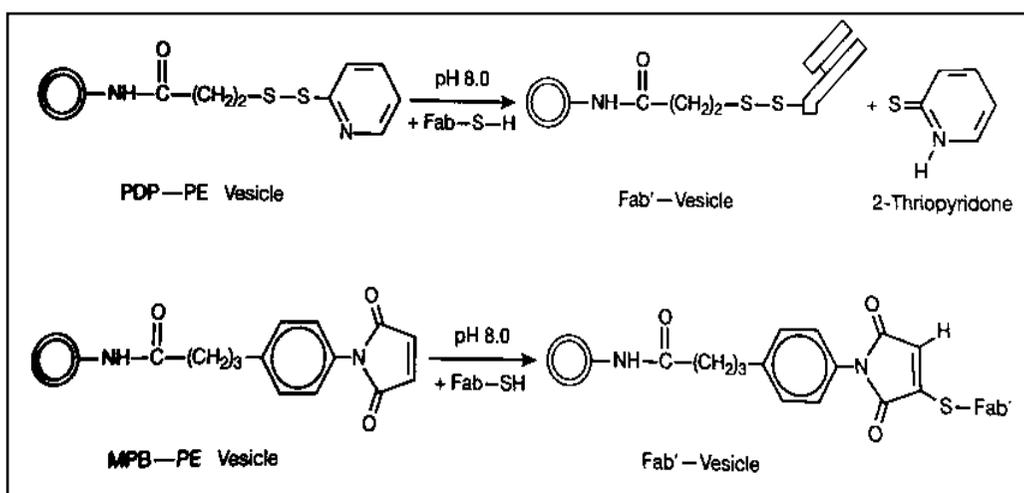


Figura 18. Comparación entre SMPB y SPDP. Esta figura muestra las diferencias en la reacción y en el tipo de unión que se forma entre PE-MPB y PE-PDP.

Existen diferencias en cuanto al uso de uno u otro compuesto, aunque ambos métodos son similares en el número de etapas. El resultado de emplear SPDP como grupo reactivo es la formación de un acoplamiento reversible del liposoma con la proteína mediante puente disulfuro, mientras que en el caso de emplear SMPB como grupo reactivo, se forma una unión irreversible mediante enlace tioéter (Torchilin y cols., 2007).

El acoplamiento PDP-PE ocurre de forma muy rápida, así como su posterior unión a la proteína tiolada, que transcurre de manera eficiente. Esta reacción puede tener lugar en un intervalo de pH comprendido entre 6,0-8,0. Por el contrario, la conjugación con MPB debe tener lugar en un intervalo más estrecho de pH (6,5-6,8), como postulan algunos autores (Ansell y cols., 2000).

Sin embargo, la unión disulfuro formada en el acoplamiento PDP-PE es reversible y, por tanto, más fácil de romper el enlace en presencia de tioles como el glutatión, el cual está presente en elevada concentración en los tejidos biológicos (Manjappa y cols., 2011). Por otro lado, cuando la reacción tiene lugar con MPB, se forma un enlace tioéter muy estable en un medio biológico (Beduneau y cols., 2007).

Teniendo en cuenta las ventajas que presenta el uso de SMPB frente al SPDP, se optó por trabajar con el grupo reactivo SMPB, para así tener la seguridad de que la molécula será estable una vez se encuentre en presencia de cualquier medio biológico.

4.1.2. Síntesis de PE-MPB

La elaboración del lípido sintético PE-MPB se llevó a cabo siguiendo el procedimiento explicado en el apartado 2.1.1. de Materiales y Métodos. Posteriormente, se procedió a chequear el progreso de la reacción mediante el uso de placas TLC para comprobar que la reacción había ocurrido de manera satisfactoria.

Una vez revelada la placa TLC, se observó que la mancha correspondiente al lípido derivado (PE-MPB) eluyó más rápidamente que la de PE libre, de acuerdo con estudios previos (Loughrey y cols., 1990).

En el revelado de las placas TLC, tras 2 horas de reacción, se observó la aparición de dos manchas (figura 19 A), la superior correspondiente al producto derivado y la inferior a la PE libre que aún quedaba sin reaccionar con el SMPB. Se dejó reaccionando durante una hora más y se añadieron 4,2 μ L de trietilamina (figura 19 B), volviéndose a obtener dos manchas, aunque, como puede observarse, la

correspondiente a la PE libre es más tenue que en la figura anterior, indicando que queda menos PE libre sin reaccionar. Una vez añadidos nuevamente 4,2 μ L de la amina y tras una hora más de reacción, se observó finalmente una única mancha (figura 19 C), correspondiente al lípido sintetizado PE-MPB, aunque se puede observar una ligera mancha que podría indicar que una cantidad insignificante de PE libre ha quedado sin reaccionar.

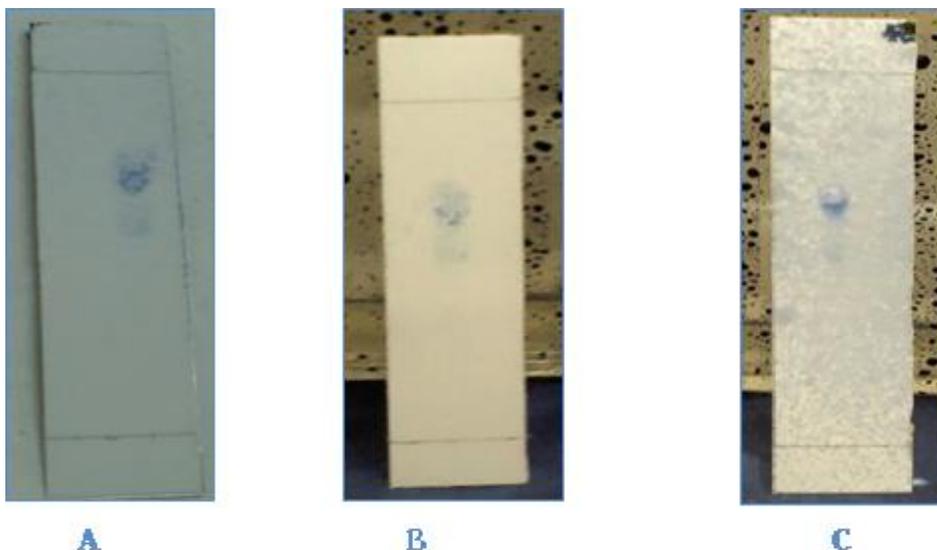


Figura 19. Progreso de síntesis PE-MPB a distintos tiempos. A: 2 horas; B: 3 horas; C: 4 horas.

Para asegurar que la reacción ha tenido lugar y que las manchas reveladas corresponden al lípido sintetizado, se procedió al sembrado en una placa con PE, SMPB y PE-MPB como control, a modo confirmatorio de que la síntesis transcurre correctamente (figura 20).

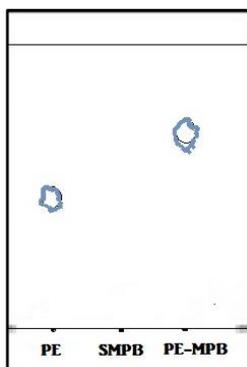


Figura 20. Representación en placa TLC de PE, SMPB y PE-MPB.

En esta imagen se observa que la mancha correspondiente a PE-MPB ha recorrido más camino que la de PE libre, confirmando así lo expuesto por autores como Torchilin y cols. (2007). Por su parte, SMPB no se localiza con el revelador empleado para la determinación de grupos fosfatos seleccionado.

Esto confirma los resultados reflejados en la figura 19, donde aparecían las 2 manchas correspondientes a los 2 compuestos, uno aparece a la altura de PE libre y la otra a la de PE-MPB.

Una vez que la reacción se ha producido por completo, el lípido sintetizado PE-MPB se sometió a filtración en columna, pasando por una columna de ácido silícico para obtener el producto purificado, proceso explicado en el apartado 2.1.1.3. de Materiales y Métodos de la presente memoria. El objetivo de esta purificación es retirar los restos de TEA que se añadieron, ya que el contacto de TEA con los lípidos durante un tiempo prolongado puede producir la hidrólisis de los enlaces éster (Torchilin y cols., 2007).

En total se recogieron 14 viales de los cuales se tomó una muestra de cada uno de ellos para revelar en placas de TLC y localizar en cuáles se encontraba recogido el lípido sintético (figura 21). Se observa la presencia de lípidos en los viales 1, 2, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 14. Posteriormente, se unieron todas las fracciones que contengan el lípido sintético y se procede a concentrar en rotavapor para eliminar los restos de cloroformo.

Así se recuperó finalmente el producto, PE-MPB sintetizado y puro para proceder a la elaboración de los liposomas.

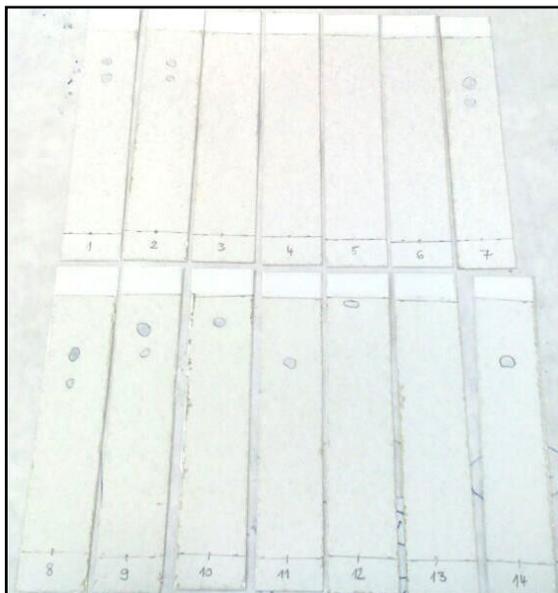


Figura 21. Representación de las 14 placas TLC correspondientes a cada uno de los viales obtenidos tras el proceso de purificación del lípido.

Se pudo comprobar que en los primeros 4 viales en los que aparecían revelados, se apreciaban 2 manchas, indicativas de la presencia de PE libre que aún no ha reaccionado; no obstante, igualmente se unió el contenido de esos viales para posteriormente elaborar los liposomas. De esta forma, PE entra a formar parte de los lípidos que constituyen la membrana de los liposomas, aunque no tenga capacidad para anclar el anticuerpo.

Para confirmar la retención de la TEA en las columnas de ácido silícico y, por tanto, la pureza del lípido derivado PE-MPB, se realizó un análisis con fenolftaleína, indicador de pH que en solución ácida permanece incoloro y en presencia de bases adquiere un color rosado (Gennaro y Alfonso, 2003). Por su parte, la TEA, al ser un compuesto de carácter básico, en caso de quedar restos en la muestra analizada, el color viraría a rosado. En nuestro caso, tras añadir la fenolftaleína, el compuesto no cambió de color, concluyendo así que la columna ha realizado su función con éxito y se han obtenido lípidos sintéticos puros.

4.1.3. Caracterización de los liposomas

4.1.3.1. Tamaño de los liposomas

Una vez elaborados los liposomas, se realizó la caracterización de los mismos tanto de las vesículas sin extruir como las sometidas al proceso de extrusión.

Esto se realizó mediante la determinación del tamaño y el IP. Los valores se recogen en la tabla 2.

	Tamaño (nm) \pm SD	IP \pm SD
SE	958,60 \pm 90,30	0,21 \pm 0,18
E	309,40 \pm 1,23	0,14 \pm 0,08

Tabla 2. *Tamaño vesicular e índice de polidispersión (IP), lote extruido (E) y sin extruir (SE).*

Respecto a la distribución del tamaño vesicular, se observa una clara diferencia entre los liposomas extruidos y sin extruir como cabría esperar, observándose que los tamaños de los lotes extruidos son bastante inferiores a los no extruidos, cumpliéndose de esta manera el objetivo inicial de conseguir una formulación con un tamaño medio de vesículas inferior a 400 nm.

El tamaño medio de los liposomas elaborados por TLE fue de 958,6 nm y se redujo el tamaño siguiendo lo realizado en estudios anteriores (Jones y Hudson, 1993; Schnyder y Huwyler, 2005). El resultado obtenido tras la extrusión, con un valor promedio de 309,4 nm, demuestra que el proceso de extrusión ha dado lugar a una población de vesículas acorde en tamaño con el diámetro de poro del filtro de membrana utilizado en el dispositivo y, por tanto, capaz de atravesar membranas biológicas (Hansen y cols., 1995).

En cuanto al IP, se observó una disminución en su valor tras la extrusión, indicando que la muestra de los liposomas extruidos es menos dispersa en cuanto a tamaño, es decir, que se obtiene una población de liposomas de tamaño homogéneo. De acuerdo con otros investigadores, se confirma la idoneidad de este método para obtener poblaciones homogéneas de liposomas (Mui y Hope, 2007).

En la figura 22 se recogen las gráficas correspondientes a la distribución del tamaño en el lote sin extruir y posteriormente extruido.

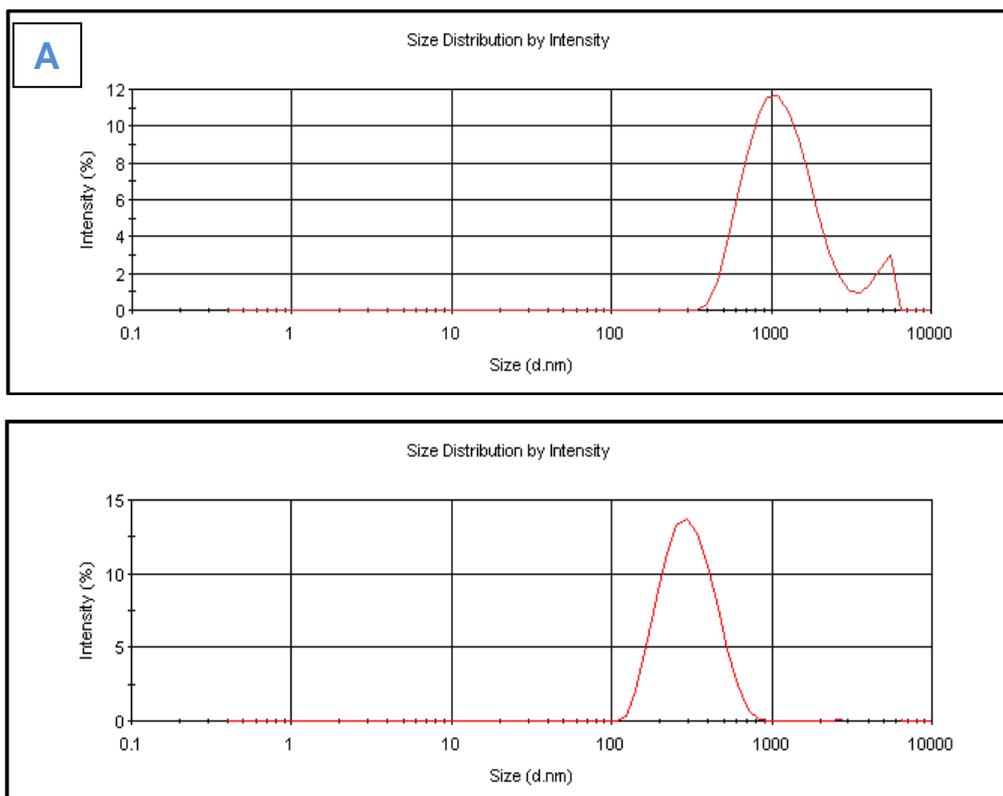


Figura 22. Distribución de tamaño del lote de liposomas. A: Sin extruir; B: Extruido.

En ellas se puede observar cómo se ha reducido el tamaño de las vesículas tras el proceso de extrusión, existiendo diferencias significativas en el valor promedio del tamaño de las vesículas cuando se someten las muestras al proceso de extrusión. Asimismo, las formulaciones que no están extruidas presentan una curva de distribución más ancha que los lotes extruidos, lo cual es indicativo de polidispersión. En cambio, la curva correspondiente a las formulaciones extruidas es mucho más estrecha, indicando homogeneidad de tamaños.

4.1.3.2. Carga superficial de los liposomas

Otro parámetro que se ha estudiado es el potencial z, que constituye un importante índice para la determinación de la estabilidad física de una dispersión de liposomas. El análisis de los valores del potencial z indica que la superficie de los liposomas posee carga negativa (tabla 3), de forma que existen fuerzas repulsivas que previenen de la agregación y la fusión. El sistema se encuentra estabilizado debido a la presencia de repulsiones electrostáticas.

	Potencial z \pm SD
SE	-11,20 \pm 0,20
E	-11,83 \pm 0,35

Tabla 3. Potencial z de la muestra de liposomas sin extrusión (SE) y extruidos (E).

Los valores obtenidos antes y después del proceso de la extrusión muestran que los liposomas no sufren variaciones en el potencial z tras ser sometidos a este proceso de reducción de tamaños. Por ello, puede decirse que no se ha producido desestructuración de las moléculas lipídicas que le confieren la carga a las vesículas tras el proceso de extrusión (Woodle y cols., 1995).

4.1.3.3. Análisis morfológico

La morfología de los liposomas se observó mediante microscopía óptica y de fluorescencia. Con la microscopía óptica se verificó la formación de vesículas tras la unión del grupo maleimida al fosfolípido PE.

Las muestras caracterizadas por microscopía de fluorescencia para la visualización adicional de liposomas cargados con IgG-FITC. En esta primera etapa, se desarrollaron liposomas como dispersiones coloidales de control y se empleó rodamina B como fármaco modelo para incluir en el compartimento acuoso. La morfología del liposoma MPB-PE cargado con rodamina mostrada en la figura 23 recoge la aparición de vesículas esféricas marcadas correspondientes a los liposomas de rodamina sin extruir.

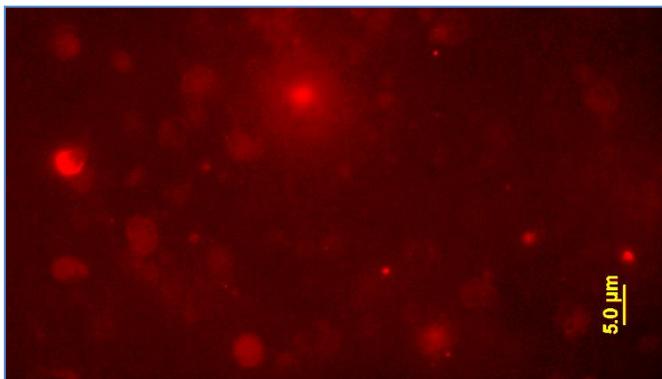


Figura 23. Fotografía de liposomas de rodamina (900 nm).

4.1.4. Método de Stewart

Este método se emplea para cuantificar los fosfolípidos presentes en la composición de los liposomas tal como se explica en el apartado 2.1.5. de Materiales y Métodos. Tras llevar a cabo el procedimiento indicado por Zuidam y cols. (2007) se obtuvieron siete muestras (figura 24) a las que se les midió la absorbancia a 464 nm por triplicado, procediéndose posteriormente a la elaboración de la recta patrón, a partir de la cual se calculará la cantidad de fosfolípidos presentes en los liposomas (figura 25).

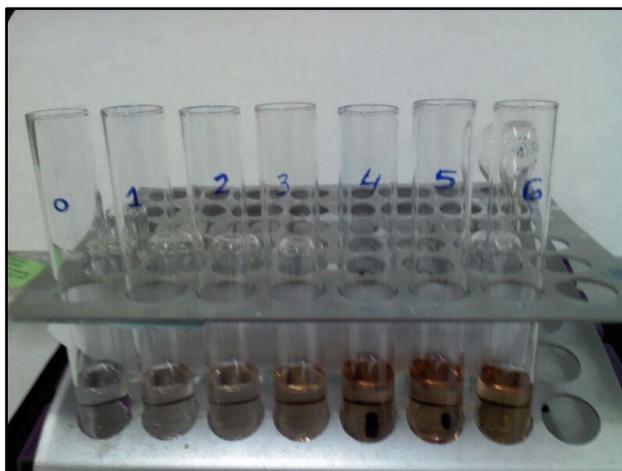


Figura 24. Muestras para la realización de la recta patrón.

Tras representar la recta patrón (figura 25), se obtuvo la recta de calibrado ($y = 8,0739x - 0,0631$) cuyo coeficiente de determinación es de 0,9969.

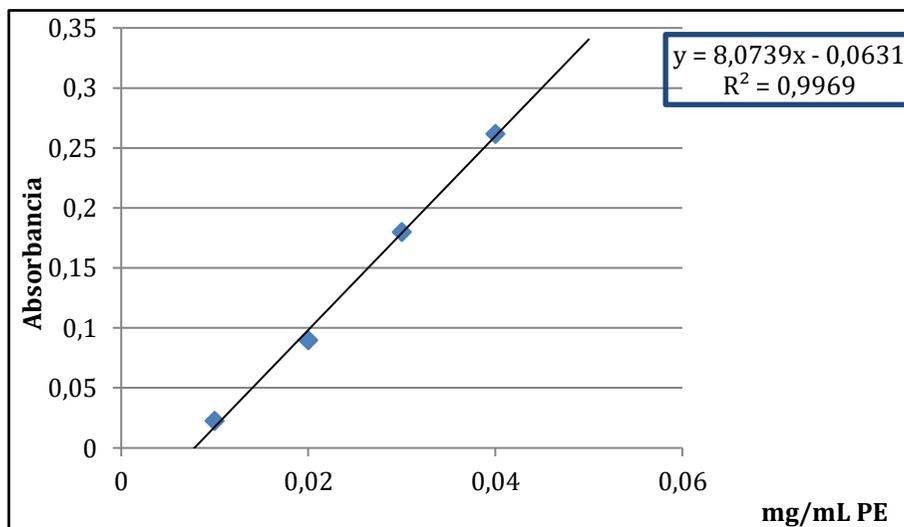


Figura 25. Recta de calibrado método Stewart.

Con estos datos se puede afirmar que el método es lineal para el intervalo de concentraciones estudiado, de manera que nos proporcionará resultados fiables.

A partir de esta recta, se interpoló el valor de absorbancia de la muestra problema ($0,1597 \pm 0,0001$), obteniendo los mg de fosfolípidos que presenta la muestra problema; en este caso $0,027$ mg/mL de PE-MPB. Teniendo en cuenta que se parte de una muestra problema con una concentración teórica de $0,05$ mg/mL, se pudo concluir que el porcentaje de recuperación fue del 54% p/v de los fosfolípidos (PE y PE-MPB).

La formulación inicial de liposomas contaba con un 66% de fosfolípidos (sin tener en cuenta el fosfatidilglicerol, para el cual este método es inactivo) y tras los procesos de elaboración y extrusión se ha cuantificado un 54% p/v de fosfolípidos que constituyen los liposomas. Con esto se concluye que las pérdidas de fosfolípidos (PE, PE-MPB) durante su procesamiento han sido pequeñas, de un 12% p/v y, por tanto, la elaboración de los liposomas ha transcurrido con éxito.

Otra técnica empleada para la cuantificación de fosfolípidos es el método de Bartlett, que consiste en la determinación colorimétrica de los fosfatos inorgánicos. Los fosfolípidos contenidos en los liposomas pueden ser determinados tras la

destrucción de los fosfolípidos con ácido perclórico, dando fosfato inorgánico. El fosfato inorgánico es convertido en ácido fosfo-molibdico por la adición de molibdato amónico, es cual es reducido a un complejo azulado. Este compuesto se determina colorimétricamente a 830 nm (Zuidam y cols., 2007). No obstante, el inconveniente que presenta esta técnica es que la presencia de fosfato inorgánico en el tampón puede interferir en la cuantificación de los fosfolípidos. De esta forma, el ensayo no puede usarse cuando los liposomas están elaborados con tampón PBS u otros tampones con grupos fosfato. En cambio, el método Stewart no presenta problemas en presencia de ningún tipo de tampón y, por tanto, la presencia de fosfatos inorgánicos no va a interferir en el ensayo (Barenholz y Amselem, 1993). Por ello, se seleccionó el método Stewart como técnica para cuantificar los fosfolípidos en nuestras formulaciones.

4.2. EFICACIA DE TIOLACIÓN DE LA PROTEÍNA

Como se explicó en el apartado 2.2. de Materiales y Métodos, la tiolación de la proteína es necesaria para llevar a cabo la funcionalización de los inmunoliposomas. En este caso, la tiolación se llevó a cabo con el grupo reactivo SATA, aunque existen otras estrategias para la introducción de grupos sulfhidrilo en una reacción (Manjappa y cols., 2011).

El método empleado para la tiolación depende en gran medida de la proteína que se vaya a anclar en la superficie del inmunoliposoma. Si la proteína posee puentes disulfuro endógenos, que se pueden romper sin destruir las uniones o las propiedades inmunogénicas de la molécula, es preferible el uso de SATA, ya que parece ser que los grupos tiol libres endógenos son más reactivos que los añadidos de manera exógena, por lo que su velocidad de reacción y la eficiencia de conjugación se verán incrementadas (Martin y Heath, 1990; Gholizadeh y cols., 2018). En este caso, es necesario introducir los grupos sulfhidrilo, ya que la proteína empleada (Ig G-FITC) no cuenta con grupos azufre en su estructura.

Otra estrategia empleada en diversos estudios es la utilización del reactivo SAMSA (Martin y Heath, 1990; Hansen y cols., 1995; Torchilin y cols., 2007). El reactivo S-

acetilmercaptosuccínico anhidro (SAMSA) es un reactivo que cuenta con un grupo amino reactivo, que contiene un grupo sulfhidrilo protegido, al igual que ocurre con SATA. La parte anhídrica se abre en respuesta al ataque nucleofílico de la amina, obteniéndose un enlace amida (Klotz y cols., 1962; Shargh y cols., 2016). La reacción de apertura del anillo produce un grupo carboxilato libre que aporta una carga negativa a la molécula modificada donde antes había una carga positiva. Este cambio de carga afecta en la conformación y a la actividad de algunas de las proteínas más sensibles, pudiendo incrementar la agregación o producir uniones no específicas en la molécula (Rector y cols., 1978; Shargh y cols., 2016). Este problema se evita con la utilización del SATA, que actúa de la misma manera que SAMSA, pero libera el grupo carboxilo libre en mayor medida (Manjappa, 2011).

En la figura 26 se describe el proceso de tiolación empleando como grupo reactivo SATA o SAMSA, así como sus diferencias.

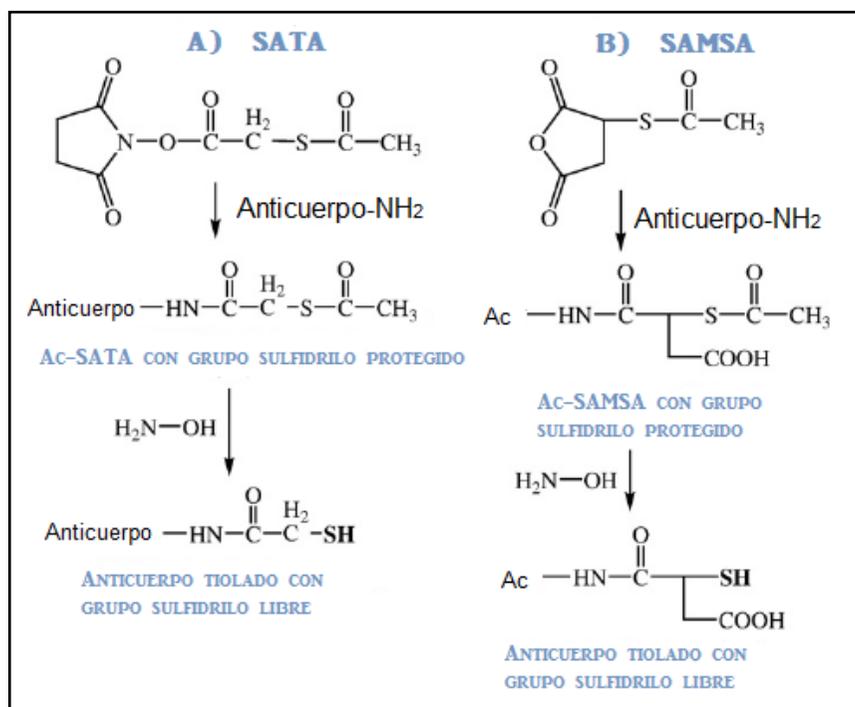


Figura 26. Representación esquemática de distintas estrategias para la tiolación de una proteína.

Con el fin de cuantificar la eficacia de tiolación de la proteína, se empleó el método de Ellmann, como bien se explica en el apartado 2.2.3. de Materiales y Métodos. Tras seguir el procedimiento indicado, se mide la absorbancia de la muestra a 412 nm por triplicado y se obtienen los valores detallados en la tabla 4.

Muestra	Absorbancia	Absorbancia media \pm SD
1	0,21174	0,2149 \pm 0,003
2	0,21628	
3	0,21691	

Tabla 4. Valores de absorbancia a 412 nm.

Tras obtener las absorbancias de la muestra, se calcula la concentración de grupos sulfhidrilo con la siguiente ecuación:

$$C = \text{Abs} / \varepsilon \cdot l = 0,2149 / 14150 \cdot 1 = \mathbf{1,52 \cdot 10^{-5} \text{ mol/L.}}$$

siendo ε el coeficiente de extinción molar ($14.150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), C la concentración (mol/L o M) y l distancia de la celda (cm).

Esta concentración representa los moles/L que hay en la cubeta. Por tanto, la muestra contiene $4,256 \cdot 10^{-8}$ moles de grupos SH.

La bibliografía indica que debe existir una relación molar SH/Proteína de 3/1, para que se considere que el proceso de tiolación ha ocurrido con éxito (Torchilin y cols., 2007). En la síntesis, se emplean 2 mg de Ig G-FITC cuyo peso molecular es 160000 g/mol, lo que corresponde a $1,25 \cdot 10^{-8}$ mol de proteína. Si por cada mol de proteína debe haber 3 moles de grupos SH, en $1,25 \cdot 10^{-8}$ mol de proteína para que se cumpla la relación, debe haber $3,75 \cdot 10^{-8}$ moles de grupos SH.

Según los resultados obtenidos, la reacción de tiolación ha tenido lugar con éxito ya que se cumple con la relación molar que debe existir entre grupos SH y la proteína.

4.3. CONJUGACIÓN DE LA PROTEÍNA AL LIPOSOMA

El proceso de acoplamiento de la proteína al liposoma es simple, rápido, eficiente y reproducible, obteniéndose uniones estables y atóxicas (Sapra y Allen, 2003).

Una vez elaborados los liposomas con el grupo funcional maleimida y tras la tiolación de la proteína se procede a la conjugación de ambas partes para obtener los inmunoliposomas, tal como se explica en el apartado 2.3. de Materiales y Métodos. Una vez llegados a este punto se procede a la caracterización de los sistemas sintetizados para verificar su correcta formación.

Para ello, se estudió la eficacia de acoplamiento Ig G-liposomas mediante técnicas IR, microscopía de fluorescencia, microscopía confocal de barrido láser y microanálisis de azufre.

4.3.1. Microscopía de fluorescencia

Los inmunoliposomas fueron observados en el microscopio de fluorescencia *Olympus BX61*. Utilizando este equipo sin activar los láseres (figura 27 A), se pueden observar las vesículas formadas por varias bicapas. Posteriormente, se aplicó el fenómeno de fluorescencia (figura 27 B) y se observa un halo verde que representa el anticuerpo (Ig G-FITC) rodeando al liposoma, lo cual es indicativo de que el anticuerpo se ha unido de manera eficaz en la superficie del liposoma.

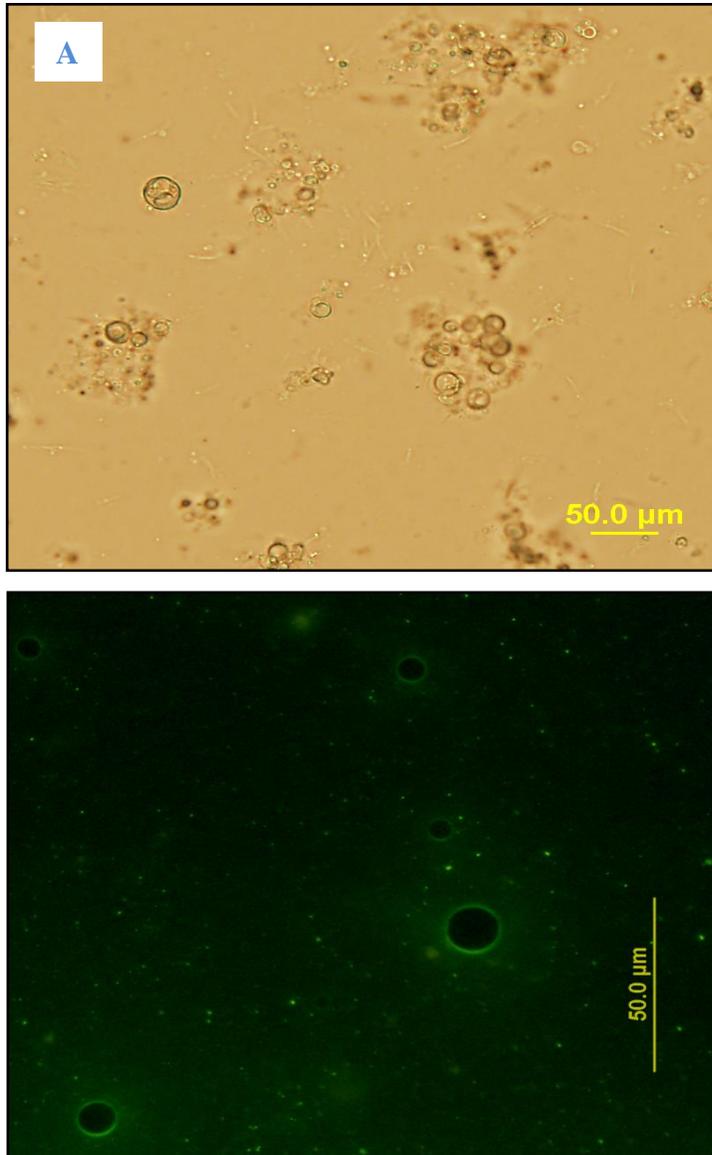


Figura 27. Imágenes correspondientes al acoplamiento liposomas-Ig G. A: Microscopio óptico; B: Microscopio de fluorescencia.

4.3.2. Microscopio de barrido láser confocal

Mediante la observación en el microscopio de barrido láser confocal se obtienen imágenes utilizando el fenómeno de fluorescencia.

En las figuras 28 A y B se puede observar el acoplamiento entre los liposomas y la proteína. En el plano inferior se representa la imagen en el microscopio óptico por

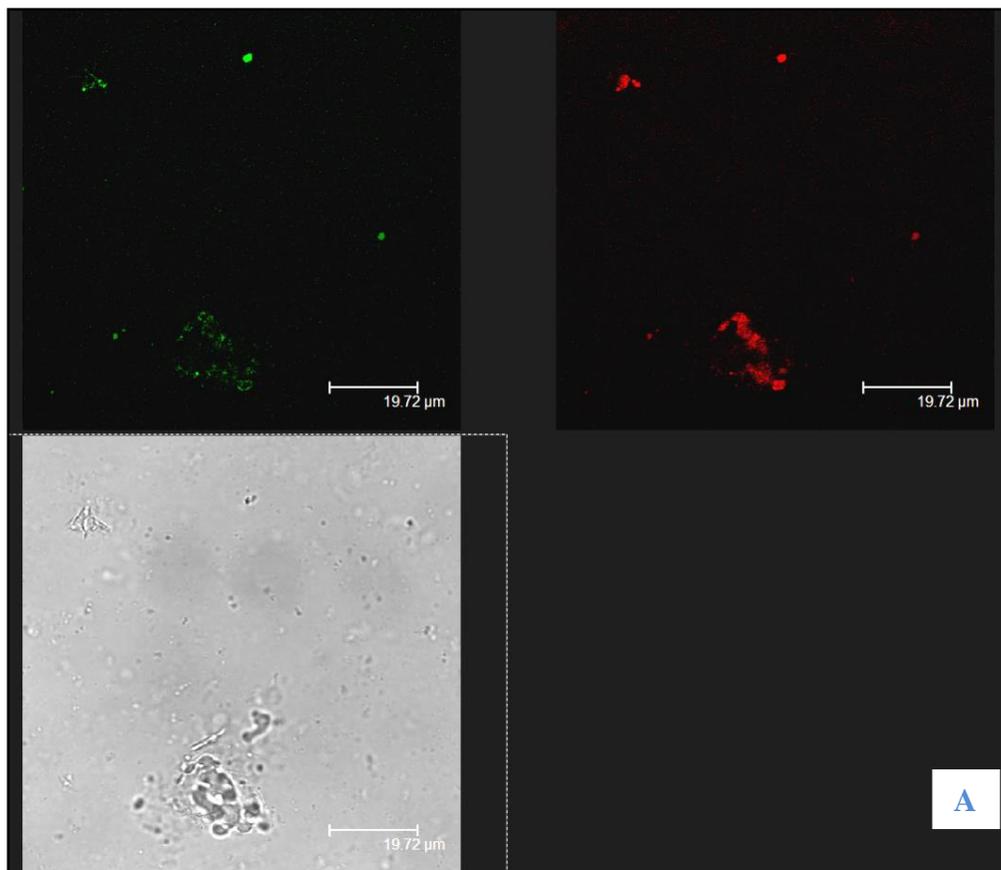
luz transmitida y se pueden apreciar esferas muy pequeñas que son las vesículas lipídicas. El principal problema que presenta la muestra es que su tamaño es tan pequeño, de apenas 300 nm, que dificulta su visualización.

La microscopía de fluorescencia va a ser muy útil porque la molécula fluorescente, aun cuando sea muy pequeña, puede ser observada debido a la luz que emite (Shaner y cols., 2004). En el plano superior se observan las imágenes correspondientes a la fluorescencia. Se han empleado 2 fluorocromos: la rodamina para marcar los liposomas (derecha) y el isotiocianato de fluoresceína (FITC) para marcar el anticuerpo (izquierda). La fluoresceína, al ser excitada por una luz de longitud de onda aproximadamente de 495 nm (azul) emite una luz de color verde cuya longitud de onda está alrededor de 519 nm, mientras que rodamina es excitada a 540 nm y emite una luz roja a una longitud de onda de 570 nm (Miyawaki y cols., 1997).

En ambas imágenes se puede observar cómo coinciden los puntos fluorescentes verdes del plano superior izquierdo (Ig G-FITC) con los puntos fluorescentes rojos del plano superior derecho (rodamina incluida dentro de los liposomas), lo que nos indica que el acoplamiento ha sido efectivo entre el liposoma y la proteína.

En las imágenes se detectaron vesículas unilaminares. Cuando se aplica el fenómeno de fluorescencia, se observó un halo verde característico alrededor del liposoma, que representa al anticuerpo (IgG-FITC) unido al liposoma. Cuando las vesículas se agregan, la intensidad de fluorescencia es mayor. Por lo tanto, podemos suponer que el anticuerpo marcado se ha unido de manera eficiente a la superficie del liposoma. Los liposomas cargados con rodamina B fueron fácilmente visualizados por CLSM debido a sus propiedades de emisión fluorescente, así como su alta afinidad a la bicapa lipídica. Los resultados obtenidos por la luz transmitida mostraron una homogénea distribución de las vesículas, aunque se sigue observando la presencia de algunos agregados. Cuando se emite fluorescencia, una clara correlación entre intensidad de manchas fluorescentes verdes en el plano superior izquierdo (IgGFITC) y la intensidad de puntos fluorescentes rojos en la

derecha se observó el plano superior, correspondiente a la rodamina B atrapada dentro de los liposomas. Esta simultánea asignación de ambas sondas fluorescentes en las observaciones de CLMS corroboró el acoplamiento efectivo entre el liposoma y la proteína.



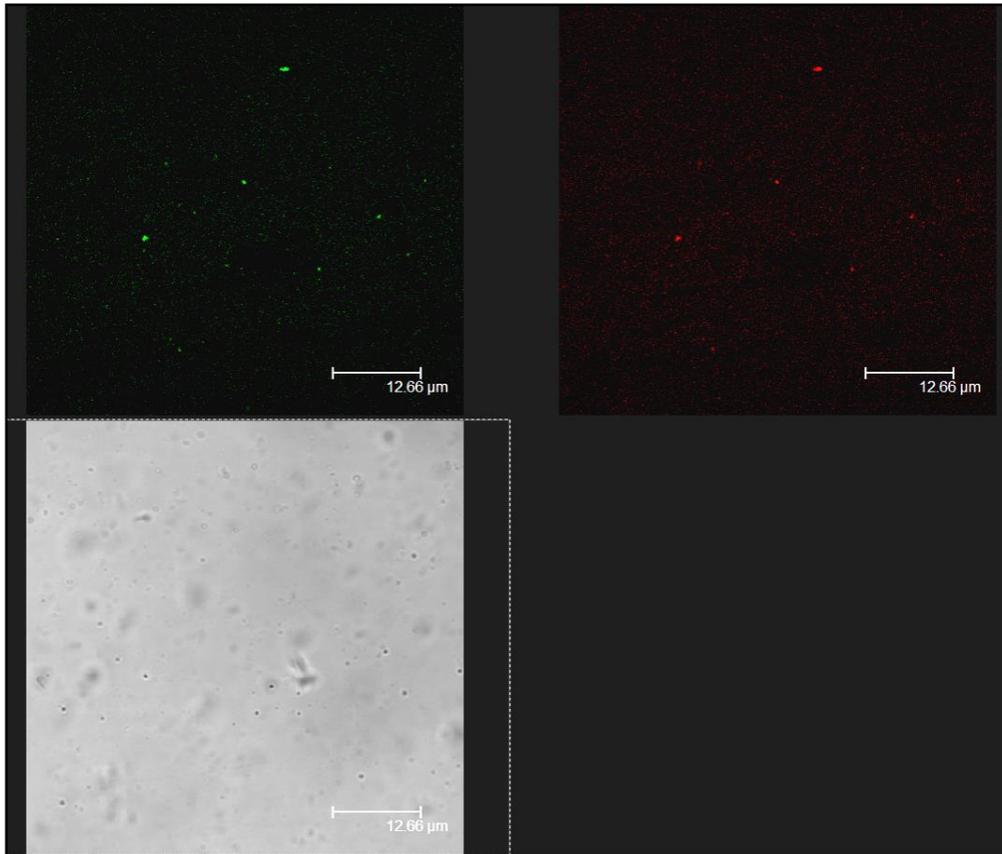


Figura 28. *Micrografías de liposomas anclados a Ig G tomadas con microscopio de barrido láser confocal.*

4.3.3. Espectroscopía IR

La espectroscopía infrarroja (IR) se usó para determinar la eficacia de acoplamiento del ligando. Esta técnica cualitativa se aplicó para identificar ciertos grupos funcionales en nuestra molécula que muestran bandas características en ciertas regiones del espectro. Se han analizado las muestras de liposomas libres y anclados a Ig G mediante espectroscopía infrarroja para confirmar el acoplamiento de la Ig G al liposoma. Sin embargo, no se han obtenido resultados significativos (figura 29). Por ello, se estudiaron tras someterlas a un calentamiento de 120 °C, con la finalidad de aumentar la energía de las moléculas, favoreciendo su excitación y, por tanto, aumentará la intensidad de las bandas.

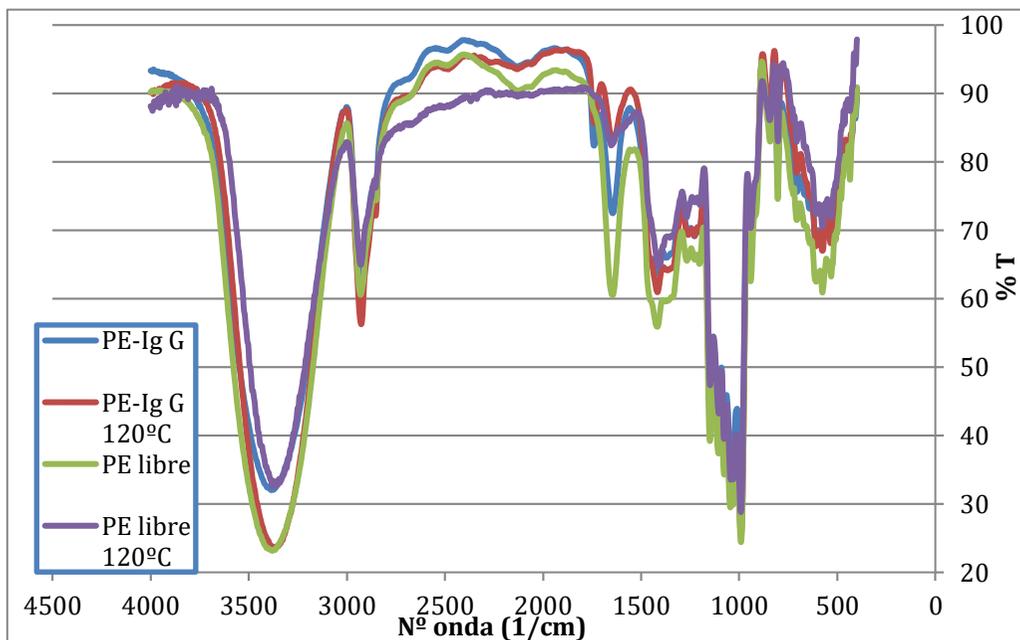


Figura 29. Espectro IR de liposomas libres y liposomas anclados a Ig G realizados a temperatura ambiente y a 120 °C.

Sin embargo, se observó cierta diferencia con el aumento de la temperatura, indicando claramente que ambos espectros FTIR de inmunoliposomas y liposomas sin IgG mostraron casi la misma banda FTIR excepto el pico a 1800 cm^{-1} .

La banda ancha que aparece cerca de 3500 cm^{-1} se atribuyó a la presencia de moléculas de agua. A 1600 cm^{-1} aparece otra banda correspondiente a la presencia de moléculas de agua en las muestras. Se obtuvieron resultados interesantes a aproximadamente 1800 cm^{-1} , donde aparece una banda estrecha, correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo C = O de la amina secundaria unida a IgG (línea azul). Se observa una diferencia de los liposomas libres de IgG (línea verde); esta señal indica el enlace de la estructura de la inmunoglobulina a los liposomas mediante el anclaje con el grupo carbonilo (figura 30).

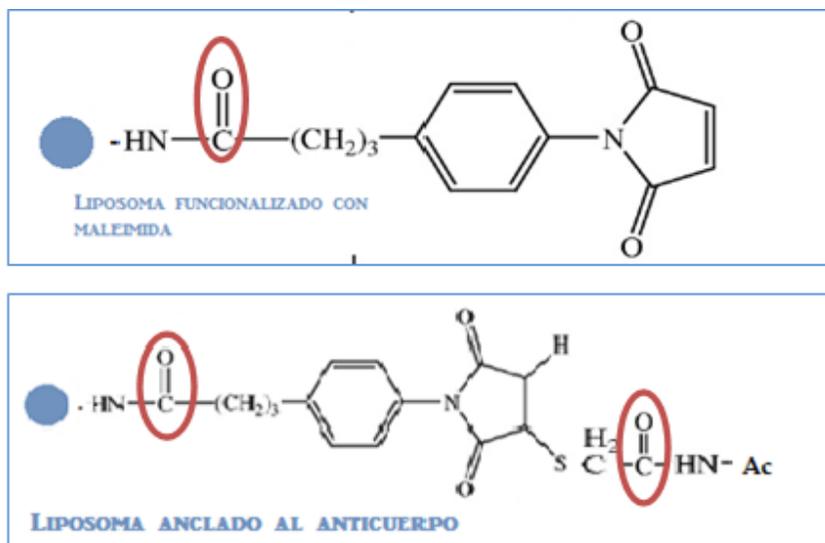


Figura 30. Diferencias de grupos carbonilo entre liposomas libres y liposomas anclados al anticuerpo.

4.3.4. Microanálisis de azufre (S)

El análisis CHNS constituye una etapa importante en la certificación de compuestos orgánicos sintetizados, y fundamental para la correcta autenticación de los productos de síntesis orgánica en intermedios y etapas finales, así como para el control de calidad de los compuestos orgánicos. Los resultados obtenidos tras el análisis elemental de las muestras de PE y PE-Ig G se recogen en la tabla 5.

Muestra	Réplica	% p/p S	% ± SD p/p S	% PE-Ig G - PE
PE	1	0,631	0,664 ± 0,04	0,042
	2	0,697		
PE - Ig G	1	0,696	0,705 ± 0,02	
	2	0,690		
	3	0,731		

Tabla 5. Datos de la proporción de azufre obtenido en PE y en PE-Ig G.

Se puede observar que la muestra PE también contiene azufre. Esto es debido a que los liposomas han sido elaborados con Hepes, compuesto que contiene moléculas de azufre. Así que, calculando la diferencia entre ambas muestras, se obtendrá el porcentaje de azufre que hay en PE-Ig G, resultando ser de **0,042% p/p de S**.

Para calcular la eficacia de acoplamiento Ig G-FITC-liposoma, hay que tener en cuenta el número total de átomos de azufre presentes en la formulación. Según datos teóricos, la formulación debe contener un total de 5,87 μg de azufre. Tras realizar el estudio de microanálisis, se obtiene un total de 2,37 μg de azufre. De esta manera se obtiene una eficacia de acoplamiento del **40,37%**, pudiendo afirmar que el proceso de acoplamiento ocurrió de manera satisfactoria.

4.4. ESTABILIDAD DE LOS INMUNOLIPOSOMAS

Como se explicó en el apartado 2.3.5. de Materiales y Métodos, una estrategia para optimizar la estabilidad de los inmunoliposomas en el tiempo es la liofilización (Ayen y Kumar, 2012).

Para comprobar la resistencia de los liposomas a la liofilización se hizo un estudio en el que se elaboraron 2 lotes de liposomas. Al lote 1 se le añadió crioprotector en la fase acuosa y al lote 2, una vez constituido, se le añadió crioprotector, de manera que envolviera externamente la estructura de los liposomas (Ayen y Kumar, 2012).

Tras ser reconstituidos los liposomas en Hepes (1:10), se observó la estructura morfológica de ambas formulaciones al microscopio óptico: el lote 1 que lleva trehalosa 20% p/v en la fase acuosa (figura 31A) y el lote 2 que lleva trehalosa 20% p/v protegiéndolo externamente (figura 31 B).

La liofilización se produjo con éxito en ambos casos, pero presentaron mayor homogeneidad de tamaño las vesículas correspondientes al lote 2 (figura 31 B), es decir, añadiendo el crioprotector posteriormente a su elaboración.

La mayoría de las vesículas son multilaminares con tamaños superiores a $1984,70 \pm 85,20$ y $519,35 \pm 1,68$ nm (muestras no extruidas *versus* muestras extruidas).

Como se observa, los liposomas liofilizados una vez reconstituidos exhibieron un aumento significativo en cuanto al tamaño e IP.

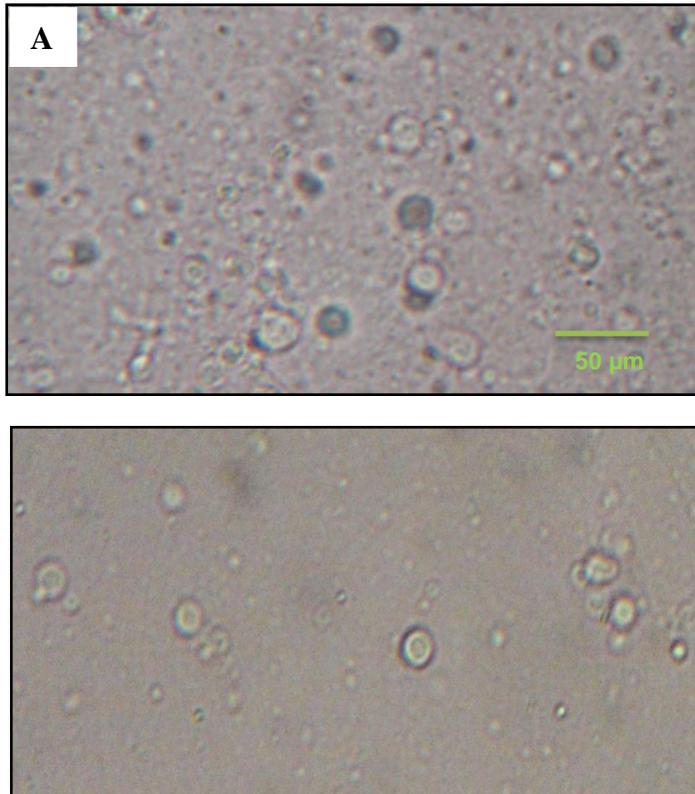


Figura 31. Imagen al microscopio óptico de liposomas liofilizados. A: Trehalosa en la fase acuosa; B: Trehalosa en medio externo.

En el lote 1 (figura 31 A) se observan precipitados, pudiendo tratarse de pequeñas partículas que hubieran cristalizado y pudieran haber alterado la composición y la estabilidad del producto. Debido a esto, se decidió realizar la liofilización añadiendo el crioprotector de forma externa tras la elaboración de los liposomas por el método tradicional, para que de este modo quede la vesícula protegida.

El mismo procedimiento se llevó a cabo con los liposomas de rodamina anclados a la inmunoglobulina G-FITC y con liposomas de rodamina libres.

Ambas muestras se congelaron en nitrógeno líquido y posteriormente se mantuvieron durante 24 horas en liofilizador en las mismas condiciones de presión y temperaturas realizadas anteriormente.

Pasado este tiempo, se llevaron a analizar en microscopio de fluorescencia, previa reconstitución con Hepes 1:10 y visualizándolos en microscopio de fluorescencia.

Se observó que los inmunoliposomas se encontraban en perfecto estado tras haber sido sometidos a liofilización. Por todo lo anterior, de acuerdo con los resultados actuales, es evidente que la liofilización es una buena técnica para prolongar la estabilidad de estos sistemas complejos.

CONCLUSIONES

Primera. La introducción del grupo funcional maleimida (SMPB) permitió la conjugación del liposoma a la proteína mediante la formación de un enlace estable tioéter irreversible.

Segunda. La síntesis del lípido PE-MPB ha transcurrido con éxito obteniéndose un lípido sintético puro como se ha comprobado con la cromatografía en capa fina (TLC).

Tercera. Tras el proceso de extrusión, se obtienen poblaciones de vesículas más homogéneas y con un tamaño nanométrico adecuado para que sea efectivo su posterior anclaje a la proteína. Los liposomas presentaron valores negativos de potencial zeta que no se vieron alterados por el proceso de extrusión, demostrando que son sistemas estables.

Cuarta. La cuantificación de fosfolípidos presentes en la composición mediante el método Stewart permite afirmar que el porcentaje de fosfolípidos tras el proceso de elaboración y extrusión se mantiene prácticamente inalterado.

Quinta. La eficacia de tiolación de la proteína arrojó unos resultados muy favorables cumpliéndose la relación molar SH/proteína 3/1.

Sexta. La microscopía de fluorescencia, los estudios de IR, así como análisis elemental de azufre arrojaron como resultado el éxito de la conjugación del liposoma sintetizado a la proteína tiolada.

Séptima. La liofilización es una técnica eficaz para mejorar la estabilidad de la formulación sin alterar ninguna de sus cualidades.

BLOQUE II

DISEÑO, DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE NANOSISTEMAS LIPÍDICOS DE LEVODOPA ADMINISTRADOS POR VÍA INTRANASAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE PARKINSON

ÍNDICE BLOQUE II

1. INTRODUCCIÓN.....	107
1.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON	109
1.1.1. Concepto y epidemiología.....	109
1.1.2. Fisiopatología.....	110
1.1.3. Tratamiento	111
1.2. LEVODOPA	114
1.2.1. Antecedentes.....	114
1.2.2. Estructura química	114
1.2.3. Propiedades fisicoquímicas	115
1.2.4. Mecanismo de acción	115
1.2.5. Farmacocinética.....	118
1.2.5.1. Absorción.....	118
1.2.5.2. Disposición.....	118
1.2.6. Reacciones adversas.....	120
1.2.7. Avances en la administración de levodopa	121
1.3. ESTABILIDAD DE LEVODOPA	123
1.3.1. Moléculas antioxidantes y mecanismos de acción.....	124
1.3.1.1. Curcumina.....	126
1.3.1.2. Ácido ascórbico.....	130
1.3.1.3. Superóxido dismutasa.....	131
1.4. SISTEMAS NANOTRANSPORTADORES DE FÁRMACOS	133
1.4.1. Liposomas.....	135
1.4.2. Ciclodextrinas	136

1.4.2.1. Ciclodextrinas como sistemas estabilizadores de fármacos.....	138
1.5. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS POR VIA INTRANASAL	139
1.5.1. Anatomía y fisiología nasal	140
1.5.2. Mecanismos de transporte de fármacos tras la administración intranasal	143
1.6. ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE FÁRMACOS HACIA EL SNC.....	144
1.6.1. Factores que afectan a la administración intranasal de fármacos hacia el Sistema Nervioso Central.....	146
1.6.1.1. Tamaño y polaridad molecular.....	146
1.6.1.2. Aclaramiento mucociliar.....	146
1.6.1.3. Degradación enzimática.....	148
1.6.2. Estrategias para aumentar el tiempo de residencia de fármacos en la cavidad nasal.....	148
1.6.2.1. Profármacos.....	148
1.6.2.2. Inhibidores enzimáticos	149
1.6.2.3. Promotores de la absorción	149
1.6.2.4. Sistemas mucoadhesivos	150
1.6.2.5. Nuevas formulaciones de fármacos para administración nasal.....	152
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	157
CAPÍTULO I.FORMULACIONES ANTIOXIDANTES DE LEVODOPA	163
CAPÍTULO II. FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS DE LEVODOPA Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN CICLODEXTRINAS PARA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL.....	249

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Representación de las células productoras de dopamina en el cerebro.....	109
Figura 2. Estructura química de la levodopa.....	114
Figura 3. Vías del metabolismo de levodopa. DDC: Dopa descarboxilasa; COMT: Catecol orto metil transferasa; BHE: Barrera hematoencefálica; 3-OMD: 3-orto metil dopa; 3,4-DFA: Ácido 3,4- dihidroxifenil acético; 3-MT: 3-metoxitiramina; HVA: Ácido homovanílico.....	116
Figura 4. Esquema de los lugares de acción de los fármacos empleados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. COMT: Catecol-O-metiltransferasa; LAAD: L-aminoácido aromático-descarboxilasa; MAO: Monoamino oxidasa.....	117
Figura 5. Síntesis de eumelaninas a partir de L-dopa.....	124
Figura 6. Estructura de los tres principales curcuminoides de curcumina.....	127
Figura 7. Representación del equilibrio tautomérico ceto y enol de curcumina.....	128
Figura 8. Formas moleculares en equilibrio de ácido ascórbico.....	130
Figura 9. Estructura de las SOD.....	132
Figura 10. Estructura que forman los fosfolípidos.....	135
Figura 11. Tipos de ciclodextrinas y sus derivados.....	137
Figura 12. Mecanismos de transporte de fármacos a través del epitelio nasal. A1: Espacios intercelulares; A2: Uniones estrechas; B1: Difusión pasiva; B2: Transporte activo; C: Endocitosis.....	143
Figura 13. Características de la cavidad nasa.....	145
Figura 14. Esquema de la administración intranasal de fármacos hacia el cerebro. BHE: barrera hematoencefálica. CSF: fluido cerebro-espinal.....	145
Figura 15. Factores que interfieren en la administración nasal de fármacos.....	147

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Tratamientos para la enfermedad de Parkinson.....	112
Tabla 2. Formulaciones de levodopa asociada a otros compuestos comercializados en el mercado español.....	121
Tabla 3. Algunos tipos de nanoestructuras utilizadas como sistemas transportadores de fármacos.....	134
Tabla 4. Características del epitelio nasal.....	142

INTRODUCCIÓN

1.1. ENFERMEDAD DE PARKINSON

1.1.1. Concepto y epidemiología

La enfermedad de Parkinson (EP) fue descrita por primera vez en 1817 por James Parkinson, bajo la denominación de parálisis agitante. Se define como una enfermedad neurológica idiopática, clínicamente caracterizada por trastornos motores (Davie, 2008).

Generalmente, afecta a partir de los 50 años de edad (Bonifacio y cols., 2014). A nivel mundial, se estima una incidencia de unos 6,3 millones de personas, siendo en España aproximadamente unas 150.000 las personas afectadas, según los datos publicados en los últimos años (Luquin y cols., 2017).

Se trata de una patología crónica degenerativa, en la cual los síntomas se agravan conforme la enfermedad avanza. Se conoce que el síndrome clínico de la EP resulta de la degeneración idiopática de las células dopaminérgicas en la parte compacta de la sustancia negra (Figura 1). Si bien la causa de dicha degeneración no se conoce con certeza, el estrés oxidativo puede jugar un papel muy importante, lo que conduce a la depleción del neurotransmisor dopamina, producido por las neuronas en la sustancia negra y liberándose en el núcleo caudado (Levine y cols., 2003).

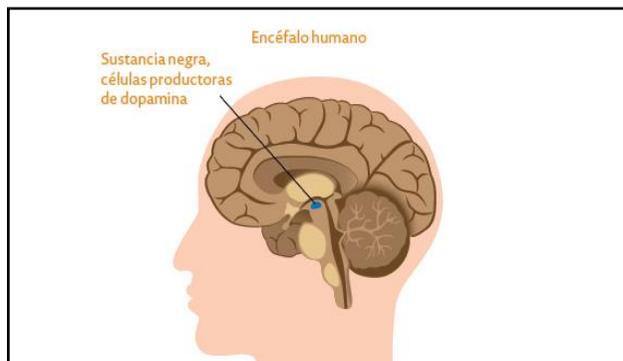


Figura 1. Representación de las células productoras de dopamina en el cerebro (De la Casa, 2013).

1.1.2. Fisiopatología

La EP se caracteriza por la pérdida progresiva de neuronas dopaminérgicas localizadas en la parte compacta de la sustancia negra, la cual proporciona la inervación dopaminérgica al cuerpo estriado. La aparición de inclusiones (cuerpos de Lewy) y la pérdida de este tipo de neuronas son aspectos fisiológicos del envejecimiento, pero en los pacientes afectados por la EP, la pérdida es más precoz y más rápida, apareciendo los síntomas cuando se ha perdido el 70-80% de la población neuronal.

La EP propiamente dicha es de etiología desconocida y tiene un carácter progresivo e irreversible. Aunque se piensa que factores genéticos y ambientales son los causantes, el envejecimiento neuronal o apoptosis y el estrés oxidativo se convierten en las causas principales que llevan a la aparición y progresión de la enfermedad. La teoría del estrés oxidativo se considera la más aceptada en su desarrollo.

En los años 90 se propuso que durante el metabolismo de la dopamina endógena (DA), en la cual se encuentra involucrada la enzima mono-amino oxidasa tipo B (MAO-B), se originan como productos secundarios radicales libres, que serían los responsables de la neurodegeneración. Además, se demostró que también disminuye la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD), cuya función es la de eliminar los radicales libres de la sustancia gris del cerebro, provocando así su incremento con la consiguiente degradación neuronal (Breen, 2004; Selkoe, 2004).

La EP se caracteriza por síntomas como: bradicinesia, que puede convertirse en acinesia en fases avanzadas; temblor en reposo de las manos, con movimientos de frotación del índice, acompañado del resto de los dedos, sobre todo el pulgar; rigidez muscular, reflejada como resistencia a los movimientos pasivos de las extremidades, y postura anormal. Dichos síntomas van acompañados de signos característicos como: modo de andar arrastrando los pies, inexpresividad facial, deterioro del habla e incapacidad para efectuar tareas que requieran destreza (Pahwa y cols., 2007).

Otros síntomas que aparecen durante el desarrollo de esta enfermedad neurodegenerativa son de presentación menos constante, pero contribuyen a deteriorar la calidad de vida del paciente. Entre ellos destacan las alteraciones cognitivas (demencia, pérdida de memoria), de la percepción (alucinaciones, delirio, falsas percepciones), de la emotividad (depresión), de los patrones de sueño, gastrointestinales (sialorrea, disfagia) y cutáneas (sudación excesiva, seborrea), así como la posible presencia de acatisia, dolor muscular y neuropático y piernas inquietas (Eriksen y cols., 2005).

1.1.3. Tratamiento

La EP es una patología individualizada que requiere una asistencia personal de cada paciente.

Se sabe que la mayoría de los síntomas de la EP están producidos por falta de dopamina en el cuerpo estriado cerebral. Aunque hoy día no existen fármacos curativos de la enfermedad, sí que se utilizan otros como paliativos de la sintomatología para mejorar la calidad de vida de los pacientes. Así, la mayoría de los fármacos antiparkinsonianos están diseñados para restituir, simular o mejorar temporalmente los niveles de dopamina, consiguiendo de este modo mejorar los síntomas. La mayoría de los fármacos pretenden aliviar la rigidez muscular, mejorar la velocidad y la coordinación del movimiento, así como reducir los temblores.

Otras investigaciones ponen de manifiesto que pacientes que sufren EP temprana, no requieren inicialmente terapia dopaminérgica, aunque no está claro si esto es debido al efecto conocido y sintomático de las enzimas IMAO o bien a un efecto neuroprotector de las mismas. Entre los efectos neuroprotectores de este grupo se incluye la protección frente al daño oxidativo (Kulisevsky y cols., 2013).

En la tabla 1 se recoge el amplio arsenal terapéutico disponible en España para paliar la EP.

Grupo farmacológico	Mecanismo acción	Presentación
Precusores de la dopamina	Debido a la incapacidad de la dopamina para atravesar la BHE y alcanzar el SNC, se utiliza un precursor de dopamina llamado L-dopa, capaz de alcanzar las neuronas, lugar en el que se convierte en dopamina. Así, L-dopa repone dopamina en el cerebro, siendo el fármaco más eficaz para tratar los síntomas de la EP (sobre todo la lentitud de movimiento y la rigidez muscular; y en menor grado el temblor, los problemas de equilibrio y las alteraciones de la postura). L-dopa sufre un rápido proceso de descarboxilación periférica formando dopamina. Es por ello que, tras su administración, L-dopa se metaboliza en gran parte antes de llegar al SNC. Para evitar este proceso de descarboxilación, se asocia a moléculas inhibitoras de la descarboxilación periférica como carbidopa o benserazida, permitiendo que llegue la cantidad suficiente de L-dopa al cerebro. De esta forma, se mejora la efectividad del fármaco y disminuyen sus efectos secundarios.	Madopar® Sinemet® Duodopa®
Agonistas dopaminérgicos	Actúan uniéndose a los receptores de la dopamina, aliviando los síntomas de la EP. Suelen ser menos eficaces que L-dopa en el control de la rigidez y la lentitud de los movimientos. Se emplean como monoterapia en la EP temprana o como tratamiento complementario de L-dopa. Se distinguen derivados ergóticos como bromocriptina, lisurida, cabergolina y pergolida	Parlodel® Dopergin® Soligen® Pharken® Pergolida® Mirapexin® Requip® Neupro® Apo-go® Amantadina Level

	y derivados no ergóticos como pramipexol, ropinirol, rotigotina, apomorfina y amantadina.	
Inhibidores de la monoaminoxidasa-B (IMAO)	Inhiben la degradación de la dopamina. Mantienen dopamina activa durante más tiempo en el cerebro. Se emplean en la fase precoz de la EP y en fases avanzadas, mejorando los efectos de L-dopa.	Azilect® Plurimen®
Inhibidores de la catecol-O-metil transferasa (COMT)	La administración de inhibidores de la COMT junto a L-dopa impide la degradación de ésta, aumentando su disponibilidad en el cerebro. Se trata de una alternativa basada fundamentalmente en prolongar los efectos de la L-dopa bloqueando su metabolismo.	Comtan® Tasmar®
Anticolinérgicos	La acetilcolina es la encargada de regular y controlar el movimiento. Estos medicamentos presentan efectos secundarios como sequedad de boca, visión borrosa, etc., por lo que no se recomienda su utilización en pacientes que presentan una edad mayor a 67 años. Se administran en EP con la finalidad de reducir los temblores y la rigidez del paciente.	Akineton® Kemadren® Artane®

Tabla 4. *Tratamientos para la enfermedad de Parkinson (Levine y cols., 2003; Kulisevsky y cols., 2013). BHE: barrera hematoencefálica. SNC: sistema nervioso central. COMT: catecol-o-metil transferasa.*

1.2. LEVODOPA

1.2.1. Antecedentes

Desde su introducción en la terapéutica a principios de la década de los 60, levodopa o L-dopa se ha convertido en uno de los fármacos más sorprendentes en Neurología. Su capacidad de inducir una mejoría casi milagrosa en sujetos portadores de la EP, rápidamente la convirtieron en el fármaco de elección para esta enfermedad. Han pasado casi 60 años desde aquella irrupción de levodopa en terapéutica y continúa siendo el principal fármaco para tratar esta patología (Zappia y cols., 2009).

Como se ha referido anteriormente, debido a que la dopamina no atraviesa la BHE, cuyo aporte sería lo ideal para tratar la enfermedad, se recurre al aminoácido precursor inmediato, L-dopa, que la atraviesa por transporte facilitado, característica propia de aminoácidos aromáticos. Como es bien sabido, este transporte es saturable y está sometido a fenómenos de competencia entre los aminoácidos que lo utilizan. En base a esto, se parte de la tirosina, que es un aminoácido esencial que se transforma en L-dopa, precursor de la dopamina, mediante la enzima reguladora tiroxina hidroxilasa. No obstante, a pesar de esta vía de síntesis, se ha demostrado que la administración de una mayor cantidad de tirosina tampoco genera un incremento significativo de dopamina (Carlsson, 2002).

1.2.2. Estructura química

Su nombre químico es L-3,4 dihidroxifenilalanina y su fórmula empírica es $C_9H_{11}NO_4$, siendo su peso molecular 197,2. En la figura 2 se muestra su estructura química.

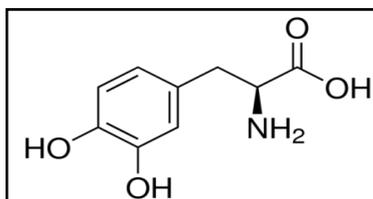


Figura 2. Estructura química de la levodopa
(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product>).

1.2.3. Propiedades fisicoquímicas

L-dopa se presenta en forma de polvo cristalino, blanco o casi blanco. A temperatura ambiente, presenta una solubilidad de 66 mg/mL en agua, 1 mg/mL en DMSO y 0,5 mg/mL en HCl. Es insoluble en etanol al 96%. Presenta un punto de fusión entre 276 y 286 °C y una absorción UV máxima a 280 nm.

Se trata de un compuesto hidrofílico, que presenta carga positiva y negativa (zwitterión) en valores de pH de 3 a 9, lo que provoca su baja solubilidad cuando se encuentra la solución dentro de este rango (Kankkunen y cols., 2002).

Es una molécula fácilmente oxidable, por lo que debe conservarse en envases bien cerrados y protegidos de la luz.

1.2.4. Mecanismo de acción

Tras su administración por vía oral, levodopa alcanza el SNC tras cruzar la BHE por medio de transportadores que permiten su paso desde el intestino. Una vez en la circulación encefálica, entra a la neurona directamente y es convertida en dopamina mediante la dopamina descarboxilasa (DDC). Levodopa y sus derivados siguen diversas vías metabólicas intra y extraneuronales como se recoge en la figura 3 (Juncos, 1992).

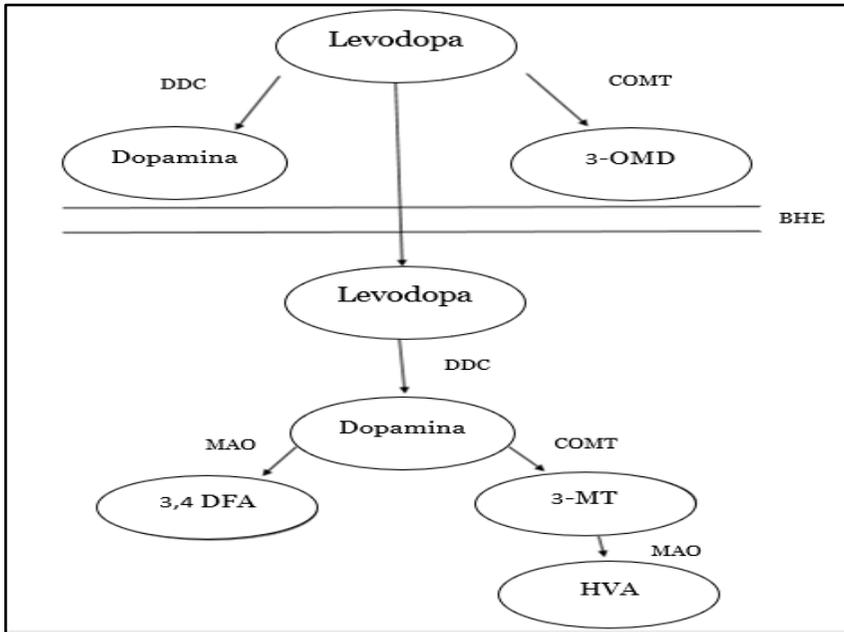


Figura 3. Vías del metabolismo de levodopa. DDC: Dopa descarboxilasa; COMT: Catecol orto metil transferasa; BHE: Barrera hematoencefálica; 3-OMD: 3-orto metil dopa; 3,4-DFA: Ácido 3,4- dihidroxifenil acético; 3-MT: 3-metoxitiramina; HVA: Ácido homovanílico (Mercuri y cols., 2005).

Este precursor de la dopamina está involucrado en la vía de biosíntesis de catecolaminas (John y cols., 2007) interviniendo en la síntesis de dopamina, noradrenalina y adrenalina, siendo la dopamina la primera catecolamina producida a partir de levodopa, seguida de la síntesis de adrenalina y noradrenalina por diferentes modificaciones de esta molécula.

Una vez alcanza el cerebro, levodopa se convierte rápidamente en dopamina por la enzima dopa descarboxilasa (Fan, 2008). Este neurotransmisor actúa estimulando directamente los receptores dopaminérgicos tipo 1 y tipo 2, asociándose los receptores del tipo 1 con un mayor riesgo de complicaciones motoras.

La liberación de la dopamina desde la terminal sináptica se haría siguiendo el patrón de descarga tónico y fásico característico de la sinapsis dopaminérgica. La dopamina liberada al espacio sináptico es recaptada por la neurona dopaminérgica a través

del transportador de dopamina (DAT) y realmente almacenada para su liberación. Este mecanismo de aclaramiento sináptico es altamente eficiente (Jankovic, 2002). Probablemente, levodopa, además de convertirse en dopamina, sufre transformación a noradrenalina, así como a productos trazas de aminas, los cuales actúan en receptores no dopaminérgicos (Figura 4).

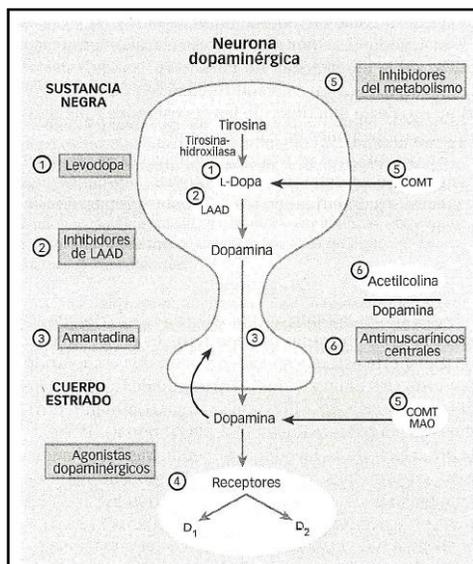


Figura 4. Esquema de los lugares de acción de los fármacos empleados en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson. COMT: Catecol-O-metiltransferasa; LAAD: L-aminoácido aromático-decarboxilasa; MAO: Monoamino oxidasa (Mercuri y cols., 2005).

La combinación de estos fenómenos podría explicar la magnífica potencia de este fármaco en la EP, superior en todas las etapas a la obtenida por la estimulación directa de los receptores mediante el empleo de agonistas dopaminérgicos (Mercuri y cols., 2005).

Como se refirió en la Tabla 1, las formulaciones de medicamentos de levodopa comercializadas involucran a otros fármacos como carbidopa y benserazida, que contribuyen a prevenir la conversión a dopamina fuera del SNC (Krack y cols., 1998).

1.2.5. Farmacocinética

1.2.5.1. Absorción

Cuando se administra por vía oral, levodopa es absorbida en el intestino delgado, absorbiéndose en su totalidad en el duodeno y en las primeras porciones del yeyuno. Este proceso tiene lugar a través de un sistema de transporte estereoespecífico y saturable, compartido por todos los aminoácidos neutros de elevado peso molecular (valina, leucina, isoleucina, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por ello, la absorción de levodopa empeora algo tras una alimentación rica en proteínas, pues aumenta la concentración de aminoácidos competidores, y mejora tras la ingesta de comidas ricas en hidratos de carbono. No obstante, aunque los alimentos interfieren en la absorción del fármaco, se suele administrar con las comidas, o inmediatamente después, para reducir síntomas como náuseas y vómitos (Stocchi y cols., 2005).

Los niveles plasmáticos alcanzan el valor máximo alrededor de 1 hora después de su administración, dependiendo de los valores de pH y ritmo de vaciamiento gástrico. La biodisponibilidad media es del 30%, aunque las variaciones interindividuales son numerosas (Khor y cols., 2007).

1.2.5.2. Disposición

Una vez alcanzada la circulación sistémica, levodopa se distribuye en el organismo, alcanzando órganos como hígado, músculo y riñón. No obstante, los procesos metabólicos sobre la molécula se inician ya en el tracto gastrointestinal. A nivel gástrico, la descarboxilación de levodopa aumenta en presencia de factores que retarden su vaciamiento, como la disminución del pH gástrico, estreñimiento y los fármacos con efecto anticolinérgico, que generan enlentecimiento y reducción de la absorción del fármaco (Chana y cols., 2009). En la mucosa intestinal también existen procesos de descarboxilación, propagándose después en casi todos los tejidos, por lo que la concentración que alcanza en circulación sistémica es muy reducida debido a la biotransformación presistémica a dopamina por acción de la DDC.

En el plasma, y en presencia del inhibidor de la DDC, levodopa es metabolizada a nivel hepático, muscular, renal y en los glóbulos rojos por la COMT, formando 3-*o*-metil-dopa (3-OMD). Éste posee una semivida de 24 h en el plasma y se acumula, llegando a alcanzar niveles plasmáticos de 10-20 veces superiores a los de levodopa. De hecho, se ha demostrado que elevados niveles de 3-OMD interfieren el paso de levodopa a nivel de la BHE (Chana y cols., 2009). Sin embargo, en la práctica clínica, esta contribución es escasa en relación al *pool* de aminoácidos neutros de cadena larga que compiten por la entrada de levodopa a nivel cerebral.

Por tanto, debido a su extenso metabolismo, son necesarias dosis muy elevadas del fármaco para obtener el efecto deseado. Por este motivo, se asocia junto con inhibidores de la dopa-descarboxilasa periférica, tales como carbidopa y benserazida, las cuales impiden la transformación prematura a dopamina, permitiendo administrar dosificaciones menores y minimizar así los efectos secundarios gastrointestinales y cardiovasculares provocados por la dopamina formada antes de llegar al cerebro. Tales asociaciones han desplazado prácticamente a levodopa sola, además de obtener una respuesta más rápida al inicio del tratamiento (Khor y cols., 2007).

Los niveles plasmáticos de levodopa que acceden a cerebro han de atravesar la BHE, y lo hacen mediante un sistema de transporte activo. Una vez allí comienza un proceso de acceso neuronal que ha sido previamente detallado en el apartado de *mecanismo de acción*.

En lo que respecta al proceso de excreción, la mayor parte de la dosis es excretada por la orina, mientras que una pequeña fracción lo hace por las heces.

1.2.6. Reacciones adversas

Las reacciones adversas más características al inicio del tratamiento son alteraciones gastrointestinales que cursan con náuseas, vómitos y anorexia y, en ocasiones, úlcera péptica y hemorragia gastrointestinal. Estas reacciones pueden acompañarse de alteraciones cardiovasculares con hipotensión ortostática, que normalmente es asintomática, pero puede verse asociada con debilidad y mareos, arritmias cardíacas e hipertensión. Asimismo, son frecuentes las alteraciones psíquicas, que afectan principalmente a ancianos e incluyen agitación, ansiedad, euforia, pesadillas e insomnio, y raras veces somnolencia y depresión. Pueden aparecer alteraciones más graves, como agresión, alucinaciones paranoicas, delirio, depresión grave, con o sin comportamiento suicida, y cuadros de demencia. En estos casos se debe reducir la dosis o suprimir la terapia. Estos efectos psíquicos son más prevalentes en los pacientes con Parkinson postencefálico o con historial de alteraciones mentales (Kaiser y cols., 2003).

También se han observado movimientos respiratorios exagerados y crisis oculógiras (desviación involuntaria de la mirada) en individuos con Parkinson postencefálico, y el conocido efecto *off-on* (alternancia rápida de normalidad y aquinesia) en terapias de larga duración. Raramente, puede aparecer anemia hemolítica autoinmune y leucopenia transitoria.

Los efectos sobre la función hepática y renal son generalmente leves. Además, se ha observado coloración rojiza de la orina, que en reposo se oscurece, y de otros fluidos corporales.

Las alteraciones gastrointestinales y cardiovasculares son menos frecuentes cuando se administra junto con un inhibidor de la dopa-descarboxilasa, pero los efectos centrales como la disquinesia y las alteraciones mentales aparecen al principio del tratamiento (Kaiser y cols., 2003).

1.2.7. Avances en la administración de levodopa

Actualmente, se puede encontrar en el mercado español levodopa asociada a otros compuestos, como se recoge en la Tabla 2.

Formulación	Forma farmacéutica	Presentación
L-dopa + Benserazida	Comprimidos oral	vía Madopar® (250 mg /50 mg) Madopar retard® (100 mg /25 mg)
L-dopa + Carbidopa	Comprimidos oral	vía Sinemet® (250 mg /25 mg) Sinemet retard® (200 mg / 50 mg) Sinemet Plus® (100 mg /25 mg) Sinemet Plus retard® (100 mg /25 mg)
L-dopa + Carbidopa	Gel intestinal	Duodopa® (20 mg /5 mg)

Tabla 5. Formulaciones de levodopa asociada a otros compuestos comercializados en el mercado español.

Las presentaciones Madopar®, Sinemet® y Sinemet Plus® son de liberación inmediata, mientras que las presentaciones *retard* se encuentran recubiertas por una película que controla la cesión del fármaco, produciendo una liberación prolongada del mismo. Como es bien sabido, estos sistemas suponen una ventaja frente a los de liberación inmediata, ya que se reduce la frecuencia de administración del fármaco, simplificando la posología y consiguiendo un mejor cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

Duodopa®: Forma de presentación de levodopa /carbidopa en forma de gel intestinal. El gel se administra mediante una bomba portátil de perfusión, dispositivo colocado en el exterior del abdomen que conecta con el intestino a través

de una sonda muy fina, depositando en el intestino la cantidad de levodopa que requiere el paciente. Se emplea en el tratamiento del estado avanzado de la EP con fluctuaciones motoras graves e hiperdiscinesias cuando han fracasado las combinaciones de medicamentos disponibles. Esta presentación conlleva ciertas ventajas, como la administración constante de levodopa, así como una absorción directa del fármaco en el intestino delgado, evitando la barrera gástrica, que a veces supone un retardo en la absorción del fármaco por no permitir el avance de levodopa hasta el intestino delgado (Santos-García y cols., 2012).

En los últimos años son muchos los estudios realizados para conseguir una mejora en el tratamiento de la EP con levodopa. A continuación, se mencionan algunas de las nuevas presentaciones de levodopa originadas por asociación con otros compuestos o por modificaciones químicas que le confieren distintas características farmacocinéticas:

- **Triple combinación**: combinación de levodopa con un inhibidor de la DDC y un inhibidor de la COMT (Stalevo®). Ha sido aprobado por la FDA para uso en portadores de EP que presentan deterioro de fin de dosis. Prolonga la duración del efecto en 30 minutos por administración y permite una reducción de la dosis diaria de levodopa en 100 a 200 mg (Deane y cols., 2004). Este medicamento puede aumentar las discinesias, lo que se resuelve reduciendo la dosis total. Asimismo, puede aparecer coloración oscura de la orina.
- **Levodopa metil éster** (Melevodopa®): profármaco muy soluble en agua. Administrado por vía oral, reduce el tiempo necesario para alcanzar el estadio de beneficio motor y resulta especialmente útil en portadores de EP con complicaciones motoras (Swope, 2004). Este medicamento aún está en fase III de evaluación en Europa.

- **Parcopa®**: forma de presentación de levodopa/carbidopa en forma de solución oral. Su mayor ventaja radica en la facilidad para la ingestión, así como la disminución del tiempo de vaciado gástrico (Keating y cols., 2005).

1.3. ESTABILIDAD DE LEVODOPA

Desde hace ya algunos años, existen evidencias suficientes que demuestran que levodopa es una molécula fácilmente oxidable en presencia de agua y luz. Así mismo, se ha demostrado que el pH del medio influye drásticamente en la estabilidad de esta molécula, de forma que sufre un rápido proceso de oxidación a pH básico, mientras que a pH ácido se ralentiza, aumentando significativamente su estabilidad (Nigam, 2015).

El proceso oxidativo de levodopa conlleva la formación de melaninas, generando especies reactivas de oxígeno (radicales libres O_2 , OH , H_2O_2), tal y como señalaron Spencer y cols. (1994). Estos radicales libres generados pueden reaccionar con componentes celulares, como el ADN, causando un daño celular que puede conducir a otras enfermedades, como la enfermedad de Alzheimer o la EP.

Este mecanismo de oxidación de levodopa que conduce a la formación de melaninas ha sido ampliamente estudiado por numerosos autores (Korytowski y cols., 1987; Halliwell, 2001; Nigam, 2015). Dicha transformación ocurre en cuatro etapas, como se observa en la figura 5, siendo las reacciones que tienen lugar las que se resumen a continuación (Kamkaen y cols., 2007):

- (1) Formación de la quinona 3,4-quinono-fenilalanina de cadena abierta (dopaquinona).
- (2) Ciclación de la quinona a ácido 2,3-dihidro-5,6-quinona-2-carboxílico (dopacromo).
- (3) Conversión de dopacromo en ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico y posteriormente en ácido indol-5,6-quinona-2-carboxílico.
- (4) Formación de melaninas como producto final (Eumelaninas).

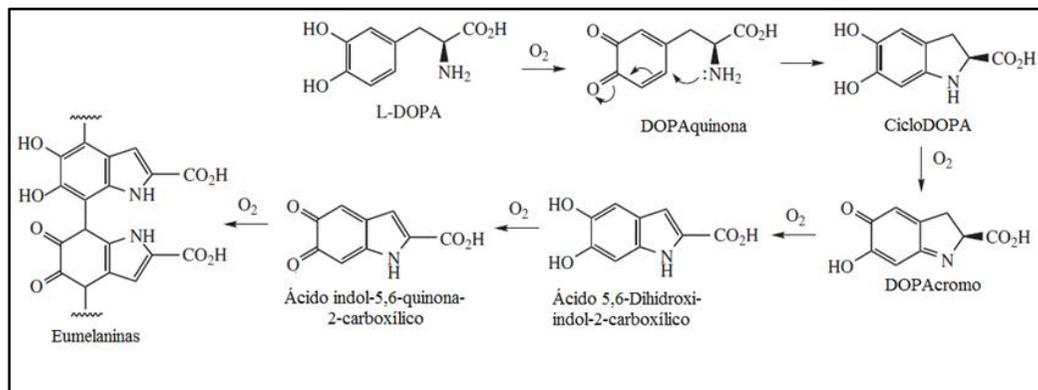


Figura 5. Síntesis de eumelaninas a partir de L-dopa (Kamkaen y cols., 2007).

Numerosos autores han demostrado que el proceso de oxidación de levodopa acelera enormemente la generación de radicales libres a partir de la reacción de Fenton (Kruk y cols., 1989; Kladny y cols., 1995; Bounias y cols., 1997). Esta generación de radicales libres es debida a la formación de cantidades considerables de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en la primera etapa de la reacción, es decir, cuando se produce la transformación de la amina en amina quinona y tiene lugar el cierre del anillo que da como resultado la formación de los compuestos dopacromo y 5,6 dihidroxiindol (Swan, 1974).

En base a este comportamiento, se ha demostrado que la presencia de antioxidantes en una formulación de levodopa contribuye a la estabilidad del fármaco, frenando el proceso de oxidación mediante la captación de radicales libres y actuando como portadores de protones (Zaitone y cols., 2013).

1.3.1. Moléculas antioxidantes y mecanismos de acción

Como se ha expuesto en el apartado anterior, levodopa es una molécula muy susceptible a la oxidación; es por ello que la adición a la formulación de un agente antioxidante contribuiría activamente a prevenir o retardar dicho proceso que, en algunos casos, podría revertir el daño oxidativo de las moléculas afectadas.

Los componentes antioxidantes ejercen su acción siguiendo distintos mecanismos. Para facilitar su comprensión, se acude previamente a una clasificación de los antioxidantes existentes (Flora, 2009), entre los que se distinguen:

- Antioxidantes enzimáticos, como superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa, glutatión S-transferasa, tiorexina-reductasa y sulfoximetionina-reductasa.
- Antioxidantes no enzimáticos, como glutatión, ácido úrico, ácido dihidro-lipoico, ubiquinol (Co-enzima Q) y melatonina.
- Vitaminas antioxidantes, como ácido ascórbico, alfa-tocoferol y beta-caroteno.
- Carotenoides como luteína, zeaxantina y licopeno.
- Polifenoles, en sus categorías de flavonoides y no flavonoides.

En base a su mecanismo de acción, los antioxidantes se clasifican en:

- **Antioxidantes primarios.** Previenen la formación de radicales libres, evitando de ese modo el daño oxidativo. Existen tres mecanismos por los que llevan a cabo su acción: a) mediante descomposición enzimática de radicales H_2O_2 . En este grupo cabe destacar las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa, así como curcumina; b) mediante secuestro por quelación de iones metálicos catalíticos, destacando proteínas como transferrina, ferritina, albúmina, y otros como AEDT; c) desplazando enzimáticamente las especies reactivas de oxígeno, destacando la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Mishra y Bisht, 2011).
- **Antioxidantes secundarios.** Atrapan los radicales libres que se forman, impidiendo así la iniciación de la cadena oxidativa o interrumpiendo su propagación. Entre estos se distinguen los de naturaleza hidrofílica (ácido ascórbico, ácido úrico, bilirrubina) o los lipofílicos (vitaminas E y A, carotenoides, melatonina, estrógenos) (Butterfield y cols., 2002).

- **Antioxidantes terciarios.** En caso de que los anteriores sistemas antioxidantes no sean eficaces y las biomoléculas se oxiden, todas las células contienen una serie de enzimas que conforman los llamados sistemas de reparación. Dichos sistemas incluyen enzimas encargadas de restaurar directamente las biomoléculas a su conformación nativa, así como enzimas catabólicas que pueden degradar específicamente las moléculas no funcionales; esta degradación puede servir no sólo para eliminarlas del citosol, sino para aumentar la cantidad de precursores para una posible resíntesis (Decker y cols., 2005).

Ya que existe una gran variedad de moléculas antioxidantes y ante la imposibilidad de realizar estudios con todas ellas, en el presente trabajo de investigación se seleccionaron tres antioxidantes, con el fin de determinar el antioxidante más apropiado para la formulación de levodopa a desarrollar: curcumina, ácido ascórbico y superóxido dismutasa.

1.3.1.1. Curcumina

Curcumina es un compuesto polifenólico derivado del rizoma de *Curcuma longa*. Se trata de una molécula que está despertando un gran interés en los últimos años porque presenta una gran variedad de actividades farmacológicas, tales como antiinflamatorio, antioxidante, anticancerígeno, antivírico, hepatoprotector, antidiabético y neuroprotector (Lim y cols., 2001; Ullah y cols., 2017).

Respecto a su presentación, la forma comercial contiene tres componentes principales: curcumina (aprox. 77%), detoxicurcumina (aprox. 17%) y bisdetoxicurcumina (aprox. 3%), como se muestra en la figura 6.

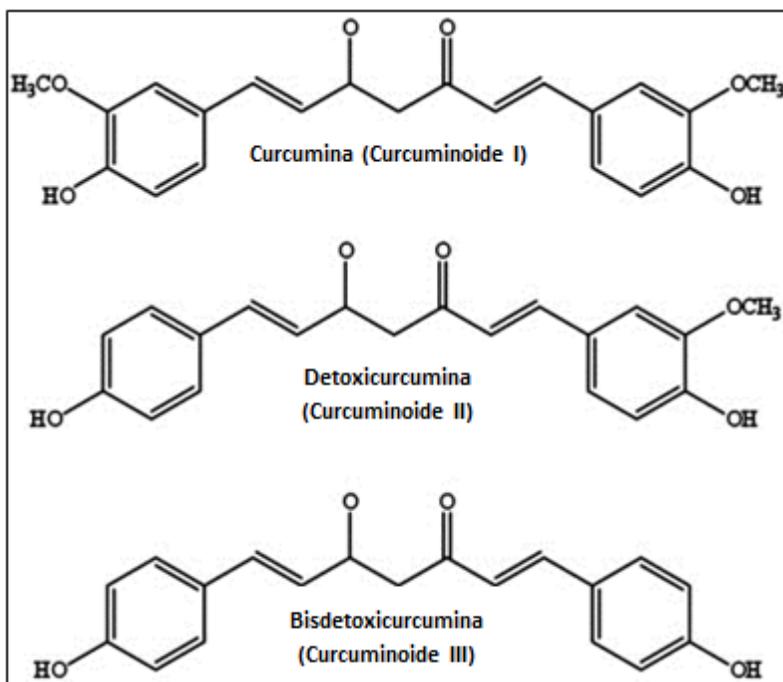


Figura 6. Estructura de los tres principales curcuminoides de curcumina (https://www.researchgate.net/Chemical-structure-of-curcuminoids-curcumin-demethoxycurcumin-and-bisdemethoxy-curcumin_fig1_255695470).

Desde el punto de vista químico, curcumina es soluble en dimetilsulfóxido, etanol o acetona; sin embargo, es extremadamente insoluble en agua a pH ácido y neutro, siendo soluble en álcalis (Suresh y cols., 2013). Además, este polifenol se caracteriza por ser químicamente inestable en condiciones ácidas y alcalinas, así como sensible a la luz solar. En condiciones fisiológicas puede existir en dos formas tautoméricas, ceto y enol, que coexisten en equilibrio (Figura 7). Dicho equilibrio tautomérico depende en parte de la polaridad y del pH del disolvente, de forma que en disolventes no polares, curcumina existe en la forma enólica, debido a la formación de puentes de hidrógeno intramoleculares, mientras que en presencia de disolventes polares predomina la forma ceto (Dinkova-Kostova y cols., 1999).

Así mismo, en soluciones ácidas y neutras domina la forma ceto de la curcumina y actúa como un potente donador de átomos de hidrógeno, mientras que en condiciones alcalinas predomina la forma enólica, actuando como donador de electrones (Jovanovic y cols., 1999).

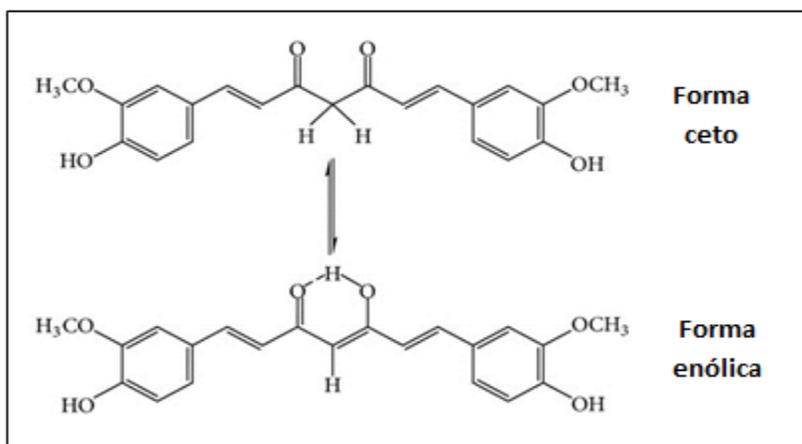


Figura 7. Representación del equilibrio tautomérico ceto y enol de curcumina (Basnet y Skalki-Basnet, 2011).

Con estas premisas, Wang y cols. (1997) demostraron ya una importante dependencia del pH de la curcumina sobre su solubilidad. A $\text{pH} < 1$, las soluciones acuosas de curcumina presentan un color rojo, que indica la existencia de la forma protonada (H_4A^+). En el intervalo de pH de 1 a 7, la forma neutra aumenta (H_3A), siendo la solubilidad en agua muy baja en este rango de pH y la preparación adquiere un color amarillo. A $\text{pH} > 7,5$, la solución posee color rojo y las formas aniónicas son predominantes, como resultado de la disociación de los tres protones ácidos en la curcumina (formas H_2A^- , HA_2^- y A_3^-).

Cabe destacar que los principales componentes colorantes de la curcumina son relativamente estables a pH ácido, pero se descomponen rápidamente a pH básico. Sobre esta base de solubilidad y estabilidad de la curcumina, es evidente que a pH fisiológico, la molécula es poco soluble en agua e inestable. Es por ello que la absorción gastrointestinal sea escasa. Si se añade un importante metabolismo intestinal y hepático, todo ello resulta en una deficiente biodisponibilidad oral

(Hergenbahn y cols., 2003). Por lo tanto, el desarrollo de un sistema de administración de fármacos eficaz, capaz mejorar la estabilidad de curcumina administrada por otras vías se convierte en una estrategia adecuada para mejorar la administración de este fármaco (Li y cols., 2007).

Como se ha comentado con anterioridad, el estrés y el daño oxidativo se encuentran implicados en la fisiopatología de muchas enfermedades crónicas, trastornos inflamatorios y degenerativos. La generación de ROS, particularmente O_2^- y OH^- , juegan papeles importantes en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como la EP y el Alzheimer (Aggarwal y cols., 2006; Biesalski, 2007). Algunos autores postulan que la propiedad antioxidante de la curcumina radica principalmente en su estructura fenólica (Priyadarsini y cols., 2003; Ak y Gülçin, 2008), de manera que la mayor eliminación de radicales libres se ha observado en compuestos con grupos hidroxifenólicos, que restringen la donación de electrones, como dos grupos metoxi en posición orto (Youssef y cols., 2004). Esto es debido a que la curcumina es un captador de electrones más potente que detoxicurcumina y bisdetoxicurcumina (Jayaprakasha y cols., 2002). La molécula de curcumina en la forma tautomérica enol posee propiedad eliminadora de radicales libres (Goel y cols., 2008), mientras que en la forma ceto, el grupo metileno es sustituido por un grupo β -dicetona (heptadienona), que posee capacidad de eliminar los radicales libres (Venkateswarlu y cols., 2005). No obstante, la sola presencia de β -dicetona no es suficiente para captar los radicales libres que se hayan producido (Jovanovic y cols., 2001).

Numerosos estudios han demostrado los grandes beneficios que proporciona curcumina frente a las enfermedades neurodegenerativas, debido a su potente actividad antioxidante y antiinflamatoria (Song y cols., 2016). Además, autores como Mythri y cols. (2012) la consideran una molécula prometedora frente a la EP, debido a sus propiedades neuroprotectoras. Este polifenol presenta numerosos beneficios frente a la EP, ya que previene la reducción de dopamina, la muerte de

las neuronas dopaminérgicas y la inflamación, a la vez que controla el proceso del estrés oxidativo.

1.3.1.2. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico o vitamina C es un ácido orgánico con capacidad antioxidante. Es hidrosoluble, termolábil y se oxida con facilidad. Interviene en numerosas reacciones metabólicas, ya que posee una potente actividad reductora debido a la presencia de sus dos grupos donadores de protones.

Su actividad antioxidante deriva del desplazamiento del ácido L-ascórbico a su forma oxidada L-dehidroascórbico, lo cual también habilita a la molécula para combatir con los radicales oxidativos ($\cdot\text{O}_2$ y $\cdot\text{OH}$) y los radicales acuosos, como el oxígeno singlete (Bielski y cols., 1985).

El ácido ascórbico posee dos valores de pKa y el grado de ionización va a influir en la formación de su forma pro-oxidante o antioxidante, de modo que cuanto más ionizado se encuentre, mayor probabilidad tendrá de ser un pro-oxidante si hay hierro disuelto en el medio. Las dos formas moleculares principales del ácido ascórbico se encuentran en equilibrio y ambas presentan actividad biológica (Figura 8).

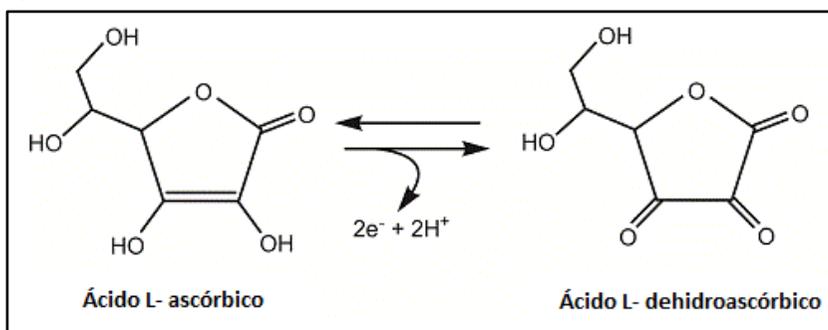


Figura 8. Formas moleculares en equilibrio de ácido ascórbico (Varshosaz y cols., 2014).

Por lo general, el estado oxidado del ácido ascórbico es difícil de determinar a un pH < 2, ya que su reactividad a este pH es baja. Por otro lado, el ácido ascórbico puede regenerarse después de someterse a una oxidación según el desplazamiento del equilibrio que lo devuelva hacia su forma original.

Nagayama y cols. (2004) demostraron la capacidad de la molécula de ácido ascórbico para mejorar la biodisponibilidad de levodopa en pacientes con EP. Parece ser que tras la administración de ácido ascórbico se produce un aumento de la acidez gastrointestinal, favoreciendo la ionización de levodopa, forma en la que se encuentra favorecida la absorción de la misma. Otros autores como Varshosaz y cols. (2014) han expuesto la capacidad neuroprotectora del ácido ascórbico frente a los radicales libres, siendo favorable su administración en la EP.

1.3.1.3. Superóxido dismutasa

El grupo de las superóxido dismutasas (SOD) lo conforman diferentes tipos de metaloenzimas denominadas así porque contienen un ion metálico en su centro activo (manganeso, hierro o cobre). En las células eucariotas, los metales que se unen son cobre y zinc (Cu y Zn-SOD) o manganeso y hierro (Mn y Fe-SOD). Estas enzimas se distribuyen ampliamente en el citosol celular donde, solubilizadas, constituyen enzimas bastante estables (De la Torre, 1994).

Las SOD son enzimas que tienen actividad antioxidante, por lo que ejercen un papel relevante en la eliminación de radicales libres de peróxido del organismo. Las enzimas Fe- y Mn-SOD poseen monómeros de 200 aminoácidos y se encuentran como dímeros o tetrámeros, por lo que se trata de enzimas de gran tamaño. Por su parte, la enzima con centro activo de Cu o Zn-SOD, puede contener un monómero de 150 aminoácidos. A título de ejemplo, se puede apreciar en la figura 9, la enzima Fe-SOD y Mn-SOD, siendo el color rosado el centro perteneciente al ión Fe, y el de color púrpura al de ión Mn; la enzima Cu-, Zn-SOD, posee el ión Zn en color negro y el monómero del Cu se representa en color verde (Miller, 2004).

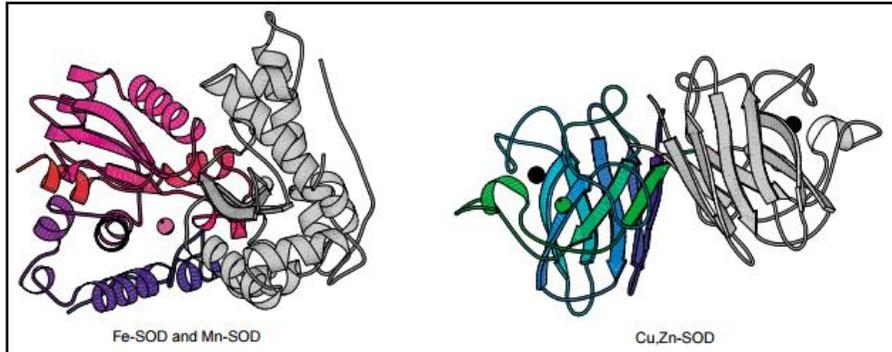


Figura 9. Estructura de las SOD (Miller, 2004).

El centro activo de la SOD, donde se localizan el cobre y el zinc, es el lugar donde se produce la reacción de catálisis por dismutación del radical libre de superóxido (O_2^-) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y O_2 en presencia del protón H^+ . Ambos están implicados en la protección celular contra la toxicidad causada por ROS. El zinc forma parte de la estructura de la enzima (SOD) y su actividad puede disminuir si hay una deficiencia de dichos elementos.

La reacción de catálisis de la SOD se produce por un mecanismo de óxido-reducción por la acción del cofactor metálico. SOD posee dos moléculas de superóxido, una libera un electrón y lo coloca en la otra. Así, una de ellas termina con un electrón menos, formando oxígeno normal, y la otra termina con un electrón extra. La que contiene el electrón extra recoge entonces rápidamente dos iones de hidrógeno para formar peróxido de hidrógeno. Por supuesto, el peróxido de hidrógeno es también un compuesto peligroso, por lo que la célula debe usar la enzima catalasa para desintoxicarse (Goodsell, 2007).

La EP se caracteriza por presentar un elevado nivel de la enzima SOD, se cree que debido a la presencia de radicales libres como producto del metabolismo de la dopamina, ejercido por la MAO-B. Sin embargo, se ha demostrado que los pacientes tratados con levodopa presentan en sus células sanguíneas una baja actividad SOD. Este hecho es atribuible a que el metabolismo de dopamina produce estrés oxidativo, obteniendo niveles altos de radicales peróxidos (H_2O_2) provocando así

una mayor actividad SOD y menor cantidad disponible de la enzima (Ihara y cols., 1999).

1.4. SISTEMAS NANOTRANSPORTADORES DE FÁRMACOS

La Nanotecnología está evolucionando a ritmos agigantados. Se considera que en un corto periodo de tiempo, el uso de los medicamentos no tendrá como objetivo la liberación, absorción y distribución de la molécula activa en el organismo, sino que se buscará una liberación y acción del fármaco en el sitio del organismo donde se localice la patología. Además, no sólo se utilizarán como terapia farmacológica, sino que éstos también serán investigados con fines diagnósticos de las diferentes patologías (Fernández y cols., 2018).

En los últimos años, se han realizado importantes esfuerzos para desarrollar estrategias que ayuden al paso de moléculas activas a través de la BHE. Entre éstos, se han propuesto diferentes enfoques casi todos ellos basados en la Química, tales como el uso de péptidos quiméricos, proteínas catiónicas y profármacos, entre otros (Navarro y cols., 2008; Wang y Maitz, 2018). Sin embargo, otras alternativas basadas en la Nanotecnología, han ganado una creciente atención como estrategias más prometedoras para administrar fármacos dirigidos al SNC. Baste citar algunos medicamentos que incorporan fármacos formando parte de sistemas nanoestructurados, como doxorubicina liposomal o la unión a la albúmina de paclitaxel, ya utilizados en clínica, mientras que otros, tales como doxorubicina incorporada en micelas poliméricas, se encuentran aún en ensayos clínicos (Micheli y cols., 2012).

Existen diferentes estructuras nanométricas que se han ido desarrollando con el tiempo, cada una con características estructurales propias, pero con un objetivo común: servir de transporte de fármacos al lugar afectado, mejorando así la biodisponibilidad en el organismo. En la Tabla 3 se describen algunos de los sistemas formulados para la administración de fármacos hacia el SNC.

Sistema transportador	Propiedades
Nanopartículas poliméricas	Plataforma polimérica versátil para direccionar de forma controlada, sostenida y selectiva fármacos de bajo peso molecular y macromoléculas (genes y proteínas).
Liposomas	Formados por bicapas lipídicas que encapsulan fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos. Escapan al sistema inmune cuando son recubiertos con PEG en su superficie.
Niosomas	Vesículas preparadas con tensioactivos no iónicos. Son capaces de encapsular fármacos tanto hidrofóbicos como hidrofílicos.
Micelas poliméricas	Estructuras de pequeño tamaño, alta capacidad de carga, mayor potencial de solubilización de fármacos hidrófobos, mejora de la estabilidad e incremento del tiempo de circulación en el organismo.
Ciclodextrinas	Estructuras constituidas por oligosacáridos cíclicos naturales. Son capaces de encapsular fármacos en su interior favoreciendo su solubilidad, estabilidad y biodisponibilidad.

Tabla 6. Algunos tipos de nanoestructuras utilizadas como sistemas transportadores de fármacos (Kapse-Mistry, 2014).

1.4.1. Liposomas

Los liposomas han recibido una especial consideración como sistemas transportadores de compuestos terapéuticamente activos, debido a sus especiales características, tales como la capacidad para incorporar fármacos hidrófilos e hidrófobos, biocompatibilidad, baja toxicidad, no activación del sistema inmune y dirigir la liberación de compuestos bioactivos al sitio de acción (González-Rodríguez y Rabasco, 2011).

Se trata de estructuras vesiculares esféricas, cuya característica diferencial es la presencia de una bicapa con componentes fosfolipídicos. Esta estructura favorece la afinidad por las sustancias hidrofóbicas (apolares) en una parte (cola) y por las sustancias hidrofílicas (polares) en la otra porción (cabeza) (Villasmil-Sánchez y cols., 2010).

En la Figura 10 se puede observar la estructura que conforman los fosfolípidos en un liposoma o en una micela.

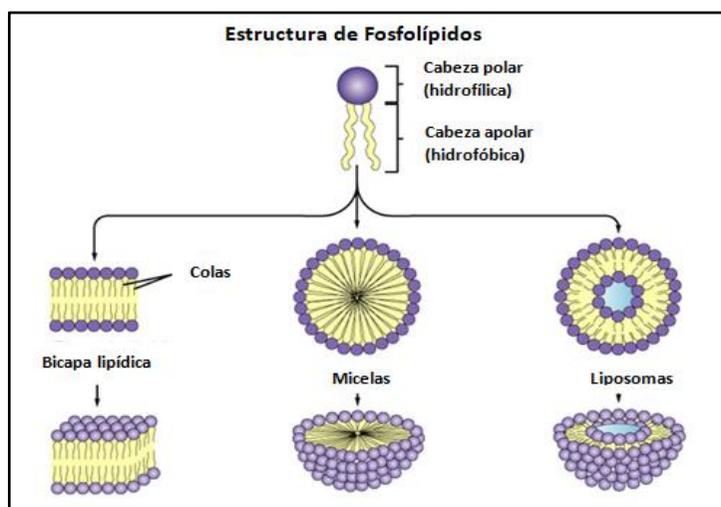


Figura 10. Estructura que forman los fosfolípidos (<http://www.naukas.com>).

Su carácter anfifílico les confiere propiedades únicas que les permiten servir como agentes vehiculantes de principios activos de naturaleza tanto hidrofílica como hidrofóbica. Por lo general, la parte hidrofóbica se dispone en la zona externa del

liposoma, mientras que la parte hidrofílica conforman el compartimento interno acuoso del mismo. Por las propiedades de los constituyentes, estas vesículas presentan niveles bajos de toxicidad intrínseca, brindando adecuada protección al principio activo.

En el organismo, a nivel sistémico, se produce un reconocimiento de los liposomas por parte del sistema retículo endotelial. Por esta razón, las propiedades farmacocinéticas vendrán determinadas por las características fisicoquímicas del liposoma. De la misma manera, en base a este principio, es posible modificar las propiedades de las vesículas en función del lugar de acción, con fines a lograr en ese sitio la mayor liberación del fármaco, y disminuir en lo posible los efectos secundarios (Navarro y cols., 2008).

No obstante, los liposomas no están exentos de limitaciones, siendo una de las más importantes, la inestabilidad, queda en parte solventada tras la incorporación en su formulación de sustancias como el colesterol (Kaur y cols., 2002).

1.4.2. Ciclodextrinas

En los últimos años, está recibiendo una atención considerable en el campo farmacéutico la inclusión de fármacos en ciclodextrinas, ya que éstas contribuyen a mejorar ciertas características de los fármacos, como solubilidad en medio acuoso, estabilidad química y biodisponibilidad (Kfoury y cols., 2014).

Las ciclodextrinas (CD) son oligosacáridos cíclicos, formados por unidades de glucopiranosas. Son sustancias cristalinas, homogéneas y no higroscópicas (Szejtli, 2004). Tienen forma de anillo tronco cónico con los C₂ y C₃ de los residuos de glucosa hacia el interior del anillo y con el C₆ hacia el exterior. A su vez, los -OH del C₆ de las CD se encuentran situados en la cara ancha del tronco cónico, mientras que los -OH de los C₂ y C₃ lo hacen en la cara estrecha de dicho tronco (Gharib y cols., 2015). Su cavidad interna es relativamente hidrofóbica, mientras que su superficie externa es hidrofílica. Como resultado, las CD pueden atrapar las moléculas hidrofóbicas para formar complejos de inclusión solubles en agua (Moyano y cols., 1994; Szejtli,

1997). Mediante difracción de Rayos-X se ha demostrado que las CD tienen un interior altamente apolar (grupos $-CH$) y una superficie exterior hidrofílica debido a los grupos hidroxilo. Esta estructura particular confiere a las CD la capacidad de incluir un gran número de moléculas hidrófobas para formar complejos de inclusión (Piel y cols., 2007). Asimismo, las CD pueden formar complejos de inclusión con muchos fármacos muy solubles potenciando su biodisponibilidad, además de mejorar la estabilidad física y térmica de los fármacos, así como limitar sus efectos tóxicos (Kfoury y cols., 2014).

Las CD más comunes, reflejadas en la figura 11, se forman a partir de seis (α -CD), siete (β -CD) u ocho (γ -CD) unidades de d-glucopiranosas, con sus respectivos tamaños de cavidad de aproximadamente 0,5, 0,6 y 0,8 nm (Sharma y Sharma, 2001).

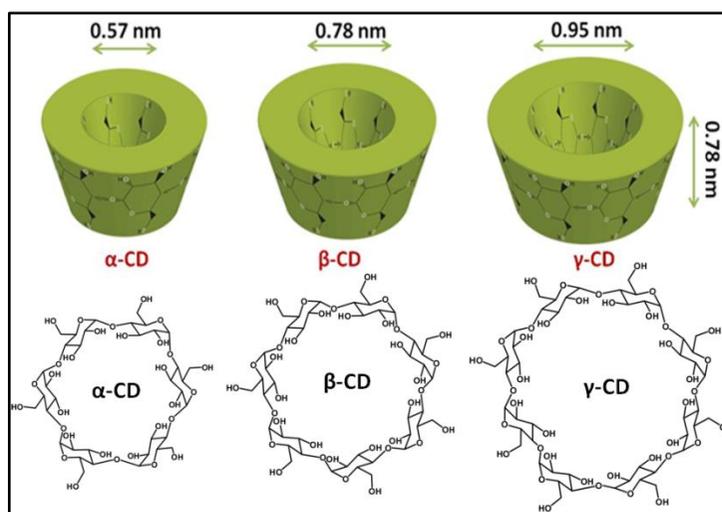


Figura 11. Tipos de ciclodextrinas y sus derivados (Nishiho y cols., 2000).

El acoplamiento del fármaco en la cavidad hidrofóbica de las CD se produce mediante la formación de enlaces no covalentes, dando lugar a complejos cuya formación cumple un equilibrio dinámico gobernado por una constante de complejación k_c (Ficarra y cols., 2000). La estabilidad de estos complejos de inclusión y, por tanto, la magnitud de su constante de complejación, depende del

grado de acoplamiento entre el fármaco huésped y la CD, de forma que a mayor k_c , mayor es la estabilidad del complejo.

La inclusión de fármacos en ciclodextrinas implica (Sharma y Baldi, 2014):

- Aumentar la biodisponibilidad de los fármacos, aumentando su solubilidad y la velocidad de disolución.
- Estabilizar el fármaco frente a la oxidación en presencia de oxígeno.
- Estabilizar el fármaco frente a la descomposición por la luz o temperatura.
- Eliminar el efecto astringente e irritante de los fármacos.
- Minimizar olores y sabores desagradables.

1.4.2.1. Ciclodextrinas como sistemas estabilizadores de fármacos

Aunque las CD se han estudiado durante más de 100 años y pueden encontrarse al menos en 35 productos farmacéuticos, aún se siguen considerando nuevos excipientes farmacéuticos (Kurkov y Loftsson, 2013).

Existen numerosas aplicaciones para las CD en la industria farmacéutica, empleándose principalmente como agentes complejantes para aumentar la solubilidad acuosa de fármacos poco solubles en agua y mejorar su biodisponibilidad y estabilidad, aumentando el efecto farmacológico y consiguiendo, por tanto, una reducción en la dosis del fármaco administrado (Arima y cols., 2001).

Estos compuestos pueden mejorar la estabilidad de diversos fármacos contra la deshidratación, hidrólisis, oxidación y fotodescomposición (Paramera y cols., 2011). Asimismo, se ha demostrado que las CD inducen a mejorar la estabilidad de los fármacos por inhibir la interacción entre el fármaco y los vehículos que conforman la formulación o por inhibir la transformación del fármaco en el lugar de absorción, ya que las CD actúan encapsulando el fármaco en su interior protegiéndolo, por tanto, de la degradación por agentes externos (Dhule y cols., 2012). Dado que el proceso de hidrólisis de los fármacos encapsulados en complejos

de inclusión es más lento que el de los fármacos libres, la inclusión de fármacos en CD juega un papel importante en la protección de las moléculas, favoreciendo así la estabilidad de los mismos.

Citemos algunos ejemplos de diversas aplicaciones: la inclusión de insulina en CD ha demostrado ser un éxito, mejorando la estabilidad de la molécula frente a la agregación, desnaturalización térmica y la degradación enzimática (Zhang y cols., 2009). Mangolim y cols. (2014) procedieron a incluir curcumina en complejos de inclusión para solventar los problemas de fotosensibilidad del fármaco. Figueiras y cols. (2009) demostraron que la formación de complejos de inclusión entre β -CD y omeprazol aumentaba la estabilidad del fármaco en condiciones neutras, ya que omeprazol sólo es estable en medios alcalinos.

1.5. ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS POR VIA INTRANASAL

Actualmente, la administración de fármacos por vía intranasal está adquiriendo una gran relevancia y está suponiendo, en algunos casos, una alternativa útil y favorable a la vía oral. Desde algunos años, esta vía se emplea para lograr una terapia efectiva y no invasiva, convirtiéndose en uno de los accesos más prometedores hacia el SNC evitando el paso a través de la BHE (Illum, 2000).

La vía intranasal ha adquirido gran importancia por ser una vía de fácil acceso, ampliamente vascularizada y altamente permeable. Presenta una gran superficie, que le confiere una elevada permeabilidad a la mucosa nasal, permitiendo una rápida absorción del fármaco e inicio del efecto terapéutico (Dahlin y cols., 2001). Los fármacos administrados por esta vía se absorben y acceden directamente a la circulación sistémica, evitando la degradación de los mismos a nivel gastrointestinal, el efecto de primer paso hepático y el metabolismo intestinal, pudiendo reducir las dosis terapéuticas disminuyendo los efectos adversos de los fármacos (Costantino y cols., 2007). Por tanto, permite el acceso a la circulación sistémica de fármacos que no se absorben por vía oral o son inestables a pH gástrico.

No obstante, las principales limitaciones para la absorción de fármacos por esta vía se relacionan con la dificultad para transportar macromoléculas con un tamaño superior a 1 kDa a través de las membranas, así como el rápido aclaramiento mucociliar y la degradación enzimática (Putheti y cols., 2009). Ello, junto al volumen máximo de administración intranasal, limitado a 25 - 250 μ L, y las alteraciones locales de la mucosa contribuyen a la gran variabilidad de acción entre pacientes que usan la vía nasal como ruta de administración de fármacos (Patil y cols., 2015).

1.5.1. Anatomía y fisiología nasal

La cavidad nasal ejerce diversas funciones, como por ejemplo la función olfatoria, la humidificación y calentamiento del aire inspirado, y la función defensiva, actuando como una barrera frente a la entrada de diversos agentes patógenos y sustancias nocivas (Kumar y cols., 2008).

Con una profundidad de 12 - 14 cm desde el vestíbulo nasal hasta la nasofaringe, se estima que en adultos, la superficie de esta mucosa oscila entre 150 y 180 cm^2 , de los cuales de 5 - 10 cm^2 constituyen el área olfatoria, la cual también tiene capacidad para absorber fármacos (Kanazawa y cols., 2017). La totalidad de la superficie no olfatoria se encuentra recubierta por una mucosa, de epitelio pseudoestratificado con células ciliares y células secretoras de moco (Kumar y cols., 2008).

Así, la cavidad nasal está dividida en tres regiones principales (Dhakar y cols., 2011):

- La región vestibular, que se encuentra en la abertura frontal de los conductos nasales. Está recubierta de microvellosidades, cuya función es filtrar el aire inhalado para evitar que accedan partículas al sistema respiratorio. En esta región, la absorción de fármacos no es relevante.
- La región respiratoria, la cual presenta un área superficial de 130 cm^2 y se encuentra altamente vascularizada. Está constituida por epitelio columnar pseudoestratificado y cubierto por una densa capa de moco. En esta región es donde se produce una mayor absorción de los fármacos.

- La región olfatoria, con un área superficial de 15 cm². Está constituida por tejido conectivo grueso y lámina propia. Esta es la región con potencial para favorecer el transporte de fármacos hacia el SNC.

La mucosa nasal tiene un espesor de entre 2 - 4 mm. Las células del epitelio se alinean en el espacio nasal y están recubiertas por una capa de moco de aproximadamente 5 µm de grosor, encargada de atrapar las partículas no deseadas. La secreción mucosa está constituida por agua (95%), mucina (2%), sales (1%), proteínas (1%) y lípidos (1%), además de las IgA, IgE e IgG (Ozsoy y cols., 2009). El pH de dicha secreción nasal varía entre 5 y 6,5 unidades (Ugwoke y cols., 2005).

En la tabla 4 se resumen las características del epitelio nasal.

Región nasal	Histología	Función	Área superficial	Vasculatura	Permeación
Vestíbulo	Epitelio estratificado escamoso	Soporte Protección	≈ 0,6 cm ²	Baja	Pobre
Región respiratoria	Células ciliadas Células caliciformes Células en cepillo Células basales Células endocrinas	Soporte Aclaramiento partículas Secretor de moco	130 cm ²	Muy alta	Buena
Región olfativa	Células basales Células olfatorias receptoras Glándula de Bowman	Sentido del olfato	≈ 15 cm ²	Alta	Entrada directa al SNC

Tabla 4. Características del epitelio nasal.

1.5.2. Mecanismos de transporte de fármacos tras la administración intranasal

Una vez administrado el fármaco por vía intranasal, éste debe atravesar la capa mucosa que protege dicha cavidad. Tras cruzar esta barrera, el fármaco será transportado siguiendo un mecanismo paracelular o transcelular (Figura 12).

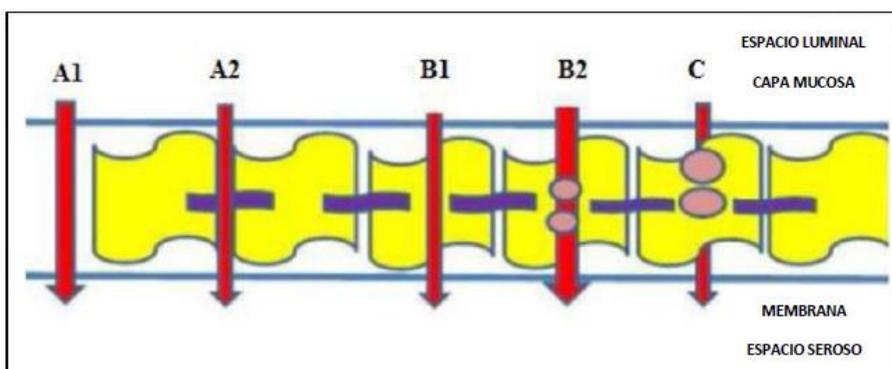


Figura 12. Mecanismos de transporte de fármacos a través del epitelio nasal. A1: Espacios intercelulares; A2: Uniones estrechas; B1: Difusión pasiva; B2: Transporte activo; C: Endocitosis (Kushwaha y cols., 2011).

- **Transporte paracelular.** En el epitelio nasal, las células están conectadas entre sí mediante uniones estrechas. Estas uniones son impermeables a moléculas de gran tamaño, aunque dichas uniones pueden modificarse permitiendo el paso de moléculas de pequeño tamaño. El proceso es independiente de la energía y se produce por el paso de los fármacos a través de los espacios acuosos entre las células mediante difusión pasiva lenta. En este caso, a mayor tamaño molecular, menor es la absorción intranasal (Yang y cols., 2014).
- **Transporte transcelular.** La endocitosis mediada por receptores consiste en una vía de transporte de moléculas a través de diferentes receptores endógenos de la BHE. En este mecanismo, el tamaño molecular puede condicionar el mecanismo de endocitosis. Otros parámetros como la carga superficial de las moléculas también influyen en este proceso (Yang y cols., 2014).

Adicionalmente, en la mucosa nasal pueden encontrarse sustancias como glucoproteína P, transportadores orgánicos de cationes y transportadores de dopamina y serotonina. Estos transportadores transfieren aminoácidos, aminas y cationes (Agu y cols., 2003) y siguen un mecanismo conocido como proceso mediado por portador (Kandimalla y Donovan, 2005).

1.6. ADMINISTRACIÓN INTRANASAL DE FÁRMACOS HACIA EL SNC

Debido al aumento en la incidencia de las enfermedades cerebrales y neurodegenerativas asociadas al envejecimiento de la población, el desarrollo de un sistema eficiente de administración de fármacos hacia el SNC se convierte en una prioridad en la industria farmacéutica (Gabathuler, 2010).

Sin embargo, la administración de fármacos al cerebro constituye un reto aún por alcanzar, ya que este órgano se encuentra protegido por la BHE y la barrera del fluido cerebroespinal, dos estructuras que aseguran la permeabilidad selectiva del cerebro a las moléculas circulantes. Estas barreras físicas, metabólicas y reguladas por transportadores, limitan el número de fármacos capaces de acceder al SNC (Chen y Liu, 2012). En este sentido, la cavidad nasal ofrece una oportunidad única en la administración de fármacos hacia el SNC (Wen y cols., 2011). Numerosos autores han demostrado que la administración de moléculas de pequeño y gran tamaño por vía intranasal son capaces de eludir la BHE accediendo a través de los nervios de la cavidad nasal, es decir, los nervios olfatorios y trigémino. Al ser el neuroepitelio olfativo la única región del SNC que no está protegido por la BHE, constituye el único acceso hacia el cerebro (Pardeshi y Belgamwar, 2013). Por su parte, el nervio trigémino participa notablemente en la comunicación entre la nariz y el cerebro y se considera tener un papel relevante en la vectorización de fármacos, especialmente en la región posterior cerebral (Chapman y cols., 2013).

Por tanto, tras la administración de moléculas activas por esta vía, éstas pueden acceder al SNC a través de tres vías principales (figura 13): a) el nervio olfatorio, que inerva el epitelio olfatorio nasal y termina en el bulbo olfatorio; b) el nervio trigémino, que inerva el epitelio respiratorio y olfatorio a través de sus

ramificaciones oftálmica y maxilar, terminando en el tallo cerebral y bulbo olfatorio, respectivamente; c) la vía vascular (Thorne y cols., 2004).

Como se expone en el esquema de la figura 14, el fármaco accede desde el espacio submucoso hasta el compartimento cerebroespinal mediante los nervios olfatorio y trigémino (Illum, 2000).

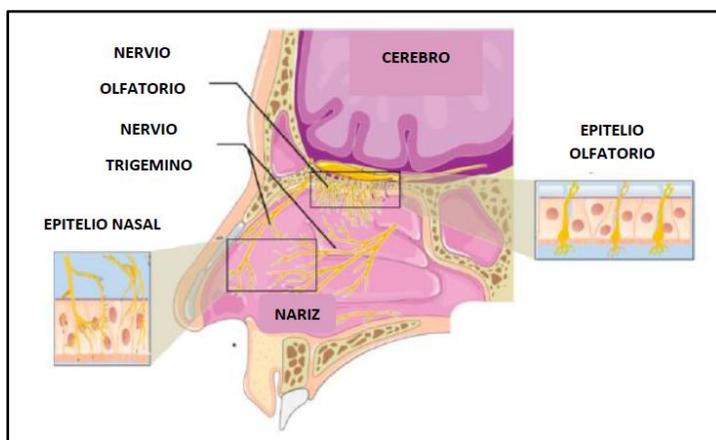


Figura 13. Características de la cavidad nasal (Sonvico y cols., 2018).

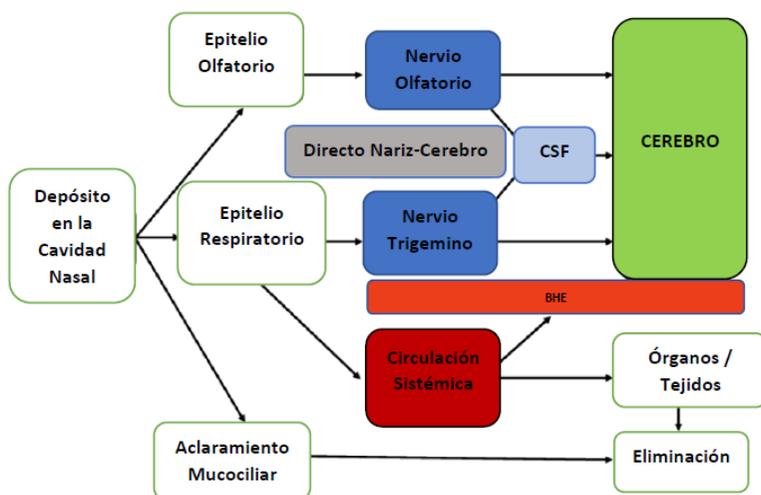


Figura 14. Esquema de la administración intranasal de fármacos hacia el cerebro (Sonvico y cols., 2018). BHE: barrera hematoencefálica. CSF: fluido cerebro-espinal.

La vía vascular proporciona un mecanismo secundario o indirecto de vectorización de fármacos que implica, en primer lugar, la absorción en circulación sistémica y, posteriormente, la entrada en el cerebro al cruzar la BHE (Dhuria, 2010).

Como resumen, el uso de la vía nasal permite el acceso del fármaco al SNC tras cruzar la barrera mucosa y ser absorbido por las neuronas y translocado a lo largo de los axones nerviosos (trigémino y olfativo), accediendo así al cerebro.

1.6.1. Factores que afectan a la administración intranasal de fármacos hacia el SNC

El diseño de una formulación intranasal con fines a administrar fármacos a nivel cerebral conlleva el control de diversos factores. Entre otros, cabe destacar las características fisicoquímicas del fármaco, los excipientes a incluir en la formulación y la condición fisiológica de la cavidad nasal. En la figura 15 se recoge un esquema de dichos factores (Dhakar y cols., 2011).

1.6.1.1. Tamaño y polaridad molecular

La baja biodisponibilidad de algunos fármacos se puede atribuir a la alta polaridad o al elevado tamaño de las moléculas. La vía intranasal es efectiva, rápida y adecuada para administrar fármacos de peso molecular inferior a 1000 Da. En este sentido, numerosos estudios han demostrado que las partículas inferiores a 1 μm pueden absorberse rápidamente por vía intranasal (Huang y Donovan, 1998), mientras que moléculas de mayor tamaño, como algunas proteínas y péptidos se transportan por endocitosis a través del epitelio nasal (Jadhav y cols., 2007).

1.6.1.2. Aclaramiento mucociliar

El aclaramiento mucociliar constituye un mecanismo de defensa que adquiere un impacto significativo en la administración y transporte del fármaco. Este eficaz mecanismo de protección elimina rápidamente sustancias nocivas, partículas y microorganismos atrapándolos en la capa mucosa, cuyo espesor oscila entre 10 y 15 mm (Jadhav y cols., 2007).

Dicho mecanismo limita en gran medida el tiempo de residencia de los fármacos en la cavidad nasal. Con el fin de minimizar este efecto, una estrategia ampliamente utilizada consiste en incorporar agentes mucoadhesivos a la formulación, capaces de proporcionar bioadhesión a la vez que aumentar la viscosidad, contrarrestando el aclaramiento mucociliar, aumentando el tiempo de residencia de la formulación en la cavidad nasal, mejorando la biodisponibilidad sistémica y reduciendo la variabilidad de la absorción nasal (Merkus y cols., 1998).

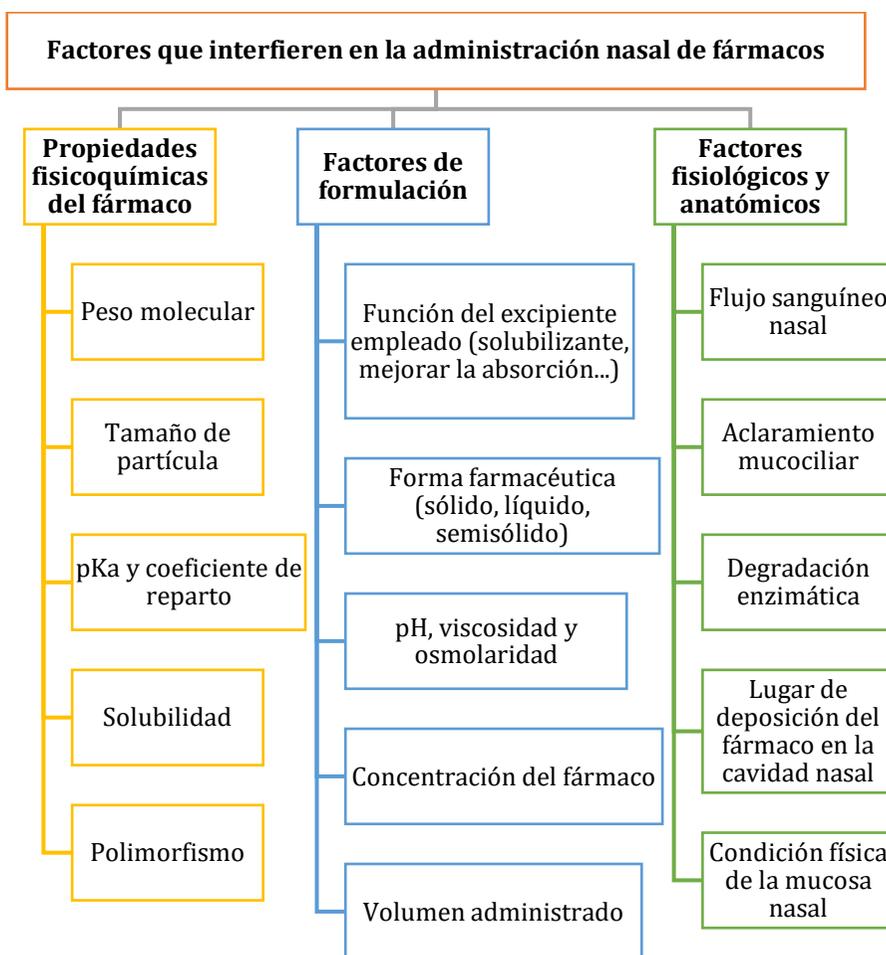


Figura 15. Factores que interfieren en la administración nasal de fármacos (Dhakar y cols., 2011).

1.6.1.3. Degradación enzimática

Numerosos estudios han demostrado que ciertos fármacos, proteínas y péptidos pueden ser degradados por la actividad enzimática de la cavidad nasal (Bogdanffy, 1990; Zhang y cols., 2016; Kaur y cols., 2015). En las células del epitelio nasal se encuentran enzimas hidrolasas, glutatión S-transferasas, isoenzimas del citocromo P450, que juegan un papel importante en la degradación de fármacos en la mucosa nasal. Esta barrera enzimática puede superarse mediante el uso de inhibidores enzimáticos en las formulaciones (Na y cols., 2004; Shin y cols., 2004).

1.6.2. Estrategias para aumentar el tiempo de residencia de fármacos en la cavidad nasal

Las formulaciones convencionales para administración intranasal contemplan dispositivos tales como gotas o aerosoles los cuales, como es bien sabido, son eliminados rápidamente de la cavidad nasal, presentando un tiempo de residencia de entre 12 y 15 minutos (Luppi y cols., 2009). Aunque este tiempo de permanencia de los vehículos líquidos puede mejorarse aumentando, por ejemplo, la viscosidad del mismo, las soluciones viscosas son difíciles de administrar en forma de gotas o aerosol (Bigucci y cols., 2008). Por otra parte, se ha demostrado que las formulaciones en polvo tienen tiempos de residencia nasal más prolongados que las soluciones, pero requieren dispositivos mucho más sofisticados para su administración (Keith, 2006).

Por ello, se han desarrollado diversas estrategias que permitan superar estas limitaciones, entre las que se incluyen el uso de profármacos, inhibidores enzimáticos, promotores de la absorción, sistemas mucoadhesivos o el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas de administración.

1.6.2.1. Profármacos

Como ocurre para otras vías de administración, estas especies sin actividad farmacológica que son metabolizadas al compuesto activo mediante un proceso químico o enzimático, son útiles para mejorar problemas de solubilidad, estabilidad

o permeabilidad de los fármacos a través de las membranas biológicas (Higuchi y Stella, 1975). Así, para favorecer la difusión de los fármacos hidrófilos a través de las membranas, se añaden grupos hidrófobos, que aumentan la lipofilia de las moléculas polares, favoreciendo su capacidad para atravesar la membrana (Wang y cols., 2005). En este sentido, autores como Meredith y cols. (2015) han empleado profármacos para la administración intranasal de proteínas y péptidos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas.

1.6.2.2. Inhibidores enzimáticos

En la mucosa nasal existen numerosas enzimas que actúan como barrera impidiendo el paso de los fármacos que se administran por vía intranasal. Para evitar la degradación enzimática que producen las células endoteliales de la mucosa nasal, se emplean inhibidores de peptidasas y peptidasas, como bacitracina, boroleucina, amastatina y purimicina, empleadas para evitar la degradación enzimática de fármacos como la hormona luteinizante y la hormona de crecimiento (Dhakar y cols., 2011).

1.6.2.3. Promotores de la absorción

Los promotores de la absorción inducen cambios reversibles en la estructura del epitelio nasal. En la administración intranasal de fármacos, los potenciadores de la absorción más empleados son tensioactivos, sales biliares, polisacáridos como quitosan y ciclodextrinas, y gelatinas (Sinswat y Tengammuyay, 2003). El mecanismo de acción de estos promotores no es conocido, pero al parecer, actúan modificando la permeabilidad de las células epiteliales de la mucosa mediante modificaciones en la bicapa lipídica, aumentando la fluidez de la membrana o la apertura de las uniones estrechas de las células epiteliales aumentando, por tanto, el transporte paracelular (Ekelund y cols., 2005). Aunque los promotores de la absorción mejoran la biodisponibilidad del fármaco, existe una relación directa entre este efecto y el daño causado a la membrana (Zaki y cols., 2006). Sin embargo, se ha demostrado también que algunos promotores como el quitosan, las ciclodextrinas y los fosfolípidos favorecen con creces la absorción de fármacos, sin causar daños en las

membranas, ya que penetran a través de las uniones estrechas. Por otro lado, el uso de potenciadores poliméricos como el quitosan, al presentar un elevado peso molecular, no son absorbidos, minimizando de este modo, la toxicidad sistémica (Maestrelli y cols., 2004).

1.6.2.4. Sistemas mucoadhesivos

El aclaramiento mucociliar es uno de los factores limitantes en la administración intranasal de fármacos, ya que reduce el tiempo de permanencia de los fármacos en la cavidad nasal. Para mejorar este parámetro, se han diseñado los sistemas mucoadhesivos (Bertram y cols., 2006). Por regla general, estos sistemas están constituidos por un polímero sintético o natural, mucoadhesivo, que tras contactar con la mucosa nasal, absorbe agua y comienza a hincharse. Posteriormente, el polímero penetra en la capa mucosa, permitiendo la penetración y absorción de la formulación a través de las uniones estrechas del epitelio de la mucosa nasal (McInnes y cols., 2005).

Los sistemas mucoadhesivos también pueden mejorar la disolución de fármacos poco solubles en agua. Gavini y cols. (2011) observaron una mejora de la solubilidad de roquitamicina incluida en microesferas de quitosan en comparación con el fármaco libre tras su administración por vía intranasal.

El fenómeno de mucoadhesión es adecuado para aquellos tejidos recubiertos de mucosa como la zona bucal, sublingual, vaginal, rectal, ocular, gastrointestinal y nasal (Smart y cols., 1984; Tsuneji y cols., 1984; Morimoto y cols., 1991). Para que tenga lugar la interacción entre los polímeros y la mucosa, se requiere un grado óptimo de polaridad del polímero para hincharse lo suficiente y entrar en contacto con la capa mucosa, favoreciéndose la interpenetración entre las cadenas poliméricas y la mucosa para lograr la bioadhesión (Patil y Sawant, 2008). Diversos polímeros biocompatibles y biodegradables han sido utilizados para formular los sistemas mucoadhesivos, como alcohol polivinílico (Swamy y Abbas, 2012), PLGA (Guerrero y cols., 2008), quitosan (Alhalaweh y cols., 2009),

hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa y alginato de sodio (Rathananand y cols., 2007).

Dentro de los sistemas mucoadhesivos, cabe destacar los insertos nasales, que son formas de dosificación sólidas bioadhesivas que permiten una liberación prolongada del fármaco en la cavidad nasal. El principio de los insertos consiste en la adherencia del sistema en la mucosa nasal aprovechando las propiedades bioadhesivas que presenta, transformándose posteriormente en un gel que actúa como una matriz que controla la liberación del fármaco a través de la mucosa. Este sistema se disuelve en la cavidad nasal, por lo que no hay necesidad de retirar los insertos una vez que se haya agotado el fármaco (Algin-Yapar, 2014). Luppi y cols. (2010) diseñaron insertos intranasales de quitosan/peptina para mejorar la biodisponibilidad de fármacos antipsicóticos en el tratamiento de enfermedades neurológicas, favoreciendo la liberación y permeación del fármaco tras su administración por vía intranasal. McInnes y cols. (2005) realizaron estudios de liberación *in vivo* de insertos intranasales de nicotinamida, demostrando una liberación prolongada del fármaco tras su administración por vía intranasal.

El quitosan es un polímero de naturaleza policatiónica ampliamente utilizado por sus propiedades biodegradables y mucoadhesivas (Sinha y cols., 2004), que favorece la disolución de fármacos insolubles. Es un polisacárido lineal obtenido de la desacetilación de la quitina obtenida de las conchas de los crustáceos. Se trata de una base débil, poco soluble en agua pero fácilmente soluble en soluciones acuosas ácidas, y prácticamente insoluble en todos los disolventes orgánicos (Dos Santos y cols., 2005). Se emplea como aglutinante o vehículo para controlar la liberación de fármacos, mejorando la disolución y la biodisponibilidad de fármacos insolubles (Sinha y cols., 2004). La propiedad mucoadhesiva del quitosan surge de las interacciones electrostáticas entre sus grupos amino catiónicos y los restos aniónicos de la capa mucosa, tales como grupos de ácido siálico y sulfónico (Lachman y cols., 1986). Patil y Murthy (2006) realizaron estudios *in vitro* de mucoadhesión en la mucosa nasal de oveja, demostrando que al aumentar la

concentración de quitosán en la formulación, se produce un incremento en la mucoadhesión, debido al aumento del número de aminoácidos catiónicos disponibles para interactuar con restos de ácido siálico de la mucosa. Asimismo, este polisacárido también puede mejorar la permeabilidad de los fármacos a través del epitelio, así como disminuir el aclaramiento mucociliar, lo que conlleva a un prolongado contacto del fármaco con el epitelio de la mucosa nasal, mejorando la absorción del mismo (Smith y cols., 2004).

1.6.2.5. Nuevas formulaciones de fármacos para administración nasal

La vectorización de fármacos hacia el SNC por vía intranasal supone una estrategia muy útil de administración de fármacos, eludiendo la BHE. En los últimos años se han desarrollado formulaciones nasales que contienen liposomas, microesferas y nanopartículas poliméricas que permiten la administración de fármacos por vía intranasal. Estos sistemas, además del fármaco, pueden incluir inhibidores enzimáticos, potenciadores de absorción nasal y/o polímeros bioadhesivos que mejoran la estabilidad, la penetración a través de las membranas y el tiempo de retención del fármaco en la cavidad nasal.

- *Nanopartículas poliméricas*

Son partículas sólidas de tipo matriz de entre 100 y 200 nm en las cuales los fármacos son encapsulados, atrapados, disueltos o unidos químicamente a la matriz polimérica (Ameller y cols., 2003). Son sistemas biodegradables, biocompatibles y estables, posibilitando una liberación controlada del fármaco. Se han empleado diversos polímeros para elaborar nanopartículas capaces de ser vectorizadas hacia el SNC, empleando diferentes técnicas de preparación, dependiendo de las características del fármaco y del polímero. Las más empleadas suelen ser nanopartículas de quitosán, ya que presentan un tamaño de partícula pequeño, mejor permeabilidad a través de la mucosa nasal y capacidad de encapsular varios fármacos a la vez (Genta y cols., 2003). Autores como Fazil y Haque (2012) han investigado la capacidad de las nanopartículas de quitosán para mejorar la captación de rivastigmina en el cerebro tras su administración intranasal. Los

resultados del estudio sugirieron que estos sistemas poliméricos constituían una buena opción para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, permitiendo la vectorización del fármaco directamente hacia el cerebro debido a su capacidad de adherencia de la formulación a la mucosa nasal.

- *Nanopartículas lipídicas*

Las nanopartículas lipídicas son sistemas transportadores coloidales como nanopartículas poliméricas, liposomas y nanoemulsiones (Estella-Hermoso y cols., 2011). Dependiendo de su composición, las nanopartículas lipídicas pueden proteger el fármaco de su degradación, así como permitir una liberación controlada del mismo. Otra de sus ventajas es la facilidad de elaboración, así como su bajo coste. Además, la naturaleza lipofílica de estos sistemas facilita la penetración a través de la BHE mediante endocitosis. Entre sus limitaciones destaca su escasa estabilidad *in vivo*, baja capacidad para incluir fármacos hidrofílicos, así como la necesidad de usar agentes tensioactivos en su elaboración (Rostami y cols., 2014).

Estos sistemas tienen mayor capacidad de atrapamiento de fármacos que las nanopartículas poliméricas, haciendo que los fármacos sean estables en su matriz lipídica. Debido al diámetro nanométrico, estos sistemas transportadores son ideales para ser absorbidos fácilmente tras atravesar las uniones estrechas de las células endoteliales de la BHE (Mishra y cols., 2010). Pardeshi (2013) desarrolló nanopartículas híbridas de ropinirol que fueron administradas por vía intranasal, obteniendo resultados farmacológicos satisfactorios minimizando los efectos perjudiciales sobre la mucosa nasal.

- *Liposomas*

Son vesículas esféricas constituidas por fosfolípidos y colesterol, con la capacidad de encapsular los fármacos en su interior, como ya ha sido explicado con detalle en el bloque I.

De hecho, Jain y cols. (2007) administraron por vía intranasal liposomas de insulina recubiertos con quitosán y Carbopol® a ratas. Los resultados demostraron que esta

formulación fue efectiva debido a la capacidad mucoadhesiva de la formulación, que permitió una liberación sostenida de la insulina. Ding y cols. (2007) demostraron un inicio rápido y sostenido en la administración de levonorgestrel tras la administración de liposomas por vía intranasal. También se obtuvieron resultados interesantes tras la administración de un gel liposomal de aciclovir (Alsarra y cols., 2008). El uso de un gel liposomal no sólo promovió el contacto prolongado entre el fármaco y el lugar de absorción, sino que también facilitó la absorción directa a través de la mucosa nasal.

- *Nanoemulsiones*

Son emulsiones O/W o W/O de escala nanométrica que tienen gotículas de tamaño inferior a 250 nm. Las nanoemulsiones son cinéticamente estables, pero termodinámicamente metaestables, por lo que hay que aportar energía para su formulación y se preparan con concentraciones más bajas de tensioactivos (Wen y cols., 2017). Varios estudios han empleado nanoemulsiones para vectorizar fármacos hacia el cerebro. Así, se han desarrollado nanoemulsiones mucoadhesivas de curcumina para ser administradas por vía intranasal, mejorando los problemas de solubilidad de curcumina (Sood y cols., 2014). Una nanoemulsión lipídica de ácido hialurónico resultó ser un portador adecuado para administrar curcumina y resveratrol desde la cavidad nasal hacia el SNC.

- *Microemulsiones*

Son sistemas transparentes constituidos por agua, lípidos y tensioactivos. Presentan un tamaño nanométrico comprendido entre 10 y 100 nm formándose de manera espontánea aportando energía. Requieren una mayor concentración de tensioactivo en comparación con las nanoemulsiones. Existen en la literatura resultados interesantes de estos preparados para administración intranasal, como la microemulsión mucoadhesiva de rivastigmina, demostrando resultados favorables, ya que no presentó ciliotoxicidad nasal y fue estable durante tres meses (Shah y cols., 2015). Jogani y cols. (2008) prepararon microemulsiones de tacrina para mejorar su vectorización a nivel cerebral. Los resultados obtenidos de este

estudio demostraron la existencia de casi dos veces los niveles cerebrales de tacrina en comparación con los niveles alcanzados tras la administración intranasal de una solución de la molécula.

- *Microesferas*

Las microesferas son muy empleadas en la administración intranasal de fármacos. Suelen estar constituidas por polímeros mucoadhesivos que facilitan la liberación de fármacos en la cavidad nasal. Estas microesferas protegen la molécula activa del metabolismo enzimático y, a su vez, mantienen la liberación del fármaco, prolongando así su efecto (Gavini y cols., 2008). En otras investigaciones, estos autores analizaron la mucosa nasal tras la administración de microesferas de alginato y quitosan que contienen metoclopramida (Gavini y cols., 2005). Observaron aperturas en las uniones estrechas del epitelio nasal y también demostraron las propiedades mucoadhesivas de las microesferas. Otros estudios llevados a cabo han dado resultados positivos en la administración intranasal de carbamazepina usando microesferas de quitosan (Gavini y cols., 2006), ciclodextrinas que usan quitosan y alginato como polímeros mucoadhesivos (Gavini y cols., 2008) y carvedilol utilizando microesferas mucoadhesivas de alginato (Patil y Sawant, 2008).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Levodopa sigue siendo el fármaco más utilizado en el tratamiento de la EP. Se administra en dosis elevadas, ya que la mayoría del fármaco se metaboliza en el organismo antes de llegar al cerebro. La administración de estas dosis provoca citotoxicidad, que resulta de la autooxidación de levodopa por los radicales libres que se forman, induciendo de esta forma el estrés oxidativo. También es cierto que la eficacia de este antiparkinsoniano se reduce con el tiempo debido a su baja biodisponibilidad, metabolismo y fluctuaciones de los niveles plasmáticos. Es por ello que para disminuir la citotoxicidad del fármaco y aumentar su biodisponibilidad, se propone desarrollar una nueva estrategia tecnológica de administración de levodopa, basada en la Nanotecnología.

Actualmente, en el mercado farmacéutico no existe disponible un sistema de administración de fármacos dirigido directamente al SNC para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas. Así, el objetivo principal de este bloque de la Tesis Doctoral se centra en diseñar una formulación liposomal de levodopa capaz de vehicular el fármaco hacia el SNC mediante una administración intranasal.

Para ello, se dividirá este bloque en dos capítulos. En el **Capítulo I**, se procederá a evaluar la estabilidad de formulaciones liposomales de levodopa mediante el uso de diferentes antioxidantes, con el objetivo de mejorar la estabilidad de la molécula. El uso de antioxidantes resulta prometedor en el tratamiento de la EP, ya que previene el estrés oxidativo. En este capítulo estudiaremos la influencia de antioxidantes como curcumina, ácido ascórbico y superóxido dismutasa. Asimismo, se llevará a cabo el desarrollo de las formulaciones vesiculares por diferentes métodos de elaboración, con el fin de obtener la máxima encapsulación del fármaco.

En el **Capítulo II**, se procederá al diseño y caracterización de complejos de inclusión de levodopa con ciclodextrinas, junto al antioxidante incluido en los liposomas. Se estudiarán diferentes ciclodextrinas para seleccionar aquella con mejores resultados de estabilidad referida al fármaco. La finalidad de estos ensayos es obtener una formulación estable para administración intranasal. La formulación

optimizada se aplicará en células neuronales y células de la microglía para evaluar su comportamiento.

Posteriormente, la formulación seleccionada se incluirá en insertos para su administración intranasal.

Para dar cumplimiento al objetivo general planteado en el capítulo I, se plantean los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1: Diseño, desarrollo y caracterización de liposomas de levodopa y curcumina.

0.1.1. Debido a los problemas de solubilidad de curcumina en medio acuoso, se plantea como objetivo realizar estudios de solubilidad en diferentes medios acuosos con el fin de seleccionar la composición adecuada para añadir este polifenol en el compartimento acuoso de los liposomas. Este objetivo se completa con la validación del método analítico y estudios de estabilidad de las formulaciones.

0.1.2. Elaborar formulaciones de liposomas cargados con levodopa y curcumina y posterior estudio de estabilidad de la formulación optimizada, con el fin de analizar la influencia del antioxidante curcumina.

Objetivo 2: Diseño, desarrollo y caracterización de liposomas de levodopa y ácido ascórbico.

0.2.1. Optimizar el medio acuoso constituyente de la fase acuosa de los liposomas que contendrá ácido ascórbico.

0.2.2. Elaborar y caracterizar las diferentes formulaciones desarrolladas con el fin de seleccionar la adecuada capaz de albergar levodopa y ácido ascórbico.

Objetivo 3: Diseño, desarrollo y caracterización de liposomas de levodopa con ácido ascórbico y superóxido dismutasa.

0.3.1. Diseñar y desarrollar una formulación de liposomas de superóxido dismutasa.

0.3.2. Desarrollar una formulación de liposomas de levodopa con ácido ascórbico y superóxido dismutasa como antioxidantes.

Objetivo 4: Determinar la actividad antioxidante de cada una de las formulaciones optimizadas.

Objetivo 5: Determinar la estabilidad de cada una de las formulaciones de levodopa en presencia de los distintos antioxidantes.

Objetivo 6: Tras seleccionar ácido ascórbico como mejor estabilizador de levodopa, se procederá a desarrollar y caracterizar formulaciones de levodopa y ácido ascórbico mediante diferentes técnicas de elaboración, así como con diferentes agentes de carga superficial de las vesículas con el fin de seleccionar la tecnología más apropiada.

A su vez, el capítulo II contiene los siguientes objetivos parciales:

Objetivo 1. Desarrollar y caracterizar formulaciones de liposomas constituidas por complejos de inclusión de levodopa con diferentes ciclodextrinas y ácido ascórbico.

O.1.1. Llevar a cabo un estudio comparativo del comportamiento de levodopa en presencia de β -CD y HP- β -CD.

O.1.2. Estudiar la interacción entre la ciclodextrina y el colesterol y aportar alternativa a la formulación.

Objetivo 2. Evaluar el efecto de las formulaciones de liposomas sobre las células neuronales y células de la microglía.

Objetivo 3. Desarrollar insertos intranasales para la administración de la formulación optimizada por vía intranasal y seleccionar una composición en base a propiedades de liberación, permeación, hinchamiento y mucoadhesión del dispositivo para administración intranasal.

CAPÍTULO I

FORMULACIONES ANTIOXIDANTES DE LEVODOPA

ÍNDICE CAPÍTULO I

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	171
3.1. ESTUDIO DE LAS FORMULACIONES DE LEVODOPA CON ANTIOXIDANTES.....	173
3.1.1. Elaboración de formulaciones con curcumina.....	173
3.1.1.1. Estudio de solubilidad de curcumina en mezcla de disolventes.....	173
3.1.1.2. Elaboración de liposomas de curcumina.....	175
3.1.1.3. Validación del método analítico.....	176
3.1.1.4. Elaboración de liposomas de levodopa y curcumina.....	182
3.1.2. Elaboración de formulaciones con ácido ascórbico	183
3.1.2.1. Optimización del medio de disolución de ácido ascórbico.....	183
3.1.2.2. Elaboración de las vesículas lipídicas de levodopa y ácido ascórbico.....	184
3.1.3. Elaboración de formulaciones con ácido ascórbico y SOD	187
3.1.3.1. Elaboración de liposomas SOD	188
3.1.3.2. Unificación de formulaciones.....	188
3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES	189
3.2.1. Caracterización fisicoquímica	189
3.2.2. Determinación de la eficacia de encapsulación	189
3.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LAS MOLÉCULAS POR HPLC.....	190
3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	191
3.4.1. Cuantificación de la actividad antioxidante de curcumina y ácido ascórbico.....	191
3.4.2. Cuantificación de la actividad antioxidante de SOD	193

3.5. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES	194
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	195
4.1. ESTUDIO DE LAS FORMULACIONES DE LEVODOPA CON ANTIOXIDANTES .	197
4.1.1. Estudios de formulaciones con curcumina	199
4.1.1.1. Estudio de solubilidad de curcumina en mezcla de solventes.....	199
4.1.1.2. Caracterización de liposomas de curcumina.....	201
4.1.1.3. Validación del método analítico.....	202
4.2. ESTUDIOS DE FORMULACIONES CON ÁCIDO ASCÓRBICO	221
4.2.1. Optimización del medio de disolución de ácido ascórbico.....	221
4.3. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS	224
4.3.1. Liposomas de levodopa y curcumina.....	225
4.3.2. Liposomas de levodopa y ácido ascórbico	226
4.3.3. Formulaciones con SOD.....	227
4.4. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE.....	229
4.4.1. Actividad antioxidante de curcumina y ácido ascórbico	229
4.4.2. Actividad antioxidante de SOD	230
4.5. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD.....	231
4.5.1. Estudio de estabilidad de curcumina.....	231
4.5.2. Estudio de estabilidad de liposomas de levodopa y curcumina.....	233
4.5.3. Estudio de estabilidad de liposomas de levodopa y ácido ascórbico.....	234
4.5.4. Estudio de estabilidad de liposomas de levodopa, ácido ascórbico y superóxido dismutasa.....	236

4.6. OPTIMIZACION DE LA FORMULACION DE LEVODOPA Y ÁCIDO ASCÓRBICO.	239
5. CONCLUSIONES.....	245

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Reacción del ABTS.....	192
Figura 2. Evolución de una solución de levodopa en tampón Hepes pH 7,4. A: tiempo cero; B: tiempo 2 días.....	197
Figura 3. Formulación de liposomas de levodopa (derecha) y liposomas control (izquierda).....	198
Figura 4. Porcentaje de curcumina degradado en diferentes condiciones de estrés en liposomas y solución estándar.....	206
Figura 5. Representación gráfica de la linealidad del sistema para curcumina junto a su ecuación de la recta y coeficiente de determinación.....	208
Figura 6. Representación del factor de respuesta frente a la concentración.....	209
Figura 7. Gráfica de los efectos principales ANOM para la respuesta área bajo la curva del estándar de curcumina.....	210
Figura 8. Gráficas de los efectos principales ANOM para la respuesta área bajo la curva de liposomas de curcumina.....	212
Figura 9. Gráfica de Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta área bajo la curva de liposomas de curcumina. A: ACN (48 v 52); B: pH (2 v 2,4); C: Temperatura (24 v 26); D: Flujo (1,1 v 1,2); E: ACN (48, 52 v 50); F: Flujo (1,1, 1,3 v 1,2); G: pH (2, 2,4 v 2,2), H: Temperatura (24, 26 v 25).....	214
Figura 10. Gráficas de los efectos principales ANOM para la respuesta tiempo de retención del estándar de curcumina.....	215
Figura 11. Gráfica de Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta tiempo de retención del estándar de curcumina. A: ACN (48 v 52); B: pH	

(2 v 2,4); C: Temperatura (24 v 26); D: Flujo (1,1 v 1,2); E: ACN (48, 52 v 50); F: Flujo (1,1, 1,3 v 1,2); G: pH (2, 2,4 v 2,2), H: Temperatura (24, 26 v 25).....217

Figura 12. Gráfica de los efectos principales ANOM para la variable respuesta tiempo de retención de liposomas de curcumina.....218

Figura 13. Gráfica de Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta tiempo de retención de los liposomas de curcumina. ACN (48 v 52); B: pH (2 v 2,4); C: Temperatura (24 v 26); D: Flujo (1,1 v 1,2); E: ACN (48, 52 v 50); F: Flujo (1,1, 1,3 v 1,2); G: pH (2, 2,4 v 2,2), H: Temperatura (24, 26 v 25).....220

Figura 14. Imágenes de soluciones de levodopa y ácido ascórbico a diferentes pH y tampones. 1. Tampón Hepes pH 7,4; 2. Tampón Hepes pH 6,2; 3. Tampón PBS pH 7,4; 4. Tampón PBS pH 6,2.....224

Figura 15. Resultados estudio actividad antioxidante ABTS sobre curcumina y ácido ascórbico.....229

Figura 16. Porcentaje de curcumina recuperada de la solución estándar y de las muestras de liposomas.....232

Figura 17. Representación del estudio de estabilidad del estándar de levodopa y curcumina frente a liposomas de levodopa y curcumina.....234

Figura 18. Representación del estudio de estabilidad del estándar de levodopa y ácido ascórbico frente a liposomas de levodopa y ácido ascórbico235.

Figura 19. Representación del estudio de estabilidad de formulaciones de levodopa con los antioxidantes ácido ascórbico y superóxido dismutasa (SOD)237

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proporción de cosolventes añadidos para estudio de solubilidad de curcumina. PEG 400: polietilenglicol 400. PG: propilenglicol.....174

Tabla 2. Volumen de solventes añadidos en la fase acuosa en cada lote de liposomas de curcumina. El pH del tampón fue de 7.4.....176

Tabla 3. Factores y niveles incluidos en el diseño de matrices ortogonales de Taguchi L9. ACN: acetonitrilo.....	181
Tabla 4. Matriz experimental modelo de Taguchi L9 para ensayo de robustez.....	182
Tabla 5. Cantidades de los lípidos utilizados (mg) para la elaboración de liposomas. PC: Fosfatidilcolina; CH: Colesterol; EA: Estearilamina; DCP: Dicetilfosfato.....	184
Tabla 6. Condiciones cromatográficas para cuantificación en HPLC de diferentes moléculas. ACN: Acetonitrilo.....	191
Tabla 7. Porcentajes de solubilidad de la curcumina en cada una de las mezclas de cosolventes y diferentes soluciones tampón.....	200
Tabla 8. Caracterización de las formulaciones de liposomas con diferentes mezclas de solventes. IP: Índice de polidispersión. EE: Eficacia de encapsulación.....	201
Tabla 9. Resultados de la idoneidad del sistema previa a la validación del método para curcumina, donde TR: Tiempo de retención. SD: desviación estándar. RSD: desviación estándar relativa.....	203
Tabla 10. Precisión intermedia. Resultados de áreas de los picos cromatográficos para estándar de curcumina (0,5 mg/mL) y liposomas curcumina (0,5 mg/mL) en ensayos realizados con analistas y días diferentes.....	204
Tabla 11. Resultados del estudio de linealidad del sistema para curcumina.....	207
Tabla 12. NOVA de la influencia de los factores evaluados sobre el área bajo la curva de la solución estándar de curcumina.....	211
Tabla 13. ANOVA de la influencia de los factores evaluados sobre el área bajo la curva de la solución de liposomas curcumina.....	213
Tabla 14. ANOVA de la influencia de los factores evaluados sobre el tiempo de retención de la solución estándar de curcumina.....	216
Tabla 15: ANOVA de la influencia de los factores evaluados sobre el tiempo de retención de la solución de liposomas de curcumina.....	219
Tabla 16. Porcentaje de levodopa recuperada en las diferentes disoluciones preparadas. Concentración de levodopa en la solución: 1 mg/MI.....	222

Tabla 17. Caracterización de formulaciones de liposomas. IP: Índice de polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.....	225
Tabla 18. Caracterización de las formulaciones de liposomas. IP: Índice de polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación; AA: Ácido ascórbico.....	227
Tabla 19. Caracterización de la formulación de liposomas de SOD. IP: Índice de polidispersión.....	228
Tabla 20. Actividad enzimática SOD de liposomas elaborados por TLE y extruidos.....	230
Tabla 21. Caracterización liposomas de curcumina en el tiempo. IP: Índice polidispersión. EE: Eficacia de encapsulación. Los valores se detallan como las medias \pm SD.....	233
Tabla 22. Representación del tamaño, IP, potencial z y PDE de liposomas de levodopa y ácido ascórbico en el tiempo. IP: Índice polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.....	236
Tabla 23. Estabilidad de la actividad enzimática SOD en las diferentes formulaciones de liposomas.....	238
Tabla 24. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas elaboradas por distintas técnicas y diferente concentración de los agentes de carga. IP: Índice polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.....	240
Tabla 25. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas elaboradas mediante TLE y FAT. IP: Índice polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.....	242
Tabla 26. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas extruidas y sin extruir. IP: Índice polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.....	244

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESTUDIO DE LAS FORMULACIONES DE LEVODOPA CON ANTIOXIDANTES

Partiendo de los grandes problemas de oxidación que presenta levodopa en medio acuoso, se desarrollarán formulaciones de nanoliposomas cargados de este fármaco en combinación con diferentes antioxidantes (curcumina, ácido ascórbico y SOD) con la finalidad de seleccionar el antioxidante que le confiera mayor estabilidad. Para ello, se procederá a la elaboración de las formulaciones liposomales mediante TLE, a su posterior caracterización así como la determinación de la actividad antioxidante y el consiguiente estudio de estabilidad de cada una de las formulaciones desarrolladas.

3.1.1. Elaboración de formulaciones con curcumina

El estudio tiene como finalidad analizar el poder antioxidante de la curcumina sobre levodopa. Sin embargo, debido a la inestabilidad que presenta este polifenol en medio acuoso, se procedió, en primer lugar, a realizar los estudios de preformulación necesarios, con el objetivo de controlar aquellos parámetros que pudieran afectar a la estabilidad del fármaco. Una vez obtenidos los parámetros óptimos para la curcumina, se procederá a formular ésta junto con levodopa con el fin de obtener una formulación estable.

3.1.1.1. Estudio de solubilidad de curcumina en mezcla de disolventes

Debido a la problemática presentada por la curcumina para solubilizarse en medio acuoso, se realizó en primer lugar un estudio de solubilidad en diferentes mezclas de disolventes. Para determinar la mayor solubilidad de la curcumina en disolventes comúnmente utilizados en formulación, se llevó a cabo este estudio en placas MultiScreen Solvinert 0,45 μm (Millipore). En cada pocillo se depositaron los volúmenes reflejados en la tabla 1 en el orden que aparecen y por último añadiendo el medio acuoso (Hepes 10 mM pH 7,4, PBS 10 mM pH 7,4 o Tris 10 mM pH 7,4) completando el volumen hasta 500 μL . La curcumina se añadió en solución (40 mM en DMSO). Seguidamente, la placa se mantuvo cerrada en agitación a 250 rpm durante 90 minutos en un baño agitador oscilante (Baño 320 OR Unitronic OR, Selecta P) y se empleó un sistema de filtración a vacío (Millipore, MultiScreen HTS

Manifold) para separar el fármaco disuelto para su posterior cuantificación (Chen y cols., 2009). Así, las muestras que presenten mayor porcentaje de solubilidad serán las seleccionadas para la elaboración de los liposomas.

Muestras	PEG 400 (μL)	PG (μL)	Etanol (μL)	Tween® 80 (μL)	Solución curcumina (μL)
1	25	50	50	10	20
2	50	50	50	10	20
3	100	50	50	10	20
4	50	25	50	10	20
5	50	100	50	10	20
6	50	50	25	10	20
7	50	50	100	10	20
8	50	50	50	5	20
9	50	50	50	20	20
10	50	0	0	0	20
11	0	50	0	0	20
12	0	0	50	0	20
13	0	0	0	10	20
14	0	0	0	0	20

Tabla 1. Proporción de cosolventes añadidos para estudio de solubilidad de curcumina. PEG 400: polietilenglicol 400. PG: propilenglicol.

3.1.1.2. Elaboración de liposomas de curcumina

Los liposomas fueron elaborados por la técnica de evaporación en capa fina o método Banghan (TLE, *Thin Layer Evaporation*). Para formularlos, se seleccionaron colesterol (CH) y fosfatidilcolina (PC) como lípidos formadores de película y el lípido estearilamina (EA) como agente de carga positiva (Sinico y cols., 2005). La curcumina fue incluida en la fase oleosa debido a sus problemas de solubilidad en medio acuoso.

Siguiendo la técnica de elaboración, en primer lugar, se procedió a la formación de la película lipídica. Para ello, se pesaron en un matraz de fondo redondo los componentes lipídicos y se disolvieron en una mezcla cloroformo/metanol 2:1, constituyendo ésta la fase orgánica de los liposomas. Para evaporar el disolvente, se aplicó vacío en rotavapor (Büchi R-210) acoplado a un baño termostatzado a 58 °C (Büchi B-491) hasta la formación de una fina película. Se mantuvo a esta temperatura durante todo el proceso, valor superior a la temperatura de transición de fases de los lípidos presentes en la formulación. A continuación, se mantuvo durante 2 h a presión reducida para eliminar las trazas del disolvente. Es necesario trabajar a una temperatura superior a la de transición de los lípidos porque, de lo contrario, la estructura de los fosfolípidos de membrana permanecería en estado de gel y la bicapa no presentaría las características de rigidez e impermeabilidad necesarias para la encapsulación eficaz de los fármacos, de ahí que se seleccione como temperatura de calentamiento 58 °C (Bangham, 1968; Bach y cols., 1995).

A continuación, la película lipídica se hidrató con las mezclas de cosolventes previamente seleccionadas, tal como se recoge en la tabla 2 (Schinid y Thieme, 1989).

Lotes	PEG 400 (μL)	PG (μL)	Etanol (μL)	Tween® 80 (μL)	Agua (μL)	Tampón Hepes (μL)	Tampón PBS (μL)
L ₁	500	250	125	25	2100	0	0
L ₂	500	500	125	25	0	1850	0
L ₃	0	0	0	50	0	2950	0
L ₄	125	250	500	100	0	0	2025

Tabla 2. Volumen de solventes añadidos en la fase acuosa en cada lote de liposomas de curcumina. El pH del tampón fue de 7.4.

Finalmente, la muestra se sometió a 5 ciclos de agitación en vórtex durante 1 minuto intercalados con 5 minutos en baño termostático a 58 °C hasta la obtención de un preparado opalescente donde se encuentran dispersos los liposomas. La realización de estos ciclos de vórtex da lugar a la reducción del tamaño medio de los liposomas. Las preparaciones se conservaron refrigeradas a 4 °C hasta su posterior uso.

3.1.1.3. Validación del método analítico

Para cuantificar de forma exacta y precisa los fármacos en cada uno de los ensayos realizados, se desarrolló y validó un método analítico por HPLC, siguiendo la metodología oficial y previamente publicada por Cózar-Bernal y cols. (2013).

Teniendo en cuenta las recomendaciones propuestas por USP, ICH y FDA vigentes, se hicieron los ajustes necesarios en cuanto a fase móvil y velocidad de flujo, adecuándolos a las condiciones óptimas para nuestro laboratorio, ya que se partió de un método publicado para cuantificación de curcumina (Musfiroh y cols., 2010).

El presente método fue validado bajo la normativa de la ICH Q2(R1) 2005, evaluándose los siguientes parámetros: linealidad, precisión, selectividad, límites de detección y cuantificación, exactitud y robustez.

- *Idoneidad del sistema*

Este parámetro se utilizó para verificar que la resolución y la precisión del sistema son adecuadas para el análisis a realizar.

La idoneidad se ha validado inyectando seis réplicas de una solución estándar de curcumina (0,5 mg/mL), evaluándose la precisión en términos de desviación estándar relativa (coeficiente de variación, CV) del área del pico, además de los parámetros cromatográficos como el tiempo de retención y número de platos teóricos. Según la USP 40 el coeficiente de variación o desviación estándar relativa (RSD) debe ser inferior al 2%.

- *Precisión*

La precisión de un método analítico se define como el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales de los análisis repetidos en una muestra homogénea. Los estudios de precisión se dividen en repetibilidad y precisión intermedia, informándonos de los errores aleatorios.

Repetibilidad. Se basa en realizar múltiples inyecciones de una solución estándar, un día determinado. Para curcumina, se inyectaron 10 veces consecutivas una solución estándar 0,5 mg/mL, y se calculó el RSD. Igualmente se trató una solución de la formulación (equivalente a 0,5 mg/mL curcumina).

Precisión intermedia. El objetivo de este estudio es determinar la variabilidad del método efectuando una serie de análisis sobre la misma muestra en un mismo laboratorio, pero realizada por diferentes analistas y en diferentes días en condiciones operativas diferentes.

- *Selectividad*

La selectividad se define como la capacidad de un método analítico para medir y/o identificar un analito en presencia de otras sustancias químicas que pueden estar presentes en la muestra. En este estudio, se comparan los resultados del análisis de muestras con y sin analito, en presencia o ausencia de impurezas, productos de degradación, sustancias relacionadas o excipientes.

Para ello, se preparó una solución estándar de curcumina (0,5 mg/mL), una formulación de liposomas libre de curcumina y liposomas cargados con curcumina (0,5 mg/mL). Cada solución se inyectó en el cromatógrafo de acuerdo con las condiciones descritas en el método analítico y se midieron las muestras por duplicado.

Además, en el estudio de selectividad, se llevaron a cabo estudios de degradación, donde las soluciones estándar y las muestras fueron sometidas a diferentes grados de estrés, siguiendo las directrices de la ICH. Estos estudios fueron realizados para demostrar la selectividad y estabilidad del estándar y de la muestra tras la exposición a condiciones extremas durante 24 horas, así como en condiciones de fabricación de las formulaciones.

Se estudió el efecto del pH tras exponer las soluciones estándar de curcumina 0,5 mg/mL a HCl 1N y NaOH 1N durante 24 horas. La degradación oxidativa se estudió mediante la exposición de las soluciones a H₂O₂ (3% v/v). El efecto de la exposición a la luz se estudió mediante la colocación de varios matraces que contenían la solución estándar de fármaco bajo la luz solar o la luz UV (254 nm) durante 24 horas. Para comprobar el efecto de la temperatura y de las ondas de ultrasonidos en la degradación del fármaco, las muestras se mantuvieron durante 1 hora en un baño de ultrasonidos termostaticado a 60 °C.

- *Linealidad*

La linealidad es la capacidad del método para responder proporcionalmente a los cambios en la concentración o cantidad del analito en la muestra. El estudio de linealidad verifica que las soluciones de la muestra se encuentran en un rango de concentración donde la respuesta es linealmente proporcional a la concentración del analito.

Para verificar la linealidad del sistema se trabajó con soluciones estándar de curcumina y para la linealidad del método, con liposomas cargados con curcumina, estableciéndose en ambos casos el siguiente intervalo de concentraciones: 25, 50, 100, 125 y 150% de la concentración de referencia (0,5 mg/mL).

Este parámetro analítico se confirmó comprobando, en primer lugar, la homogeneidad de varianzas mediante el test de Cochran, el cual es indicativo de si el factor de concentración ejerce alguna influencia en la variabilidad de los resultados. Para ello, se calculó el valor de G_{exp} de la siguiente forma:

$$G_{\text{exp}} = \frac{Var_{\text{max}}}{\sum_1^k var}$$

donde Var_{max} es la varianza máxima y var es la varianza para cada concentración.

El resultado obtenido se comparará con la G tabulada para $p = 0,05$, $n = 2$, $k = 5$.

En caso de demostrar la homogeneidad de varianzas, se procedería a calcular la regresión lineal para la misma concentración y áreas corregidas por el método de los mínimos cuadrados. Si las áreas obtenidas para cada concentración muestran una relación lineal, estos resultados deben ser analizados mediante el método de los mínimos cuadrados. Además, se realizará el test de proporcionalidad, que permite evaluar si la recta pasa por el origen de coordenadas, determinando si la variable independiente es significativamente distinta de cero. Así, para llevar a cabo este test, se recurrió a la prueba de significación *t de student* ($n = 4$ grados de libertad, $p = 0,05$).

De forma complementaria, se calculó el factor de respuesta (f), que expresa la relación entre el área y la concentración del analito, y puede tomarse como una expresión aproximada de la sensibilidad de calibrado. Los factores respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente. Se calculó el factor de respuesta aplicando la expresión:

$$f = \frac{\text{area}}{\text{concentración}}$$

- *Límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ)*

El límite de detección (LOD) es definido por la USP como la concentración más baja de analito que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada. A su vez, el límite de cuantificación (LOQ) es la concentración más baja en una muestra que

puede ser medida dentro de un nivel aceptable de precisión y exactitud, en las condiciones experimentales seleccionadas. LOD se define para un pico que da una relación de señal-ruido de alrededor de 3:1, mientras que LOQ es el definido para un pico que da una relación de señal-ruido de alrededor 10:1.

La determinación de estos parámetros se realizó inyectando seis soluciones estándar, cuya concentración se encuentra cerca de los límites de detección. El rango seleccionado fue de 0,01% a 0,1% y la solución estándar más diluida que presenta respuesta lineal es la considerada LOQ.

- *Robustez*

La robustez de cualquier procedimiento analítico según la ICH es “una medida de la capacidad del método para no verse afectado por pequeños cambios o variaciones deliberadas, y proporciona una indicación de su aptitud durante el uso normal”.

Para determinar la robustez del método analítico, se variaron deliberadamente algunos parámetros cromatográficos dentro de un intervalo real, y se determinó su influencia cuantitativa sobre las variables respuesta. Los datos obtenidos de estos efectos permitirán juzgar si el método necesita ser revalidado cuando se cambian uno o más parámetros. Para ello, se utilizó un diseño factorial fraccional y se analizaron múltiples factores, minimizando así los costes económicos y el tiempo.

El diseño seleccionado fue el de Taguchi, una poderosa herramienta matemática que permite predecir y prevenir problemas de calidad desde las etapas tempranas del desarrollo y diseño de un producto (Wu y Wu, 1997). El método de Taguchi se encuentra englobado en el ámbito de lo que se llama “ingeniería de calidad” (Xua y cols., 2011), la cual se define como “una serie de planteamientos para predecir y prevenir las dificultades o problemas que podrían ocurrir tras la finalización del producto y su uso bajo múltiples condiciones ambientales y de utilización durante el periodo de vida diseñado” (Wu y Wu, 1997).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la robustez del método desarrollado, focalizado en el sistema cromatográfico. Para demostrar este parámetro, se aplicó la metodología del diseño experimental (DOE), herramienta estadística que permite

evaluar los efectos y las interacciones de un gran número de factores diferentes al mismo tiempo con un número limitado de ensayos.

El uso del diseño experimental multifactorial para optimizar las condiciones del ensayo reduce significativamente el tiempo total y el coste, al mismo tiempo que proporciona información esencial sobre el sistema de calidad (Belfast y cols., 2006). Por consiguiente, cuando se detectan factores que no son robustos, uno puede decidir cambiar el método o controlar más estrictamente el o los factores en cuestión (Kriera y cols., 2011). Por lo tanto, este método constituye el mejor índice para medir la calidad en un modelo sólido.

La primera etapa en la aplicación del método de Taguchi consistió en organizar una matriz ortogonal adecuada, que depende del número de factores y sus niveles. En este estudio, se investigaron cuatro factores críticos relacionados con el método analítico (temperatura, pH de la solución tampón, porcentaje de acetonitrilo y velocidad de flujo), cada uno de ellos con tres niveles diferentes, como se muestra en la tabla 3.

Factor	Nivel		
	-1	0	+1
ACN (%)	48	50	52
pH	2,0	2,2	2,4
Temperatura horno (°C)	24	25	26
Velocidad flujo (mL/min)	1,1	1,2	1,3

Tabla 3. Factores y niveles incluidos en el diseño de matrices ortogonales de Taguchi L₉. ACN: acetonitrilo.

Se investigaron como variables de respuesta el área del pico cromatográfico y el tiempo de retención del principio activo en la columna. Se seleccionó una matriz ortogonal estandarizada L₉ (Tabla 4). Partiendo de una solución estándar de

curcumina (0,5 mg/mL), se realizó el ensayo por duplicado para asegurar la reproducibilidad de todos los datos. Una vez obtenidos éstos para cada experimento, se completó la matriz ortogonal. Posteriormente, se analizaron con la ayuda del Software DOEpack 2000 v.3.0.22, el cual permite estudiar el efecto de cada factor sobre las variables respuesta a través del análisis de medias (ANOM) y del análisis de varianzas (ANOVA).

Muestra	ACN (%)	pH	Temperatura (°C)	Velocidad flujo (mL/min)
1	48	2,0	24	1,1
2	48	2,2	25	1,2
3	48	2,4	26	1,3
4	50	2,0	24	1,3
5	50	2,2	25	1,1
6	50	2,4	26	1,2
7	52	2,0	24	1,2
8	52	2,2	25	1,3
9	52	2,4	26	1,1

Tabla 4. Matriz experimental modelo de Taguchi L9 para ensayo de robustez.

3.1.1.4. Elaboración de liposomas de levodopa y curcumina

Una vez optimizada la formulación de liposomas de curcumina, se procedió a incluir levodopa en la formulación con el objetivo de disponer ambos activos en la misma.

Para comprobar la influencia de la curcumina sobre levodopa, se elaboraron las siguientes formulaciones: liposomas de levodopa (1 mg/mL), liposomas de curcumina (2 mg/mL) y liposomas de levodopa (1 mg/mL) y curcumina (2 mg/mL).

Los liposomas se elaboraron por la técnica TLE explicada anteriormente en el apartado 3.1.1.2. del presente capítulo, obteniendo vesículas multilaminares. La fase lipídica, constituida por PC, CH, EA y curcumina, se disolvió en una mezcla cloroformo/metanol 2:1 y posteriormente evaporada hasta crear una película lipídica. Seguidamente, esta película se hidrató con la fase acuosa, la cual contenía

levodopa disuelta en la mezcla de cosolventes seleccionada previamente en los estudios de solubilidad de curcumina (PEG 400, PG, Tween® 80, etanol y tampón Hepes pH 7,4) (Schinid y Thieme, 1989). Una vez hidratada, se sometió a 5 ciclos de agitación en vórtex durante 1 minuto, intercalados con 5 minutos en baño termostatzado a 58 °C, hasta la obtención de un preparado opalescente donde se encuentran dispersos los liposomas. Finalmente se conservaron refrigerados a 4 °C hasta su posterior uso.

3.1.2. Elaboración de formulaciones con ácido ascórbico

En este apartado se procedió a estudiar la capacidad antioxidante del ácido ascórbico sobre levodopa. Para ello, en primer lugar, se optimizó el medio de disolución de la molécula antioxidante, dada su influencia con el pH, para posteriormente ser incluida en la formulación liposomal junto al principio activo. En este caso, los liposomas se elaboraron por diferentes técnicas con el fin de obtener la formulación que confiriera mayor estabilidad al fármaco antiparkinsoniano.

3.1.2.1. Optimización del medio de disolución de ácido ascórbico

Con el fin de mejorar la estabilidad de levodopa en medio acuoso, se procedió a realizar una serie de estudios para determinar la concentración óptima de ácido ascórbico. Para ello, se estudió, en primer lugar, la influencia del medio acuoso, es decir, el tipo de tampón y su pH sobre la estabilidad de levodopa.

La técnica consistió en añadir en viales opacos 1 mL de una solución de levodopa (1 mg/mL) con cantidades crecientes de una solución de ácido ascórbico, obteniendo una concentración final que osciló entre 0,2 y 0,8 mg/mL.

Cada solución se preparó en tampón Hepes o PBS, y se estudió la influencia del pH a 6,2 (pH mucosa nasal) y 7,4 (pH fisiológico). El uso de estos tampones se debe a su capacidad para controlar el pH de las soluciones. Además, son ampliamente empleados en estudios con cultivos celulares.

Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente, protegidas de la luz durante 72 horas para ser posteriormente analizadas mediante HPLC.

3.1.2.2. Elaboración de las vesículas lipídicas de levodopa y ácido ascórbico

La elaboración de las vesículas lipídicas se llevó a cabo por diferentes métodos, con la finalidad de conseguir la mayor estabilidad del principio activo en el medio acuoso y seleccionar aquella que presentase mejores resultados de encapsulación del fármaco. Cada una de las técnicas empleadas requirió la utilización de diferentes tipos de componentes con una función específica, que ayudarán a aportar unas propiedades específicas a las vesículas lipídicas.

Para formularlos, se utilizaron los lípidos PC y CH como formadores de película, y EA (+) y DCP (-) como inductores de carga superficial.

Basándonos en experiencias previas realizadas por el grupo de investigación, las cantidades utilizadas para cada uno de los lotes elaborados se reflejan en la tabla 5.

Experimento	PC (mg)	CH (mg)	EA (mg)	DCP (mg)
1	70	30	0,83	-
2	70	30	1,66	-
3	70	30	3,33	-
4	70	30	-	0,83
5	70	30	-	1,66
6	70	30	-	3,33

Tabla 5. Cantidades de los lípidos utilizados (mg) para la elaboración de liposomas. PC: Fosfatidilcolina; CH: Colesterol; EA: Estearilamina; DCP: Dicetilfosfato.

En base a los resultados obtenidos en el apartado 4.1.1.2., se seleccionó el tampón Hepes a pH 6,2, para su incorporación en la fase acuosa de las vesículas.

Una vez han sido concretados los componentes que conformarán las mismas, se procedió a la síntesis de las estructuras lipídicas por diferentes métodos, entre los que se encuentran los siguientes: evaporación en capa fina (TLE), evaporación en

fase reversa (REV), método de calentamiento y congelación (FAT) y método de sonicación.

- *Método Bangham o TLE*

Este método, ya detallado en apartados anteriores, fue el método de partida para elaborar los liposomas de levodopa y ácido ascórbico. En base a la tabla 5, se pesaron en un matraz de fondo redondo los componentes lipídicos y el agente de carga, disolviéndose en 8 mL de cloroformo. Posteriormente, el disolvente orgánico se sometió a evaporación en rotavapor y presión reducida. Una vez formada la película lipídica, se dejó a temperatura ambiente hasta la eliminación completa del cloroformo y posteriormente se hidrató con 3 mL del medio acuoso, compuesto por una mezcla de levodopa y ácido ascórbico en tampón Hepes pH 6,2.

A continuación, la mezcla resultante se sometió a cinco ciclos de agitación en vórtex por un tiempo de 1 minuto, seguido de 5 minutos a 58 °C reposando en baño. Finalmente, la muestra se almacenó a 4 °C en viales topacio con el fin de proteger al fármaco de la luz para evitar su oxidación.

- *Evaporación en fase reversa (REV)*

Este método se fundamenta en la formación de gotículas de agua estabilizadas por los fosfolípidos; dichas estructuras son conocidas como micelas invertidas, por lo que el método no requiere la formación de una película en el matraz utilizado (Maestrelli y cols., 2006). El procedimiento consistió en disolver los componentes lipídicos especificados en la tabla 5 en una mezcla de dietiléter y cloroformo en una relación 8:1 v/v. A continuación, se sometió el preparado a un proceso de sonicación a 0 °C, hasta que la dispersión adquiere un aspecto lechoso, indicativo de la formación de micelas invertidas. Seguidamente, se rotaevaporó controlando la temperatura (58 °C) y presión reducida, observando que la solución pasaba de un estado líquido a una fase de gel coloidal (Dua y cols., 2012). Este momento de la preparación constituye un punto crítico, ya que el gel colapsa y se produce inmediatamente la formación de las vesículas. Con el fin de obtener una máxima capacidad de encapsulación, se ha demostrado que la relación entre la fase orgánica

y la fase acuosa debe ser 3:1. Por esta razón, en nuestro estudio se adicionaron 3 mL de tampón Hepes (pH 6,2) que contenían disueltos levodopa y ácido ascórbico.

La formulación se sometió a cinco ciclos de agitación, siguiendo la metodología descrita en el procedimiento anterior. Posteriormente se almacenó a 4 °C, protegiéndola de la luz.

- *Método de calentamiento y congelación (FAT)*

Partiendo de la dispersión de liposomas multilaminares, se sometió la muestra a un proceso de congelación durante treinta segundos en nitrógeno líquido, calentándose en baño termostático posteriormente, a 58 °C durante cinco minutos. Este proceso, que se repitió nueve veces, favorece el atrapamiento del fármaco ya que, durante el proceso de congelación, la bicapa de fosfolípidos se deshidrata y entra en contacto con el principio activo a encapsular (Abraham y cols., 2005) y, por tanto, aumenta la encapsulación del fármaco disuelto en la fase acuosa. La muestra se dejó reposar a temperatura ambiente y se almacenó a 4 °C protegida de la luz.

- *Método de sonicación*

La interrupción de la formación de dispersiones MLVs utilizando energía ultrasónica (sonicación) produce típicamente vesículas unilaminares pequeñas (SUV), dando lugar a estructuras con diámetros comprendidos en el intervalo de 15-50 nm (Dua y cols., 2012). Así, tras la obtención de vesículas multilaminares por TLE, se sometió la muestra a un proceso de sonicación (100 W, 20 min, 58 °C), dejándola reposar a temperatura ambiente y almacenándola finalmente a 4 °C protegida de la luz.

- *Extrusión secuencial*

Las vesículas lipídicas multilaminares se sometieron a un proceso de extrusión, el cual tiene como objetivo la reducción del tamaño de los liposomas y obtener poblaciones unilaminares con una mayor uniformidad del tamaño de las vesículas. Esta técnica es aplicable en un amplio rango de concentraciones de lípidos (0-400

mg/mL) y prácticamente todos los lípidos y mezclas de ellos pueden ser extruidos, controlando la temperatura para que sea siempre superior a la temperatura de transición de fase del lípido.

La reducción del tamaño de las vesículas se llevó a cabo con la ayuda de un extrusor mediante la aplicación de presiones moderadas (100 - 800 psi), gracias al acoplamiento de una bala de nitrógeno. De esta manera, se logra forzar el paso de las vesículas lipídicas a través de filtros de policarbonato de tamaño de poro definido. La presión empleada fue de 600 psi y se utilizaron filtros de policarbonato de 0,8 μm y 0,4 μm (200 bar), a través de los cuales se hizo pasar la muestra 10 veces por cada uno de estos filtros.

Algunas consideraciones a tener en cuenta en el proceso se describen a continuación. En primer lugar, para obtener una mayor homogeneidad de las vesículas, es necesario filtrar las muestras sucesivamente a temperatura superior a la T_c ; además, es recomendable que se realice la filtración empezando por el filtro que tiene mayor diámetro de poro y culminar con el de menor tamaño.

3.1.3. Elaboración de formulaciones con ácido ascórbico y superóxido dismutasa

Una vez optimizada la formulación de liposomas de levodopa y ácido ascórbico, se procedió a introducir en la formulación SOD, con el fin de estudiar la capacidad antioxidante de ambas moléculas sobre levodopa.

Para ello, en primer lugar, se procedió a optimizar la formulación de liposomas con SOD, para posteriormente unirla a la formulación de liposomas de levodopa y ácido ascórbico, ya que este compuesto enzimático presentaba unas características distintas a las otras moléculas que no permitieron incluirla con el resto de las sustancias en una misma formulación.

3.1.3.1. Elaboración de liposomas SOD

La elaboración de las vesículas lipídicas SOD se llevó a cabo por el método TLE, explicado previamente en el apartado 3.1.1.2. La fase lipídica se compuso en este caso de una mezcla de 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), CH y EA, en una relación 6:3:0,5 (Vorauer-Uhl, 2001). Se seleccionó DPPC debido a la sensibilidad que presenta la enzima SOD al someterse a altas temperaturas, ya que este fosfolípido presenta una temperatura de transición menor que la PC (Kalra y Bally, 2013), lo cual permite trabajar en condiciones menos agresivas de temperatura, evitándose así que SOD se viera afectada por dicho factor.

Posteriormente, los componentes lipídicos se disolvieron en 8 mL de cloroformo y se sometieron a rotavaporación, controlando la temperatura y presión. Una vez obtenida la película, se hidrató con 3 mL de una solución de SOD (0,5 mg/mL) en tampón Hepes pH 7,4. Se utilizó este valor de pH ya que estudios anteriores realizados por Rengel y cols. (2002) demostraron que la SOD presenta su máxima actividad enzimática a este pH.

A continuación, se procedió a la formación de las vesículas mediante los ciclos de vórtex descritos en apartados anteriores, con la única modificación de controlar la temperatura a 40 °C, por las características de la temperatura de transición del DPPC.

3.1.3.2. Unificación de formulaciones

Una vez optimizada la formulación de liposomas de SOD, se añadió la formulación de liposomas de levodopa y ácido ascórbico, previamente optimizada.

3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES

3.2.1. Caracterización fisicoquímica

Debido a la incompatibilidad que presenta la enzima SOD para ser formulada a temperaturas elevadas y a bajos valores de pH, se elaboraron de manera independiente ambas formulaciones para posteriormente unificarse en una, previo a su administración. Esta formulación será caracterizada exhaustivamente para determinar si la estabilidad de levodopa en medio acuoso se ve favorecida.

El tamaño de las vesículas así como el índice de polidispersión se determinaron por espectroscopía de correlación fotónica, siguiendo la metodología previamente descrita en la presente memoria.

Las formulaciones de liposomas que contenían curcumina se diluyeron 1:20 (v/v) en Hepes pH 7,4, mientras que las formulaciones de liposomas que incluían ácido ascórbico y SOD se diluyeron 1:20 (v/v) en Hepes pH 6,2. Las muestras se midieron a una temperatura de 25 °C, por triplicado y se presentaron como media \pm DS.

Por otra parte, para determinar la carga superficial de los liposomas se introdujeron 3 mL de la dispersión liposomal en el equipo *Zetasizer Nano ZS*, donde se calculó el potencial zeta (ζ) a partir de la movilidad electroforética (μ), como también queda recogido en el apartado correspondiente del Bloque I de la memoria.

Las muestras se midieron a 25 °C, empleando la misma dilución que para el tamaño, por triplicado y los resultados se presentan como media \pm DS.

3.2.2. Determinación de la eficacia de encapsulación

La cuantificación de la fracción de levodopa encapsulada en los liposomas se llevó a cabo tras su extracción de los mismos con lauril sulfato sódico (0,5 % p/v) mediante un proceso de centrifugación.

Para ello, se transfirieron a un eppendorf 0,7 mL de los liposomas preparados (almacenados 24 horas en refrigeración a 4 °C) y se centrifugó la muestra durante 60 min a 8000 rpm y 4 °C (González-Rodríguez y cols., 2016). Así, se separó el sobrenadante del sedimento, siendo éste último diluido hasta 3 mL con lauril sulfato

sódico 0,5% p/v, sonicando y agitando con vórtex para garantizar la destrucción de las vesículas y la disolución de los fármacos encapsulados en el medio. El sobrenadante se diluyó a 2 mL con Hepes para cuantificar la fracción de fármaco no encapsulada. Finalmente, las soluciones resultantes se filtraron a través de un filtro de membrana (0,45 μm) para su cuantificación posterior mediante HPLC. Las muestras se analizaron por triplicado y la eficacia de encapsulación (EE) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$EE = \frac{\left(\frac{A_m}{A_{std}}\right) \times C_{std} \times 10,6}{X} \times 100$$

Donde, A_m : Área cromatográfica de la muestra, A_{std} : Área cromatográfica del estándar, C_{std} : Concentración de estándar del fármaco y, X: Cantidad teórica del fármaco

3.3. DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE LAS MOLÉCULAS POR HPLC

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se ha convertido en el principal método para la separación de especies químicas estrechamente relacionadas entre sí, además de permitir realizar una identificación cualitativa (tiempo de retención) y una identificación cuantitativa (áreas de los picos) de las especies separadas (Skoog y cols., 2001; Femenía-Font y cols., 2005).

El cromatógrafo utilizado (Lachrom Hitachi HPLC System Manager) se compone de cuatro unidades: bomba isocrática L-7100, inyector automático de muestras L-7200, detector DAD L-7455 de longitud de onda variable e interfase D-7000. La columna cromatográfica empleada fue C_{18} (ZORBAX SB-C18 150 mm \times 4,6 mm, 3,5 μm). La determinación de las moléculas se llevó a cabo mediante la aplicación de HPLC de fase reversa (Badwe y cols., 2005).

En la tabla 6 se recogen las condiciones cromatográficas utilizadas para la determinación de cada una de las moléculas empleadas en este capítulo.

Molécula	Curcumina	Levodopa
Fase móvil (v/v/v)	Ácido acético 2%:ACN (50:50)	ACN:Ácido acético 2%:H ₂ O mQ (30:50:20)
Velocidad flujo (mL/min)	1,2	1
Volumen inyección (μL)	10	20
Temperatura horno (°C)	25	25
Longitud onda (nm)	420	280 / 265

Tabla 6. Condiciones cromatográficas para cuantificación en HPLC de diferentes moléculas. ACN: Acetonitrilo.

3.4. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

Para evaluar la actividad antioxidante de los compuestos seleccionados en las formulaciones liposomales de levodopa, se usaron dos métodos químicos diferentes: el denominado ABTS y Xantina/Xantina oxidasa.

3.4.1. Cuantificación de la actividad antioxidante de curcumina y ácido ascórbico

Se seleccionó el ensayo ABTS para medir la actividad antioxidante de las moléculas curcumina y ácido ascórbico, así como su capacidad para eliminar radicales libres generados tanto en medio acuoso como lipófilo (Antolovich y cols., 2002).

Se trata de una reacción basada en la capacidad de los antioxidantes para capturar el radical catiónico ABTS^{•+} (Pisoschi y cols., 2011). La generación de este radical constituye la base de uno de los métodos espectrofotométricos que han sido aplicados para medir la actividad antioxidante total de soluciones o sustancias puras y mezclas acuosas. Para la generación del radical catión ABTS^{•+}, se procedió a mezclar 2,98 mM de ABTS y 0,98 mM K₂S₂O₈ (persulfato de potasio) en agua purificada (Figura 1). Esta reacción implica la producción directa del cromóforo ABTS^{•+} verde-azul. La adición de los antioxidantes curcumina y ácido ascórbico al radical formado lo reduce a ABTS, de manera que el grado de decoloración como porcentaje de inhibición del radical catión ABTS^{•+} está determinado en función de la concentración y el tiempo.

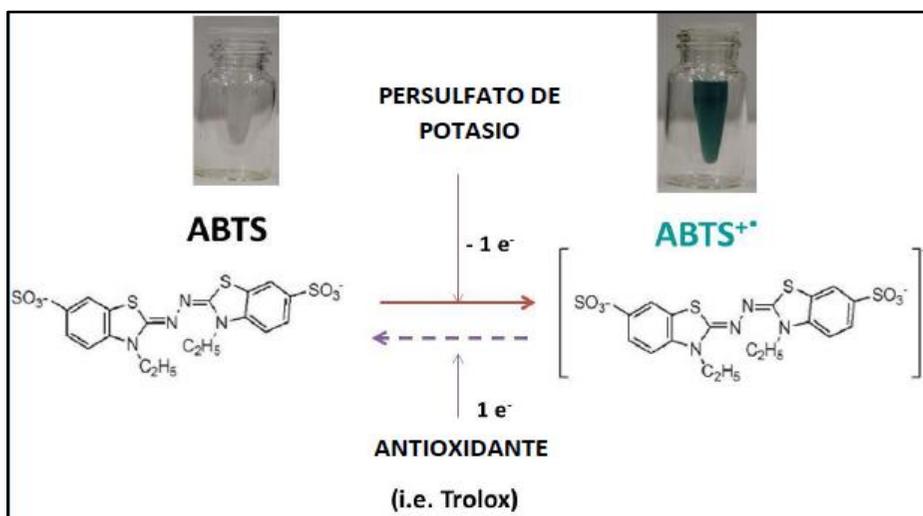


Figura 1. Reacción del ABTS.

Esta solución será reducida por el antioxidante obteniendo una solución incolora, debido a la sustitución del átomo de nitrógeno por un átomo de hidrógeno, produciendo la decoloración de la solución.

Metodológicamente, la mezcla ABTS-persulfato obtenida se almacenó en recipiente opaco a 4 °C durante 16 h antes de su uso. A partir de esta solución se preparó una dilución (1: 10) con etanol para lograr una absorbancia de aproximadamente 0,7 a 734 nm. Como solución estándar antioxidante de referencia se seleccionó Trolox (1,05 mg/mL en etanol absoluto), el cual es un derivado soluble del β -caroteno.

Posteriormente, se prepararon las placas de ensayo añadiendo en placas de 96 pocillos, un volumen de 10 μ L de cada una de las muestras a analizar, que contenían levodopa y uno de los antioxidantes. Se analizaron diferentes concentraciones (2, 1, 0,4, 0,2, 0,1, 0,04 y 0,02 mg/mL para la curcumina, y 0,2, 0,1, 0,04, 0,02, 0,01, 0,004 y 0,002 mg/mL para ácido ascórbico). Las muestras en los pocillos fueron diluidas con 90 μ L de etanol para reaccionar con 100 μ L de la solución ABTS^{•+} fresca. La solución madre estándar de Trolox también se preparó en etanol y se diluyó para proporcionar siete concentraciones diferentes: 1,05, 0,525, 0,21, 0,105, 0,0525, 0,021 y 0,0105 mg/mL.

La absorbancia se midió 6 minutos tras la preparación de la mezcla y todas las mediciones se realizaron por triplicado. En presencia del antioxidante en la muestra, el color azul-verdoso del radical ABTS^{•+} cambió a incoloro (disminución en la absorbancia) ya que el antioxidante puede reducir este radical hasta ABTS. Dicha decoloración de la muestra debe ser directamente proporcional al aumento de la actividad antioxidante de la muestra estudiada.

La actividad antioxidante se definió como EC50, el cual mide la efectividad de un compuesto para inhibir una actividad biológica (Joshi y cols., 2010). En este ensayo, este parámetro mide la concentración de antioxidante necesaria para disminuir en un 50% la concentración inicial del radical ABTS^{•+}, teniendo en cuenta que un IC50 bajo está directamente asociado con una actividad antioxidante alta (Zhu y cols., 2011). Finalmente, este parámetro se normalizó en relación al Trolox, como: EC50 muestra / EC50 Trolox.

3.4.2. Cuantificación de la actividad antioxidante de superóxido dismutasa

Para la determinación de la actividad antioxidante de SOD, se empleó un método indirecto, basado en la aplicación del sistema de reacción xantina/xantina oxidasa. Este método cuantifica la cantidad de aniones superóxidos ($O_2^{\cdot-}$) formados mediante la reacción enzimática de los radicales SOD, con xantina/xantina oxidasa (X/XOD), a través del uso de nitroazul de tetrazolio (NBT), indicador comúnmente utilizado debido a la rápida respuesta a la oxidación y facilidad de uso (Iranzo, 2011).

La actividad antioxidante de SOD se determinó mediante la utilización de un método espectrofotométrico. Dicho método consistió en una secuencia de reacciones en un medio que contenía 160 μ L de tampón 0,1 M de glicina-NaOH (pH 9) y 6,75 μ L de cada componente: Xantina (3 mM), EDTA (3 mM), L-dopa (0,002 mM), NBT (0,75 mM), individualmente. A continuación, se dejó incubar a 20 °C durante 10 min. La reacción comenzó tras añadir 6 mU de XOD y se continuó con la incubación a 20 °C durante 20 min. Finalmente, se adicionaron 6,75 μ L de $CuCl_2$ 6 mM, para detener dicha reacción. La actividad de la SOD fue cuantificada por espectrofotometría UV-

visible utilizando el mismo equipo que anteriormente. Las muestras se midieron a una longitud de onda de 560 nm.

Según este método, una unidad de enzima se define como la cantidad de SOD requerida para lograr una inhibición del 50% en la tasa de formación de colorante diformazano (Umasuthan y cols., 2013).

Los resultados obtenidos se tratan teniendo como patrón de referencia una solución estándar de SOD. La ecuación utilizada para la determinación de la actividad fue la siguiente:

$$\% \text{ Actividad relativa} = \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia estándar}} \times 100$$

3.5. ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES

Tras optimizar cada una de las formulaciones de liposomas de levodopa con los diferentes antioxidantes, se realizó un estudio de estabilidad en el tiempo con la finalidad de analizar la influencia sobre la encapsulación del fármaco en los sistemas vesiculares, así como obtener una formulación lo más estable posible.

Para ello, las formulaciones en presencia de los diferentes antioxidantes (curcumina, ácido ascórbico y SOD), se almacenaron a 4 °C durante 30 días. A tiempos predeterminados, se recogieron muestras para su posterior evaluación (0, 2, 6, 9, 15 y 30 días). Las alícuotas recogidas se sometieron a centrifugación durante 60 minutos, 8000 rpm y 4 °C. La estabilidad de los liposomas frente a la solución estándar de levodopa-antioxidante se determinó midiendo el tamaño de las vesículas, el IP, el potencial zeta y el porcentaje de fármaco atrapado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

—

4.1. ESTUDIO DE LAS FORMULACIONES DE LEVODOPA CON ANTIOXIDANTES

Como se ha comentado en el apartado de Introducción, levodopa continúa siendo a día de hoy el fármaco de elección en el tratamiento de la EP. Sin embargo, es un fármaco que presenta una corta semivida biológica (1 h), baja biodisponibilidad oral (< 1%) y sufre oxidación en medio acuoso (Vieira y Gamarra, 2016), entre otras propiedades.

Autores como Mason y cols. (1949) ya defendían que la levodopa tiende a ser degradada en medio acuoso conduciendo a la formación de melaninas. Así, tras el estudio de degradación en Hepes pH 7,4 (figura 2), se muestra visualmente cómo una solución de levodopa (1 mg/mL) se degrada debido a la formación de melaninas, que se producen tras el proceso de oxidación de levodopa con el tiempo, observándose cómo la solución transparente torna a negruzca (Korytowski y cols., 1987).

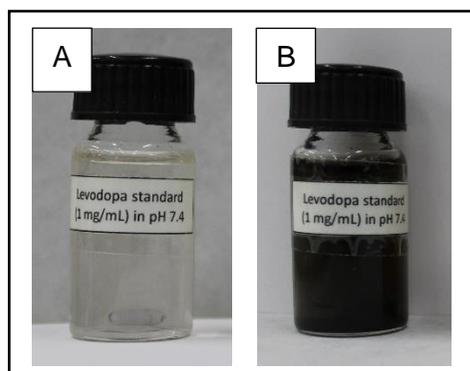


Figura 2. Evolución de una solución de levodopa en tampón Hepes pH 7,4. A: tiempo cero; B: tiempo 2 días.

Con la finalidad de solucionar el problema de estabilidad de levodopa en medio acuoso, se formularon liposomas con el objetivo inicial de proteger al fármaco de los agentes externos (Yadav y cols., 2011). Sin embargo, como se muestra en la figura 3, esta formulación no evitó la degradación del fármaco, mostrando una ligera coloración parda, muy diferente al aspecto que presenta una formulación placebo. La explicación a este resultado pudo buscarse en el hecho de que, en la formulación, el fármaco se encuentra disuelto en la fase acuosa, favoreciéndose así el proceso de oxidación (Spuch y cols., 2011). En base a estos antecedentes, y para evitar el

proceso de oxidación, se adicionaron antioxidantes a la formulación (Zaitone y cols., 2013).

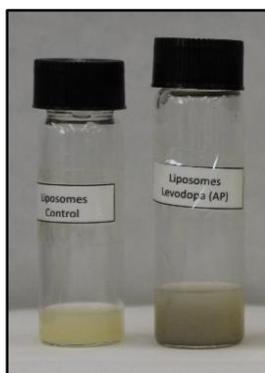


Figura 3. *Formulación de liposomas de levodopa (derecha) y liposomas control (izquierda).*

Por ello, el presente capítulo se centrará en la búsqueda de un antioxidante que confiera la máxima estabilidad a los liposomas de levodopa para su posterior acondicionamiento en la forma final.

Con este objetivo se desarrollaron formulaciones de nanoliposomas cargados de levodopa en combinación con antioxidantes como curcumina, ácido ascórbico y SOD. El procedimiento será, en primer lugar, optimizar el medio de disolución de los antioxidantes, que posteriormente serán formulados junto al agente antiparkinsoniano. Tras diseñar y caracterizar cada una de las formulaciones se procederá a estudiar la actividad antioxidante y la estabilidad de cada una de las formulaciones.

Una vez los resultados confirmaron que el ácido ascórbico fue el antioxidante que confirió mayor estabilidad a levodopa, se procedió a elaborar y caracterizar los liposomas de levodopa y ácido ascórbico mediante diferentes técnicas y además añadiendo agentes de carga a la formulación, con el objetivo de obtener la máxima estabilidad de la misma.

4.1.1. Estudios de formulaciones con curcumina

4.1.1.1. Estudio de solubilidad de curcumina en mezcla de solventes

La curcumina es un compuesto polifenólico poco soluble en agua ($< 1 \mu\text{g/mL}$). El estudio llevado a cabo para mejorar las propiedades de solubilidad demostró que este parámetro mejoró en aquellas muestras en las que se emplearon mezclas de solventes.

Como se recoge en la tabla 7, el uso de un único solvente en el medio acuoso proporcionó valores inferiores de solubilidad que aquellos que llevaron mezclas de varios solventes, a excepción de la muestra 13, que sólo llevaba Tween® 80. Este efecto solubilizante pudo deberse a su naturaleza tensioactiva, que favoreció la reducción de la tensión superficial aumentando el área superficial disponible para la solubilización del fármaco (Chen y cols., 2003). Sin embargo, aunque el uso de Tween® 80 pareció mejorar la solubilidad de la curcumina, la adición de mezclas cuaternarias de diferentes solventes mejoró considerablemente este parámetro. Respecto al uso de diferentes soluciones tampón, el uso del tampón Tris contribuyó a empeorar la solubilidad del fármaco.

Tras seleccionar las proporciones más adecuadas de cada solvente para mejorar la solubilidad de nuestro principio activo, se elaboraron y caracterizaron 4 lotes de liposomas con diferentes composiciones, que quedaron recogidas en el apartado 3.1.1.2 para poder así seleccionar aquel que proporcionase mejores características fisicoquímicas.

Muestra	Agua	Tampón Hepes	Tampón PBS	Tampón Tris
1	85	80	100	80
2	95	35	78	50
3	100	100	82	60
4	37	92	59	60
5	58	100	7	100
6	100	70	0	45
7	40	60	96	55
8	100	40	27	25
9	59	39	100	86
10	29	2	1	1
11	2	2	1	0
12	0,8	0	1	0
13	80	100	43	96
14	0,08	0	1	0

Tabla 7. *Porcentajes de solubilidad de la curcumina en cada una de las mezclas de cosolventes y diferentes soluciones tampón.*

4.1.1.2. Caracterización de liposomas de curcumina

La caracterización de las formulaciones de curcumina se recoge en la tabla 8. Se puede observar que los diferentes lotes de liposomas presentaban valores de potencial zeta e IP similares; sin embargo, la formulación L₂ fue la que presentó una mayor eficacia de encapsulación de fármaco; ello conllevó a un incremento en el tamaño de las vesículas de esta formulación respecto a las otras formulaciones, de forma que al aumentar la cantidad de fármaco incluido en el compartimento acuoso, se produjo un aumento del tamaño de las vesículas (Choudhury y cols., 2016).

Lotes	Tamaño (nm)	IP	Potencial zeta (mV)	EE (%)
L ₁	310,36 ± 4,7	0,18 ± 0,02	5,46 ± 0,6	16 ± 0,46
L ₂	764,1 ± 25,6	0,25 ± 0,04	4,47 ± 1,27	50 ± 0,75
L ₃	128,5 ± 4,9	0,30 ± 0,19	1,52 ± 0,4	4 ± 0,27
L ₄	422,7 ± 6,7	0,40 ± 0,03	4,20 ± 0,48	18 ± 0,81

Tabla 8. Caracterización de las formulaciones de liposomas con diferentes mezclas de solventes. IP: Índice de polidispersión. EE: Eficacia de encapsulación.

En el estudio, una determinada mezcla de PEG 400 y etanol exhibió un alto potencial de solubilización (Seedher y cols., 2003), de manera que la curcumina es atrapada por el PEG 400, aumentando la solubilidad de fármaco. Este mecanismo de atrapamiento del fármaco se produce también entre este polifenol y otras moléculas como PC (Began y cols., 1999; Yu y cols., 2010). En estos estudios, los autores demostraron la interacción hidrofóbica que se produce entre el fármaco y la PC quedando éste atrapado en el interior de los liposomas. Dicho proceso de atrapar el fármaco en el interior del liposoma favorece la solubilización del fármaco, así como su protección frente a las condiciones externas, mejorando así la estabilidad del mismo.

Sin embargo, a pesar de haber mejorado el parámetro de solubilidad, todas las formulaciones de liposomas presentaron bajo potencial z, muy inferior a 30 mV, por lo que estas formulaciones de liposomas, *a priori*, no gozan de buena estabilidad.

4.1.1.3. Validación del método analítico

En este estudio se ha desarrollado y validado un método por HPLC de fase reversa para la determinación de curcumina en liposomas con la mejor resolución cromatográfica posible. Este método permite el análisis de una amplia serie de muestras, evitando la posible degradación asociada a un tiempo de análisis prolongado. La preparación de la muestra fue simple, de corto tiempo de separación y habiendo considerado el bajo límite de cuantificación al iniciarse el estudio. El objetivo del método de preparación de la muestra fue eliminar las interferencias de los otros constituyentes de los liposomas, que permitan que el método sea reproducible, con una alta recuperación y empleando un número mínimo de pasos, así como corroborar la estabilidad de la formulación diseñada.

- *Idoneidad del sistema*

Se comprobó la idoneidad del sistema (*system suitability*) como requisito fundamental antes de empezar el ensayo de validación. Para ello se midieron los parámetros cromatográficos y la precisión del sistema cromatográfico, recogiendo los datos en la tabla 9.

Como se puede apreciar en la tabla 9, los resultados de este parámetro indican que la precisión del sistema como parámetro de mayor aplicación para la evaluación de la idoneidad del sistema, es óptima para iniciar el ensayo, ya que nos proporciona una variabilidad de los valores de área del pico de curcumina inferior al 2% (% RSD = 0,93), garantizando desde este punto de vista la leve dispersión entre inyecciones repetidas. Además, se verifica que los tiempos de retención del pico no presentan un desplazamiento significativo, siendo el tiempo de retención (TR) = $5,46 \pm 0,67$ min.

	TR (min)	Área
1	5,46	97318029
2	5,50	96281965
3	5,47	95267019
4	5,46	97086393
5	5,50	95168700
6	5,40	96157834
Promedio	5,46	96213323,33
SD	0,04	891868,35
RSD (%)	0,67	0,93

Tabla 9. Resultados de la idoneidad del sistema previa a la validación del método para curcumina, donde TR: Tiempo de retención. SD: desviación estándar. RSD: desviación estándar relativa.

- *Precisión*

Repetibilidad

Como define la ICH, la repetibilidad expresa la precisión del sistema, actuando en un corto intervalo de tiempo bajo las mismas condiciones. La ICH sugiere un mínimo de 10 inyecciones sobre una solución estándar y una muestra de liposomas de curcumina al 100% de la concentración nominal (0,5 mg/mL).

Los resultados obtenidos fueron satisfactorios (%RSD estándar curcumina = 1,1%; %RSD liposomas curcumina = 1,56%), ya que la dispersión de los mismos fue inferior al 2%, tomando éste como criterio de aceptación.

Precisión intermedia

La precisión intermedia consistió en realizar un ensayo de repetibilidad, y se llevó a cabo con el objetivo de analizar si las condiciones operativas y ambientales afectaron a la variabilidad de los resultados. Para ello, se procedió a realizar un estudio comparativo entre los resultados obtenidos por diferentes operarios en distintos días. Cada estudio de repetibilidad se realizó mediante el análisis de dos inyecciones de dos muestras de liposomas de curcumina preparadas por cada analista. Los resultados obtenidos se recopilan en la tabla 10.

	Solución estándar curcumina (0,5 mg/mL)			Solución liposomas curcumina (0,5 mg/mL)		
	Día 1	Día 2	RSD (%)	Día 1	Día 2	RSD (%)
Analista 1	82168659	81721303	0,29	33449,445	33804,153	1,08
	82279560	81980998		33037,074	33791,373	
Analista 2	84068212	86442004	1,5	33005,988	31784,814	1,81
	84375152	86413499		32927,49	32202,495	
Analista 1	80258075	83145374	1,97	33005,547	32752,728	0,54
	80670321	83341862		32570,91	30434,949	
Analista 2	81931052	83559059	1,44	32867,163	33222,564	1,31
	81081241	83381806		32941,116	32819,67	
RSD (%)			1,81			0,73

Tabla 10. *Precisión intermedia. Resultados de áreas de los picos cromatográficos para estándar de curcumina (0,5 mg/mL) y liposomas curcumina (0,5 mg/mL) en ensayos realizados con analistas y días diferentes.*

Como indican los resultados obtenidos, se concluye que el método analítico desarrollado es repetitivo, ya que la variabilidad de los resultados no se ven influidos significativamente por el día del análisis, así como el tipo de analista que lo lleve a cabo, habiéndose obtenido unos %RSD inferiores al 2%.

- *Selectividad*

El estudio de selectividad consistió en evaluar de manera cuali y cuantitativa la influencia de los constituyentes de las formulaciones de los liposomas sobre el tiempo de retención, pureza cromatográfica y espectral y área del pico de curcumina, además de los posibles degradantes que pudieran generarse bajo condiciones de estrés.

Selectividad cualitativa

Una vez analizadas las muestras en el cromatógrafo, se observó que los constituyentes del placebo de liposomas no se retienen en el mismo tiempo de retención que los liposomas cargados de curcumina, demostrando la no interferencia de éstos sobre la mezcla de componentes. Además, el pico correspondiente al estándar de curcumina no se encontraba solapado espectroscópicamente con ninguno de los otros componentes y los constituyentes del placebo no absorben a la longitud de onda a la que lo hace nuestro fármaco. De esta forma, se comprobó cromatográfica y espectroscópicamente la selectividad cualitativa entre el placebo de liposomas y el estándar de curcumina (0,5 mg/mL).

Selectividad tras someter las muestras a condiciones de estrés

La selectividad también se demostró sometiendo un estándar de curcumina y la formulación a condiciones de estrés (condiciones ácidas, alcalinas, oxidantes, reductoras, calor-sonicación, luz solar y luz UV).

En una primera aproximación, los estudios de degradación forzada revelaron mayores niveles de degradación en la solución estándar que en las formulaciones de liposomas, lo que denota una mayor estabilización del fármaco incluido en la formulación de liposomas y, por tanto, su efecto protector (figura 4). Así, los

liposomas protegían en más de un 90% a la curcumina en condiciones ácidas. Por otro lado, se observó un porcentaje de degradación superior al 50% en el resto de condiciones.

Se apreció en los cromatogramas que el pico de curcumina en la solución estándar apareció en el minuto 5,7, mientras que el pico de la solución degradada apareció en el minuto 5,1 aproximadamente. En cambio, en las muestras de liposomas, el pico de curcumina se adelantó aproximadamente un minuto, apareciendo en torno a 4,8 minutos. Ello demuestra que el tiempo de retención diferente en ambas preparaciones es indicativo de la diferente naturaleza de cada producto, pudiendo concluir que las formulaciones de liposomas tienen la propiedad de ser más hidrófobas que la solución estándar de curcumina (Salmani y cols., 2014).

De acuerdo con estos resultados, se puede concluir que parámetros como el pH, el calor, las ondas de ultrasonidos y la luz solar deben controlarse para minimizar el proceso de degradación de la curcumina.

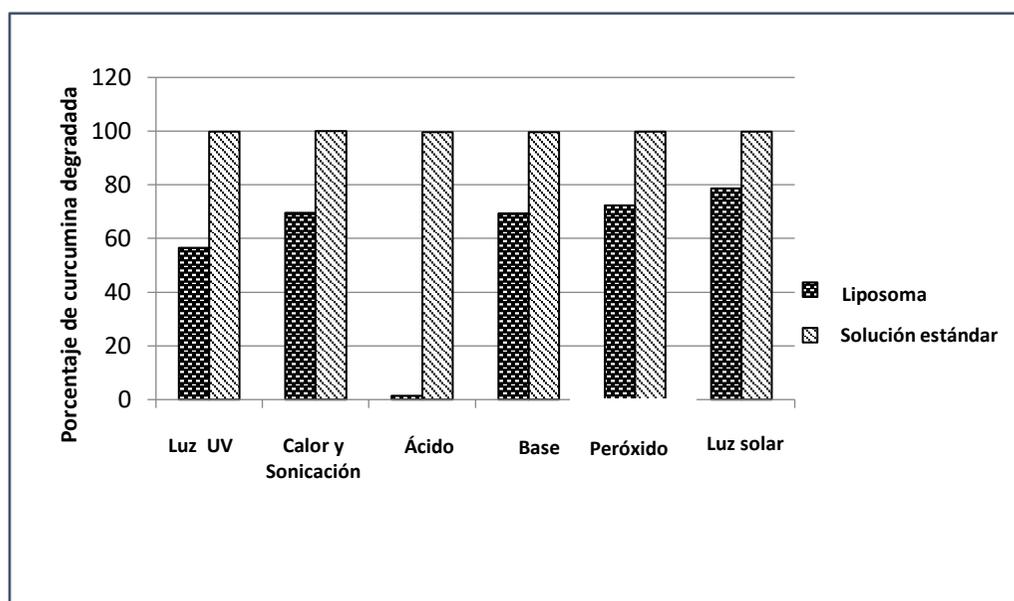


Figura 4. Porcentaje de curcumina degradado en diferentes condiciones de estrés en liposomas y solución estándar.

- *Linealidad*

El propósito de esta prueba fue demostrar que todo el sistema exhibe una respuesta lineal y que es directamente proporcional a un intervalo de concentración del analito objeto de estudio (curcumina). Se trabajó con una solución estándar de curcumina donde el 100% se correspondía a una concentración 0,5 mg/mL. La linealidad se evaluó a partir del 25% (0,125 mg/mL) al 150% (0,75 mg/mL) de la concentración nominal de la solución. Los resultados de este ensayo se recogen en la tabla 11.

Nivel (%)	Réplica	Concentración final (mg/mL)	Area (mAU)	Factor de respuesta	Varianza
I (25%)	2	0,125	24263	194107	65254
II (50%)	2	0,25	48681	194726	3292
III (100%)	2	0,5	98825	197650	46341
IV (125%)	2	0,625	123023	196838	1166811
V (150%)	2	0,75	143195	190927	2734408
Media f		194849			
SD f		2753			
RSD (%)		1,41			

Tabla 11. Resultados del estudio de linealidad del sistema para curcumina.

La representación gráfica (área vs concentración) permitió ajustar los datos a la ecuación de la recta y calcular su coeficiente de determinación (r^2), como se recoge en la figura 5.

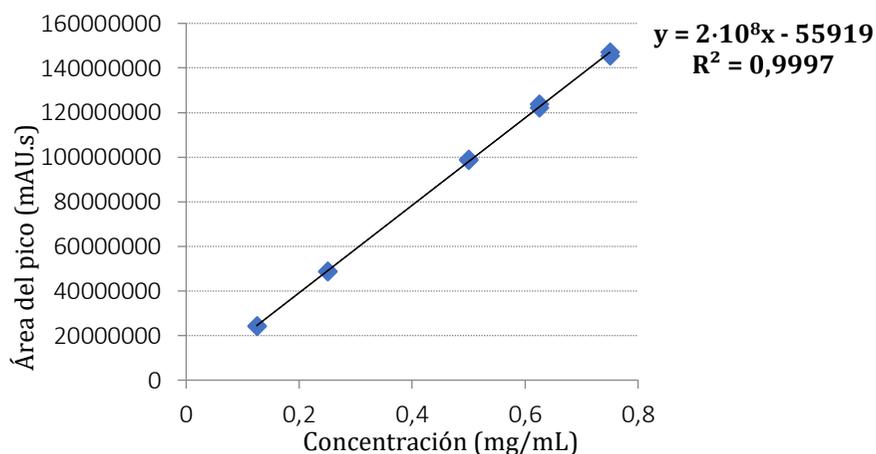


Figura 5. Representación gráfica de la linealidad del sistema para curcumina junto a su ecuación de la recta y coeficiente de determinación.

Con estos resultados se comprobó la linealidad del método. Así, la ecuación que definió la respuesta del equipo mediante la técnica de los mínimos cuadrados fue $y = 2 \cdot 10^8 x - 55919$; $R^2 = 0,9997$.

Seguidamente, se comprobó mediante un ANOVA, la existencia de bondad en el ajuste de los datos, ya que $p = 6,56 \cdot 10^{-19}$ indica la linealidad del sistema y $p = 1,77 \cdot 10^{-20}$ indica la linealidad del método. Se verificó mediante el test de Cochran la homogeneidad de varianzas, resultando que $G_{\text{exp}} (0,4821) < G_{\text{tab}} (0,6838)$, lo que significa que las varianzas de las concentraciones son homogéneas y que el factor de concentración no influyó en la variabilidad de los resultados.

Finalmente, se evaluó la linealidad a través de dos estudios. El primero de ellos se basó en la determinación de los coeficientes de variación de los factores respuesta (f), comprobándose que el mismo fue inferior al 2% (RSD = 1,89%), hecho que se confirmó gráficamente al ver que en la representación de los factores respuesta frente la concentración no se apreció un cambio en el valor de la pendiente. El segundo estudio fue el análisis de la significación estadística de la desviación estándar de la pendiente, cuyo valor resultó ser $t_{\text{exp}} = 1,00 < t_{\text{tab}} = 1,7613$. Por lo

tanto, los resultados obtenidos y analizados desde un punto de vista estadístico nos permiten garantizar la linealidad del sistema cromatográfico y del método analítico.

- *LOD/LOQ*

Para la determinación del LOQ, se analizaron cinco soluciones estándar a baja concentración, en un rango del 0,01 % al 0,1 % de la concentración nominal (0,5 mg/mL). A partir de la curva de calibración, empleando el método de los mínimos cuadrados, se determinaron la ecuación de la recta y los parámetros de ajuste, entre ellos el error estándar de la ordenada, datos que permitieron calcular la concentración mínima para ser detectado y cuantificado el activo bajo las condiciones cromatográficas descritas en el método analítico.

Con los resultados de la figura 6 podemos colegir que los valores de LOD y LOQ fueron 0,000075 y 0,000125 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

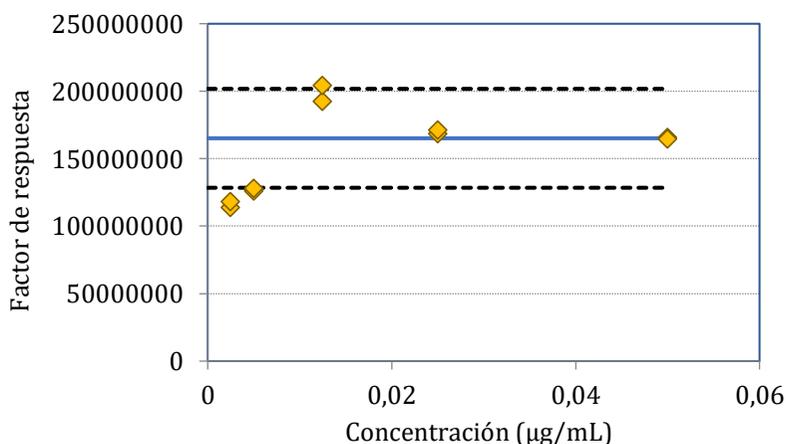


Figura 6. Representación del factor de respuesta frente a la concentración.

- *Robustez*

Para demostrar la robustez del método, se aplicó la metodología del diseño experimental, como se detalló en el apartado de Metodología. Los resultados obtenidos se irán discutiendo a continuación.

Análisis de la variable respuesta "área bajo la curva (AUC) del pico"

Partiendo de los resultados obtenidos para esta respuesta, se analizó cómo los factores estudiados afectaron al área del pico del estándar de curcumina (figura 7 y tabla 12). Según el análisis ANOM complementado con el ANOVA, no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los factores estudiados. Aplicando las pruebas de contrastes para grupos heterogéneos se obtuvo que ninguno de los factores, así como sus interacciones, afectó a la variabilidad del área bajo la curva, observándose un bajo porcentaje de contribución de los diferentes factores estudiados.

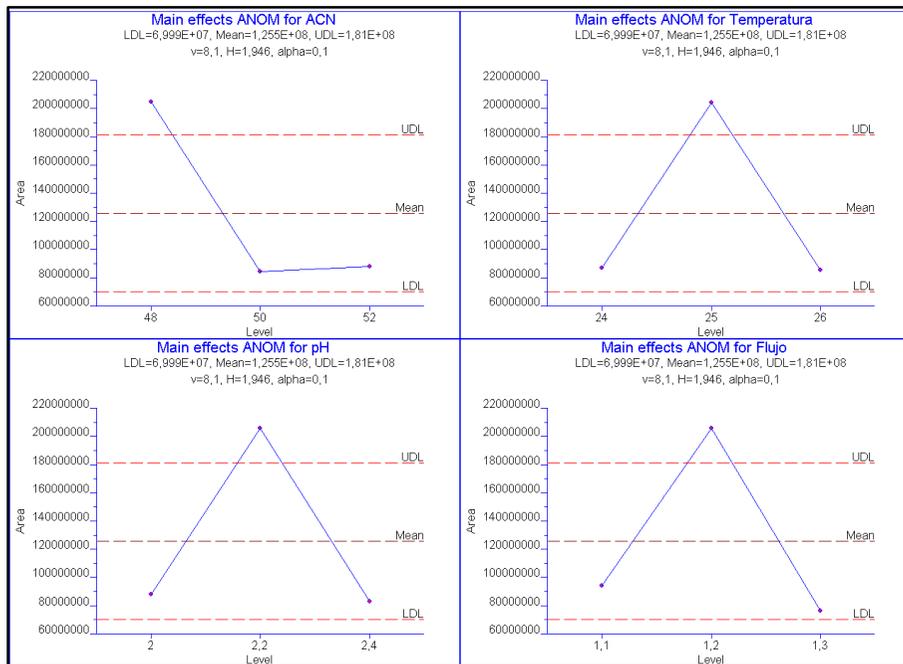


Figura 7. Gráfica de los efectos principales ANOM para la respuesta área bajo la curva del estándar de curcumina.

Tablas de ANOVA para Área (Promedios de respuesta) - Nivel alfa = 0,1								
ANOVA de una vía								
	Fuente	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P	% contrib
	Entre	2,29E+17	8	2,862E+16	0,9769		0,508	
	Entre (error)	2,637E+17	9	2,93E+16				
	TOTAL	4,927E+17	17					
Un único grado de libertad ANOVA								
	Fuente	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P	% contrib
A	ACN (48 v 52)	4,082E+16	1	4,082E+16	1,393	-1.16E+08	0,268	8,3
B	pH (2 v 2,4)	7,255E+13	1	7,255E+13	0,002476	-4918000	0,961	0,0
C	Temperatura (24 v 26)	9,372E+12	1	9,372E+12	0,000319	-1767000	0,986	0,0
D	Flujo (1,1 v 1,2)	9,559E+14	1	9,559E+14	0,03263	-1,78E+07	0,861	0,2
E	ACN (48, 52 v 50)	1,534E+16	1	1,534E+16	0,5236	-6,19E+07	0,488	3,1
F	Flujo (1,1, 1,3 v 1,2)	5,817E+16	1	5,817E+16	1,985	1,206E+08	0,192	11,8
G	pH (2, 2,4 v 2,2)	5,809E+16	1	5,809E+16	1,983	1,205E+08	0,193	11,8
H	Temperatura (24, 26 v 25)	5,553E+16	1	5,553E+16	1,895	1,178E+08	0,202	11,3
	Entre (error)	2,637E+17	9	2,93E+16				
	TOTAL	4,927E+17	17					

Tabla 12. ANOVA de la influencia de los factores evaluados sobre el área bajo la curva de la solución estándar de curcumina.

Partiendo de los resultados obtenidos para esta respuesta, se analizó igualmente cómo los factores estudiados afectaron al área bajo la curva de los cromatogramas correspondientes a los liposomas de curcumina (figura 8 y tabla 13). Según el análisis ANOM complementado con el ANOVA, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los factores estudiados ($p < 0,001$). Aplicando las pruebas de contrastes para grupos heterogéneos, se obtuvo que ninguno de los factores afectó a la variabilidad del área bajo la curva, pero de todos ellos, dos son los factores que hay que considerar con mayor énfasis en su control, debido a su porcentaje de contribución (tabla 17): el pH del tampón (35,8%) y la velocidad de flujo (30,6%).

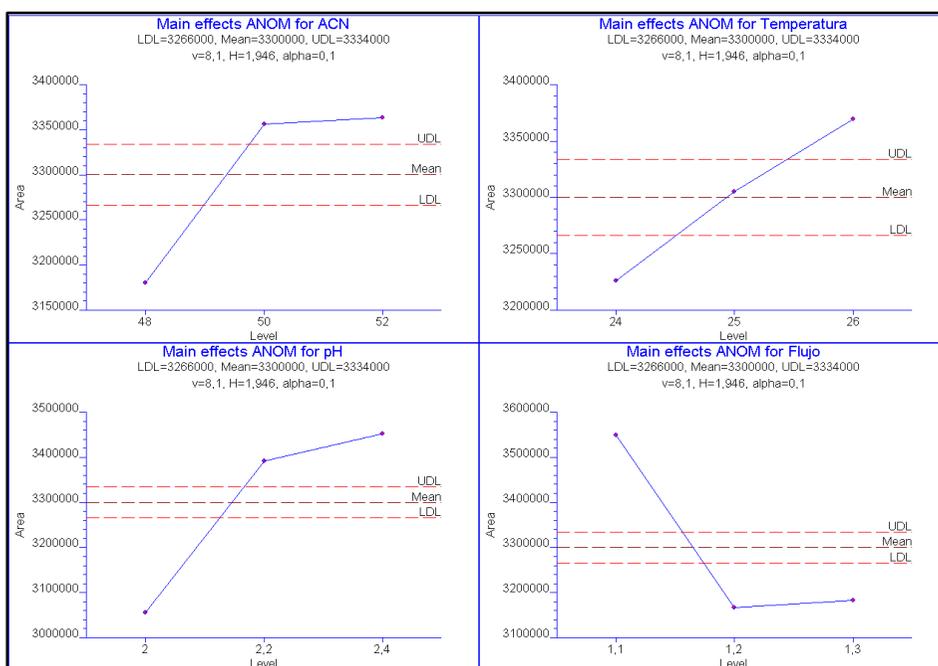


Figura 8. Gráficas de los efectos principales ANOM para la respuesta área bajo la curva de liposomas de curcumina.

Tablas de ANOVA para Área (Promedios de respuesta) - Nivel alfa = 0,1								
ANOVA de una vía								
	Fuente	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P	% contrib
	Entre	1,299E+12	8	1,624E+11	82,17*		<0,001	
	Entre (error)	1,779E+09	9	1,977E+09				
	TOTAL	1,317E+12	17					
Un único grado de libertad ANOVA								
	Fuente	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P	% contrib
A	ACN (48 v 52)	1,006E+11	1	1,006E+11	50,89*	183100	<0,001	7,6
B	pH (2 v 2,4)	4,72E+11	1	4,72E+11	2,38,8*	396700	<0,001	35,8
C	Temperatura (24 v 26)	6,209E+10	1	6,209E+10	31,41*	143900	<0,001	4,7
D	Flujo (1,1 v 1,2)	4,027E+11	1	4,027E+11	203,7*	-366400	<0,001	30,6
E	ACN (48, 52 v 50)	2,845E+10	1	2,845E+10	14,4*	84340	0,004	2,2
F	Flujo (1,1, 1,3 v 1,2)	1,584E+11	1	1,584E+11	80,12*	-199000	<0,001	12,0
G	pH (2, 2,4 v 2,2)	7,491E+10	1	7,491E+10	37,9*	136900	<0,001	5,7
H	Temperatura (24, 26 v 25)	2,012E+08	1	2,012E+08	0,1018	7092	0,757	0,0
	Entre (error)	1,779E+10	9	1,977E+09				
	TOTAL	1.317E+12	17					

Tabla 13. ANOVA de la influencia de los factores evaluados sobre el área bajo la curva de la solución de liposomas curcumina.

Este fenómeno de influencia estadística se puede visualizar gráficamente con los diagramas de Pareto (figura 9) donde se representan gráficamente los efectos de los factores sobre la respuesta. Con respecto a los efectos positivos, la respuesta aumenta a medida que pasa de un nivel menor a uno mayor. Por el contrario, los efectos negativos se alcanzan cuando la respuesta disminuye, pasando de un nivel inferior a uno superior. La figura 9 muestra que los principales factores que afectaron a las áreas de los picos cromatográficos fueron el pH y la velocidad de flujo. Con respecto al pH, las áreas cromatográficas aumentaron significativamente a medida que el pH pasó de 2 a 2,4. Como es bien sabido, este parámetro está relacionado con la ionización de la curcumina y el aumento en el pH da lugar a un ligero aumento de la forma aniónica, dando como resultado una forma más soluble de la misma.

Por el contrario, la relación entre la velocidad de flujo y el área del pico es negativa, resultado que puede relacionarse con el tiempo necesario para solubilizar la curcumina.

Otros factores, como la proporción de ACN y la temperatura del horno, contribuyeron al aumento significativo de las áreas de los picos, en el sentido de que un nivel más alto de ACN y una temperatura más alta facilitan la elución de curcumina.

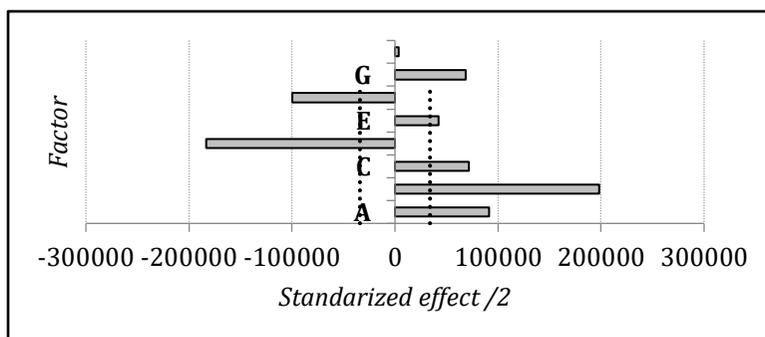


Figura 9. Gráfica de Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta área bajo la curva de liposomas de curcumina. A: ACN (48 v 52); B: pH (2 v 2,4); C: Temperatura (24 v 26); D: Flujo (1,1 v 1,2); E: ACN (48, 52 v 50); F: Flujo (1,1, 1,3 v 1,2); G: pH (2, 2,4 v 2,2), H: Temperatura (24, 26 v 25).

Análisis de la variable respuesta "tiempo de retención"

Partiendo de los resultados obtenidos para esta respuesta, se analizó cómo los factores estudiados afectaron al tiempo de retención a partir de la solución estándar (figura 10 y tabla 14). Según el análisis ANOM y el ANOVA, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los factores estudiados, $p < 0,001$. Aplicando las pruebas de contrastes ANOM para grupos heterogéneos, se obtuvo que los factores que interaccionaron con la variabilidad del tiempo de retención fueron el porcentaje de ACN (78,1%) y la velocidad de flujo (11%).

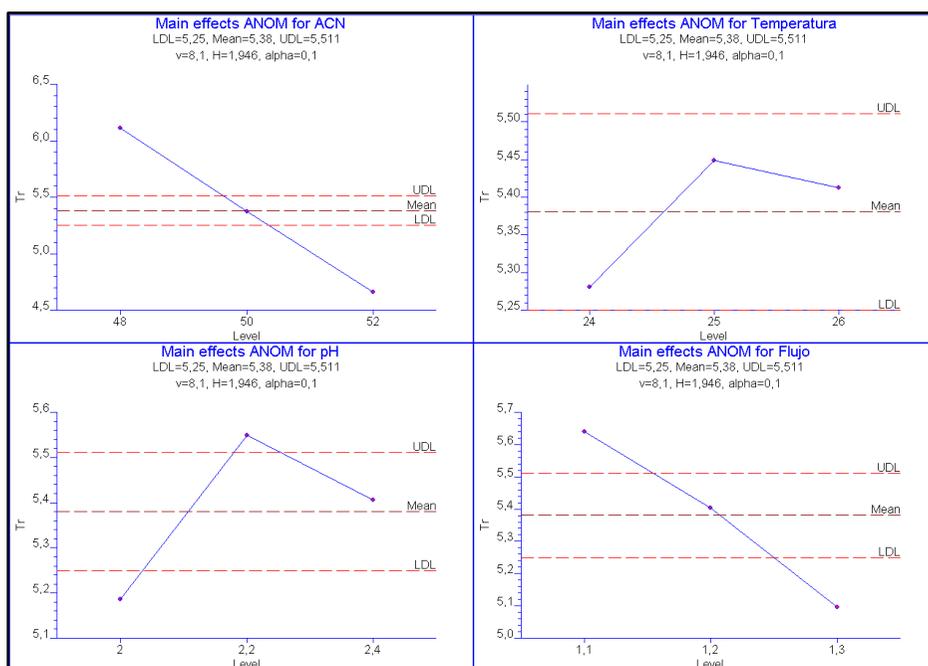


Figura 10. Gráficas de los efectos principales ANOM para la respuesta tiempo de retención del estándar de curcumina.

Tablas de ANOVA para tiempo de retención (Promedios de respuesta) - Nivel alfa = 0,1								
ANOVA de una vía								
	Fuente	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P	% contrib
	Entre	7,67	8	0,9588	23,35*		<0,001	
	Entre (error)	0,3696	9	0,04106				
	TOTAL	8,04	7					
Un solo grado de libertad ANOVA								
	Fuente	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P	% contrib
A	ACN (48 v 52)	6,281	1	6,281	153*	-1,447	<0,001	78,1
B	pH (2 v 2,4)	0,1459	1	0,1459	3,552*	0,2205	0,092	1,8
C	Temperatura (24 v 26)	0,05214	1	0,05214	1,27	0,1318	0,289	0,6
D	Flujo (1,1 v 1,2)	0,8873	1	0,8873	21,61*	-0,5438	0,001	11,0
E	ACN (48, 52 v 50)	0,0009817	1	0,0009817	0,02391	-0,01567	0,881	0,0
F	Flujo (1,1, 1,3 v 1,2)	0,005208	1	0,005208	0,1268	0,03608	0,730	0,1
G	pH (2, 2,4 v 2,2)	0,2552	1	0,2552	6,214*	0,2526	0,034	3,2
H	Temperatura (24, 26 v 25)	0,04209	1	0,04209	1,025	0,1026	0,338	0,5
	Entre (error)	0,3696	9	0,04106				
	TOTAL	8,04	17					

Tabla 14. ANOVA de la influencia de los factores evaluados sobre el tiempo de retención de la solución estándar de curcumina.

El gráfico de Pareto (figura 11) nos muestra cómo disminuyó el tiempo de retención de la curcumina al aumentar el porcentaje de ACN (factor A). Una ligera modificación en el porcentaje de ACN en la fase móvil contribuye a aumentar la polaridad del medio, mejorando la elución de curcumina. Por otro lado, cuando se varió la velocidad de flujo se observó una clara influencia en el tiempo de retención, de forma que este parámetro se incrementó cuando la velocidad de flujo se vió disminuida (factor D): como es lógico, un aumento en la velocidad de flujo conlleva a una aceleración de la elución de curcumina, reduciendo el tiempo de retención.

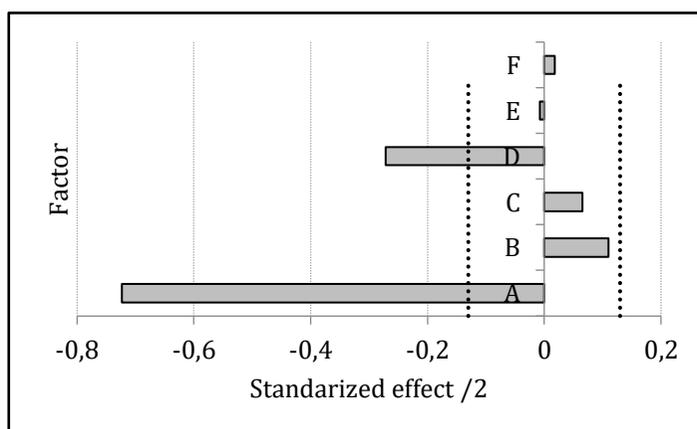


Figura 11. Gráfica de Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta tiempo de retención del estándar de curcumina. A: ACN (48 v 52); B: pH (2 v 2,4); C: Temperatura (24 v 26); D: Flujo (1,1 v 1,2); E: ACN (48, 52 v 50); F: Flujo (1,1, 1,3 v 1,2); G: pH (2, 2,4 v 2,2), H: Temperatura (24, 26 v 25).

Asimismo, se analizaron cómo los factores estudiados afectan al tiempo de retención de los liposomas de curcumina (figura 12 y tabla 15). Según los análisis ANOM y ANOVA, se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los factores estudiados ($p < 0,001$). Aplicando las pruebas de contrastes para grupos heterogéneos, se obtuvo que todos los factores interaccionaron con la variabilidad del tiempo de retención siendo de nuevo el porcentaje de ACN (74,4%) y la velocidad de flujo (20,5%) los más significativos.

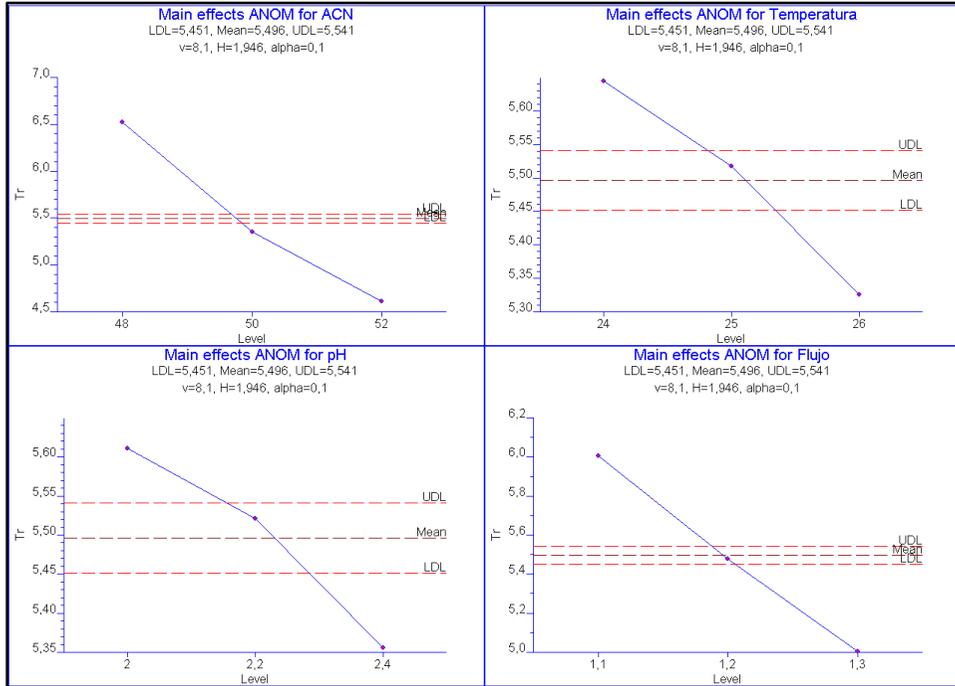


Figura 12. Gráfica de los efectos principales ANOM para la variable respuesta tiempo de retención de liposomas de curcumina.

Tablas de ANOVA para tiempo de retención (Promedios de respuesta) - Nivel alfa = 0,1								
ANOVA de una vía								
	Fuente	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P	% contrib
	Entre	14,64	8	1,83	353,6*		<0,001	
	Entre (error)	0,04657	9	0,005174				
	TOTAL	14,68	7					
Un único grado de libertad ANOVA								
	Fuente	SS	DF	MS	F-ratio	I-hat	P	% contrib
A	ACN (48 v 52)	10,92	1	10,92	2110*	-1,908	<0,001	74,4
B	pH (2 v 2,4)	0,1961	1	0,1961	37,9*	- 0,2557	<0,001	1,3
C	Temperatura (24 v 26)	0,3053	1	0,3053	59*	-0,319	<0,001	2,1
D	Flujo (1,1 v 1,2)	3,014	1	3,014	582,5*	-1,002	<0,001	20,5
E	ACN (48, 52 v 50)	0,1888	1	0,1888	36,49*	- 0,2172	<0,001	1,3
F	Flujo (1,1, 1,3 v 1,2)	0,003364	1	0,003364	0,6501	-0,029	0,441	0,0
G	pH (2, 2,4 v 2,2)	0,005776	1	0,005776	1,116	0,038	0,318	0,0
H	Temperatura (24, 26 v 25)	0,004225	1	0,004225	0,0325	0,0325	0,390	0,0
	Entre (error)	0,04657	9	0,005174				
	TOTAL	14,68	17					

Tabla 15. ANOVA de la influencia de los factores evaluados sobre el tiempo de retención de la solución de liposomas de curcumina.

El diagrama de Pareto (figura 13) indicó que todos los factores evaluados afectan al tiempo de retención de las muestras de liposomas. Previamente ha sido expuesta la relación entre el pH y la ionización de curcumina. Por esta razón, una ligera modificación en el pH proporciona cambios en sus características de ionización, lo que produjo una modificación en la interacción entre la molécula, la fase móvil y la fase estacionaria C₁₈. Por otro lado, hay que señalar que la temperatura incrementa la cinética de interacción cromatográfica, lo que conduce a una variación en el tiempo de retención de la muestra de liposomas.

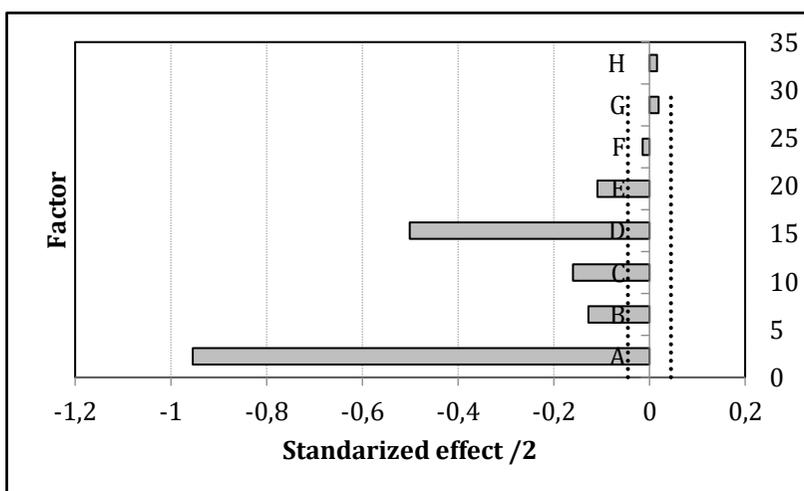


Figura 13. Gráfica de Pareto de efectos principales e interacciones para la variable respuesta tiempo de retención de los liposomas de curcumina. ACN (48 v 52); B: pH (2 v 2,4); C: Temperatura (24 v 26); D: Flujo (1,1 v 1,2); E: ACN (48, 52 v 50); F: Flujo (1,1, 1,3 v 1,2); G: pH (2, 2,4 v 2,2), H: Temperatura (24, 26 v 25).

A modo de conclusión, los factores críticos a controlar para asegurar la robustez del sistema fueron el pH, velocidad de flujo y porcentaje de acetonitrilo.

4.2. ESTUDIOS DE FORMULACIONES CON ÁCIDO ASCÓRBICO

4.2.1. Optimización del medio de disolución de ácido ascórbico

Como se ha comentado anteriormente, levodopa sufre un proceso de autooxidación en medio acuoso formando melaninas, sustancia responsable del color negrozco de las soluciones (Swan, 1974). Este proceso oxidativo conlleva la formación de radicales libres, responsables asimismo de la degradación del fármaco (Kruk y cols., 1999). Para ralentizar dicho proceso, se añadió en este caso, ácido ascórbico a la formulación, por ser éste un excelente captador de radicales libres, que actúa impidiendo la iniciación de la cadena oxidativa o interrumpiendo su propagación (Butterfield y cols., 2002).

Así, resulta esencial conocer la concentración óptima del ácido ascórbico para determinar el medio de disolución más favorable que permita mejorar la estabilidad de la levodopa en la formulación. Para ello, se realizó un primer estudio acerca de la influencia del medio tampón y del pH del medio tras añadir ácido ascórbico a la formulación, ya que el comportamiento de este antioxidante puede modificarse en función de estos parámetros.

De los resultados obtenidos (tabla 16) se observó que la concentración mínima de ácido ascórbico (0,2 mg/mL) resultó útil para ralentizar el proceso de oxidación de la levodopa, mientras que el efecto oxidativo se incrementaba a medida que la concentración del antioxidante aumentaba.

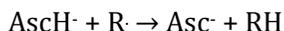
Ácido ascórbico (mg/mL)	Hepes pH 7,4	PBS pH 7,4	Hepes pH 6,2	PBS pH 6,2
Blanco	100	100	100	100
0,2	100	90	100	70
0,3	90	70	70	60
0,4	80	70	60	40
0,5	60	60	40	20
0,6	40	50	30	0
0,7	20	0	0	0
0,8	0	0	0	0

Tabla 16. *Porcentaje de levodopa recuperada en las diferentes disoluciones preparadas. Concentración de levodopa en la solución: 1 mg/mL.*

No se ha encontrado una relación directamente proporcional entre la concentración de ácido ascórbico y el porcentaje de recuperación del fármaco. Más bien ocurre lo contrario: al aumentar la concentración de ácido ascórbico en el medio, se incrementa el proceso de oxidación del fármaco, hecho que puede deberse a la presencia de trazas de iones metálicos en el tampón que favorecen la formación de radicales libres del ácido, favoreciendo la oxidación de levodopa (Mikirova y cols., 2012).

El efecto antioxidante del ácido ascórbico sobre la levodopa se produciría siguiendo la siguiente secuencia: en soluciones tampón a pH 7,4, el 99,95% de ácido ascórbico aparece como ascorbato monoanión (AsCH^-), el 0,05% como ácido dehidroascórbico (AsCH_2) y el 0,004% como ascorbato dianión (AsCH^{2-}). El AsCH^- reacciona rápidamente con agentes oxidantes que lo convierten en un excelente antioxidante

(Bors y cols., 1997), AscH⁻ dona un átomo de hidrógeno a un radical oxidante para producir el radical libre de ascorbato de tricarbonilo estabilizado por resonancia, correspondiendo R[•] con levodopa.



Por otra parte, cuantitativamente se observó que la solución de levodopa elaborada en tampón Hepes presentó resultados más favorables que la solución elaborada en tampón PBS, debido principalmente a su composición. Sin embargo, la variación de pH del medio no mostró resultados muy relevantes.

En la figura 14 se observa visualmente la degradación que sufren las soluciones de levodopa a pH 7,4, mientras que las soluciones a pH 6,2 se mantienen más claras. También es posible apreciar que el tampón Hepes mostró mejores resultados que el PBS. Cuantitativamente, la diferencia entre ambos tampones es mínima, pero cualitativamente las diferencias fueron más patentes, demostrando que la disminución del pH favorece la estabilidad de las soluciones.

En base a los resultados obtenidos, se pudo concluir que la solución de levodopa en tampón Hepes pH 6,2 fue la que mostró mejores resultados, resultando una solución totalmente nítida, así como un 100% en el porcentaje de recuperación de levodopa.

Esta mejora en la estabilidad del fármaco al disminuir el pH del medio tiene su justificación, ya que el proceso de formación de melaninas se ve reducido cuando los valores de pH del medio disminuyen (Kruk y cols., 1989). Este hecho está claramente relacionado con el estado de ionización del fármaco y concuerda con los valores óptimos de la constante de disociación de los grupos hidroxilo. Además, el ácido ascórbico disminuye su estabilidad a pH más altos, reduciéndose su actividad antioxidante. Es por ello que un valor de pH más bajo favorece la capacidad antioxidante de esta vitamina (Kibbe, 2009).

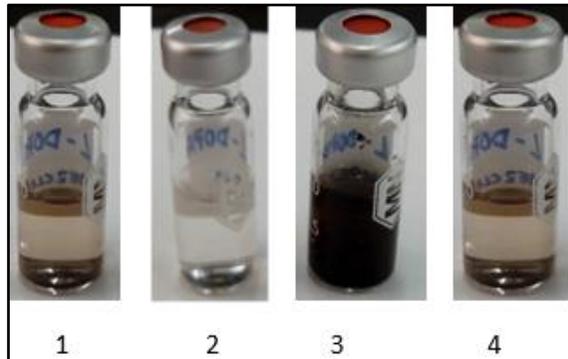


Figura 14. Imágenes de soluciones de levodopa y ácido ascórbico a diferentes pH y tampones. 1. Tampón Hepes pH 7,4; 2. Tampón Hepes pH 6,2; 3. Tampón PBS pH 7,4; 4. Tampón PBS pH 6,2.

Este efecto de reducir la degradación de levodopa cuando se reduce el pH de la solución concuerda con estudios realizados por Kankkunen y cols. (2002), que demuestran que en medio ácido existe un “obstáculo” para evitar el desprendimiento de las moléculas de hidrógeno, lo cual se traduce en una mejor estabilidad del fármaco.

De acuerdo con estos resultados, se seleccionó el tampón Hepes pH 6,2 y 0,2 mg/mL de ácido ascórbico para formular liposomas cargados con levodopa (1 mg/mL).

4.3. ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS

Debido a los problemas de estabilidad en medio acuoso que presenta levodopa, se decidió formular el fármaco incluido en liposomas y añadir un antioxidante a la formulación. Tras optimizar el medio de disolución de cada uno de los antioxidantes, se procedió a la elaboración y caracterización de cada una de las formulaciones liposomales, con la finalidad de obtener la formulación que proporcione mayor estabilidad a la molécula de levodopa.

En este apartado se comenzará analizando cada una de las formulaciones de manera independiente, ya que los medios de disolución empleados para cada antioxidante son diferentes, según sus requerimientos fisicoquímicos. A continuación, se seleccionará la formulación que confiera mayor estabilidad a la molécula antiparkinsoniana.

4.3.1. Liposomas de levodopa y curcumina

Tras optimizar la formulación liposomal con curcumina, se procedió a elaborar y caracterizar liposomas de levodopa con este antioxidante, con la finalidad de analizar su efecto sobre el fármaco antiparkinsoniano.

Para determinar la influencia del antioxidante sobre el fármaco, se caracterizaron las siguientes formulaciones elaboradas mediante TLE: liposomas de levodopa (1 mg/mL), liposomas de curcumina (2 mg/mL) y liposomas de levodopa (1 mg/mL) y curcumina (2 mg/mL).

En la tabla 17 se observa que la formulación de liposomas de levodopa y curcumina presentó valores de tamaño superiores a los liposomas constituidos por una sola molécula, lo cual se justifica ya que, al aumentar la cantidad de fármaco o al añadir más de una molécula en el compartimento liposomal, se produce un aumento del tamaño de las vesículas (Choudhury y cols., 2016), como era de esperar.

Muestra	Tamaño (nm)	IP	Potencial Z (mV)	EE (%)
Liposomas L-dopa	764,1 ± 25,6	0,25 ± 0,04	4,47 ± 1,28	50 ± 0,25
Liposomas curcumina	686,2 ± 27,4	0,10 ± 0,05	7,95 ± 0,91	95 ± 0,32
Liposomas L-dopa/curcumina	804,2 ± 21,1	0,31 ± 0,06	4,45 ± 0,46	95 ± 0,6 (Curcumina) 25 ± 0,22 (L-dopa)

Tabla 17. Caracterización de formulaciones de liposomas. IP: Índice de polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.

Respecto al IP, también se aprecia un incremento de este parámetro en la formulación constituida por ambos fármacos, indicando que las vesículas lipídicas presentaron mayor dispersión en cuanto a tamaño, exhibiendo la formulación una población heterogénea (Rajan y cols., 2011).

En cuanto al potencial zeta, las formulaciones de liposomas de levodopa y de levodopa/curcumina presentaron valores similares (4 mV). Este resultado es indicativo de que la formulación puede tender a inestabilizarse como consecuencia de la aparición de fenómenos de agregación (Villasmil-Sánchez y cols., 2010).

Asimismo, se observó un descenso importante en la EE de levodopa tras añadir el antioxidante curcumina en la bicapa lipídica de la formulación, lo que puede explicarse en base al método de preparación, ya que la curcumina se ubica en la bicapa lipídica, proporcionando rigidez a la membrana y reduciendo el espacio acuoso para que levodopa sea atrapada (Choudhury y cols., 2016). Otra razón por la que se produce un descenso en la encapsulación de levodopa al incluir curcumina en la formulación podría deberse a la incapacidad de curcumina para captar radicales libres en medio acuoso debido a que este polifenol, en medio acuoso, ejerce su capacidad eliminadora de radicales libres cuando se encuentra en la forma tautomérica enólica (Goel y cols., 2008). En este estudio, los liposomas están elaborados a pH fisiológico y la curcumina a pH neutro se encuentra en la forma tautomérica ceto, actuando como un potente donador de átomos de hidrógeno, por lo que no se favorece la captación de radicales libres (Jovanovic y cols., 1999) ni su acción antioxidante.

4.3.2. Liposomas de levodopa y ácido ascórbico

Una vez optimizado el medio de disolución del ácido ascórbico, se elaboraron y caracterizaron liposomas de levodopa y ácido ascórbico, con el objetivo de estudiar la capacidad antioxidante de esta nueva molécula.

Para determinar la influencia del antioxidante sobre el fármaco, se elaboraron las siguientes formulaciones mediante TLE: liposomas de levodopa (1 mg/mL), liposomas de levodopa (1 mg/mL) y ácido ascórbico (0,2 mg/mL).

Tras dejar las formulaciones en reposo a 4 °C durante toda la noche, se procedió a su caracterización midiendo su tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación. En la tabla 18 se aprecia que la formulación de liposomas constituida por levodopa y ácido ascórbico presentó un tamaño superior a los liposomas constituidos por una sola molécula, debido a que al aumentar la cantidad de fármaco o al añadir más de una molécula en el compartimento acuoso, se produce un aumento del tamaño de las vesículas, como ocurrió con la formulación anterior de curcumina (Choudhury y cols., 2016). Sin embargo, se obtuvieron valores de potencial z superiores, rindiendo, por tanto, una mayor estabilidad de la formulación (Villasmil-Sánchez y cols., 2010) y un aumento en la encapsulación de levodopa. Probablemente, el antioxidante protege al fármaco de la oxidación, atrapando los radicales libres que se producen en su proceso de autooxidación (Butterfield y cols., 2002).

Muestra	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	% EE
Liposomas L-dopa	1200 ± 0,09	0,8 ± 0,20	18,76 ± 0,70	32 ± 0,20
Liposomas L-dopa/AA	2210 ± 0,06	0,13 ± 0,07	22,90 ± 0,04	43 ± 0,01

Tabla 18. Caracterización de las formulaciones de liposomas. IP: Índice de polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación; AA: Ácido ascórbico.

Además, esta formulación presentó un IP inferior respecto a las muestras ausentes del antioxidante, lo que nos llevó a afirmar que presentaba una menor dispersión en cuanto a tamaño, con una población de liposomas más homogénea (Rajan y cols., 2011).

4.3.3. Formulaciones con SOD

Una vez se ha optimizado el medio para que el ácido ascórbico ejerza su máxima acción antioxidante, parece ser que al encapsularlo junto a levodopa en liposomas, continúa ejerciendo su actividad pro-oxidante, y por tanto, manteniendo la estabilidad de la molécula antiparkinsoniana (Fennema, 1976).

Fijada la composición cuantitativa de las muestras de liposomas de levodopa y ácido ascórbico, se procedió a introducir SOD en la formulación. Como se comentó en

materiales y métodos, la SOD es una enzima termolábil que no puede ser sometida a elevadas temperaturas. Por ello, se elaboraron los liposomas de SOD cambiando el fosfolípido PC por DPPC, cuya temperatura de transición de lípidos es 40 °C, en lugar de los 58 °C de la PC (Bach y cols., 1995). Además, debido al elevado tamaño de las vesículas, éstas fueron sometidas a un proceso de extrusión con el fin de mejorar las características de los sistemas.

Una vez elaborados los liposomas de SOD, se procedió a su caracterización (tabla 19).

Lote	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)
TLE	2175 ± 167	0,96 ± 0,05	41 ± 1,2
Extrusión	707 ± 14,50	0,06 ± 0,06	17 ± 1,39

Tabla 19. Caracterización de la formulación de liposomas de SOD. IP: Índice de polidispersión.

Como se pudo observar, los liposomas elaborados por la técnica TLE mostraron un elevado tamaño e IP, pero tras el proceso de extrusión, ambos parámetros se redujeron considerablemente, obteniéndose una muestra más homogénea, así como un tamaño acorde al diámetro de poro utilizado en el extrusor (800 nm). Así mismo, el potencial z de la muestra tras el proceso de la extrusión mostró valores muy inferiores, resultado que concuerda con los estudios realizados por Villasmil-Sánchez y cols. (2010) donde se demuestra que, al extruir los liposomas, la estructura de bicapa inicial se reorganiza, y las cargas pueden orientarse de manera que se favorezca la neutralización con el medio, lo que ocasiona una reducción en el valor de este parámetro. Estos resultados son indicativos de que la extrusión favorece la estabilidad y homogeneidad de la muestra. Por tanto, se plantea la hipótesis de que la técnica de preparación pueda ejercer influencia en la estabilidad de las vesículas y del fármaco. Esta variable, junto a la evaluación de la actividad antioxidante de las mismas serán abordadas en el siguiente apartado de la memoria.

4.4. CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

4.4.1. Actividad antioxidante de curcumina y ácido ascórbico

Como se detalló en el apartado de metodología, se empleó la técnica del ABTS para determinar la concentración media inhibitoria de la actividad antioxidante de las muestras de liposomas de curcumina, liposomas de levodopa y curcumina y liposomas de levodopa y ácido ascórbico. Los resultados de este estudio se recogen en la figura 15, donde se representa el porcentaje de captación de ABTS en función de la concentración de antioxidante. Todas ellas mostraron un aumento de actividad antioxidante a medida que se aumenta la concentración de éstos en la formulación.

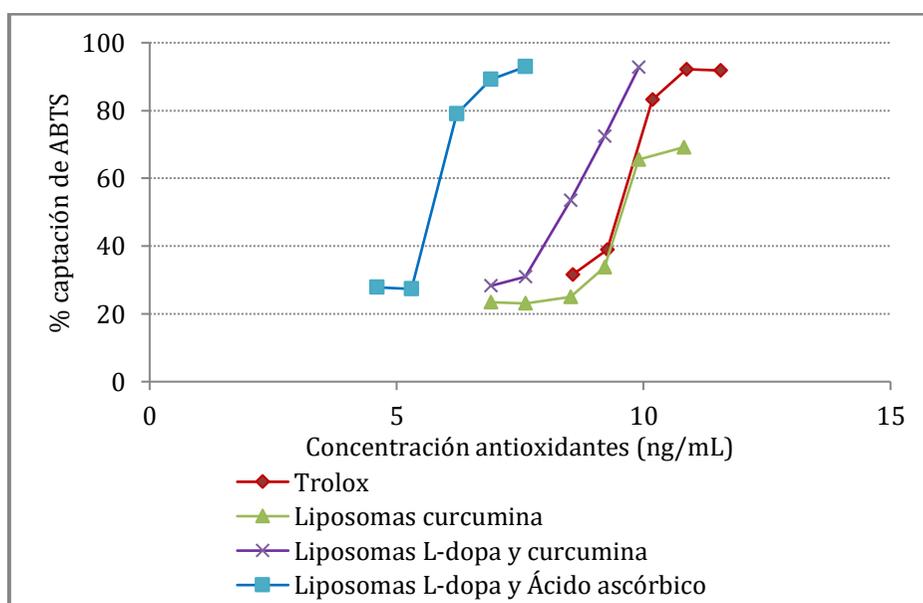


Figura 15. Resultados estudio actividad antioxidante ABTS sobre curcumina y ácido ascórbico.

En concreto, las muestras de curcumina, a una concentración de 9,21 ng/mL arrojaron el 72,3 y el 33,7%, mientras que el trolox utilizado como antioxidante control mostró un 91,8% de captación de ABTS a esta concentración. Además, las muestras de ácido ascórbico mostraron una actividad similar a trolox (92% aprox) pero con una menor concentración de antioxidantes (7,6 ng/mL).

Por otra parte, los valores calculados de EC50 para todas las muestras exhibieron diversos grados de actividad. Mientras las muestras de ácido ascórbico mostraron

EC50 a una concentración inferior a 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, los liposomas de curcumina mostraron actividad antioxidante similar al grupo de ácido ascórbico con EC50 a 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Además, la EC50 más baja 0,23 fue indicativa de que el ácido ascórbico fue más eficaz que Trolox (EC50 1), lo que indica su capacidad para actuar como captador de radicales libres a bajas concentraciones, en comparación con muestras de curcumina que mostraron valores alrededor de 3,4 y 10,8.

Esta diferencia de comportamiento antioxidante de la curcumina respecto al ácido ascórbico se pudo justificar porque este polifenol no es capaz de capturar los radicales libres producidos por la levodopa en medio acuoso. En este medio, el polifenol pierde su capacidad de eliminar radicales libres cuando está en forma tautomérica enólica (Goel y cols., 2008). En cambio, al formularse los liposomas a pH fisiológico, la curcumina a este pH se encuentra en forma ceto tautomérica, actuando como un potente donador de átomos de hidrógeno y evitando la captación de radicales libres, como ya se adelantó en un apartado anterior (Jovanovic y cols., 1999).

4.4.2. Actividad antioxidante de SOD

La actividad de SOD ha sido evaluada mediante un método indirecto por el cual se valora la actividad antioxidante en el sobrenadante obtenido de las vesículas lipídicas elaboradas por TLE y tras su extrusión.

En este estudio se obtuvieron valores similares de actividad en ambas formulaciones, superiores al 35% (tabla 20).

Lote	Actividad SOD (%)
TLE	35,38 \pm 0,01
Extrusión	46,58 \pm 0,01

Tabla 20. Actividad enzimática SOD de liposomas elaborados por TLE y extruidos.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Umasuthan y cols. (2013), cuyos sistemas mostraban una actividad SOD del 40 %, lo cual demuestra que los liposomas elaborados con SOD mantenían una actividad enzimática favorable, pudiéndose utilizar como agentes antioxidantes. Por tanto, el proceso de extrusión, mediante el cual se obtuvieron vesículas unilaminares con un compartimento acuoso importante, se mostró favorable para encapsular este tipo de moléculas activas hidrófilas.

Para obtener una actividad del 100%, la bibliografía recomienda utilizar una temperatura de 20 °C y un pH de 9 (Umasuthan y cols., 2013). Sin embargo, como es de esperar, estas condiciones no son favorables para la elaboración de nuestras formulaciones, ya que para la formación de las vesículas lipídicas se requiere una temperatura de transición entre 40-58 °C y el pH tiene que ser similar al fisiológico para su posterior administración en humanos (González-Rodríguez y cols., 2016).

4.5. ESTUDIOS DE ESTABILIDAD

4.5.1. Estudio de estabilidad de curcumina

Con el fin de analizar la estabilidad de curcumina con el tiempo, se llevó a cabo un seguimiento a las muestras de liposomas de curcumina durante 30 días, teniendo como control una solución estándar. Los resultados obtenidos mostraron una reducción continua en la concentración del fármaco a lo largo del tiempo en todas las muestras (figura 16). El estándar de curcumina se degradó aproximadamente en un 80% en los 30 días que se realiza el estudio, debido a la inestabilidad de la molécula en soluciones neutras o alcalinas (Chen y cols., 2009).

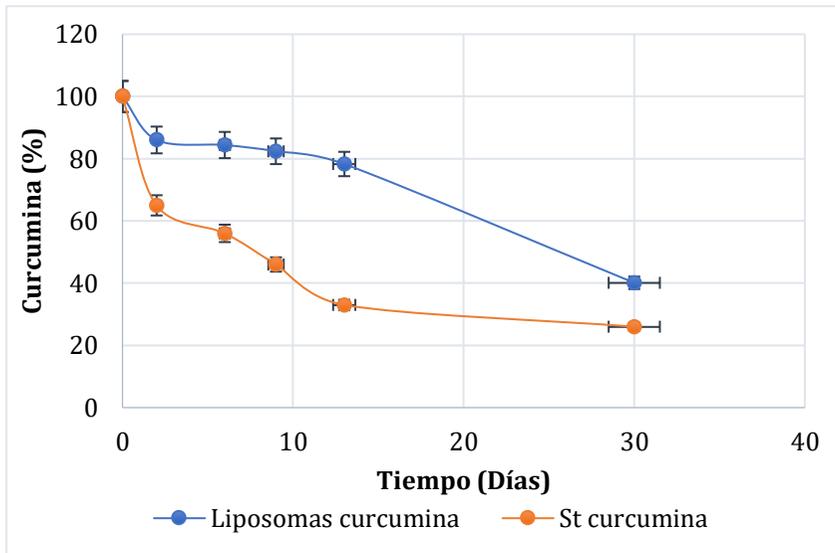


Figura 16. Porcentaje de curcumina recuperada de la solución estándar y de las muestras de liposomas.

Por otra parte, en la tabla 21 se detalla los resultados obtenidos tras la caracterización de la formulación a tiempos predeterminados durante el estudio de estabilidad. Los liposomas de curcumina mostraron pocos cambios en el tamaño de las vesículas y su IP durante los primeros 13 días de almacenamiento en nevera a 4 °C. A partir de este tiempo, los liposomas sufrieron un ligero aumento de tamaño e IP, como consecuencia de la agregación de las vesículas lipídicas a los 30 días. El potencial z también sufrió una disminución a los 13 días, demostrando que los liposomas son inestables con el paso del tiempo y se produce cierta agregación de las vesículas lipídicas (Hincha, 2003).

Tiempo (días)	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	EE (%)
0	362,13 ± 6,25	0,21 ± 0,06	3,43 ± 0,55	100
2	358,3 ± 17,14	0,22 ± 0,08	3,29 ± 0,25	86,02 ± 0,75
6	344,23 ± 7,39	0,32 ± 0,15	3,64 ± 0,53	84,4 ± 0,27
9	388,93 ± 10,87	0,35 ± 0,09	3,97 ± 0,31	82,39 ± 0,81
13	397,43 ± 12,42	1	1,95 ± 0,54	78,3 ± 0,32
30	449,7 ± 4,45	1	1,73 ± 0,48	40,11 ± 0 43

Tabla 21. Caracterización liposomas de curcumina en el tiempo. IP: Índice polidispersión. EE: Eficacia de encapsulación. Los valores se detallan como las medias ±SD.

4.5.2. Estudio de estabilidad de liposomas de levodopa y curcumina

Con el fin de analizar la estabilidad de levodopa durante 30 días tras incluir curcumina en la formulación, se realizó un estudio comparativo de la solución estándar de levodopa y una muestra de liposomas de levodopa y curcumina. Los resultados mostraron, en primer lugar, que la levodopa incluida en liposomas se mantuvo estable en comparación con la levodopa libre (figura 17), lo cual indica que formular levodopa en liposomas favorece la estabilidad del fármaco (Yang y cols., 2007).

Así mismo, comparando la estabilidad de la solución estándar de levodopa y curcumina con la formulación liposomal, se observó que las muestras de levodopa libre se degradaban gradualmente en solución Hepes pH 7,4, mientras que la encapsulada en liposomas se mantuvo estable durante 6 días para después comenzar a descender su concentración. Esto puede achacarse a que la curcumina, como se ha descrito en el apartado anterior, también se va degradando con el paso de los días, ya que no es estable en soluciones neutras o alcalinas, lo cual conlleva a una pérdida de su capacidad antioxidante sobre levodopa (Chen y cols., 2009).

Este estudio de estabilidad demostró, por tanto, que la formulación vesicular de levodopa y curcumina no era estable en el tiempo, sufriendo levodopa una degradación casi en su totalidad con el paso de los días, aún en presencia del antioxidante. Como ya se ha detallado anteriormente, curcumina no es capaz de ejercer su actividad antioxidante sobre levodopa en las condiciones en las que han sido elaborados los liposomas, pudiendo ser esta la causa de la degradación del antiparkinsoniano (Goel y cols., 2008).

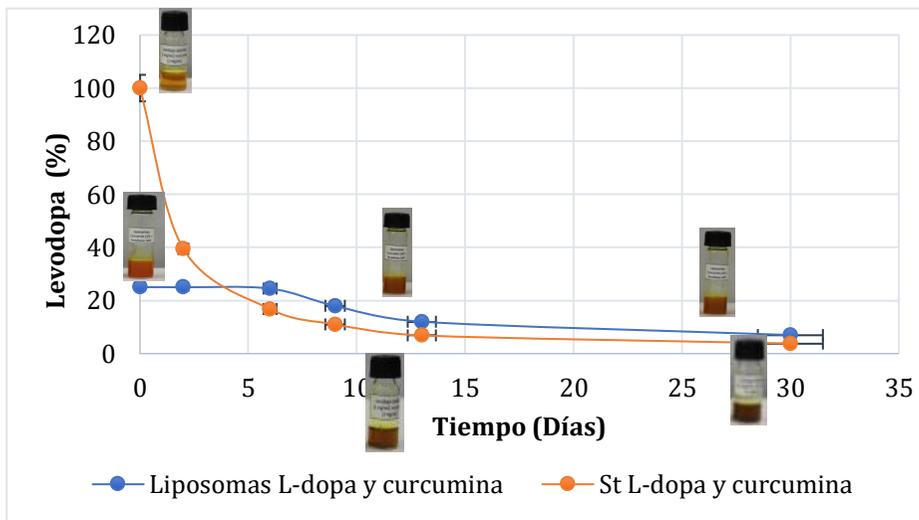


Figura 17. Representación del estudio de estabilidad del estándar de levodopa y curcumina frente a liposomas de levodopa y curcumina.

4.5.3. Estudio de estabilidad de liposomas de levodopa y ácido ascórbico

Con el fin de estudiar la estabilidad de levodopa tras incluir ácido ascórbico en la formulación, se llevó a cabo un análisis comparativo de una solución estándar de levodopa y ácido ascórbico con una muestra de liposomas de levodopa y ácido ascórbico durante 30 días.

En la figura 18 se observa que levodopa incluida en liposomas junto al antioxidante se mostraba más estable que levodopa libre con el antioxidante, lo que nos llevó a corroborar que los liposomas favorecían la estabilidad de levodopa (Yang y cols., 2007).

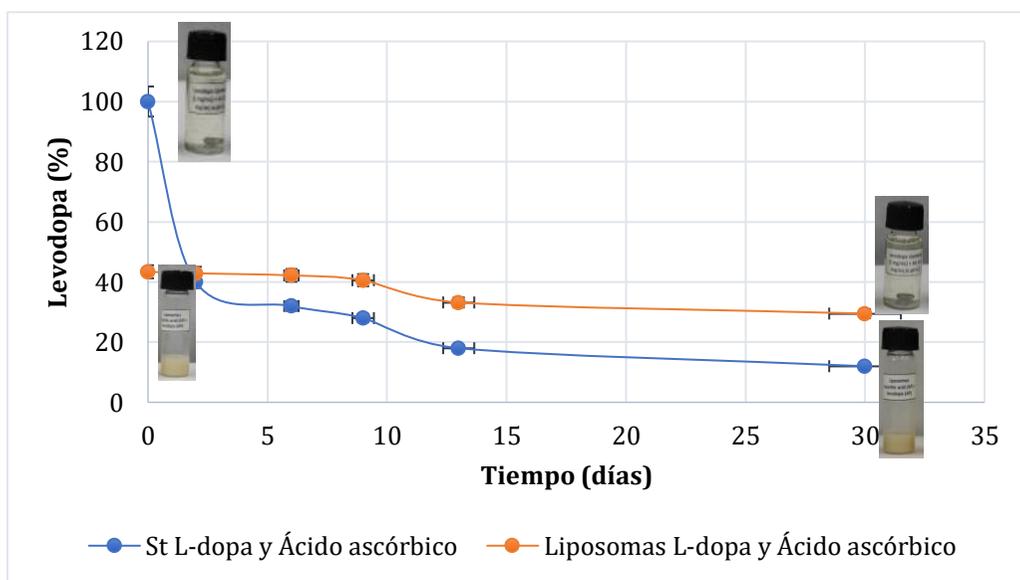


Figura 18. Representación del estudio de estabilidad del estándar de levodopa y ácido ascórbico frente a liposomas de levodopa y ácido ascórbico.

Haciendo un análisis comparativo de la estabilidad de la solución estándar frente a la formulación liposomal, se observó una degradación gradual del fármaco con el paso de los días en las soluciones estándar. Sin embargo, tras formular el fármaco en liposomas y añadir el antioxidante, este permaneció estable durante 9 días y a los 12 días comienza a decrecer su concentración como fármaco. La justificación a este resultado radica en que el ácido ascórbico va reduciendo también su capacidad antioxidante con el paso de los días. Como ya se ha comentado anteriormente, la actividad antioxidante del ácido ascórbico deriva del desplazamiento del ácido L-ascórbico a su forma oxidada L-dehidroascórbico, combatiendo con los radicales libres producidos por levodopa. Con el paso de los días, el equilibrio existente entre el ácido L-ascórbico y ácido L-dehidroascórbico se encuentra desplazado hacia la derecha, convirtiéndose todo el ácido L-ascórbico en ácido L-dehidroascórbico, que es su forma oxidada, perdiendo su capacidad captadora de radicales libres (Fennema, 1976).

Como se muestra en la tabla 22, los liposomas de levodopa y ácido ascórbico mostraron escasas variaciones en el tamaño de las vesículas y su índice de

polidispersión durante 9 días de almacenamiento. A partir de los 13 días, los liposomas sufren un aumento del tamaño y del índice de polidispersión, debido a la agregación entre las vesículas. El potencial z también sufrió una disminución en sus valores a los 30 días, lo cual demuestra la inestabilidad de los liposomas con el paso del tiempo y como consecuencia de la agregación de las vesículas lipídicas (Hincha, 2003).

Tiempo (días)	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	EE (%)
0	2210 ± 0,05	0,13 ± 0,07	22,9 ± 0,07	43,4 ± 0,01
2	2250 ± 0,04	0,12 ± 0,07	23,11 ± 0,03	42,9 ± 0,02
6	2252 ± 0,06	0,14 ± 0,10	21,5 ± 0,01	42,2 ± 0,01
9	2260 ± 0,2	0,17 ± 0,09	19,89 ± 0,01	40,6 ± 0,09
13	2682 ± 0,5	0,20 ± 0,10	18,15 ± 0,05	33,2 ± 0,2
30	2701 ± 0,9	0,32 ± 0,96	13,69 ± 0,2	29,5 ± 0,86

Tabla 22. Representación del tamaño, IP, potencial z y PDE de liposomas de levodopa y ácido ascórbico en el tiempo. IP: Índice polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.

4.5.4. Estudio de estabilidad de liposomas de levodopa, ácido ascórbico y superóxido dismutasa

Finalmente, con el fin de analizar la estabilidad de levodopa junto a los antioxidantes ácido ascórbico y SOD, se realizó un estudio de estabilidad comparando muestras de liposomas de levodopa y ácido ascórbico, muestras de liposomas de levodopa y ácido ascórbico junto a liposomas de SOD y muestras de liposomas de levodopa, ácido ascórbico y SOD, a lo largo de 30 días de estudio.

En la figura 19 se observa un porcentaje similar de levodopa en las 3 formulaciones de liposomas, manteniéndose constante durante los 9 primeros días y empezando a decrecer a partir del día 12. Además, no se apreciaron grandes diferencias entre la formulación que contiene los antioxidantes ácido ascórbico y SOD frente a la que contiene ácido ascórbico solo.

Con el transcurso del tiempo, el porcentaje de encapsulación de levodopa, en las diferentes formulaciones, empieza a decrecer, no pudiéndose mantener estable en ningún sistema de liposomas combinados. Este fenómeno podría ser achacable a los procesos de degradación, hidrólisis y oxidación que tienen lugar en los componentes de las vesículas lipídicas (PC y CH), como ocurre en todas las formulaciones de liposomas, pudiendo modificarse las propiedades de las vesículas. La hidrólisis química de los ésteres de glicerofosfolípidos produce ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Estos productos formados provocan un incremento en la permeabilidad de la bicapa lipídica, lo que induce a la liberación del fármaco encapsulado en su interior (Kumar y cols., 2011).

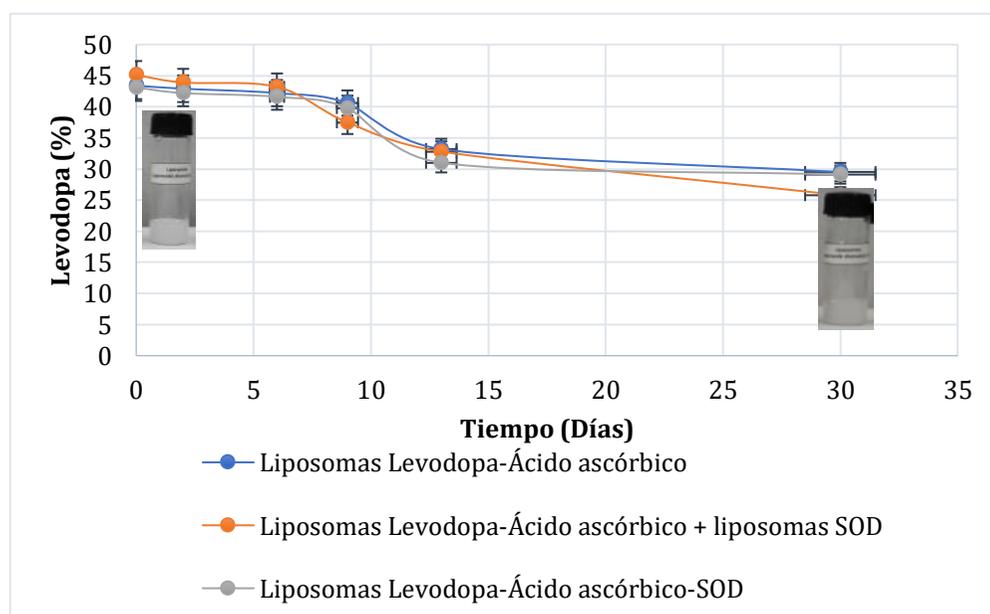


Figura 19. Representación del estudio de estabilidad de formulaciones de levodopa con los antioxidantes ácido ascórbico y superóxido dismutasa (SOD).

Por otro lado, se realizó simultáneamente la medición de la actividad enzimática SOD en cada una de las formulaciones con la finalidad de conocer si durante el transcurso del tiempo de estudio, la actividad enzimática se veía o no afectada.

Según los datos reflejados en la tabla 23, en la mezcla de los liposomas de levodopa-AA + liposomas SOD, se obtuvo una actividad enzimática del 46,43%, una actividad

alta teniendo en cuenta que la SOD se encuentra encapsulada en liposomas. Por esta razón, se puede apreciar que su actividad se prolongó hasta el día 6. En cambio, en la formulación de liposomas de levodopa-AA-SOD, la enzima SOD no presentó actividad en ningún momento, lo que nos ayudó a constatar que la SOD, al ser sometida a procesos similares que levodopa (58 °C y pH 6,2) en la síntesis de los liposomas, podría desnaturalizarse por la elevada temperatura utilizada, evitando poder ejercer la función de antioxidante.

Muestra	Tiempo (días)					
	0	2	6	9	13	30
Liposomas SOD	46,43	38,5	8,51	0	0	0
Liposomas levodopa-AA-SOD	0	0	0	0	0	0

Tabla 23. Estabilidad de la actividad enzimática SOD en las diferentes formulaciones de liposomas.

Además, en la formulación de liposomas SOD se evidenció que la actividad enzimática SOD fue disminuyendo, debido a que el pH en el que se encuentra disuelta la enzima afecta la estabilidad de la misma, provocando una posible desnaturalización. Por otra parte, la presencia de los iones que componen el buffer Hepes probablemente afecte también a las interacciones electrostáticas, factor importante a considerar en la prevención de la desnaturalización, como afirman Jiménez y cols. (2014).

Con los resultados obtenidos en el estudio de estabilidad de las vesículas lipídicas, se comprobó que tanto la concentración de levodopa como la actividad enzimática SOD se vieron afectadas significativamente en el transcurso del tiempo, debido principalmente al estado líquido en que se encuentran las muestras. Por tanto, no se apreciaron resultados favorables tras añadir SOD a la formulación de liposomas de levodopa y ácido ascórbico.

Se deduce entonces, que la formulación más estable fue la conformada por levodopa y ácido ascórbico.

4.6. OPTIMIZACION DE LA FORMULACION DE LEVODOPA Y ÁCIDO ASCÓRBICO

Tras analizar todos los resultados obtenidos en las formulaciones de levodopa con los diferentes compuestos antioxidantes, se deduce que el ácido ascórbico fue el antioxidante que más favoreció la estabilidad de levodopa en medio acuoso.

A continuación, con el fin de obtener una formulación estable de liposomas de levodopa y ácido ascórbico, se procedió a elaborar las vesículas lipídicas por distintos métodos de elaboración y añadiendo diferentes concentraciones de agentes de carga, como estearilamina y dicetilfosfato, con el fin de evaluar la estabilidad final de la formulación.

Los liposomas se han formulado adicionando agentes de carga, para proporcionar una mayor estabilidad a las formulaciones (Manosroi y cols., 2002; Manosroi y cols., 2004) teniendo en cuenta los bajos valores de potencial z hasta ahora obtenidos, por lo que se elaboraron liposomas de levodopa y ácido ascórbico con carga positiva y negativa.

Los lotes así obtenidos fueron evaluados nuevamente en cuanto a eficacia de encapsulación, tamaño de las vesículas, índice de polidispersión y potencial z, cuyos resultados se registran en la tabla 24. Como puede apreciarse, todos estos datos varían en función del método de elaboración así como del agente inductor de carga. A continuación se analizará de manera global la influencia de la técnica y del agente de carga con el fin de obtener la formulación más estable.

Método	EA (mg)	DCP (mg)	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	EE (%)
TLE	0,83	-	2015 ± 0,1	0,88 ± 0,20	8,76 ± 0,66	35,6 ± 0,3
TLE	1,66	-	2210 ± 0,1	0,13 ± 0,07	22,90 ± 0,04	43,0 ± 0,1
TLE	3,33	-	2432 ± 0,1	0,23 ± 0,18	29,50 ± 0,07	26,3 ± 0,2
TLE	-	0,83	1721 ± 0,1	0,29 ± 0,07	-14,50 ± 0,51	33,8 ± 0,3
TLE	-	1,66	1090 ± 0,1	0,94 ± 0,10	-23,2 ± 0,52	27,0 ± 0,1
TLE	-	3,33	1303 ± 0,0	0,88 ± 0,20	-27,56 ± 2,05	24,5 ± 0,1
FAT	0,83	-	969 ± 0,1	0,79 ± 0,50	9,39 ± 1,52	34,3 ± 0,1
FAT	1,66	-	949,8 ± 0,1	0,53 ± 0,07	15,23 ± 0,04	40,0 ± 0,1
FAT	3,33	-	708 ± 0,1	1 ± 0,91	27,06 ± 2,20	29,8 ± 0,1
FAT	-	0,83	832,2 ± 0,1	0,69 ± 0,30	-15,52 ± 0,81	32,8 ± 0,4
FAT	-	1,66	709,7 ± 0,0	1 ± 0,75	-23,20 ± 0,50	17,7 ± 0,2
FAT	-	0,33	747,6 ± 0,0	0,15 ± 0,05	-24,50 ± 1,80	17,4 ± 0,1
REV	-	-	260 ± 0,1	0,19 ± 0,02	-4,38 ± 0,03	30 ± 0,0
SON	0,83	-	354 ± 0,1	0,11 ± 0,03	17,23 ± 0,09	11,1 ± 0,1
SON	1,66	-	328 ± 0,1	0,12 ± 0,02	23,11 ± 0,08	13,1 ± 0,1
SON	3,33	-	342 ± 0,0	0,10 ± 0,02	21,00 ± 0,01	16,1 ± 0,1
SON	-	0,83	302 ± 0,0	0,16 ± 0,03	-12,38 ± 0,6	8,7 ± 0,1
SON	-	1,66	315 ± 0,0	0,12 ± 0,01	-15,18 ± 0,07	7,6 ± 0,2
SON	-	3,33	335 ± 0,0	0,21 ± 0,03	-21,08 ± 0,91	6,5 ± 0,2

Tabla 24. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas elaboradas por distintas técnicas y diferente concentración de los agentes de carga. IP: Índice polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.

El primer parámetro evaluado fue la capacidad de los liposomas para encapsular el fármaco, en función del agente de carga y de la técnica de elaboración.

De forma global, se observó que los liposomas cargados positivamente presentaron un mayor porcentaje de encapsulación, siendo más favorable para aquellos

elaborados con el método TLE y FAT (43-40%) y con la cantidad intermedia del agente de carga EA (tabla 24). Este aumento de la eficacia de encapsulación ocurre porque este lípido puede afectar a las características específicas de las vesículas, como la permeabilidad de la membrana o la densidad de la carga eléctrica (Villasmil-Sánchez y cols., 2010). Como defienden algunos autores, ello puede deberse a que el aumento de las cargas positivas del lípido ocasiona una inclinación de la bicapa por interacción electrostática y un cambio en su empaquetamiento (Pavelic y cols., 2005).

Por el contrario, la menor eficacia de encapsulación ha sido observada en los liposomas con carga negativa. Esto ocurre porque, aunque la retención de levodopa depende directamente de su ionización, bien es cierto que también existe una afinidad entre la molécula y la bicapa fosfolipídica, produciéndose interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals, con las colas de los lípidos contribuyendo a su encapsulación; ya en otros estudios se ha señalado la posibilidad de coexistencia de ambos tipos de interacciones (Lawy y cols., 2001).

En lo que respecta al método de elaboración de las vesículas, TLE y FAT fueron los que presentaron mejores eficacias de atrapamiento, así como un mayor tamaño vesicular. El incremento del tamaño de las vesículas, como se ha referido con anterioridad, está relacionado con la mayor capacidad de encapsulación que presentan estas formulaciones (Maestrelli y cols., 2006).

En cambio, los liposomas elaborados mediante la técnica REV presentaron un porcentaje de encapsulación razonable, aunque menor que FAT y TLE. Su estructura unilaminar posee un único espacio acuoso, que favorece la encapsulación de sustancias especialmente hidrosolubles (Taylor y cols., 1990) como es levodopa.

Los liposomas elaborados por sonicación conforman vesículas SUV que, debido a su pequeño compartimento acuoso, son capaces de encapsular menor cantidad de fármaco. Es por ello que los liposomas tratados con esta técnica han mostrado los valores más bajos de encapsulación de levodopa, así como un pequeño tamaño vesicular (Maestrelli y cols., 2006).

Tras el análisis de estos resultados, se demostró que las técnicas más favorables para obtener la mayor eficacia de encapsulación de levodopa fueron TLE y FAT, añadiendo como agente de carga 1,66 mg de EA.

Una vez seleccionadas las técnicas de elaboración de liposomas y el agente de carga, se decidió aumentar la concentración de levodopa hasta 2 mg/mL con el fin de analizar la capacidad de los liposomas para albergar mayores cantidades del fármaco, ello aplicando las técnicas TLE y FAT. Como se observa en la tabla 25, se obtuvo un incremento en la eficacia de encapsulación de levodopa en las formulaciones elaboradas por TLE, mientras que las vesículas formuladas por FAT disminuyeron su eficacia de encapsulación al aumentar la cantidad de fármaco. Autores como Kumar y cols. (2011) demostraron la capacidad de las vesículas multilaminares obtenidas mediante la técnica TLE para albergar fármacos hidrófilos con un radical apolar en su estructura química. El resto de los parámetros estudiados mantienen sus valores a pesar del aumento de la concentración de fármaco. Por el contrario, la formulación elaborada por FAT, al aumentar la concentración del fármaco muestra un aumento de tamaño así como de heterogeneidad de población.

Técnica	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	% EE
TLE	2248 ± 0,02	0,17 ± 0,03	22,4 ± 0,08	48,32 ± 0,02
FAT	1265 ± 0,05	0,30 ± 0,04	15,4 ± 0,05	30,59 ± 0,12

Tabla 25. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas elaboradas mediante TLE y FAT. IP: Índice polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.

Tras elaborar los liposomas de levodopa y ácido ascórbico mediante TLE, se obtuvieron unas vesículas de gran tamaño, como se recoge en las Tablas 24 y 25. Con el fin de obtener vesículas de menor tamaño y una dispersión homogénea, se procedió finalmente a extruir las muestras.

Por otro lado, también es importante controlar el IP de la muestra con el fin de reproducir el comportamiento en el organismo. Valores superiores a 0,2 indican que la muestra es heterogénea, presentando tamaños muy diferentes. Por el contrario, si la muestra presenta valores inferiores a 0,2, ello es indicativo de que la muestra es homogénea y la distribución de tamaños de las vesículas es monodispersa, por lo que su comportamiento es más reproducible. Controlar este parámetro es importante porque si en una muestra los tamaños son heterogéneos, al ingresar en el organismo, su eliminación es irregular, de manera que se eliminan más rápidamente los más pequeños; y a la inversa, muestras homogéneas dan lugar a procesos de eliminación monofásicos (Clares, 2003).

Con el fin de reducir el tamaño vesicular y estudiar su influencia sobre la eficacia de encapsulación del fármaco, se extruyeron los liposomas de levodopa y ácido ascórbico elaborados por TLE. Los resultados de la caracterización llevada a cabo se recogen en la tabla 26. Tras el proceso de extrusión, las muestras presentaron una disminución del tamaño de las vesículas, como cabría esperar. Se sugirió que el mecanismo de reducción de tamaños incluye la ruptura de vesículas y la reorganización espontánea tras el paso a través de la membrana, dando como resultado la formación de liposomas unilaminares (Berger y cols., 2001). En lo que respecta al tamaño, el diámetro de liposomas extruidos exhibió un valor promedio de 647 nm, acorde con el tamaño de poro del filtro utilizado (800 nm). Dicho tamaño, al ser manipulable, podría ser adaptado para poder atravesar membranas biológicas (Ruano, 2013).

En cuando al IP, existe una disminución en su valor después de la extrusión, demostrando que la muestra de los liposomas extruidos está menos dispersa en relación al tamaño, significando ello la presencia de una población de liposomas de tamaño más homogéneo.

Así mismo, los valores de potencial z superiores obtenidos en las muestras extruidas predicen una mayor estabilidad de la dispersión coloidal de las vesículas frente a las no extruidas (Ruano, 2013).

Tras el proceso de extrusión, el tamaño de las vesículas lipídicas disminuye, mientras que la eficacia de encapsulación de levodopa aumenta. La explicación a estos resultados proviene del propio mecanismo de acción del equipo de extrusión sobre las vesículas, ya que la reorganización estructural de las vesículas durante el paso a través de los filtros, provoca un mayor atrapamiento del fármaco (Schneider y cols., 1996; González-Rodríguez y cols., 2012). Este resultado es favorable y se establecería como el adecuado para la elaboración de liposomas con levodopa.

Extrusión	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	% EE
No	2248 ± 0,02	0,17 ± 0,03	22,4 ± 0,08	48,32 ± 0,02
Sí	647 ± 0,05	0,13 ± 0,07	23,23 ± 0,07	62,4 ± 0,01

Tabla 26. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas extruidas y sin extruir. IP: Índice polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.

CONCLUSIONES

Primera. El problema de falta de solubilidad de la curcumina en medio acuoso es solventado mediante la adición de una mezcla de disolventes compuesta por PEG400:PG:etanol:Tween® 80 en proporción 100:100:25:5 (v/v/v/v) en tampón Hepes pH 7,4. La encapsulación de curcumina favorece su estabilidad debido a la protección que proporcionan estos sistemas vesiculares lipídicos.

Segunda. El método analítico desarrollado para cuantificar la curcumina fue selectivo, lineal, preciso, exacto y robusto, identificando como parámetros críticos el pH, porcentaje de ACN, temperatura y velocidad de flujo.

Tercera. Los estudios de degradación de la levodopa demuestran que el fármaco se oxida en medio acuoso, por lo que es necesaria la adición de un antioxidante en la formulación. La adición de curcumina no detiene el proceso de oxidación de levodopa. El estudio de estabilidad de liposomas de levodopa y curcumina demuestra un descenso en la estabilidad de ambos fármacos con el paso del tiempo.

Cuarta. La levodopa se consigue estabilizar en una solución de Hepes a pH 6,2 y agregando 0,2 mg/mL de ácido ascórbico a la misma. El método de elaboración que mostró los mejores resultados de encapsulación de este fármaco fue TLE y su posterior extrusión, obteniéndose una población de vesículas más homogénea y con un tamaño nanométrico adecuado para su posterior administración intranasal. En lo que respecta al potencial z de los liposomas, los valores positivos obtenidos no se vieron afectados por el proceso de extrusión, demostrando que son sistemas estables. El estudio de estabilidad de los liposomas de levodopa y ácido ascórbico demostró una disminución en la eficacia de encapsulación con el tiempo debido a que ácido ascórbico va perdiendo capacidad antioxidante.

Quinta. El desarrollo de una formulación con ácido ascórbico, SOD y levodopa no genera resultados esperanzadores ya que la SOD no es capaz de mantener su actividad tras verse sometida a las condiciones necesarias para la síntesis de los liposomas.

Sexta. Se consigue estabilizar la molécula de levodopa mediante la adición del antioxidante ácido ascórbico y posterior inclusión en liposomas elaborados

mediante la técnica TLE y posterior extrusión. La formulación final está constituida por 2 mg/mL de levodopa, 0,2 mg/mL de ácido ascórbico y añadiendo el agente de carga estearilamina (1,66 mg). Ha sido elaborada mediante la técnica TLE, obteniendo tras su extrusión un 62% de levodopa encapsulada.

CAPÍTULO II

FORMULACIÓN DE LIPOSOMAS DE LEVODOPA Y ÁCIDO ASCÓRBICO EN CICLODEXTRINAS PARA ADMINISTRACIÓN INTRANASAL

ÍNDICE CAPÍTULO II

3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	257
3.1. DESARROLLO DE LAS FORMULACIONES DE CICLODEXTRINAS INCLUIDAS EN LIPOSOMAS.....	259
3.1.1. Estudios de solubilidad de fase	259
3.1.2. Preparación de formulaciones de ciclodextrinas-en-liposomas de levodopa y ácido ascórbico	260
3.1.2.1. Estudio de interacción de la β -CD con el colesterol.....	260
3.1.2.2. Mdificación de la carga superficial y tipo de CD.....	261
3.1.2.3. Modificación de la técnica de preparación.....	262
3.1.3. Caracterización de las formulaciones.....	263
3.2. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS MOLÉCULAS	263
3.3. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA FORMULACIÓN EN CULTIVOS CELULARES	264
3.3.1. Condiciones de los cultivos celulares.....	264
3.3.2. Estudio de citotoxicidad celular.....	264
3.4. FORMULACIÓN DE INSERTOS NASALES LIOFILIZADOS	266
3.4.1. Formulación de los hidrogeles	266
3.4.1.1. pH.....	267
3.4.1.2. Viscosidad.....	267
3.4.1.3. Estudio de la carga superficial.....	268
3.4.2. Elaboración de los insertos	268
3.4.2.1. Estudio morfológico.....	270
3.4.2.2. Estudio de hinchamiento.....	270
3.4.2.3. Uniformidad de contenido.....	271

3.4.2.4. Mucoadhesión.....	272
3.4.2.5. Estudio de liberación in vitro.....	273
3.4.2.6. Estudio de permeación ex vivo.....	274
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	277
4.1. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE CICLODEXTRINAS INCLUIDAS EN LIPOSOMAS.....	279
4.1.1. Selección del tipo de CD y composición del complejo.....	279
4.1.2. Estudio de la interacción entre β -CD y colesterol.....	284
4.2. INFLUENCIA DE LA CARGA SUPERFICIAL, TÉCNICA DE PREPARACIÓN Y TIPO DE CD EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS VESÍCULAS LIPÍDICAS.....	286
4.2.1. Influencia del proceso de extrusión.....	289
4.3. APLICACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN CULTIVOS CELULARES.....	291
4.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS INSERTOS NASALES LIOFILIZADOS.....	299
4.4.1. Caracterización físico-química de los geles.....	299
4.4.2. Caracterización de los insertos.....	303
4.4.2.1. Caracterización morfológica.....	304
4.4.2.2. Hinchamiento.....	309
4.4.2.3. Uniformidad de contenido.....	315
4.4.2.4. Mucoadhesión.....	316
4.4.2.5. Estudios de liberación in vitro.....	318
4.5.2.6. Estudios de permeación ex vivo.....	320
5. CONCLUSIONES.....	323

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mucosa nasal de cerdo.....	272
Figura 2. Dispositivo de medición de la fuerza mucoadhesiva. (A) Balanza modificada; (B) Pesos; (C) Vial de vidrio; (D) Inserto intranasal liofilizado; (E) Mucosa nasal de cerdo; (F) Bandeja ajustable en altura.....	272
Figura 3. Representación del diagrama de solubilidad de fase de la L-dopa-AA/ β -CD y la L-dopa/ β -CD.....	279
Figura 4. Representación del diagrama de solubilidad de fase de L-dopa-AA/HP- β -CD y la L-dopa/HP- β -CD.....	281
Figura 5. Representación de las formulaciones de levodopa/ β -CD y levodopa-AA/ β -CD.....	283
Figura 6. Representación de las formulaciones de levodopa/HP- β -CD y levodopa-AA/HP- β -CD.....	284
Figura 7. Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares. A) Solución control de levodopa; B) Solución control de levodopa y ácido ascórbico; C) Solución control de levodopa-ácido ascórbico y β -CD; D) Liposomas blancos; E) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico; F) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico/ β -CD.....	292
Figura 8. Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares a las 12 horas de tratamiento. G) Solución DCP; H) Liposomas blancos sin DCP; I) Liposomas blancos con DCP; J) Liposomas blancos sin DCP con β -CD; K) Liposomas blancos con DCP y β -CD.....	294
Figura 9. Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares a las 24 horas de tratamiento. G) Solución DCP; H) Liposomas blancos sin DCP; I) Liposomas blancos con DCP; J) Liposomas blancos sin DCP con β -CD; K) Liposomas blancos con DCP y β -CD.....	295
Figura 10. Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares a las 12 horas de tratamiento. A) Solución control de levodopa; B) Solución control de levodopa y ácido ascórbico; C) Solución control de levodopa-ácido ascórbico y HP- β -CD; D)	

Liposomas blancos; E) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico; F) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico/HP-β-CD.....	296
Figura 11. Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares a las 24 horas de tratamiento. A) Solución control de levodopa; B) Solución control de levodopa y ácido ascórbico; C) Solución control de levodopa-ácido ascórbico y HP-β-CD; D) Liposomas blancos; E) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico; F) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico/HP-β-CD.....	297
Figura 12. Estructura de quitosano.....	301
Figura 13. Ilustración esquemática de la formación de micelas y agregados multimoleculares de Pluronic F127.....	302
Figura 14. Imágenes SEM de los insertos intranasales liofilizados. A: Quitosano/Pluronic (90:10) + HMPC; B: Quitosano/Pluronic (10:90) + HMPC.....	305
Figura 15. Imágenes SEM de los insertos intranasales liofilizados cargados de liposomas de levodopa-AA/HP-β-CD. A: Quitosano/Pluronic (90:10) + HMPC; B: Quitosano/Pluronic (10:90) + HMPC.....	307
Figura 16. Imágenes SEM de los insertos intranasales liofilizados. A y B: Quitosano/Pluronic (90:10) + Goma xantana.....	319
Figura 17. Representación del porcentaje de captación de agua de cada una de las formulaciones de insertos elaboradas.....	310
Figura 18. Imágenes del estudio de hinchamiento de los insertos a tiempo 30 minutos (izquierda) y 24 horas (derecha). A. Insertos Quitosano/Pluronic 10:90 + HPMC; B. Insertos Quitosano/Pluronic 90:10 + HPMC; C. Insertos Quitosano/Pluronic 90:10 + Goma xantana; D. Insertos Quitosano/Pluronic 10:90 + Goma xantana.....	314
Figura 19. Uniformidad de contenido de los insertos de levodopa.....	316
Figura 20. Estudio de mucoadhesión de los insertos intranasales de levodopa y ácido ascórbico.....	317

Figura 21. Perfiles de liberación in vitro de insertos constituidos por levodopa-AA/HP- β -CD y solución control.....	319
Figura 22. Estudio de permeación ex vivo en membrana de cerdo. A. Permeación de fármaco a tiempo 0; B: Permeación de fármaco a las 24 horas.....	320
Figura 23. Perfiles de permeación ex vivo de insertos constituidos por levodopa-AA/HP- β -CD y solución control.....	321

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Composición de la fase oleosa de los liposomas elaborados por TLE y método transmembrana, así como la denominación de los diferentes lotes.	261
Tabla 2. Condiciones de gradiente para elución de levodopa.....	264
Tabla 3. Formulaciones empleadas en el estudio de cultivos celular.....	265
Tabla 4. Composición de los insertos intranasales.....	269
Tabla 5. Composición de las distintas formulaciones que componen los insertos. C _x :P _y : Porcentaje de quitosano (C _x), Porcentaje de Pluronic® F127 (P _y), H: HPMC y X: Goma xantana.....	269
Tabla 6. Datos obtenidos del diagrama de solubilidad de L-dopa con y sin antioxidante y con las diferentes ciclodextrinas. α : pendiente; K _s : Constante estabilidad; R ² : Coeficiente de determinación.....	282
Tabla 7. Caracterización de diferentes formulaciones liposomales incluidas en β -CD. IP: Índice de polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación. Lote CD/D, constituido sólo por el fosfolípido DPPC; Lote CD/DC, constituido por DPPC y colesterol; Lote CD/DCH, constituido por DPPC y colesterol-hemisuccinato. En todos los lotes estaba presente la β -CD (CD).....	285
Tabla 8. Valores obtenidos de porcentaje de permeación de levodopa, coeficiente de permeabilidad (P) y flujo (J) para cada formulación ensayada.....	287

Tabla 9. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas elaboradas por distintas técnicas y diferente concentración de los agentes de carga incluidos en HP- β -CD.....	289
Tabla 10. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas tras el proceso de extrusión.....	290
Tabla 11. Representación del pH, viscosidad y carga superficial de las diferentes combinaciones de geles elaboradas.....	300
Tabla 12. Valores obtenidos de porcentaje de permeación de levodopa, coeficiente de permeabilidad (P) y flujo (J) para cada formulación ensayada.....	321

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y equipos empleados en este capítulo se recogen en el Anexo II.

3.1. DESARROLLO DE LAS FORMULACIONES DE CICLODEXTRINAS INCLUIDAS EN LIPOSOMAS

Una vez obtenida la formulación de liposomas de levodopa incluyendo el antioxidante ácido ascórbico en su composición, y con la finalidad de mejorar la estabilidad del fármaco antiparkinsoniano en medio acuoso, se decidió incluir levodopa junto al antioxidante en ciclodextrinas. Estos complejos de inclusión poseen la capacidad de mejorar los problemas de solubilidad y/o estabilidad que presentan determinados fármacos. Por esta razón, este capítulo se centrará en diseñar y analizar el efecto de estos complejos de inclusión levodopa-ácido ascórbico-ciclodextrina (L-dopa-AA/CD) sobre las características fisicoquímicas de los liposomas elaborados. Posteriormente, la formulación seleccionada se incluirá en insertos intranasales liofilizados para su administración por vía intranasal, de forma que los fármacos puedan acceder desde la cavidad nasal hasta el sistema nervioso central (SNC).

3.1.1. Estudios de solubilidad de fase

Los estudios de solubilidad de fase han seguido el método descrito por Higuchi y Connors (1965). En base a él, se añadió una cantidad en exceso de fármaco (75 mg) a 5 mL de una solución acuosa de las ciclodextrinas seleccionadas para el estudio (β -CD y HP- β -CD) a distintas concentraciones (0-15 mM). Las mezclas se mantuvieron en agitación en recipientes sellados durante 48 horas a temperatura constante ($37 \pm 0,5$ °C) para conseguir el equilibrio de complejación.

Transcurrido el tiempo correspondiente, se extrajeron alícuotas (2 mL) para determinar la concentración de levodopa mediante HPLC, según el método cromatográfico explicado en el apartado 3.2. del presente capítulo. Este estudio se realizó por duplicado y las muestras fueron filtradas previamente.

Posteriormente se calculó la constante de estabilidad (K_s) de cada complejo formado, siguiendo la siguiente ecuación:

$$K_s = \frac{\text{pendiente}}{S_o (1 - \text{pendiente})}$$

Donde S_o es la solubilidad intrínseca de L-dopa, y K_s es la constante de estabilidad.

3.1.2. Preparación de formulaciones de ciclodextrinas-en-liposomas de levodopa y ácido ascórbico

3.1.2.1. Estudio de interacción de la β -CD con el colesterol

Este estudio se llevó a cabo empleando la metodología de evaporación en capa fina para elaborar los liposomas, la cual ha sido previamente explicada en el apartado 3.1.1.2. del capítulo 1.

Está basado en dilucidar el efecto de la CD sobre la composición de los liposomas, en concreto sobre el colesterol incluido en los mismos, con el fin de estudiar la interacción existente entre la β -CD y el esteroide, ya que según referencias bibliográficas, es posible la existencia de un desplazamiento del fármaco incluido en el hueco de la CD, por el colesterol. Para ello, se prepararon tres formulaciones de liposomas: A) Lote *CD/D*, constituido sólo por el fosfolípido DPPC (2,75 mM), B) Lote *CD/DC*, constituido por DPPC (1,7 mM) y colesterol (1,05 mM), y C) Lote *CD/DCH*, constituido por DPPC (1,7 mM) y colesterol-hemisuccinato, CHEMS (1,05 mM). Una vez pesados los componentes, se procedió a disolverlos en 3 mL de cloroformo, evaporando posteriormente la solución en rotavapor a 40 °C hasta la formación de una fina película. Posteriormente, se procedió a hidratar con la fase acuosa, la cual se preparó a partir de dos soluciones independientes que posteriormente se mezclaron bajo agitación constante de 400 rpm durante 120 minutos. Para ello, se elaboró, en primer lugar, una solución 15 mM de β -CD en 5 mL de Hepes pH 6,2 y otra de 15 mM de L-dopa y 0,2 mg/mL de AA en 5 mL de Hepes pH 6,2. Tras la formación del complejo L-dopa-AA/ β -CD y posterior hidratación de la película lipídica, las muestras se sometieron a 5 ciclos de agitación en vórtex durante 1 minuto intercalados con 5 minutos en baño termostatizado a

40 °C hasta la obtención de un preparado opalescente donde se encuentran dispersos los liposomas. Finalmente, se conservaron a 4 °C hasta su posterior uso.

Una vez detectado el posible desplazamiento del fármaco de la cavidad de la CD en presencia del colesterol de la bicapa, se seleccionó el derivado CHEMS como lípido que contribuye a aportar la rigidez suficiente a la vesícula para mantener su integridad.

3.1.2.2. Modificación de la carga superficial y tipo de CD

Seguidamente, se ha continuado modificando la composición de la bicapa con el fin de incrementar las propiedades de estabilidad de las formulaciones. Para ello, se procedió a incorporar agentes de carga superficial positiva (DDAB) y negativa (dicetilfosfato, DCP), así como el derivado hidroxipropilado de la β -CD, efectuando la elaboración por diferentes técnicas, con el objetivo de obtener la máxima eficacia de encapsulación del fármaco. En la tabla 1 se recogen las composiciones cuali y cuantitativas de las bicapas elaboradas.

Formulación	DPPC (mM)	CHEMS (mM)	DCP (mM)	DDAB (mM)
β CD/DCH/-	1,7	1,05	0,15	-
HP β CD/DCH/-	1,7	1,05	0,15	-
β CD/DCH/+	1,7	1,05	-	0,15
HP β CD/DCH/+	1,7	1,05	-	0,15

Tabla 1. Composición de la fase oleosa de los liposomas elaborados por TLE y método transmembrana, así como la denominación de los diferentes lotes.

Tras elaborar la fase oleosa de las formulaciones con las cantidades y componentes reflejados en la tabla 1 y evaporar el cloroformo en rotavapor, se procedió a hidratar la película lipídica con el complejo L-dopa-AA/ β -CD y L-dopa-AA/HP- β -CD. Posteriormente, se sometió a la muestra a 5 ciclos de agitación en vórtex durante 1 minuto, intercalados con 5 minutos en baño termostático a 40 °C hasta la

obtención de un preparado opalescente donde se encuentran dispersos los liposomas. Finalmente, se conservan refrigerados a 4 °C hasta su posterior caracterización.

3.1.2.3. Modificación de la técnica de preparación

Se incluyeron como técnicas alternativas y/o complementarias a la TLE, el método transmembrana y el proceso de la extrusión, con el fin de analizar la influencia de la técnica de preparación de los liposomas sobre sus características fisicoquímicas y de estabilidad.

Respecto a la *extrusión*, tras la elaboración de las formulaciones mediante TLE, se procedió a extruir las muestras a través de un filtro de 0,4 µm, como se explicó en el apartado 3.1.2.2. del capítulo 1.

El *método transmembrana* consiste en un procedimiento de carga de los fármacos que se efectúa mediante un mecanismo de carga activa, gracias a un gradiente iónico. Consiste en elaborar, en primer lugar, la fase oleosa de las formulaciones con las cantidades y componentes reflejados en la tabla 1 y evaporar el cloroformo en rotavapor. A continuación, se procede a hidratar la película lipídica con 3 mL de acetato amónico 0,025 M, sometiéndola a 5 ciclos de agitación en vórtex durante 1 minuto, seguidos de 5 minutos en baño termostático a 40 °C. Seguidamente, se introdujeron los liposomas en una membrana de diálisis (Pm 12000-14000 Da) previamente hidratada en tampón Hepes 10 mM pH 6,2, para someterlos a un proceso de diálisis. El medio de disolución fue el mismo que el de hidratación, utilizándose un volumen cien veces mayor al de la muestra con el fin de mantener las condiciones *sink* del medio. Así, se crea una transferencia iónica dentro y fuera de la bolsa de diálisis, por lo que se procedió a medir por conductivimetría la conductividad iónica del medio cada 30 minutos durante 3 horas hasta obtener valores constantes.

A continuación, las moléculas a encapsular se introdujeron en los liposomas mediante carga activa a través de un gradiente de iones siguiendo el método propuesto por Gilbert y cols. (2004) con ligeras modificaciones. Así, una vez ha sido

estabilizada la medida de la conductividad, los liposomas se incubaron a 40 °C durante 5 minutos. El complejo L-dopa-AA/ β -CD (constituido por 15 mM L-dopa, 0,2 mg/mL AA y 15 mM β -CD) se añade poco a poco, agitando a intervalos regulares. Finalmente, los liposomas se dejaron en reposo durante 24 horas en refrigeración hasta su uso. Se repitió el mismo procedimiento añadiendo el complejo L-dopa-AA/HP- β -CD (constituido por 15 mM L-dopa, 0,2 mg/mL AA y 15 mM HP- β -CD).

3.1.3. Caracterización de las formulaciones

La caracterización de las distintas formulaciones de liposomas se llevó a cabo según la metodología desarrollada en el apartado 3.2.1. de caracterización fisicoquímica correspondiente al capítulo 1. Para determinar la eficacia de encapsulación de las formulaciones se siguió la metodología desarrollada en el apartado 3.2.2. del capítulo 1.

3.2. DETERMINACIÓN CROMATOGRÁFICA DE LAS MOLÉCULAS

Como ha sido explicado en el capítulo 1, se empleó la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la determinación y cuantificación de levodopa.

El cromatógrafo utilizado (Lachrom Hitachi HPLC System Manager) se compone de cuatro unidades: bomba isocrática L-7100, inyector automático de muestras L-7200, detector DAD L-7455 de longitud de onda variable e interfase D-7000.

En este capítulo de la Tesis, hubo que modificar el método cromatográfico para la detección y cuantificación de levodopa, ya que se tuvo que tener en cuenta la presencia de las CD para evitar su precipitación en contacto con los solventes orgánicos. El sistema estuvo constituido por una columna C₁₈ (ZORBAX SB-C18 150 mm × 4,6 mm, 3,5 μ m). Para determinar la levodopa con la mejor resolución cromatográfica posible, se seleccionó la longitud de onda de máxima absorción, 280 nm. La fase móvil estuvo constituida por tampón fosfato y metanol, en el sistema de gradiente recogido en la tabla 2. El tampón fosfato estaba constituido por potasio dihidrógeno ortofosfato 10 mM ajustado a pH 2,5. La velocidad de flujo se fijó en 1 mL/min y la temperatura a 25 °C. El volumen de inyección fue de 20 μ L.

Tiempo (min)	Tampón fosfato (% v/v)	Metanol (% v/v)
0 → 5	98	2
5 → 6	98 → 40	2 → 60
6 → 13	40	60
13 → 14	40 → 98	60 → 2
14 → 18	98	2

Tabla 2. Condiciones de gradiente para elución de levodopa.

3.3. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE LA FORMULACIÓN EN CULTIVOS CELULARES

3.3.1. Condiciones de los cultivos celulares

Para este estudio se emplearon neuronas dopaminérgicas N27 separadas y/o en conjunto con células de la microglía BV2. Las células se cultivaron rutinariamente en medio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), suplementado con 10% v/v de suero bovino fetal (FBS) inactivado por calor, 1% v/v de L-glutamina y 1% v/v de penicilina-estreptomicina, manteniéndose a 37 °C en una atmósfera humidificada de CO₂ al 5% en frascos de cultivo de 75 cm³. El medio se cambió cada 3 días y se dejó crecer hasta alcanzar un 80% de la población celular. La manipulación de las células se realizó en campana de flujo laminar.

3.3.2. Estudio de citotoxicidad celular

Para analizar el comportamiento de las formulaciones expuestas en la tabla 3 (A-F) se realizó un estudio en co-cultivos celulares, de manera que las formulaciones fueron incubadas en placa, en cuyos pocillos se encontraban neuronas dopaminérgicas N27 y células de la microglía BV2. Se comenzó sembrando en placa las neuronas N27 a una densidad inicial de 12 x 10³ células/pocillo. Se eliminó el medio de cultivo de todos los pocillos, para posteriormente añadir 1 mL de medio

sin FBS y 20 μL de *CellTracker™ Green*, empleado por su capacidad para marcar las células neuronales, y se incubó a 37 °C durante 30 minutos. A continuación, se quitó el medio anterior y se añadió 1 mL de medio sin FBS, dejándolo incubar durante 30 minutos. De nuevo, el medio fue eliminado y se añadieron las células de la microglía BV2 a una densidad inicial de 6×10^3 células/pocillo y tras incubar durante 24 horas, se añadieron 10 μL de las formulaciones a ensayar. Las células fueron fotografiadas por el microscopio invertido de contraste de fase con objetivos 10x, 20x y 40x (*Olympus CKX41SF2*) a las 24 y 48 horas de aplicación de las formulaciones.

Con el objetivo de determinar la capacidad neuroprotectora de las formulaciones desarrolladas, las células co-cultivadas fueron activadas con 20 $\mu\text{g/mL}$ de LPS. El LPS es un lipopolisacárido con capacidad para inducir el proceso inflamatorio y degenerativo de las células neuronales.

Tras la realización del estudio en co-cultivos y observar la muerte de las células neuronales, se procedió a determinar el agente causante de dicha muerte celular. Para este estudio, se incubaron en una placa neuronas dopaminérgicas N27 durante 24 horas y posteriormente se añadieron 10 μL de las formulaciones expuestas en la tabla 3 (G-K). Las células fueron fotografiadas por el microscopio invertido de contraste de fase con objetivos 10x, 20x y 40x (*Olympus CKX41SF2*) a las 24 y 48 horas de aplicación de las formulaciones.

A	Solución control L-dopa (1 mg/mL)
B	Solución control L-dopa (1 mg/mL) + ácido ascórbico (0,2 mg/mL)
C	Solución control L-dopa (15 mM) + ácido ascórbico (0,2 mg/mL) / CD (15 mM)
D	Liposomas blancos
E	Liposomas L-dopa (1 mg/mL) + ácido ascórbico (0,2 mg/mL)
F	Liposomas L-dopa (15 mM) + ácido ascórbico (0,2 mg/mL) / CD (15 mM)

G	Solución control DCP (0,15 mM)
H	Liposomas blancos sin DCP (0,15 mM)
I	Liposomas blancos con DCP (0,15 mM)
J	Liposomas blancos sin DCP (0,15 mM) y β -CD (15 mM)
K	Liposomas blancos con DCP (0,15 mM) y β -CD (15 mM)

Tabla 3. *Formulaciones empleadas en el estudio de cultivos celular.*

3.4. FORMULACIÓN DE INSERTOS NASALES LIOFILIZADOS

Una vez ha sido optimizada la formulación de ciclodextrinas de levodopa y ácido ascórbico incluidas en los liposomas aniónicos, se procedió a incluir la formulación en insertos nasales liofilizados, los cuales podrían permitir la administración de una única dosis de fármaco en la cavidad nasal por un tiempo prolongado gracias al control de la liberación del mismo hacia el SNC.

El diseño de dichos insertos se basa en obtener un sistema gelificado con la formulación, el cual, tras ser colocado en moldes, se liofiliza para dar lugar a una forma sólida que contenía la formulación de los liposomas previamente desarrollada.

3.4.1. Formulación de los hidrogeles

La primera etapa en la elaboración de los insertos intranasales consistió en seleccionar diferentes polímeros con propiedades gelificantes en medio acuoso, combinarlos entre ellos y seleccionar aquella combinación que presentara mejores condiciones en cuanto a consistencia y mucoadhesión.

Tras experiencias previas, se seleccionaron finalmente los polímeros quitosano y Pluronic® F127, que se mezclaron en distintas proporciones. Dada su capacidad mucoadhesiva, favorecerá el tiempo de permanencia de la formulación en la cavidad intranasal. Para efectuar el estudio, se prepararon los siguientes geles: gel de quitosano al 0,4% p/v en ácido acético 1% v/v (ya que el tampón PBS tiende a

neutralizar el quitosano) y gel Pluronic® F127 al 17% p/v en tampón PBS pH 6,2. Tras su elaboración, se procedió a realizar las mezclas quitosano:Pluronic® F127 en las siguientes proporciones (v/v): 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80 y 10:90, manteniéndose en agitación hasta su total homogeneización.

Para seleccionar la combinación de geles que presentara mejores características, se estudiaron los siguientes parámetros: pH, viscosidad y carga superficial de cada una de las mezclas realizadas.

3.4.1.1. pH

Para determinar el pH de las mezclas de geles se empleó un pH-metro *Crison*. El ensayo fue realizado por triplicado.

3.4.1.2. Viscosidad

La viscosidad es un parámetro que permite medir la resistencia que ofrece un sistema al flujo cuando se aplica una fuerza de cizalla. Cuanto más viscoso es el sistema, mayor es la fuerza que hay que aplicar para que fluya a una determinada velocidad.

La medida de la viscosidad se llevó a cabo usando un viscosímetro *Brookfield* y los husillos o *spindle* con un diámetro variable. El funcionamiento del viscosímetro se basa en el principio de la viscosimetría rotacional, el cual mide la viscosidad captando la energía de torsión necesaria a emplear para hacer girar a velocidad constante un husillo inmerso en la muestra a analizar. La relación viscosidad/husillo se selecciona en función de la viscosidad a medir, de la precisión deseada y del gradiente de velocidad ensayado. La energía de torsión es proporcional a la resistencia viscosa sobre el eje sumergido, en consecuencia, a la viscosidad del fluido (Lyapunov y cols., 2015).

Para determinar la viscosidad de las mezclas de geles, se prepararon 500 mL de muestra insertándose el *spindle* de forma inclinada para evitar la formación de burbujas en la parte inferior. Se incrementa la velocidad desde 0,5 hasta 100 rpm, provocando la agitación del sistema durante 1 minuto. Una vez estabilizado el

resultado, se bloquea el *spindle* y se anota la lectura. Repetimos el procedimiento por triplicado, y se realiza la media de las tres lecturas. Todas las medidas se hicieron a 25 °C.

La determinación de la viscosidad se lleva a cabo aplicando la siguiente ecuación:

$$v = K \times L$$

Donde K es el coeficiente que depende de la relación velocidad/*spindle* y L es el valor de la media de las lecturas obtenidas.

3.4.1.3. Estudio de la carga superficial

Para determinar la estabilidad de la formulación y controlar posibles interacciones entre el gel y los liposomas se realizó el estudio de la carga superficial.

Este parámetro se determinó empleando el equipo *Zetasizer Nano ZS* (Malvern) como ya fue explicado en el apartado 3.2.1. del capítulo 1. Para realizar este estudio se añadieron 0,2 mL de cada gel y 3,8 mL de tampón PBS pH 6,2. De esta forma, el gel se encuentra lo suficientemente diluido como para facilitar el proceso de medición. La medida se realizó por triplicado.

3.4.2. Elaboración de los insertos

Una vez seleccionadas las combinaciones de geles con características favorables para una administración intranasal, se procedió a incluir otros agentes gelificantes a la formulación. Tras unos ensayos preliminares, se seleccionaron los polímeros goma xantana y HPMC, con la finalidad de aumentar la consistencia de los insertos intranasales al ser liofilizados. La composición final de los mismos se recoge a continuación en la Tabla 4.

Compuesto	Cantidad (mg)
Mezcla del gel chitosan:Pluronic®127	100
Levodopa	2,8 mg
Ácido ascórbico	0,2 mg
Agente viscosizante (HPMC o goma xantana)	7,18 mg
D(+)-trehalosa dihidrato	1,03 mg

Tabla 4. Composición de los insertos intranasales.

La mezcla se agitó vigorosamente en agitador *IKA* hasta su total homogeneización. Posteriormente, los blísteres se rellenaron con la mezcla y fueron congelados durante 24 horas. A continuación, los blísteres se liofilizan en liofilizador *Telstar Cryodos -80*.

En la Tabla 5 se representa la composición de las formulaciones que componen los insertos a estudiar.

Formulación	Chitosan	Pluronic®	HPMC	Goma xantana
C₁₀P₉₀H	10	90	+	
C₉₀P₁₀H	90	10	+	
C₁₀P₉₀X	10	90		+
C₉₀P₁₀X	90	10		+

Tabla 5. Composición de las distintas formulaciones que componen los insertos. C_x:P_y: Porcentaje de quitosano (C_x), Porcentaje de Pluronic® F127 (P_y), H: HPMC y X: Goma xantana.

Para desarrollar los insertos con las formulaciones de liposomas, se partió de la misma composición y metodología, con la única excepción de que las muestras de liposomas fueron incorporadas en el proceso de elaboración del gel binario quitosano:Pluronic.

Tras la obtención de los insertos con las diferentes composiciones, se procedió a realizar diversos estudios con la finalidad de seleccionar aquella formulación que presentara mejores características de morfología, hinchamiento, mucoadhesión, liberación *in vitro* y permeación *ex vivo*.

3.4.2.1. Estudio morfológico

Este estudio se llevó a cabo mediante Microscopía Electrónica de Barrido en microscopio *Zeiss EVO*, conformado por un cañón de emisión termiónica y filamentos de hexaboruro de lantano (LaB_6)/tungsteno (W). Los insertos nasales se cortaron con un microtomo para exponer el interior de la estructura, fijada sobre soportes y recubierto con oro-paladio bajo una atmósfera de argón usando un módulo de pulverización en condiciones de vacío. Las muestras se observaron en el equipo utilizando imágenes con sistema de detección de electrones secundarios a 15 kV para examinar la morfología y estructura de la superficie de los insertos. El estudio morfológico fue realizado sobre insertos que contenían levodopa y ácido ascórbico, así como liposomas de levodopa y ácido ascórbico/HP- β -CD.

3.4.2.2. Estudio de hinchamiento

Para llevar a cabo este estudio, se siguió la metodología previamente establecida por Gupta y cols. (2012). Con el fin de evitar la rotura y el error de manipulación de las estructuras una vez se van humectando, los insertos secos se colocaron sobre papeles de filtro de 40 mm de diámetro empapados de SNF (*simulated nasal fluid*), el cual está compuesto por 5 mg/mL NaCl, 0,32 mg/mL $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1,29 mg/mL KCl ajustado a pH 6,2 (Paul y cols., 2017). Éstos, a su vez, se dispusieron sobre la superficie de una esponja de dimensiones 5 cm x 5 cm x 2 cm, la cual fue empapada previamente con SNF y colocada sobre una placa Petri con medio SNF.

Según esta metodología, el hinchamiento se determinó midiendo el aumento de peso de los insertos con el paso del tiempo, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Captación de agua (\%CA)} = \frac{(P_{ihp} - P_{hfp} - P_{is}) \times 100}{P_{is}}$$

donde P_{ihp} representa el peso del inserto hidratado y el papel de filtro húmedo, P_{hfp} representa el peso del papel de filtro hidratado y P_{is} representa el peso inicial del inserto seco.

El estudio de hinchamiento se realizó sobre insertos constituidos por levodopa y ácido ascórbico, ya que se consideró que la presencia de los liposomas no afectaría significativamente a este parámetro.

3.4.2.3. Uniformidad de contenido

Este ensayo se basa en la valoración individual del contenido en principio activo en un número de unidades de dosificación a fin de determinar si el contenido individual se encuentra dentro de los límites especificados.

Para ello, se analizaron diez insertos de cada una de las formulaciones mostradas en la Tabla 5 constituidos por levodopa y ácido ascórbico. Cada uno de los insertos fue colocado en un vaso de precipitado de 50 mL. Tras añadir 20 mL de agua milliQ, se colocaron en baño ultrasonidos durante 10 minutos, para permitir la total disolución de levodopa. A continuación se extrajeron alícuotas de 0,5 mL que fueron cuantificadas por HPLC, para obtener una concentración teórica esperada y aproximada de 2,8 mg por inserto. Se preparó una solución patrón de levodopa-AA en agua milliQ.

3.4.2.4. Mucoadhesión

Para determinar la capacidad de adhesión de los insertos liofilizados a la mucosa nasal, se procedió a extraer una sección de la mucosa nasal de cerdo obtenido tras el sacrificio del animal. En la Figura 1 se refleja la mucosa nasal de cerdo obtenida tras el proceso de extracción.



Figura 1. Mucosa nasal de cerdo.

Para desarrollar este estudio se diseñó un dispositivo de medición capaz de determinar la fuerza mucoadhesiva de la formulación a la mucosa nasal, tal como se muestra en la figura 2 (Choi y cols., 2000).

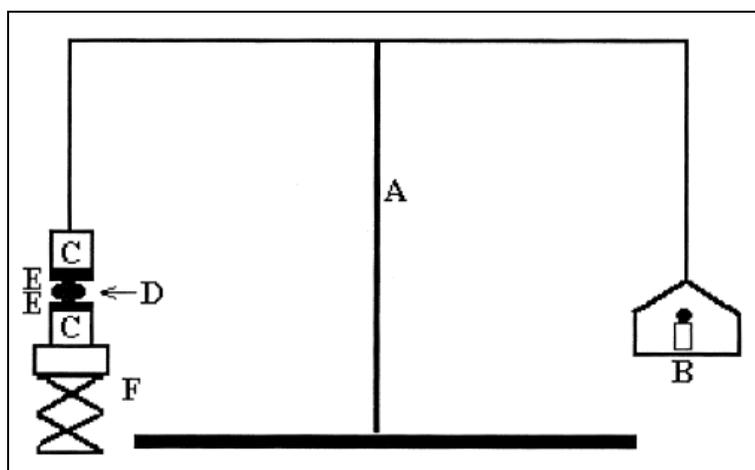


Figura 2. Dispositivo de medición de la fuerza mucoadhesiva. (A) Balanza modificada; (B) Pesos; (C) Vial de vidrio; (D) Inserto intranasal liofilizado; (E) Mucosa nasal de cerdo; (F) Bandeja ajustable en altura (Choi y cols., 2000).

Tras extraer una sección de tejido de la mucosa nasal del cerdo, ésta se aseguró con el lado de la mucosa hacia el exterior en cada uno de los viales de vidrio (C). A continuación, se conectó un vial con una sección de mucosa (E) a la balanza (A) y el otro vial se colocó en una bandeja ajustable en altura (F). Se añadió el inserto intranasal liofilizado (D) al tejido de uno de los viales. A continuación, la altura del otro vial se ajustó de manera que el inserto quedaba colocado entre los tejidos de la mucosa de ambos viales. Los pesos (B) se fueron elevando hasta que los viales se separaron. La fuerza bioadhesiva fue establecida como el peso mínimo necesario para separar los dos viales (Choi y cols., 2000). La fuerza mucoadhesiva se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Fuerza mucoadhesiva (dyne /cm}^2\text{)} = m \times \frac{g}{A}$$

Donde m = peso requerido para separar los viales, g = aceleración de la gravedad (980 cm/s²), y A = área del tejido expuesto (cm²).

El estudio de mucoadhesión fue realizado sobre insertos constituidos por levodopa y ácido ascórbico.

3.4.2.5. Estudio de liberación *in vitro*

Los estudios de liberación *in vitro* de los insertos intranasales se llevaron a cabo en celdas de Franz (*Vidrafoc*, Barcelona), depositando el inserto liofilizado sobre una membrana de celulosa. El compartimento receptor estaba compuesto de medio PBS pH 6,2 para simular el medio fisiológico de la cavidad nasal. El ensayo se realizó a una temperatura de 37 ± 0,2 °C. El tiempo de duración del ensayo fue establecido en 24 horas, durante las cuales se extrajeron 500 µL de muestra a tiempos predeterminados. Tras cada toma de muestra, el medio fue reemplazado por 500 µL de PBS pH 6,2 para mantener constante el volumen inicial (Betageri y Parsons, 1992; Nounou y cols., 2006). Además, en el compartimento donador se fueron inyectando 500 µL de SNF tras cada toma de muestra. El contenido de levodopa en cada una de las alícuotas extraída fue determinado por HPLC. Este ensayo se realizó

por triplicado. El estudio de liberación fue realizado sobre insertos constituidos por liposomas de levodopa y ácido ascórbico/HP-β-CD.

Finalmente, para cada lote se representó gráficamente el porcentaje de activo liberado frente al tiempo.

3.4.2.6. Estudio de permeación *ex vivo*

Los estudios de permeación de los insertos intranasales se llevaron a cabo utilizando de nuevo las celdas de difusión de Franz (*Vidrafoc*, Barcelona), con un área efectiva de difusión de 2,54 cm² y el compartimento receptor con capacidad para un volumen de 14,5 mL. En este caso, como membrana limitante se extrajo mucosa nasal de hocicos de cerdo, para simular la mucosa nasal humana (Mura y cols., 2007; Maestrelli y cols., 2009). El compartimento receptor fue completado con tampón PBS ajustado a pH 6,2 y el compartimento donador con SNF.

Como el destino de nuestras formulaciones era su administración por vía intranasal, se elaboraron insertos liofilizados para incorporar en cada uno de ellos las formulaciones en estudio con el fin de controlar su permeación y, de acuerdo a los resultados obtenidos, establecer la posibilidad de utilizar o no, uno de estos sistemas como vehículo para la administración de los complejos de L-dopa en CD y en liposoma, por vía nasal.

El tiempo de duración del ensayo fue de 48 horas, durante las cuales se extrajeron alícuotas de 1 mL del compartimento receptor a intervalos de tiempo predeterminados. El medio extraído fue reemplazado con 1 mL de tampón fresco con el fin de mantener las condiciones *sink*. El ensayo se realizó a 37 ± 1 °C, bajo agitación (*Multimatic* – 9N, potencia 650 W) y por triplicado. Finalmente, las alícuotas fueron cuantificadas por HPLC.

Se calculó el coeficiente de permeación P mediante la siguiente ecuación (Ceschel y cols., 2002; Zhang y cols., 2009):

$$P = \frac{dQ/dt}{A \times C_d}$$

Donde dQ/dt es la cantidad de fármaco que atraviesa la membrana por unidad de tiempo (masa/tiempo), A es la superficie disponible de difusión (cm^2), y C_d es la concentración del agente penetrante en el compartimento donador (mg/cm^3).

El flujo en estado estacionario se obtuvo al representar la cantidad acumulada del fármaco en el compartimento receptor por unidad de superficie ($Q \mu\text{g}/\text{cm}^2$), respecto al tiempo. La parte lineal del gráfico ha sido tomada como el flujo en estado de equilibrio. La ecuación utilizada para el cálculo del flujo en estado estacionario J_{ss} fue la siguiente:

$$J_{ss} = P \times C_d$$

Donde P es el coeficiente de permeación (cm/h) y C_d la concentración del fármaco en el compartimento donador (mg/cm^3).

El estudio de permeación fue realizado sobre insertos constituidos por liposomas de levodopa y ácido ascórbico/HP- β -CD.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. DESARROLLO Y CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES DE CICLODEXTRINAS INCLUIDAS EN LIPOSOMAS

4.1.1. Selección del tipo de CD y composición del complejo

Una vez se han obtenido los resultados del estudio de solubilidad de fase descrito en el apartado de metodología, se procedió a representar gráficamente los perfiles de solubilidad de levodopa en presencia de las CD (β y HP- β) aumentando su concentración desde 0 a 15 mM. El objetivo de este estudio fue comparar la influencia de ambas CD sobre la solubilidad y estabilidad de levodopa y seleccionar aquella que aportara los mejores valores de tales parámetros (Tonnesen y cols., 2002). El estudio se repitió con ambas CD añadiendo el antioxidante AA (0,2 mg/mL) a la formulación, con el fin de seleccionar aquella que aportara la máxima estabilidad a levodopa.

Tras la representación gráfica de los perfiles de solubilidad de la formulación de L-dopa y L-dopa-AA incluidos en β -CD (Figura 3), se observó un aumento de la solubilidad del fármaco de forma lineal al incrementar la concentración de β -CD. Como resultado, el diagrama de solubilidad de fase mostró una curva lineal, que es de primer orden con respecto a la β -CD. Dicha correlación lineal entre L-dopa y β -CD sugiere que la estequiometría de complejación es 1:1 (mol/mol) entre el fármaco y la CD (Higuchi y Connors, 1965).

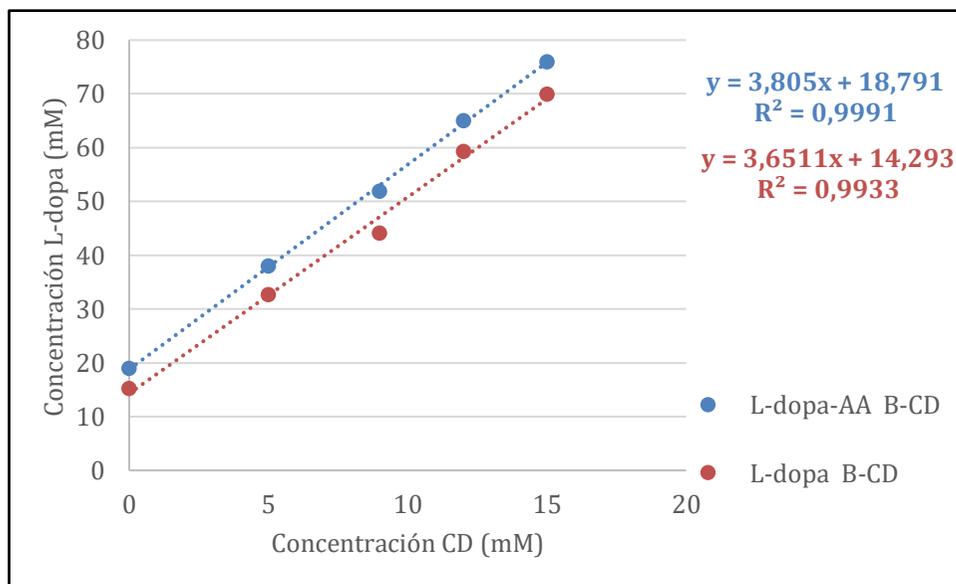


Figura 3. Representación del diagrama de solubilidad de fase de la L-dopa-AA/ β -CD y la L-dopa/ β -CD.

Asimismo, se observó que tras representar gráficamente las solubilidades, la formulación L-dopa / β -CD mostró la ecuación $y = 3,6511x + 14,293$ con un coeficiente de determinación de 0,9933. En el caso de L-dopa-AA / β -CD, la ecuación fue $y = 3,805x + 18,791$ con un coeficiente de determinación de 0,9991. En ambos casos, el incremento de la solubilidad de levodopa fue lineal respecto al aumento de la concentración de CD. Como es bien sabido, la solubilidad de los fármacos al complejarse con las CD cambia debido a que los grupos hidrofóbicos del fármaco ya no se encuentran en contacto con el solvente sino con los átomos de la cavidad de la CD, siendo la superficie externa de las CD la que interactúa con el solvente. Como resultado, la superficie externa de las CD contribuye a la solubilidad del complejo y no el fármaco en sí. Por otra parte, la inclusión de levodopa en los complejos de inclusión también mejora su estabilidad, ya que el fármaco puede quedar protegido del medio externo frente a la oxidación (Ansari y Parveen, 2016).

A partir de la pendiente de la recta, se procedió a calcular la constante de estabilidad del complejo formado en cada uno de los casos. La constante de estabilidad (K_s) del complejo L-dopa / β -CD fue $275,44 \text{ M}^{-1}$, mientras que el del complejo L-dopa-AA /

β -CD fue $271,30 \text{ M}^{-1}$, indicando ambos valores que el complejo fármaco-CD es suficientemente estable. Según algunos autores, valores de K_s que se encuentren en un rango entre 100 y 1000 M^{-1} , indican valores ideales de estabilidad, mientras que valores inferiores de K_s indican una interacción entre el fármaco y la CD, lo cual supondría una liberación incompleta del fármaco del complejo de inclusión (Mukne, 2004).

A continuación, se repitió el mismo procedimiento, representando gráficamente los perfiles de solubilidad de la formulación de L-dopa y L-dopa-AA incluidos en HP- β -CD (Figura 4). Al igual que ocurría en el caso de β -CD, en este gráfico también se observó un aumento de la solubilidad de levodopa de forma lineal al incrementar la concentración de HP- β -CD (Higuchi y Connors, 1965). Como resultado, el diagrama de solubilidad de fase mostró una curva lineal, que es de primer orden con respecto a HP- β -CD. Esta correlación lineal entre L-dopa y HP- β -CD sugiere que la estequiometría de complejación es 1:1 (mol/mol) entre el fármaco y la CD.

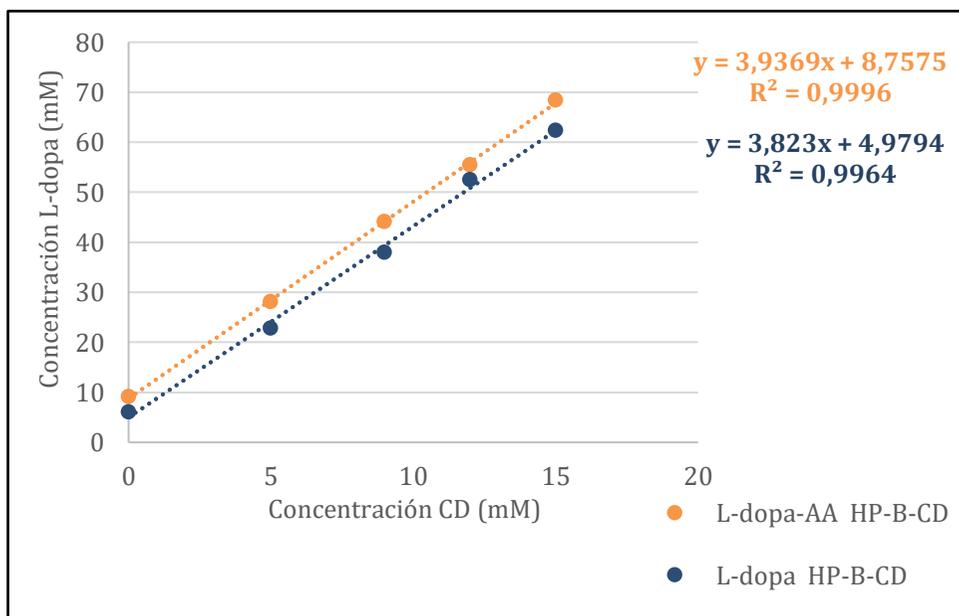


Figura 4. Representación del diagrama de solubilidad de fase de L-dopa-AA/HP- β -CD y la L-dopa/HP- β -CD.

Tras representar gráficamente las solubilidades obtenidas en el estudio de solubilidad, se obtuvo una recta. En el caso de L-dopa / HP- β -CD se obtuvo la recta

de calibrado $y = 3,8230x + 4,9794$ cuyo coeficiente de determinación fue 0,9964. Y en el caso de L-dopa-AA / HP- β -CD se obtuvo la recta de calibrado $y = 3,9369x + 8,7575$ cuyo coeficiente de determinación fue 0,9996. Con estos datos podemos afirmar, al igual que ocurría con la β -CD, que el aumento de la concentración de CD provocaba un incremento de la solubilidad de L-dopa. Igualmente, las pendientes de las rectas facilitarán el cálculo de las constantes de estabilidad de los complejos formados en cada uno de los casos, siendo de 270,84 M^{-1} para L-dopa / HP- β -CD y 268,09 M^{-1} para el complejo L-dopa-AA / HP- β -CD. Ambos valores indican que el complejo fármaco-CD es suficientemente estable.

Los valores de α y K_s extraídos de las rectas, así como el coeficiente de determinación, se resumen en la tabla 6.

Muestra	α	$K_s (M^{-1})$	R^2
L-dopa-AA / β -CD	3,805	271,30	0,9991
L-dopa / β -CD	3,6511	275,44	0,9933
L-dopa-AA / HP- β -CD	3,9369	268,09	0,9996
L-dopa / HP- β -CD	3,823	270,84	0,9964

Tabla 6. Datos obtenidos del diagrama de solubilidad de L-dopa con y sin antioxidante y con las diferentes ciclodextrinas. α : pendiente; K_s : Constante estabilidad; R^2 : Coeficiente de determinación.

Tras realizar los estudios de solubilidad de fase empleando diferentes complejos de inclusión con el fin de observar la capacidad de β -CD y HP- β -CD para proteger levodopa del proceso de oxidación, se dedujo que ambos complejos favorecen la estabilidad de levodopa. En la Tabla 6, se aprecian resultados similares de K_s tanto en las formulaciones con β -CD como con HP- β -CD. Estos resultados son razonables ya que la formación del complejo de inclusión depende de las interacciones hidrofóbicas entre el fármaco y la cavidad apolar de las CD, de tal forma que el fármaco queda incluido en el interior de las ciclodextrinas, protegido de los agentes

externos que provocan su oxidación, favoreciendo, por consiguiente, la estabilidad del mismo (Manca y cols., 2005). Por otro lado, cabe destacar que las formulaciones que contienen ácido ascórbico han mostrado un mejor ajuste de los puntos, pudiendo ser indicativo de una mayor estabilidad de la molécula en presencia del antioxidante.

Cualitativamente, se apreció el proceso de oxidación de levodopa en las formulaciones sin ácido ascórbico (Figuras 5 y 6), lo que demostró que la adición del antioxidante es necesaria para detener este proceso oxidativo. Las Figuras 5 y 6 mostraron mejores resultados en presencia de AA, debido a que esta molécula actúa como un captador de moléculas de oxígeno e inhibe la oxidación (Ahn y cols, 2007; Yetella y Min, 2008). AA también puede promover la generación de especies reactivas de oxígeno (OH , O_2 , H_2O_2 e iones de fermentación) en presencia de Fe^{3+} o Cu^{2+} libre. Esta actividad prooxidante se deriva de la capacidad del ácido ascórbico para reducir Fe^{3+} o Cu^{2+} a Fe^{2+} o Cu^+ , respectivamente, y para reducir el O_2 a H_2O_2 (Herbert y cols., 1996; Carr y cols., 1999).

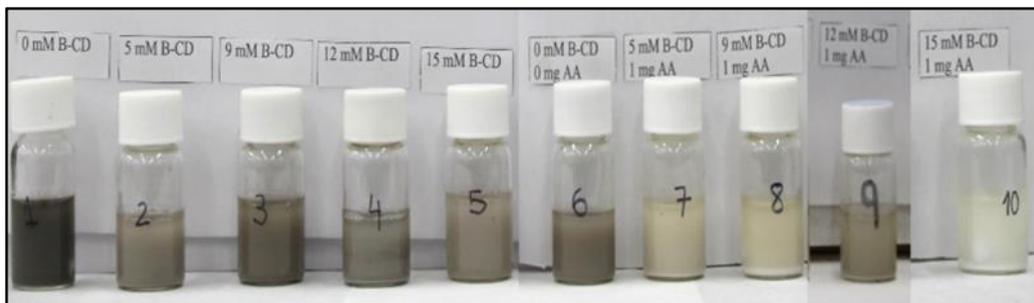


Figura 5. Representación de las formulaciones de levodopa/ β -CD y levodopa-AA/ β -CD.

Tras la realización de este estudio, se corroboró la importancia de añadir el antioxidante AA a la formulación de levodopa y CD. Parece ser que la CD sola no es capaz de evitar el proceso de oxidación del fármaco, siendo necesaria la adición del antioxidante a la formulación, de tal forma que la inclusión de levodopa y AA en CD sería la opción más favorable para mejorar la estabilidad de este fármaco en medio acuoso. Como se observa en las Figuras 5 y 6, tanto la β -CD como la HP- β -CD

favorecen la estabilidad del fármaco, corroborando el resultado obtenido en la Tabla 6 donde ambas CD muestran una constante de estabilidad similar.

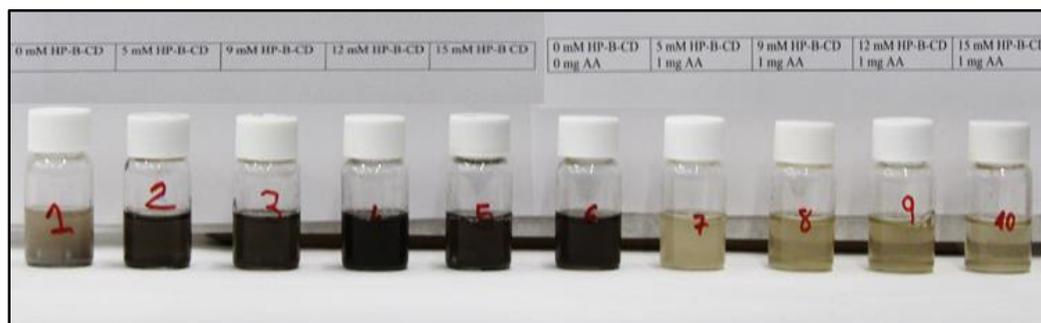


Figura 6. Representación de las formulaciones de levodopa/HP-β-CD y levodopa-AA/HP-β-CD.

4.1.2. Estudio de la interacción entre β-CD y colesterol

Tras observar que ambas ciclodextrinas favorecen la estabilidad de levodopa, se procedió a incluir levodopa y AA en las CD, para elaborar posteriormente los liposomas. Básicamente, estos están constituidos por fosfolípidos y colesterol; como es bien sabido, el colesterol añadido a la formulación de liposomas modifica la fluidez de la membrana, favoreciendo la capacidad de encapsulación de los fármacos y mejorando la estabilidad física de las vesículas lipídicas (Magarkar y cols., 2014; Briuglia y cols., 2015). Debido a la posible interacción que pudiera existir entre el colesterol y la β-CD, detectada en trabajos previos y propuesta ya por autores como Sánchez y cols. (2011), se caracterizaron las diferentes formulaciones de liposomas elaboradas para estudiar dicha interacción.

En la Tabla 7 se observan los resultados obtenidos tras la caracterización de las distintas formulaciones.

Lote	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	EE (%)
CD/D	1327 ± 0,2	0,63 ± 0,1	-1,9 ± 0,08	12,2 ± 0,06
CD/DC	1825 ± 0,05	0,51 ± 0,04	-0,3 ± 0,06	29,1 ± 0,08
CD/DCH	2231 ± 0,01	0,38 ± 0,01	-11,83 ± 0,05	62,3 ± 0,02

Tabla 7. Caracterización de diferentes formulaciones liposomales incluidas en β -CD. IP: Índice de polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación. Lote CD/D, constituido sólo por el fosfolípido DPPC; Lote CD/DC, constituido por DPPC y colesterol; Lote CD/DCH, constituido por DPPC y colesterol-hemisuccinato. En todos los lotes estaba presente la β -CD (CD).

Como se observa en la Tabla 7, los liposomas formulados con colesterol hemisuccinato (CD/DCH) mostraron los resultados más favorables. Estas formulaciones presentaron los valores más elevados de eficacia de encapsulación de levodopa. En consecuencia, a mayor carga de fármaco, el tamaño de las vesículas es superior. Autores como Rajan y cols. (2011) y Choudhury y cols. (2016) explican que el aumento de la cantidad de fármaco incluido en el compartimento acuoso, conlleva a un incremento de las dimensiones de las vesículas.

Asimismo, la formulación CD/DCH mostró valores más negativos de potencial z que las formulaciones que contenían colesterol o ausencia del mismo, indicando una posible mayor estabilidad de esta formulación. Autores como Sánchez y cols. (2011) han demostrado la afinidad existente entre β -CD y el colesterol, produciendo la eliminación de los esteroides liposomales lo que conlleva a la inestabilidad de la membrana, disminuyendo el potencial z de las formulaciones liposomales. De la misma forma, otros autores sugieren que β -CD puede formar complejos de inclusión con el colesterol siguiendo una estequiometría 1:1, desplazando el fármaco (Uekama y cols., 1987). Esto es lo que ocurre en el lote CD/DC, se forma un complejo entre la ciclodextrina y colesterol, produciendo un efecto de competencia entre el colesterol y levodopa, disminuyendo de este modo su eficacia de encapsulación, así como la estabilidad de la vesícula.

Por tanto, debido a este efecto de competencia del colesterol por la ciclodextrina, los estudios se continuarán incluyendo en la formulación de los liposomas colesterol hemissucinato.

4.2. INFLUENCIA DE LA CARGA SUPERFICIAL, TÉCNICA DE PREPARACIÓN Y TIPO DE CD EN LAS CARACTERÍSTICAS DE LAS VESÍCULAS LIPÍDICAS

El objetivo de este apartado fue el intentar conseguir el mayor porcentaje de levodopa encapsulada en los liposomas. Para ello, una vez detectado el posible desplazamiento del fármaco de la cavidad de la CD y modificada la composición de la bicapa por el derivado hemisuccinato del colesterol, se procedió a incluir agentes de carga en la misma, a fin de intentar mejorar la estabilidad de las formulaciones. Además, se optó por estudiar el efecto que tendría la inclusión del derivado hidroxilado de la β -CD. Por otra parte, y analizando el proceso de atrapamiento del fármaco en el interior del liposoma, se pensó en introducir una nueva técnica de encapsulación de levodopa, siguiendo un procedimiento activo, como se detalló en el apartado de metodología, por gradiente transmembrana.

En primer lugar, se procedió a la modificación del agente de carga superficial para evaluar el efecto de la carga superficial en las características de los liposomas obtenidos mediante las dos técnicas de elaboración seleccionadas. Para ello, se añadió a la formulación agentes de carga positiva (DDAB) y negativa (DCP) (Manosroi y cols., 2002; Manosroi y cols., 2004). Los lotes así obtenidos fueron evaluados en cuanto a tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación. Los resultados se recogen en la Tabla 8.

Técnica	Lote	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	% EE
TLE	β CD/DCH/-	2916 \pm 0,7	0,96 \pm 0,2	-11,7 \pm 0,6	52 \pm 0,2
TLE	β CD/DCH/+	2843 \pm 0,2	1,00 \pm 0,1	5,64 \pm 0,9	42,8 \pm 0,3
Transmembrana	β CD/DCH/-	1185 \pm 0,6	0,85 \pm 0,7	-11,2 \pm 0,4	33 \pm 0,1
Transmembrana	β CD/DCH/+	925 \pm 0,9	0,86 \pm 0,5	7,9 \pm 0,8	38 \pm 0,5

Tabla 8. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de levodopa en vesículas lipídicas elaboradas por distintas técnicas y diferente concentración de los agentes de carga incluidos en β -CD. IP: Índice de polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación. β CD/DCH/-: β -ciclodextrina/DPPC y colesterol hemisuccinato/Dicetilfosfato. β CD/DCH/+ : β -ciclodextrina/DPPC y colesterol hemisuccinato/DDAB.

En cuanto al tamaño de las formulaciones, se observó que los liposomas elaborados mediante el método transmembrana mostraron dimensiones inferiores que los liposomas elaborados por TLE. Este resultado está relacionado con el proceso de elaboración de los mismos, que implica un proceso de diálisis que conlleva la reducción del tamaño de las vesículas lipídicas (Fernández-Romero y cols., 2017). Respecto al IP, también se observó un incremento en los liposomas elaborados mediante TLE, indicando que las vesículas lipídicas presentaron mayor dispersión en cuanto a tamaño, exhibiendo las formulaciones una población heterogénea (Rajan y cols., 2011). Como ya se ha referido con anterioridad, este parámetro puede ser controlado mediante la extrusión de las muestras, de tal forma que es posible obtener una reducción en el tamaño vesicular así como en el IP.

Respecto a la modificación de la carga superficial, se observó que el diámetro vesicular de los liposomas con carga negativa fue mayor que el de las formulaciones con carga positiva debido a que la inclusión de carga negativa da como resultado un aumento en el espacio entre las bicapas lipídicas. Este fenómeno puede explicarse por la atracción del fármaco hacia las partículas cargadas negativamente empujando al grupo de cabezas de fosfolípidos (Lawrence y cols., 1993). Además,

los liposomas elaborados con el agente de carga DCP mostraron eficacias de encapsulación superiores a los que llevaban DDAB en su formulación. Autores como Hosny (2010) han demostrado que los liposomas cargados negativamente presentan mayor eficacia de encapsulación debido a la atracción electrostática entre el fármaco y los lípidos cargados negativamente. Numerosos estudios corroboran que los liposomas compuestos por DPPC-colesterol-DCP retienen más cantidad de fármaco que los liposomas compuestos por DPPC-colesterol-DDAB. Este efecto parece ser debido a la repulsión electrostática que se produce entre el fármaco y los liposomas cargados positivamente, lo que da como resultado una mayor velocidad de liberación de la molécula activa (Gubernator y cols., 2007; Kadar y cols., 2010).

En cuanto a los valores de potencial zeta, se obtuvieron valores similares al añadir el mismo agente de carga, independientemente de la técnica de elaboración, lo que hace indicar que por ambos métodos se producen liposomas estables mostrando una mayor estabilidad las formulaciones que contienen DCP.

En la Tabla 9 se representan los resultados obtenidos tras la caracterización de los liposomas elaborados por las técnicas TLE y transmembrana incluyendo levodopa y ácido ascórbico en el complejo de inclusión HP- β -CD. Como puede observarse, no se aprecian grandes diferencias entre las formulaciones elaboradas con la β -CD que con la HP- β -CD, mostrando similares resultados en cuanto a la encapsulación del fármaco, así como en el tamaño, IP y potencial z de cada una de las formulaciones.

Técnica	Lote	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	% EE
TLE	HP β CD/DCH/-	2866 \pm 0,5	0,61 \pm 0,3	-11,3 \pm 0,5	54 \pm 0,21
TLE	HP β CD/DCH/+	2848 \pm 0,3	0,97 \pm 0,1	5,73 \pm 0,6	41,1 \pm 0,2
Transmembrana	HP β CD/DCH/-	1197 \pm 0,4	0,87 \pm 0,9	-11,1 \pm 0,4	31,4 \pm 0,1
Transmembrana	HP β CD/DCH/+	932 \pm 0,6	0,84 \pm 0,3	6,8 \pm 0,5	36,2 \pm 0,5

Tabla 9. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas elaboradas por distintas técnicas y diferente concentración de los agentes de carga incluidos en HP- β -CD. IP: Índice de polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación. HP β CD/DCH/-: HP- β -ciclodextrina/DPPC y colesterol hemisuccinato/Dicetilfosfato. HP β CD/DCH/+ : HP- β -ciclodextrina/DPPC y colesterol hemisuccinato/DDAB.

Tras observar que las formulaciones elaboradas por TLE y con el agente de carga DCP fueron las que presentaron mayor eficacia de encapsulación y carga superficial favorable, se procedió a extruir las muestras con la finalidad de reducir el tamaño de las vesículas, ya que al ser destinada la formulación a ser administrada por vía intranasal, resulta imprescindible controlar el tamaño.

4.2.1. Influencia del proceso de extrusión

Tras elaborar los liposomas de levodopa y AA, ambos formulados con CD, mediante TLE, se obtienen unas vesículas de gran tamaño, como se recoge en las tablas 8 y 9.

Con el fin de reducir el tamaño vesicular y estudiar su influencia sobre la eficacia de encapsulación del fármaco, se extruyeron los liposomas de levodopa y AA elaborados por TLE. Los resultados de la caracterización llevada a cabo se recogen en la Tabla 10.

Lote	Tamaño (nm)	IP	Potencial z (mV)	% EE
βCD/DCH/- Ext	457 \pm 0,03	0,12 \pm 0,04	-18,4 \pm 0,05	64,5 \pm 0,01
HPβCD/DCH/- Ext	463 \pm 0,01	0,14 \pm 0,01	-19,1 \pm 0,06	66,1 \pm 0,02

Tabla 10. Representación del tamaño, IP, potencial z y eficacia de encapsulación de vesículas lipídicas tras el proceso de extrusión. IP: Índice de polidispersión; EE: Eficacia de encapsulación.

Tras el proceso de extrusión, las muestras presentaron una disminución del tamaño de las vesículas, como cabría esperar. Se sugirió que el mecanismo de reducción de tamaño incluye la ruptura de vesículas y la reorganización espontánea después del paso a través de la membrana, dando como resultado la formación de liposomas unilaminares (Berger y cols., 2001). En lo que respecta al tamaño, el diámetro de liposomas extruidos exhibió un valor promedio de 457 nm y 463 nm en liposomas con β -CD y HP- β -CD, respectivamente, acorde con el tamaño de poro del filtro utilizado (400 nm). Dicho tamaño, al ser manipulable, podría ser adaptado para su administración por vía intranasal (Ruano, 2013).

En cuando al IP, existe una disminución en su valor después de la extrusión, demostrando que la muestra de los liposomas extruidos se encontraba menos dispersa en relación al tamaño, significando ello la presencia de una población de liposomas de tamaño más homogéneo.

Así mismo, los valores de potencial z superiores obtenidos en las muestras extruidas predicen una mayor estabilidad de la dispersión coloidal de las vesículas frente a las no extruidas (Ruano, 2013).

Tras el proceso de extrusión, el tamaño de las vesículas lipídicas disminuye, mientras que la eficacia de encapsulación de levodopa aumenta. La explicación a estos resultados proviene del propio mecanismo de acción del equipo de extrusión sobre las vesículas, ya que la reorganización estructural de las vesículas durante el paso a través de los filtros, provoca un mayor atrapamiento del fármaco (Schneider

y cols., 1996; González-Rodríguez y cols., 2012). Este resultado es favorable y se establecería como el adecuado para la elaboración de liposomas con levodopa.

4.3. APLICACIÓN DE LAS FORMULACIONES EN CULTIVOS CELULARES

Una vez optimizadas las formulaciones compuestas por levodopa-AA en CD, incluidas en liposomas, se procedió a aplicar las formulaciones en células neuronales y de la microglía para observar el comportamiento en cultivos celulares. En este estudio, para el co-cultivo, se seleccionaron neuronas dopaminérgicas de rata N27, obtenidas del tejido mesencefálico de ratas E12 (1RB3AN27) y células de la microglía BV2, representando una población homogénea de células con características funcionales similares a las neuronas dopaminérgicas y células de la microglía como modelo *in vitro* para estudios de neurodegeneración dopaminérgica (Anantharam y cols., 2007; Ortiz-Ortiz y cols., 2009). Diversos estudios han establecido que las células N27 y BV2 constituyen un modelo de cultivo celular adecuado para estudiar la neurodegeneración dopaminérgica, ya que estas células derivan del mesencéfalo, una región cerebral directamente afectada en numerosas enfermedades neurodegenerativas (Anantharam y cols., 2002; Kaul y cols., 2003; Kanthasamy y cols., 2006). Estas células aportan ventajas significativas, ya que particularmente permiten la investigación directa y rápida de respuestas celulares relevantes y susceptibles de manipulación genética. Las neuronas primarias de los roedores son inadecuadas, porque el número de células es bajo y las neuronas derivadas de células madre aún adolecen de una diferenciación insuficiente y, por lo tanto, de problemas de consistencia.

En este estudio se comenzó aplicando las formulaciones A-F mencionadas en la Tabla 3 de metodología, incluyendo la β -CD, sobre los co-cultivos celulares y se analizó al microscopio a las 24 horas de la siembra, obteniéndose los resultados que se exponen a continuación.

Hay que exponer que el LPS es un ligando específico del receptor TLR4 y se ha convertido en un método muy popular para investigar las respuestas de las células gliales a estímulos neuroinflamatorios, simulando el entorno neuronal en diferentes

trastornos del SNC. Por ello, añadimos LPS al medio, de forma que favorezca la activación de las neuronas.

En las imágenes de la Figura 7 se observa el comportamiento de las células neuronales y de la microglía tras aplicar cada una de las muestras elaboradas, así como los controles.

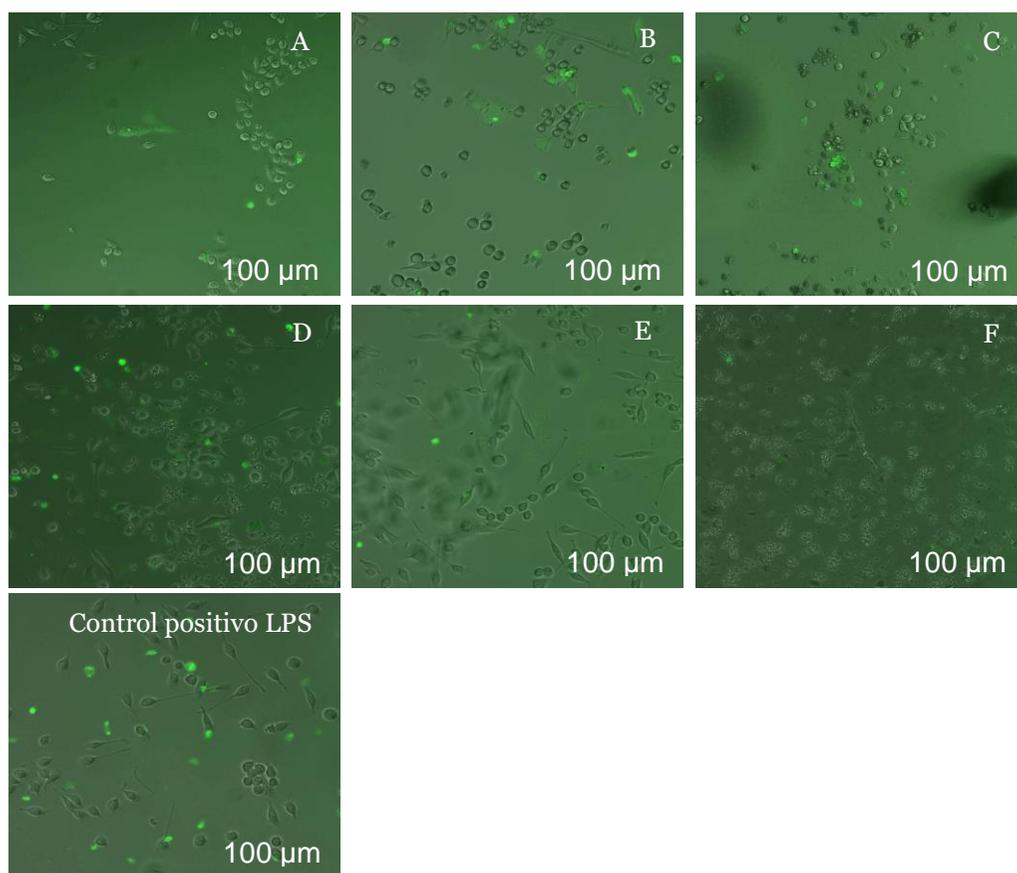


Figura 7. Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares. A) Solución control de levodopa; B) Solución control de levodopa y ácido ascórbico; C) Solución control de levodopa-ácido ascórbico y β -CD; D) Liposomas blancos; E) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico; F) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico/ β -CD.

En el caso de la solución control de levodopa (Figura 7A) se observa un comportamiento normal de las células, con cierta aglomeración, si lo comparamos con la imagen de la solución control de levodopa y ácido ascórbico (Figura 7B), donde aparecen las células más dispersas. Una respuesta similar ofrecen las células

tras la aplicación de los liposomas de levodopa y ácido ascórbico (Figura 7E), lo que hace pensar que la formulación liposomal de levodopa y ácido ascórbico podría ser un buen candidato como neuroprotector de las células del SNC. Esto se debe a la capacidad neuroprotectora que presenta levodopa, así como a la capacidad para captar radicales libres del antioxidante ácido ascórbico. Como ya ha sido demostrado en apartados anteriores, la inclusión del fármaco en liposomas, así como la adición de un antioxidante, favorece la estabilidad de levodopa, gracias a la capacidad del antioxidante para captar los radicales libres producidos por el mismo fármaco antiparkinsoniano. Este hecho queda reflejado en las imágenes de las células neuronales, donde se puede observar cómo la formulación de liposomas presentó mayor capacidad de neuroprotección frente la solución de levodopa o la solución de levodopa-AA.

No obstante, a las 24 horas de la aplicación de las formulaciones, se observó una aglomeración celular, así como la rotura o lisis de muchas de ellas en las imágenes correspondientes a la formulación liposomal que contenía β -CD (Figura 7F) así como en la solución control con β -CD (Figura 7C). Este efecto puede ser debido al efecto citotóxico de la β -CD (Horvath y cols., 2016).

No obstante, este mismo efecto en las células se observó en los liposomas blancos (Figura 7D). Se pensó entonces que, bien la composición liposomal o bien la presencia de trazas de cloroformo en la formulación, podrían ser las responsables de la muerte de las células neuronales, ya que tanto el agente de carga DCP como el cloroformo pueden ser neurotóxicos (Dick y cols., 2006). Para determinar la causa de la muerte neuronal, se observó al microscopio la influencia de cada una de las muestras G-K expuestas en la Tabla 3 sobre las células neuronales N27, a las 12 y 24 horas de tratamiento con la finalidad de detectar el parámetro a controlar para evitar el proceso de muerte celular. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura 8.

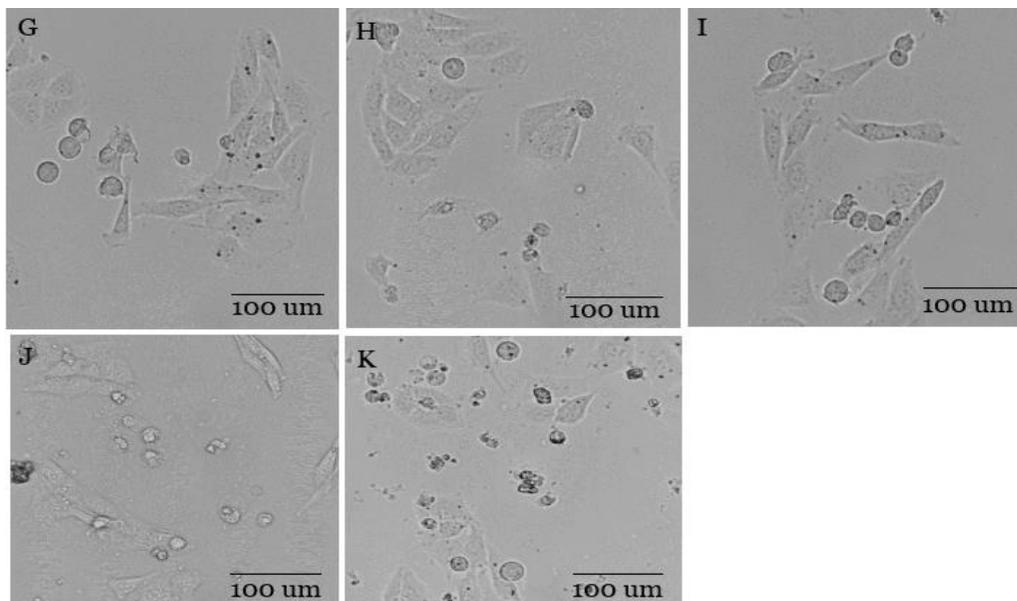


Figura 8. Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares a las 12 horas de tratamiento. G) Solución DCP; H) Liposomas blancos sin DCP; I) Liposomas blancos con DCP; J) Liposomas blancos sin DCP con β -CD; K) Liposomas blancos con DCP y β -CD.

En la Figura 8 se observa la influencia de las distintas formulaciones sobre las células neuronales a las 12 horas de tratamiento. Según se puede observar, la solución de DCP (Figura 8G) no produce muerte celular, observándose una población celular homogénea, lo cual nos llevaría a pensar que el agente de carga DCP no es el principal responsable del proceso de necrosis. Respecto a las formulaciones de liposomas blancos sin y con DCP (Figuras 8H y 8I), éstas tampoco provocan muerte celular, aunque sí empieza a observarse cierta agregación entre las células neuronales. Las formulaciones liposomales que incluyen β -CD en la formulación empiezan a mostrar deterioro de las células, observándose una clara muerte celular tras aplicar los liposomas blancos con DCP y β -CD.

Antes de tomar alguna decisión, se procedió a analizar el comportamiento neuronal tras aplicar las formulaciones durante 24 horas, y los resultados se reflejan a continuación.

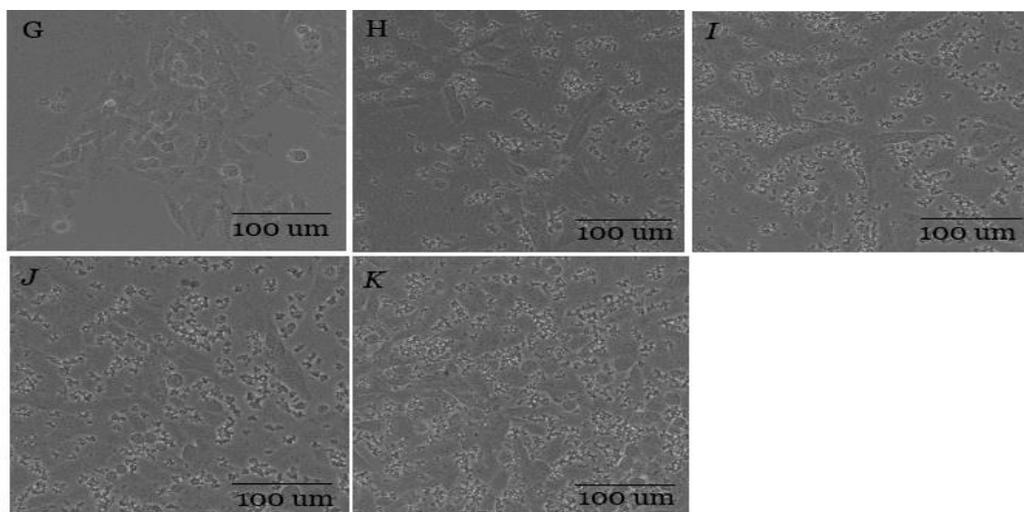


Figura 9. Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares a las 24 horas de tratamiento. G) Solución DCP; H) Liposomas blancos sin DCP; I) Liposomas blancos con DCP; J) Liposomas blancos sin DCP con β -CD; K) Liposomas blancos con DCP y β -CD.

Tras 24 horas de tratamiento, se sigue observando que la solución de DCP (Figura 9G) no produce daño sobre las células neuronales con el paso del tiempo. Sin embargo, las formulaciones liposomales sin y con DCP muestran muerte celular a las 24 horas. Al descartar el DCP como agente causante de la neurotoxicidad, nos hace pensar que las formulaciones liposomales contienen trazas de cloroformo, que no haya sido evaporado por completo en el proceso de elaboración, ya que el cloroformo es neurotóxico. Para solventar estos problemas, se procedió a aumentar el tiempo de evaporación del cloroformo, de tal forma que tras la disolución de los componentes que conforman la película lipídica en cloroformo, las muestras de dejaron evaporando durante 48 horas en rotavapor, para asegurarnos que no quedasen trazas de dicho solvente.

Por tanto, las muestras que contienen β -CD son las que mostraron una mayor muerte celular, debido al efecto citotóxico de la β -CD. Así, nos decantamos por la hipótesis del desplazamiento de levodopa y ácido ascórbico del complejo, ya que la β -CD tiene gran afinidad por las moléculas de colesterol de las células, de tal forma que la ciclodextrina desplaza el fármaco para incluir en su interior el colesterol de las células neuronales, produciendo la muerte de las mismas (Horvath y cols., 2016).

Numerosos estudios han demostrado que la exposición de las células con formulaciones que contienen β -CD provocan el desplazamiento del colesterol, formando las ciclodextrinas el complejo de inclusión con el colesterol, lo que llevaría a la destrucción de la estructura celular y, por tanto, la muerte de la misma (Zidovetzki y Levitan, 2007; Roka y cols., 2015).

Tras detectar los problemas de citotoxicidad producidos por la β -CD, se procedió a repetir los ensayos pero sustituyendo la ciclodextrina por su derivado hidroxipropilado. Se aplicaron las formulaciones A-F con la HP- β -CD de la Tabla 3 sobre las células neuronales N27 y se observó su comportamiento a las 12 y 24 horas de tratamiento (Figuras 10 y 11, respectivamente).

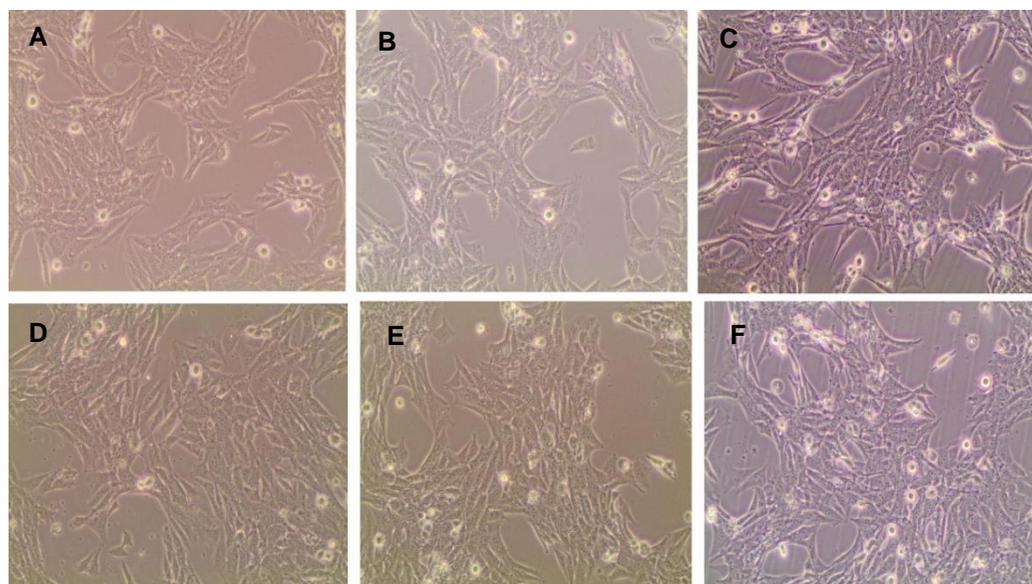


Figura 10. Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares a las 12 horas de tratamiento. A) Solución control de levodopa; B) Solución control de levodopa y ácido ascórbico; C) Solución control de levodopa-ácido ascórbico y HP- β -CD; D) Liposomas blancos; E) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico; F) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico/HP- β -CD.

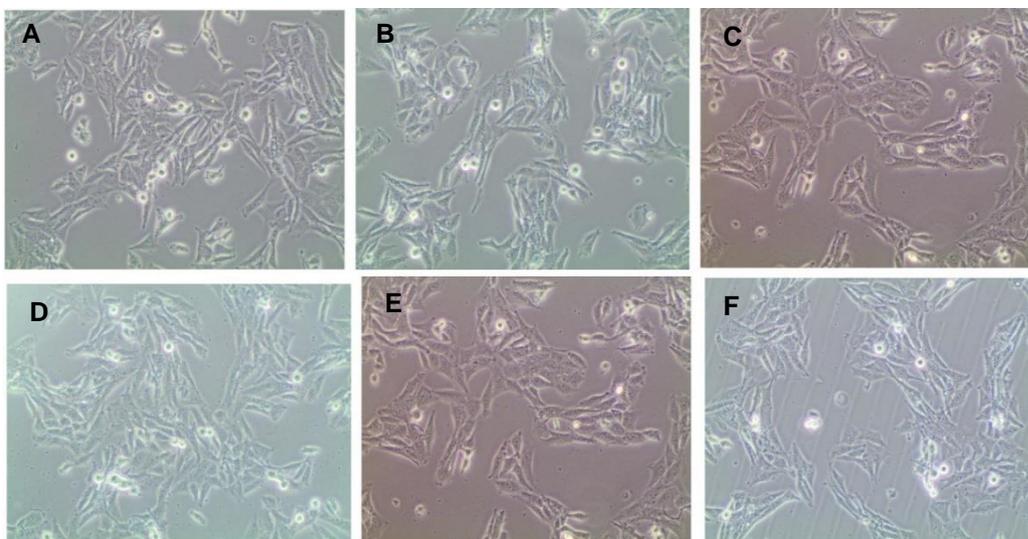


Figura 11. *Imágenes obtenidas tras estudios en cultivos celulares a las 24 horas de tratamiento. A) Solución control de levodopa; B) Solución control de levodopa y ácido ascórbico; C) Solución control de levodopa-ácido ascórbico y HP- β -CD; D) Liposomas blancos; E) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico; F) Liposomas de levodopa-ácido ascórbico/HP- β -CD.*

Tras aplicar cada una de las formulaciones sobre las células neuronales, se analizó el comportamiento de las células a las 12 y 24 horas de la aplicación. En este caso, transcurrido el tiempo, no hubo diferencias apreciables en el comportamiento celular. A ambos tiempos se observó un comportamiento normal de las células en las soluciones controles tanto de levodopa (Figuras 10A y 11A) como levodopa y ácido ascórbico (Figuras 10B y 11B). La solución constituida por HP- β -CD (Figuras 10C y 11C) no mostró muerte celular, como podía observarse con la β -CD, lo cual nos permite corroborar el efecto citotóxico de la β -CD, mediante la inclusión del colesterol celular en la ciclodextrina, lo que conlleva a un proceso de muerte neuronal. Por su parte, la formulación de liposomas blancos (Figuras 10D y 11D) también ofrece resultados favorables a nivel celular, lo cual nos lleva a pensar que el cloroformo también estaba interviniendo parcialmente en el proceso de la muerte de las células. Al conseguir eliminar por completo las trazas de cloroformo en la formulación, se evita el efecto neurotóxico del mismo. Las formulaciones liposomales de levodopa y ácido ascórbico (Figuras 10E y 11E) continuaron

mostrando resultados favorables al ser aplicadas sobre las células neuronales. Finalmente, el complejo L-dopa-AA/HP- β -CD incluido en liposomas mostró una gran mejora en el comportamiento de las células neuronales. El cambio de ciclodextrina ha evitado el proceso de muerte celular producido por la β -CD. Otros autores han demostrado la alta tolerabilidad que presenta la línea celular de astrocitos para las formulaciones con HP- β -CD. Asimismo, autores como Schonfelder y cols. (2006) informaron que la β -CD induce muerte celular, observando alteraciones fenotípicas de las células, que incluyen la producción excesiva de proteínas estructurales y filamentos intermedios, hipertrofia celular y proliferación celular. Sofian y cols. (2012) encontraron hallazgos similares, observando un aumento en la tasa de proliferación celular de las células de la glía tras la exposición de la β -CD durante 72 horas. Sin embargo, la tolerabilidad de los astrocitos mejoró con el complejo HP- β -CD, mostrando un aumento en la viabilidad celular (Rasheed y cols., 2008).

Estos resultados preliminares serán objeto de estudios más completos en relación a la cuantificación de la actividad neuroprotectora de la formulación propuesta, así como la viabilidad celular en presencia de la misma.

4.4. CARACTERIZACIÓN DE LOS INSERTOS NASALES LIOFILIZADOS

4.4.1. Caracterización físico-química de los geles

Una vez han sido elaborados los geles de quitosano y Pluronic® F127, se procedió a mezclarlos en distintas proporciones. Cada una de estas combinaciones fue analizada con el fin de obtener un gel que ofrezca las mejores características de viscosidad y mucoadhesión para su administración por vía nasal.

Se decidió incluir quitosano en todas las combinaciones de geles por sus propiedades bioadhesivas, su naturaleza viscosa, su capacidad para mantenerse en estado de hidrogel a pH intranasal y, fundamentalmente, por su naturaleza catiónica, que favorece el tiempo de residencia de la formulación en la mucosa nasal, de naturaleza aniónica (Luppi y cols., 2010). Numerosos estudios han demostrado la eficacia de los sistemas de administración de fármacos constituidos por quitosano (Marin y Andrianov, 2011; Hosseini y cols., 2013).

Para conseguir un sistema capaz de controlar la liberación del fármaco y mejorar su capacidad adyuvante, los sistemas de quitosano se prepararon en presencia de Pluronic F-127 como agente estabilizante (Kang y cols., 2009). La elección del polímero Pluronic se debe a su capacidad de gelificación termorreversible, en la que el polímero cambia de líquido a gel al alcanzar temperaturas fisiológicas (Schmolka, 1991). Varios estudios han demostrado las ventajas de usar la combinación quitosano/Pluronic para proporcionar un buen sistema para la administración intranasal de fármacos (Westerink y cols., 2001; Gupta y cols., 2010).

Una vez elaboradas cada una de las combinaciones de geles descritas en apartados anteriores, se procedió a realizar medidas de pH, viscosidad y carga superficial de cada una de las muestras, de forma que pudiéramos seleccionar la combinación de geles más favorable para la elaboración de los insertos intranasales (Tabla 11).

Formulación gel	pH	Viscosidad	Carga superficial
C₉₀:P₁₀	3,85	18 ± 0,02	31,57 ± 4,04
C₈₀:P₂₀	4,04	17 ± 0,01	25,23 ± 1,26
C₇₀:P₃₀	4,03	15,9 ± 0,5	23,23 ± 4,1
C₆₀:P₄₀	4,25	16,3 ± 1,15	13,83 ± 6,4
C₅₀:P₅₀	4,28	13,3 ± 0,57	12,23 ± 2,38
C₄₀:P₆₀	4,54	12,56 ± 0,01	7,65 ± 3,94
C₃₀:P₇₀	4,70	12,29 ± 1,15	9,32 ± 0,08
C₂₀:P₈₀	5,07	11,18 ± 0,24	1,61 ± 0,14
C₁₀:P₉₀	6,03	10,91 ± 0,51	0,49 ± 0,22

Tabla 11. Representación del pH, viscosidad y carga superficial de las diferentes combinaciones de geles elaboradas. C_x:P_y: Porcentaje de quitosano (C_x): Porcentaje de Pluronic® F127 (P_y).

Si analizamos los geles elaborados (Tabla 11), se aprecia una disminución del pH, un aumento de la viscosidad y también un incremento de la carga superficial conforme aumenta la proporción de quitosano en la formulación. Respecto al pH, el resultado es lógico, ya que el gel de quitosano fue disuelto en ácido acético (pH 4,7) para evitar la neutralización de su carga, mientras que el gel de Pluronic fue disuelto en tampón PBS pH 6,2 de forma que al aumentar la proporción de quitosano se está incrementando la proporción de medio ácido.

Autores como Nilsen-Nygaard y cols. (2015) han demostrado que la variación de pH va a influir significativamente en la estructura del hidrogel, de manera que a pH bajo se produce la rotura de los enlaces covalentes de la molécula de quitosano, quedando los grupos -NH₃⁺ libres, lo que conlleva a la formación de un gel con

grupos más ionizables. Debido a este incremento de carga, se producen repulsiones electrostáticas entre las cadenas catiónicas de las moléculas de quitosano, lo que conlleva al hinchamiento del gel, al mismo tiempo que las cadenas del polímero se vuelven más hidrófilas produciendo un aumento en la hidratación del mismo. En cambio, a pH altos, los grupos -NH_3^+ se neutralizan formando NH_2 , que conlleva a una disminución de las fuerzas de repulsión entre las cadenas de quitosano. Asimismo, se produce un aumento en la hidrofobicidad del gel debido al incremento de los grupos NH_2 en las cadenas de quitosano. Este efecto hidrofóbico provoca la agregación de las cadenas moleculares, haciendo que el gel se encoja, de forma que disminuye el volumen del mismo (Domínguez-Delgado y cols., 2016).

La Figura 12 muestra cómo la molécula de quitosano a pH bajo presenta los grupos amino protonados, responsables del comportamiento policatiónico de la molécula a pH ácido, mientras que a pH más elevados, la molécula se desprotona, haciendo que el polímero pierda su carga, lo que también influye en su capacidad mucoadhesiva (Kurita, 2006).

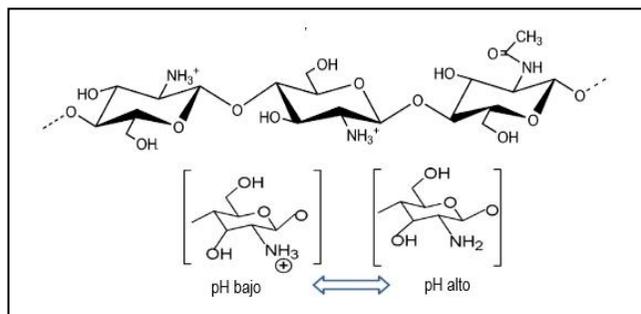


Figura 12. Estructura de quitosano (Kurita, 2006).

Por otra parte, el pH del hidrogel va a influir directamente en la viscosidad de la formulación, de manera que a pH bajo la formulación se encuentra protonada. A medida que aumentan las cargas de las cadenas poliméricas y aumenta la repulsión electrostática, se produce una expansión de la formulación, de manera que la viscosidad aumenta sustancialmente (Klossner y cols., 2008), al igual que influye la proporción de quitosano en la viscosidad intrínseca. Así, un aumento en la proporción de quitosano conlleva a un aumento de la viscosidad del hidrogel,

debido a una restricción en la libertad de giro de las cadenas poliméricas por un aumento del entrecruzamiento entre las moléculas de polímero (Berth y Dautzenberg, 2002).

Autores como Escobar-Chávez y cols. (2006) demostraron que incluir Pluronic a bajas concentraciones era favorable, ya que permitía la formación de micelas monomoleculares, mientras que a concentraciones más altas dan como resultado agregados multimoleculares constituidos por un núcleo hidrófobo unidos a unas cadenas hidrófilas en contacto con el medio acuoso (Figura 13).

Cuando se añade el polímero por encima de la concentración micelar crítica (10-20%), que es la concentración óptima para que se forme el gel, las micelas pueden ordenarse formando un enrejado. Parece ser que esto es lo que ocurre en las formulaciones de geles elaboradas, ya que al aumentar la proporción de Pluronic se produce un descenso tanto en la viscosidad, como en la estabilidad de los hidrogeles. Por tanto, es importante controlar la proporción de este polímero alrededor de su concentración micelar crítica.

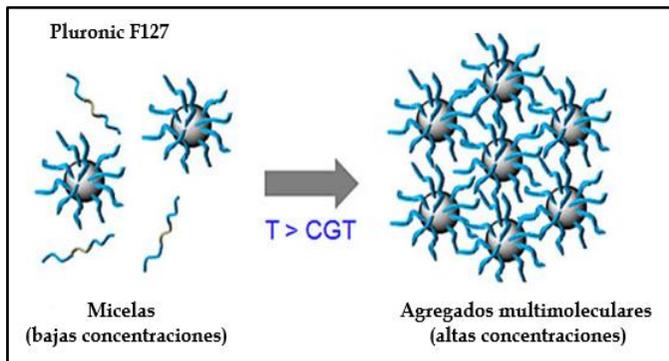


Figura 13. Ilustración esquemática de la formación de micelas y agregados multimoleculares de Pluronic F127.

En lo referente a la carga superficial, parámetro muy útil para determinar la estabilidad de la formulación, los resultados demuestran que a mayor porcentaje de quitosano, mayor es la estabilidad del hidrogel, ya que valores de potencial z superiores a 20 mV indican que se trata de un sistema estable (Villasmil-Sánchez y cols., 2010).

Por tanto, la estabilidad del hidrogel está estrechamente relacionada con el pH de la formulación, ya que a pH bajo se modifica el entorno del hidrogel, modificando las interacciones iónicas, lo que conlleva a un aumento de la viscosidad del sistema, así como un aumento de la estabilidad del mismo (Yamagata y cols., 2006).

Tras analizar estos resultados se determinó que la formulación Quitosano/Pluronic® F127 90:10 presentaba características favorables para la elaboración de los insertos que serán administrados por vía intranasal. Se decidió continuar los ensayos elaborando los insertos nasales liofilizados seleccionando los geles Quitosano:Pluronic 90:10 y 10:90, para compararlos con un control negativo.

4.4.2. Caracterización de los insertos

Una vez seleccionados los geles Quitosano/Pluronic® F127 90:10 y 10:90, se procedió a elaborar los insertos añadiendo los agentes gelificantes goma xantana o HMPC para incrementar la consistencia de los insertos. HPMC y goma xantana son polímeros no iónicos con gran capacidad bioadhesiva, por lo que constituyen una opción atractiva para la administración de formulaciones por vía intranasal. Estos polímeros han sido ampliamente utilizados en la elaboración de insertos intranasales, permitiendo un aumento en el tiempo de residencia de la formulación en la cavidad nasal, así como una prolongación del tiempo de liberación del fármaco (McInnes y cols., 2005).

La administración de estos polímeros altamente viscosos por vía nasal resultaría extremadamente difícil e incómoda. Es por ello que se elaboraron los insertos nasales, mecánicamente robustos, producto de la liofilización de tales polímeros viscosos junto con el resto de la formulación. Así, los insertos serían hidratados rápidamente al entrar en contacto con la humedad de la mucosa nasal, formando un gel viscoso, que permitiría la penetración del fármaco de forma controlada a través de la mucosa nasal.

Tras elaborar los insertos con diferentes composiciones, como recoge la Tabla 4, se procedió a analizar las características de morfología, hinchamiento, mucoadhesión, liberación y permeación.

4.4.2.1. Caracterización morfológica

Tras la elaboración de los insertos nasales, se analizó la morfología de cada uno de los insertos elaborados tanto visualmente como mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En ambos casos se observó que la estructura de los insertos dependía de la proporción de quitosano y Pluronic, así como de los agentes gelificantes HMPC o goma xantana.

Autores como Goncalvez y cols. (2005) comentan que el grado de entrecruzamiento entre las moléculas que conforman el gel es el principal parámetro que influye en las propiedades de hinchamiento, adhesión y liberación, además de brindar una estructura porosa. Parece ser que el entrecruzamiento covalente que se produce entre las moléculas permite obtener una red que facilita la difusión de agua y mejora las propiedades mecánicas. Estos complejos polielectrolíticos, conformados por la interacción de un componente policatiónico como es el quitosano y un componente polianiónico como es el Pluronic, conducen a la formación de hidrogeles físicamente reticulados que pueden retener gran cantidad de agua en el interior (Berger y cols., 2004).

Como los insertos intranasales han sido obtenidos por liofilización, las muestras se caracterizan por presentar una estructura porosa, la cual es más evidente en la formulación Quitosano/Pluronic (90:10) que en (10:90) con HPMC (Figuras 14A y 14B). Así, el inserto constituido por Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC (figura 14A) muestra una porosidad elevada con un tamaño homogéneo de poro. Esta estructura puede deberse a la presencia de un mayor porcentaje de quitosano, que forma una estructura de red tridimensional debido a la formación de enlaces covalentes entre cadenas poliméricas proporcionando una porosidad más homogénea. La figura 14A presentaría una morfología adecuada para hidrogeles administrados por vía intranasal, debido a su aspecto más parecido a la estructura de una esponja, que puede proporcionar gran hidratación a los insertos cuando entren en contacto con la mucosa nasal.

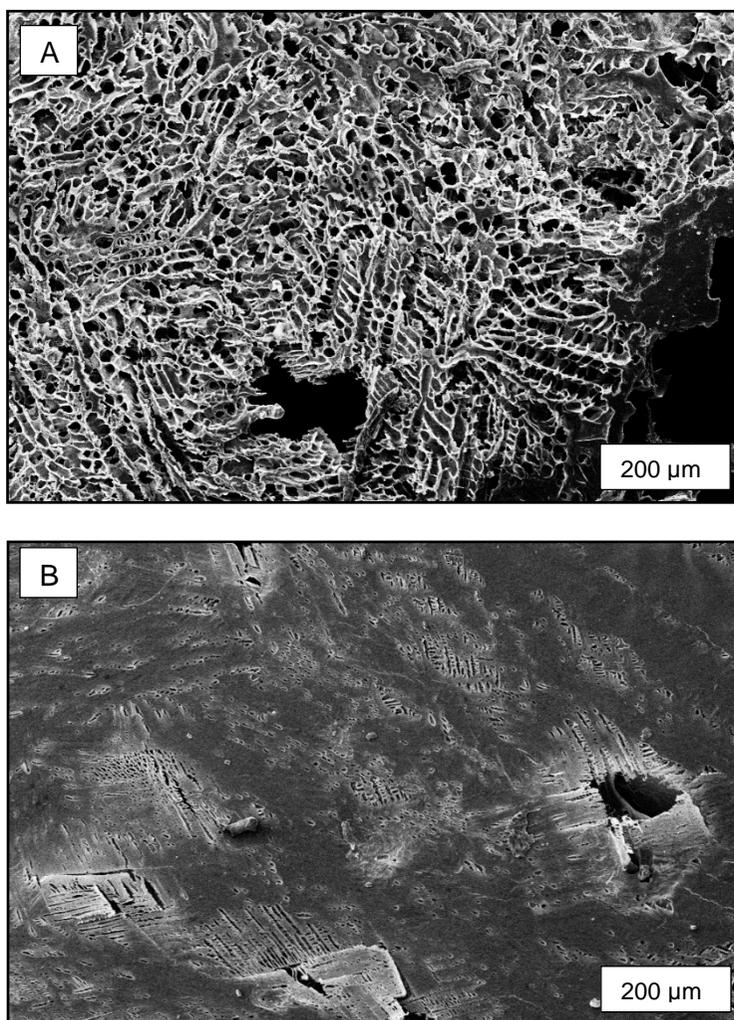


Figura 14. Imágenes SEM de los insertos intranasales liofilizados. A: Quitosano/Pluronic (90:10) + HMPC; B: Quitosano/Pluronic (10:90) + HMPC.

En cambio, los insertos constituidos por Quitosano/Pluronic 10:90 con HMPC (Figura 14B) presentan menor porosidad. Esto se debe a que el gel Pluronic, a bajas concentraciones, se encuentra en forma de micelas monoméricas, mientras que al aumentar su concentración, se produce la agregación de estos monómeros formando agregados micelares (Domínguez-Delgado y cols., 2016). Por tanto, a medida que aumenta la proporción de Pluronic, aumenta la agregación de los monómeros, de forma que se disponen formando micelas, constituidos por una cabeza hidrófila dispuesta hacia el interior y por colas hidrófobas que se disponen

hacia el exterior, en contacto con el medio acuoso (Archana y Maheshwari, 2011). Esta nueva conformación es la responsable de que los insertos apenas presenten porosidad, mostrando una estructura en forma de bloque con mínima porosidad. Este cambio estructural conlleva a una menor capacidad para captar agua, disminuyendo del mismo modo su capacidad de adhesión a la mucosa, así como una disminución en la liberación del fármaco.

La inclusión de HPMC en la formulación no parece haber supuesto un gran cambio en la estructura de los insertos. HPMC es un derivado de la celulosa, de carácter hidrófilo, no ionizable, que contiene grupos metoxi e hidroxipropilo, que le confiere capacidad hidrófila, factor que favorece la captación de agua por parte del inserto (Mughal y cols., 2011). Añadir HPMC a la formulación va a favorecer la administración intranasal de los insertos, ya que permitirá una mayor captación de agua, de forma que influirá positivamente en el hinchamiento y liberación del fármaco.

Cuando se incorporaron a la formulación los liposomas en lugar de las soluciones estándares de levodopa-AA/HP- β -CD, se obtuvieron diferencias en cuanto a la morfología de los insertos (Figura 15).

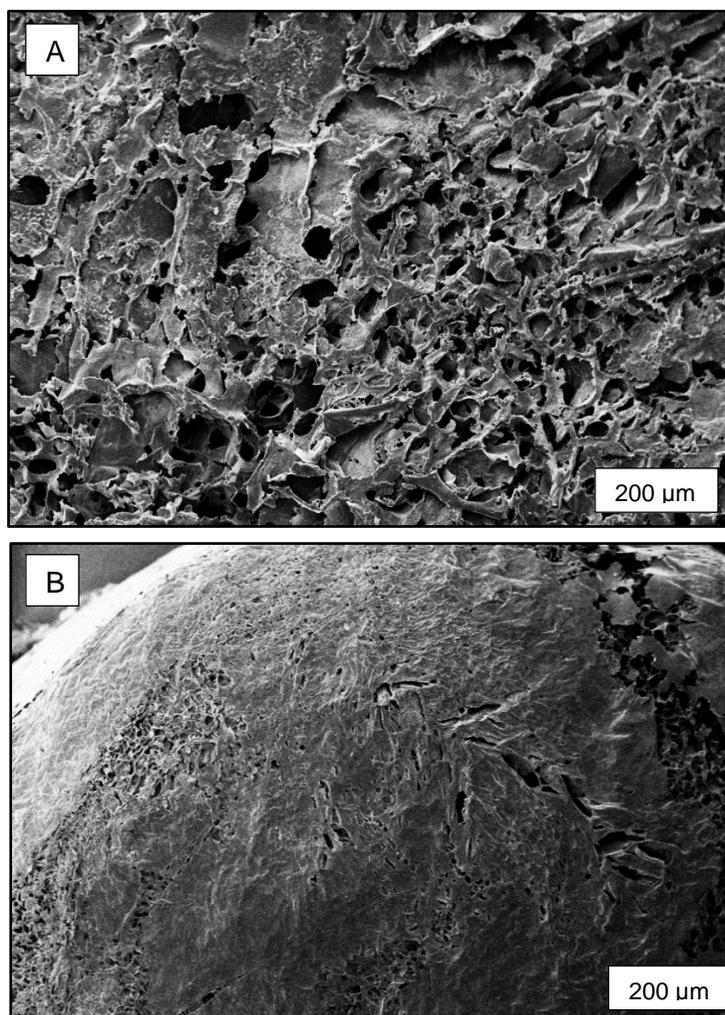


Figura 15. Imágenes SEM de los insertos intranasales liofilizados cargados de liposomas de levodopa-AA/HP- β -CD. A: Chitosan/Pluronic (90:10) + HMPC; B: Chitosan/Pluronic (10:90) + HMPC.

Las Figuras 15A y 15B muestran un aumento de la rugosidad, así como una disminución en la porosidad si se comparan con los insertos sin fármaco (Figuras 14A y 14B). Autores como Luppi y cols. (2010) han demostrado que la inclusión de fármaco/complejo inclusión en los insertos conlleva a la formación de una superficie rugosa, no observada en las muestras sin fármaco. Las muestras que contenían fármaco mostraron una disminución de la porosidad, comportamiento

que parece estar relacionado con una posible interacción entre el fármaco/complejo de inclusión durante el proceso de elaboración de los insertos.

En las figuras 16A y 16B se representan insertos de Quitosano/Pluronic 90:10, pero añadiendo el gelificante goma xantana. En este caso, no ha podido ser analizada la estructura morfológica del inserto Quitosano/Pluronic 10:90 con goma xantana, ya que tras la liofilización no se consiguió una estructura compacta, sino más bien pegajosa. Las imágenes revelan estructuras muy rugosas, desapareciendo la estructura porosa que se observaba en los insertos con HPMC. En este caso, puede ser que se produzca interacción entre los componentes de la formulación con la goma xantana impidiendo la formación de los retículos tridimensionales que favorecen la absorción de agua. El carácter aniónico de la goma xantana hace que interaccione con quitosano, de carácter catiónico. Se produce un aumento en el grado de entrecruzamiento de los polímeros quitosano y goma xantana, de modo que disminuye el grado de porosidad. Esta disminución de la porosidad va a influir en la capacidad de hinchamiento, ya que la densidad de reticulación es inversamente proporcional a la capacidad para captar agua (Goncalves y cols., 2005). De esta forma, la adición de goma xantana a la formulación ha incrementado el grado de entrecruzamiento entre los polímeros, lo que conlleva a una disminución en la capacidad de captación de agua del inserto, factor que influirá en parámetros como la mucoadhesión y liberación del fármaco a través de la mucosa (Dehghan y Marzuka, 2014).

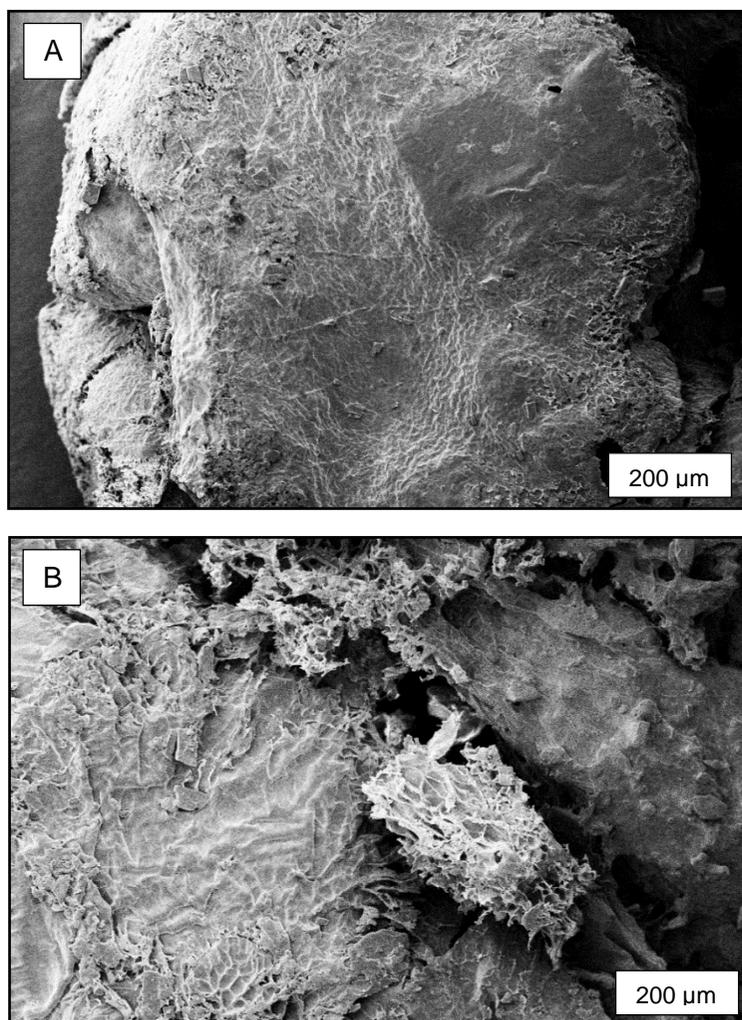


Figura 16. Imágenes SEM de los insertos intranasales liofilizados. A y B: *Chitosan/Pluronic (90:10) + Goma xantana*.

4.4.2.2. Hinchamiento

Una vez han sido elaborados los insertos de levodopa y ácido ascórbico con las formulaciones propuestas en la Tabla 5, se procedió a medir la capacidad de hinchamiento o de captación de agua de cada una de las formulaciones, parámetro que influirá en la capacidad adhesiva del inserto, de manera que a mayor capacidad de hinchamiento, mayor será su capacidad de adhesión a la mucosa nasal (Dehghan y Marzuka, 2014).

Aunque no de forma muy patente, en la Figura 17 se observa que las formulaciones constituidas por Quitosano/Pluronic 90:10 presentaron un mayor porcentaje de captación de agua a lo largo del tiempo frente a las constituidas por Quitosano/Pluronic 10:90. Esto hace pensar que un mayor porcentaje de quitosano en la formulación deriva en una mayor captación de agua por parte del inserto. Igualmente, la inclusión de HPMC en la formulación repercutió favorablemente en la capacidad de hinchamiento del inserto, frente a la inclusión de goma xantana.

Como defienden algunos autores, la capacidad de hinchamiento del hidrogel depende de factores como la densidad de reticulación, la estructura química de los polímeros y de las condiciones ambientales (Ahmadi y cols., 2015; Domínguez-Delgado, 2016). La densidad de reticulación se refiere al número de entrecruzamientos que se produce entre las cadenas poliméricas. Si esta densidad de entrecruzamiento es elevada, el material presentará poca elasticidad y tendrá menor capacidad de captación de agua, mientras que la baja densidad de entrecruzamiento polimérico, favorece la porosidad y, por tanto, la penetración de moléculas de agua, permitiendo una mayor capacidad de hinchamiento (Goncalves y cols., 2005).

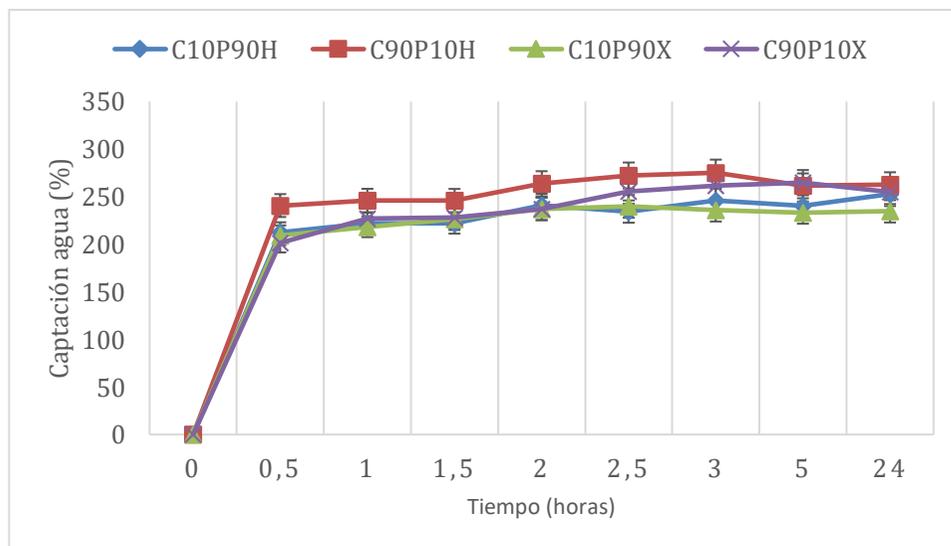


Figura 17. Representación del porcentaje de captación de agua de cada una de las formulaciones de insertos elaboradas.

Otro parámetro influyente en la captación de agua es la estructura química del polímero, así como la presencia de grupos funcionales hidrófilos o hidrófobos en la cadena del polímero, de manera que a mayor número de grupos hidrófilos, mayor será su capacidad para captar agua. En este caso, la formulación con mayor capacidad de hinchamiento está constituida por un mayor porcentaje de quitosano. La estructura de este polímero contiene grupos funcionales hidrófilos como grupos aminas e hidroxilos, que favorecen la captación de agua por parte del hidrogel, provocando la expansión o hinchamiento del mismo. Durante dicho hinchamiento, la estructura reticulada del hidrogel evita la disolución y destrucción de los enlaces cruzados del hidrogel (Ahmadi y cols., 2015).

Del mismo modo, resulta lógico pensar que disminuya la capacidad de captación de agua de los insertos con menor proporción de quitosano, al disminuir el número de grupos hidrófilos, disminuyendo de este modo la captación de agua (Roy y cols., 2009).

En cuanto a la inclusión de HPMC o goma xantana en las formulaciones, parece ser que HPMC favorece un poco más, aunque no de forma significativa, la capacidad de hinchamiento del inserto, respecto al que contiene goma xantana. Esto es debido a que HPMC contiene grupos metoxi e hidroxipropilo, que le confieren capacidad hidrófila a la formulación, favoreciendo la captación de agua. Sin embargo, la naturaleza aniónica de la goma xantana provoca interacciones con quitosano, que influye en la estructura del inserto, disminuyendo su capacidad para captar agua (McInnes y cols., 2005).

Haciendo un estudio comparativo entre la capacidad de hinchamiento de cada uno de los insertos con su morfología, se observa que los insertos constituidos por Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC presentan una superficie altamente porosa, debida a su baja densidad de entrecruzamiento polimérico, que permite la formación de poros, que favorecerán la captación de agua, consiguiendo un hinchamiento eficiente y rápido del inserto (Hosseini y cols., 2013). Como ha sido explicado en el apartado anterior, la inclusión de HPMC en la formulación, supone la inclusión de grupos hidrófilos, que van a favorecer la capacidad para captar agua,

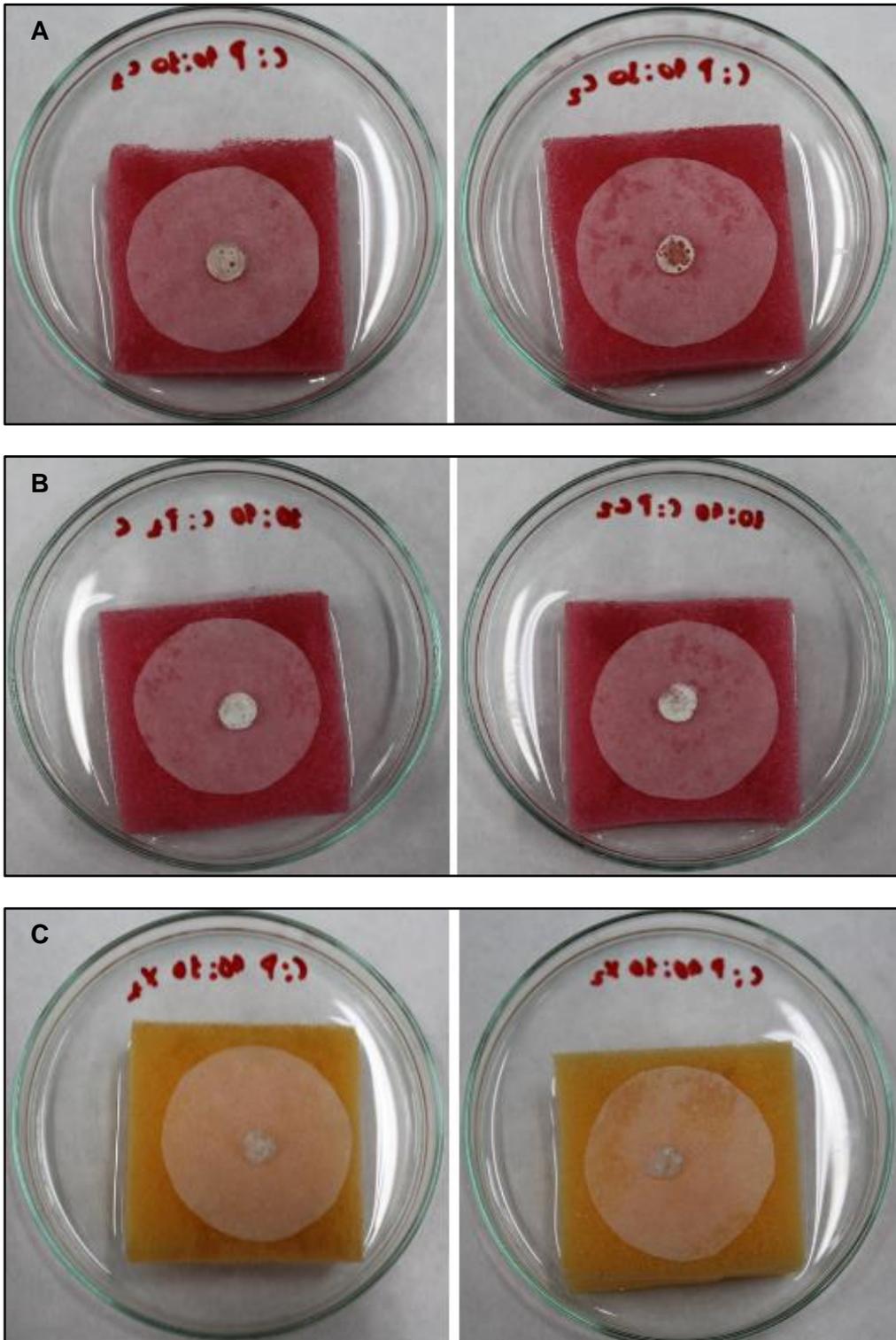
de forma que las primeras moléculas de agua que penetran en el inserto hidratan los grupos polares hidrofílicos, observándose un rápido incremento en el porcentaje de absorción de agua en los primeros 30 minutos (Figura 17). Esto se debe a la gran cantidad de grupos hidrófilos que presenta la molécula de quitosano en su estructura. Después de una rápida absorción, viene una etapa de reposo, en la cual se van exponiendo los grupos hidrofóbicos y van interaccionando con las moléculas de agua a través de enlaces débiles, hasta llegar a absorber el máximo de agua posible, como se observa a las 3 horas. A partir de ahí, el inserto ya no es capaz de seguir absorbiendo agua. El incremento de la capacidad de hinchamiento del inserto se observa en la Figura 18A, donde se visualiza la aparición de pequeños poros en el inserto tras contactar con el medio acuoso durante 30 minutos, así como un incremento de la porosidad con el paso del tiempo, coincidiendo con la máxima captación de agua por parte del inserto. Esta estructura porosa se corresponde con las imágenes del SEM obtenidas al analizar su morfología.

En cambio, los insertos constituidos por Quitosano/Pluronic 10:90 con HPMC muestran menor capacidad de hinchamiento al contactar con el medio acuoso. En la Figura 17 se observa un incremento de la captación de agua a los 30 minutos, aunque mucho menor que en los insertos de Quitosano/Pluronic 90:10 y continúa aumentando su hinchamiento hasta las 3 horas gradualmente. Esto se debe a la presencia de un mayor porcentaje de Pluronic, que produce un aumento de la agregación micelar, aumentando el enmarañamiento de las cadenas poliméricas, de forma que dificulta la formación de poros, lo que conlleva a una menor captación de agua por parte del inserto (Domínguez-Delgado, 2016). En la Figura 18B, se visualiza la menor captación de agua por parte del inserto a los 30 minutos, de forma que el inserto muestra poco hinchamiento si se compara con la Figura 18A, que favorece la aparición de poros. A las 24 horas, muestra una mayor humectación respecto a los 30 minutos, aunque sigue reflejando una capacidad de captación de agua menor que la formulación 18A.

Sin embargo, en la Figura 17, los insertos constituidos por Quitosano/Pluronic 90:10 con goma xantana muestran un menor porcentaje de captación de agua a los

30 minutos con respecto al resto de formulaciones, aunque a partir de la primera hora comienza a incrementar su hinchamiento de forma gradual hasta las 5 horas, que comienza a decrecer. Este comportamiento queda reflejado en la Figura 18C, donde se observa escasa capacidad de hinchamiento a los 30 minutos, mientras que a las 24 horas de contacto del inserto con el medio acuoso, puede observarse cómo el inserto está totalmente humectado. Se piensa que su gran capacidad de hinchamiento es debido a la elevada proporción de quitosano en la formulación, cuyos grupos hidrófilos que conforman las cadenas poliméricas favorecen la captación de agua, como ya ha sido expuesto anteriormente. Parece ser que la presencia de goma xantana en la formulación es la responsable de que disminuya la capacidad de captación de agua por parte del inserto, achacable a una posible interacción entre la goma xantana (carácter aniónico) y quitosano (carácter catiónico), de forma que aumenta el grado de entrecruzamientos poliméricos entre quitosano y goma xantana, por lo que disminuye considerablemente el número de poros, así como su diámetro, viéndose reflejado en el porcentaje de captación de agua, de manera que al disminuir su porosidad, disminuye también su capacidad de hinchamiento (Dehghan y Marzuke, 2014).

Por último, la formulación que conlleva menor capacidad para captar agua es la constituida por Quitosano/Pluronic 10:90 con goma xantana (Figura 17). Este resultado es lógico, según lo expuesto anteriormente, ya que la mayor proporción de Pluronic en la formulación conlleva a una menor capacidad para captar agua, debido al aumento del enmarañamiento micelar que dificulta la captación de agua. Por otro lado, la presencia de goma xantana en la formulación, no favorece la captación de moléculas de agua. En la Figura 18D se visualiza la escasa captación de agua por parte del inserto, donde puede observarse una captación de agua similar a los 30 minutos que a las 24 horas.



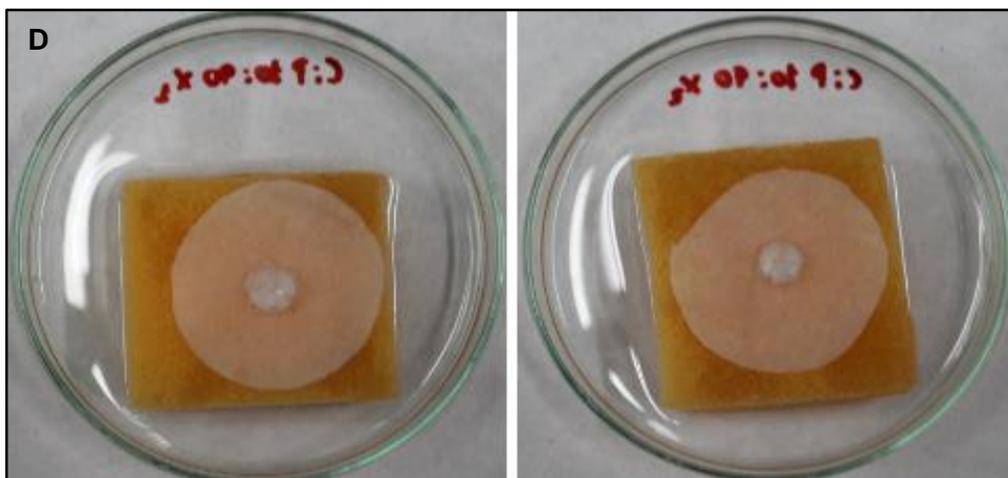


Figura 18. Imágenes del estudio de hinchamiento de los insertos a tiempo 30 minutos (izquierda) y 24 horas (derecha). A. Insertos Chitosan/Pluronic 10:90 + HPMC; B. Insertos Chitosan/Pluronic 90:10 + HPMC; C. Insertos Chitosan/Pluronic 90:10 + Goma xantana; D. Insertos Chitosan/Pluronic 10:90 + Goma xantana.

4.4.2.3. Uniformidad de contenido

El análisis de uniformidad de contenido realizado a las formulaciones de los insertos muestra variación en sus resultados.

El estudio del porcentaje de levodopa recuperado en los insertos se muestra en la Figura 19. Los insertos constituidos por Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC mostraron resultados favorables, con porcentajes de recuperación del principio activo en torno al 90%. La Real Farmacopea Española 5ª edición establece como criterio de aceptación, que el porcentaje de principio activo se encuentre dentro del intervalo de 85% a 115%. En cambio, los insertos de Quitosano/Pluronic 10:90 con HPMC presentaron valores medios del 70%, los insertos Quitosano/Pluronic 90:10 con goma xantana en torno al 62,67% de principio activo y los insertos de Quitosano/Pluronic 10:90 con goma xantana presentaron un 57% de levodopa.

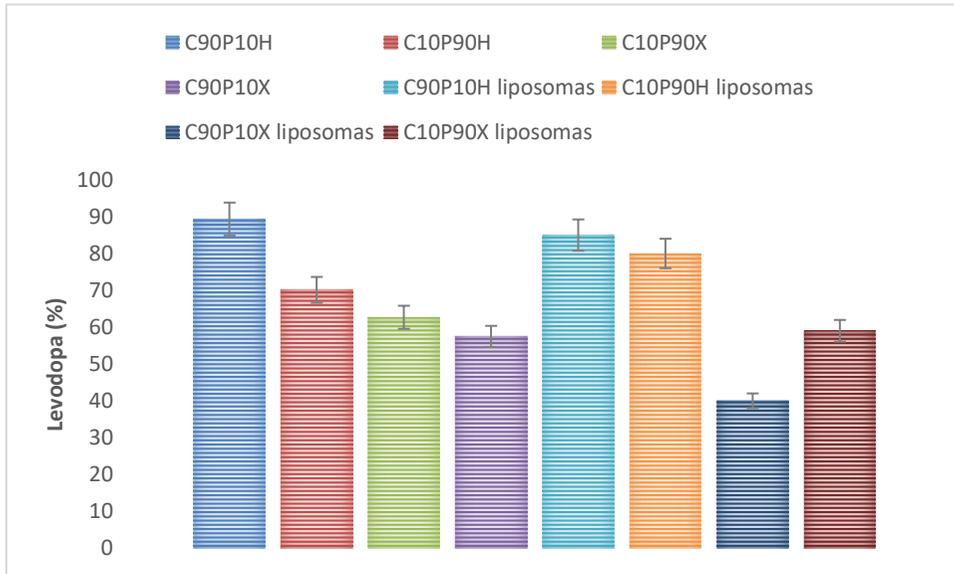


Figura 19. Uniformidad de contenido de los insertos de levodopa.

Por otro lado, las formulaciones que incluyeron liposomas mostraron elevados porcentajes de recuperación de fármacos, siendo la formulación constituida por Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC la que alcanza mayor porcentaje de recuperación, en torno al 87%. Al igual que ocurre en las formulaciones sin liposomas, la presencia de goma xantana no favorece la obtención de lotes homogéneos en cuanto a contenido, mostrando unos valores en torno al 55% en la formulación Quitosano/Pluronic 10:90 y 40% en la formulación Quitosano/Pluronic 90:10.

Por consiguiente, este estudio demuestra que la formulación Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC es la única que cumple el objetivo de uniformidad de contenido.

4.4.2.4. Mucoadhesión

Para determinar la capacidad adhesiva de los insertos en la mucosa nasal, se realizó un estudio *in vitro* de la fuerza mucoadhesiva de cada una de las formulaciones expuestas en la Tabla 4.

En la Figura 20 se observó que la formulación constituida por Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC es la que presenta mayor fuerza mucoadhesiva. La segunda formulación con mayor capacidad de adhesión es la formada por

Quitosano/Pluronic 90:10 con goma xantana, de manera que las formulaciones con mayor proporción de quitosano, son las que van a tener mayor capacidad de adhesión a la mucosa nasal.

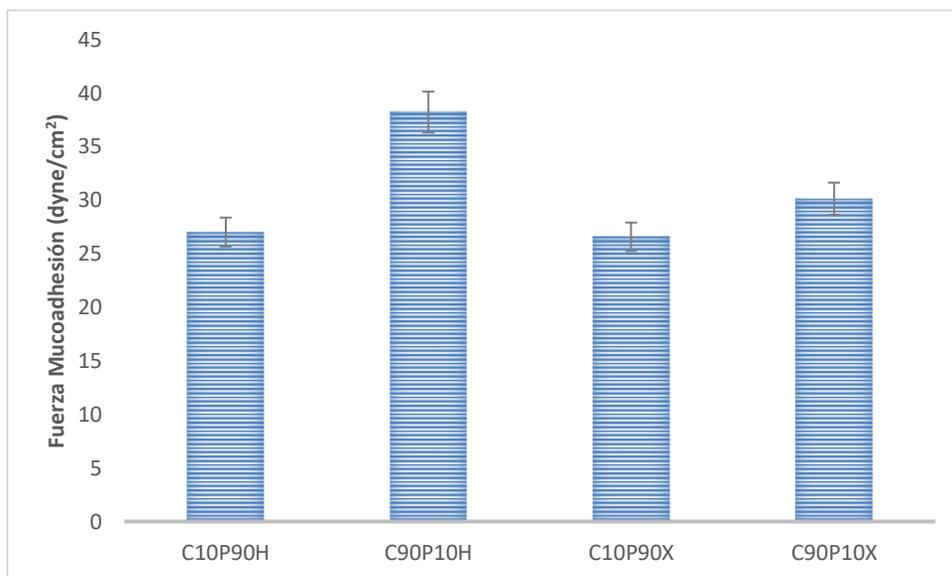


Figura 20. Estudio de mucoadhesión de los insertos intranasales de levodopa y ácido ascórbico.

Numerosos investigadores han demostrado las propiedades mucoadhesivas del polímero quitosano (Harikarnpakdee y cols., 2006; Sun y cols., 2009). Al aumentar la proporción de quitosano, se produce un aumento del número de grupos amino cargados positivamente, que van a interactuar fuertemente con la glicoproteína y el ácido siálico de la mucosa nasal, cargadas negativamente, aumentando la capacidad mucoadhesiva de la formulación (Martinac y cols., 2005; Hafner y cols., 2007).

Así, los insertos elaborados con menor proporción de quitosano presentan una disminución en su capacidad mucoadhesiva, ya que al disminuir el número de cargas positivas aportadas por los grupos amino del polímero, se reduce su capacidad de interacción con la mucosa nasal. Por su parte, el polímero Pluronic no destaca por su capacidad bioadhesiva, sino por su capacidad gelificante, de tal forma que un incremento en la proporción de este polímero no influye positivamente en la capacidad de adhesión de los insertos (Archana y Maheshwari, 2011). Es por ello

que las formulaciones Quitosano/Pluronic 10:90 con HPMC o goma xantana muestran menor capacidad de mucoadhesión.

Por otro lado, no se observan grandes diferencias en la capacidad mucoadhesiva al emplear HPMC o goma xantana en la formulación, quedando patente que el factor dominante es la proporción de quitosano empleado en la formulación.

Cabe destacar la coincidencia en los resultados obtenidos tras la medición de la capacidad de hinchamiento de las distintas formulaciones de insertos con los resultados obtenidos en la capacidad mucoadhesiva, de tal forma que los insertos con mayor capacidad de hinchamiento son los que presentaron una mayor capacidad de adhesión a la mucosa nasal.

Tras administrar los insertos liofilizados en la cavidad nasal, se produce la hidratación de los insertos tras su contacto con la mucosa nasal, lo que induce la formación de redes gelificantes capaces de interactuar con la mucosa nasal como resultado del entrecruzamiento físico y mediante enlaces secundarios como enlaces de hidrógeno o fuerzas de Van der Waals. De hecho, la capacidad de captación de agua de los insertos aumenta la movilidad de las cadenas poliméricas lo que facilita la interpenetración e interacción con la capa mucosa (Domínguez-Delgado y cols., 2016). De esta manera, a mayor capacidad para captar agua, mayor es la movilidad de las cadenas poliméricas, que conlleva a una mayor interacción electrostática que favorecen la interacción de la formulación con la mucosa nasal, aumentando la fuerza mucoadhesiva (Jadhav y cols., 2009).

4.4.2.5. Estudios de liberación *in vitro*

El estudio de liberación *in vitro* se realizó con el fin de dilucidar la influencia de la composición de los insertos intranasales en el proceso de liberación del fármaco incluido en liposomas. La composición de los insertos seleccionados para este estudio fue Quitosano/Pluronic 90:10 y 10:90 con HPMC.

Para obtener los perfiles de liberación, se representó el porcentaje de liberación de levodopa frente al tiempo, incluyendo como control una solución standard de levodopa.

Como cabe esperar, se observaron dos comportamientos claramente diferenciados: el primero, el perfil correspondiente a la solución de levodopa, que libera rápidamente alcanzando su máxima liberación a las 2 horas (casi un 80%) y el segundo, los perfiles de los liposomas incluidos en los insertos intranasales donde se visualiza una modulación en la liberación de levodopa.

Como se observa en la Figura 21, los insertos compuestos por Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC muestran un mayor porcentaje de liberación del fármaco, en torno al 70% de levodopa es liberada a las 4 horas de comenzar el estudio. En cambio, los insertos constituidos por Quitosano/Pluronic 10:90 con HPMC muestran una liberación de levodopa en torno al 40% en torno a las 5-6 horas del inicio del estudio.

Estos resultados concuerdan con lo obtenido en apartados anteriores, donde los insertos constituidos por Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC muestran una estructura porosa, con capacidad para captar mayor porcentaje de agua, que se traduce en una mejor liberación del fármaco a lo largo del tiempo.

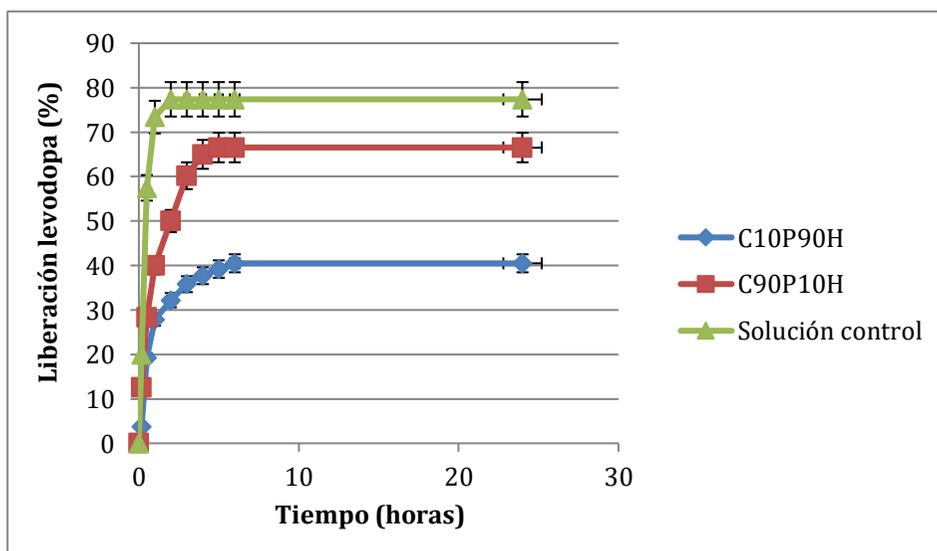


Figura 21. Perfiles de liberación in vitro de insertos constituidos por levodopa-AA/HP- β -CD y solución control.

4.4.2.6. Estudios de permeación *ex vivo*

Se realizó el estudio de permeación *ex vivo* sobre la mucosa nasal de cerdo, simulando la mucosa nasal humana, con el objetivo de establecer la posibilidad de administrar los insertos por vía intranasal como posible vehículo de nuestra formulación. Para ello, se colocaron cantidades iguales de la formulación elaborada en los insertos constituidos por Quitosano/Pluronic 90:10 y 10:90 con HPMC en la superficie de la mucosa nasal de cerdo, en el compartimento donador para evaluar su capacidad de penetración a través de la mucosa (Figura 22).

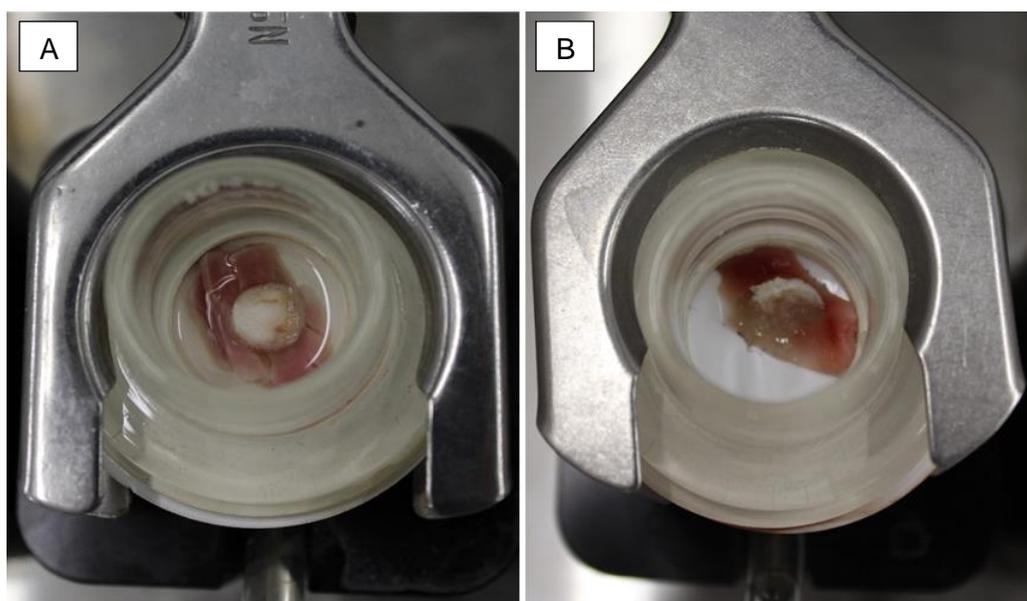


Figura 22. Estudio de permeación *ex vivo* en membrana de cerdo. A. Permeación de fármaco a tiempo 0; B: Permeación de fármaco a las 24 horas.

En la Figura 23 se representan los perfiles de permeación de levodopa en las distintas formulaciones de los insertos, usando como control una solución estándar de levodopa (1 mg/mL).

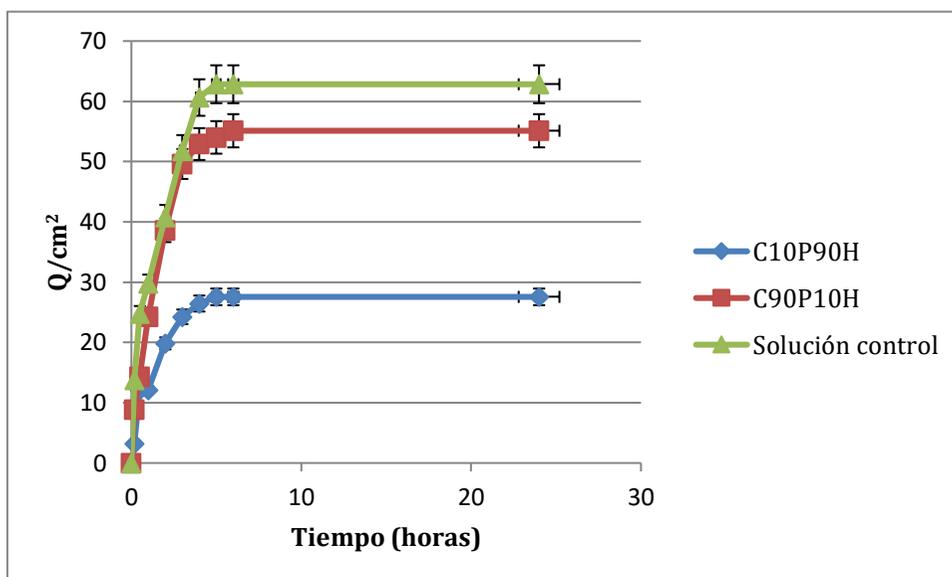


Figura 23. Perfiles de permeación *ex vivo* de insertos constituidos por levodopa-AA/HP- β -CD y solución control.

Tal como se observa en la gráfica, la permeación de levodopa incrementó de forma directamente proporcional con el tiempo, mostrando una tendencia lineal en las primeras 4 horas. Al representar la cantidad de fármaco acumulado en el compartimento receptor por unidad de área (Q/cm^2) frente al tiempo, se obtuvo una recta a partir de la cual pudieron calcularse los parámetros de permeación: flujo y coeficiente de permeabilidad. Los valores de estos parámetros se recogen en la Tabla 12.

Formulación	% permeado (24 horas)	J ($mg/cm^2/min$)	P (cm/min)
Solución control	57	$4,3 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-2}$
C ₉₀ P ₁₀ H	50	$3,8 \times 10^{-2}$	$1,3 \times 10^{-2}$
C ₁₀ P ₉₀ H	25	$1,9 \times 10^{-2}$	$6,8 \times 10^{-3}$

Tabla 12. Valores obtenidos de porcentaje de permeación de levodopa, coeficiente de permeabilidad (P) y flujo (J) para cada formulación ensayada.

Los resultados obtenidos demuestran que los coeficientes de permeabilidad (P) y los valores de flujo (J) están directamente relacionados con el porcentaje de permeación en cada formulación. El flujo permeado de levodopa fue superior en los insertos constituidos por Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC.

Los insertos elaborados con Quitosano/Pluronic 90:10 con HPMC muestran un mayor porcentaje de permeación del fármaco (55%), alcanzando su máximo porcentaje de permeación a las 6 horas.

Este tipo de inserto parece ser un buen candidato para la administración intranasal de nuestra formulación, proporcionando una permeación prolongada del fármaco durante más de 6 horas (Luppi y cols., 2010)

Autores como McInnes y cols. (2005) demostraron que la inclusión de HPMC en los insertos liofilizados promovía un aumento en el tiempo de residencia del inserto en la cavidad nasal. Por otro lado, el quitosano tiene gran capacidad mucoadhesiva, lo cual también influye en el tiempo de residencia del inserto en la mucosa nasal, factores que favorecen la liberación y permeación por parte del fármaco.

CONCLUSIONES

Primera. La inclusión de levodopa y ácido ascórbico en complejos de inclusión favorece la estabilidad del fármaco. Las ciclodextrinas β e HP- β muestran resultados favorables, protegiendo al fármaco del medio externo. El estudio de solubilidad de fase sugiere una estequiometría 1:1 fármaco:complejo de inclusión.

Segunda. La sustitución de colesterol por colesterol-hemisuccinato en la elaboración de los liposomas, solventa el problema de competencia entre la β -CD y el colesterol.

Tercera. La elaboración de los liposomas de levodopa-AA/CD mediante TLE y añadiendo el agente de carga DCP muestra resultados favorables. Los liposomas de L-dopa-AA/ β -CD presentan un tamaño de 457 nm, potencial z -18,4 y eficacia de encapsulación 64,5%, mientras que los liposomas de L-dopa-AA/HP- β -CD presentan un tamaño de 463 nm, potencial z -19,1 y eficacia de encapsulación 66,1%.

Cuarta. El estudio en co-cultivos celulares mostró el carácter citotóxico de la β -CD, solventándose el problema sustituyéndola por la HP- β -CD. Esto es debido a la necesidad de la β -CD por competir con el colesterol que conforman las células, produciendo muerte neuronal. Por otro lado, se concluyó la necesidad de controlar la presencia de trazas de cloroformo en la formulación, aumentando el tiempo de evaporación en el proceso de elaboración de los liposomas.

Quinta. Los insertos intranasales liofilizados desarrollados permiten administrar la formulación optimizada de levodopa por vía intranasal, de manera que el fármaco pueda acceder directamente desde la cavidad nasal hacia el cerebro, mediante una técnica no invasiva. Estos insertos son elaborados con agentes mucoadhesivos que favorecen el tiempo de permanencia del fármaco en contacto con la mucosa nasal.

Sexta. Los insertos elaborados con los geles Chitosan/Pluronic en proporción 90:10 (v/v) y añadiendo HPMC presentan una estructura porosa, que favorece la capacidad de hinchamiento del inserto, factor que influye en una mayor capacidad bioadhesiva de la mucosa nasal. Esta formulación aumenta el tiempo de residencia del inserto en la cavidad nasal, de forma que la liberación del fármaco se ve

favorecida. Esta formulación es la única que cumple los criterios que establece la Real Farmacopea Española sobre uniformidad de contenido, ya que hemos obtenido un valor del 90%.

BIBLIOGRAFÍA

- Abraham SA, Waterhouse DN, Mayer LD, Cullis PR, Madden TD, Bally MB. The liposomal formulation of doxorubicin. *Methods Enzymol.* 2005; 391: 71-97.
- Aggarwal BB, Shishodia S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. *Biochem Pharmacol.* 2006; 71: 1397-142.
- Agu R, Dang HV, Jorissen M, Willems T, Vandoninck S, Lint JV. In vitro polarized transport of L-phenylalanine in human nasal epithelium and partial characterization of the amino acid transporters involved. *Pharm Res.* 2003; 20 (8): 1125-1132.
- Ahmadi F, Oveisi Z, Samani SM, Amoozgar Z. Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications. *Res Pharm Sci.* 2015; 10(1): 1-16.
- Ahn J, Grun IU, Mustapha A. Effects of plant extracts on microbial growth, color change, and lipid oxidation in cooked beef. *Food Microbiol.* 2007; 24: 7-14.
- Ak T, Gülçin I. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. *Chem Biol Interact.* 2008; 174: 27-37.
- Algin-Yapar E. Nasal inserts for drug delivery: an overview. *Trop J Pharm Res.* 2014; 13(3): 459.
- Alhalaweh A, Andersson S, Velaga SP. Preparation of zolmitriptan-chitosan microparticles by spray drying for nasal delivery. *Eur J Pharm Sci.* 2009; 38: 206-214.
- Allen TM, Moase EH. Therapeutic opportunities for targeted liposomal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996; 21(2): 117-133.
- Allhenn D, Boushehri MAS, Lamprecht A. Drug delivery strategies for the treatment of malignant gliomas. *Int J Pharm.* 2012; 436: 299-310.
- Alsarra IA, Hamed AY, Alanazi FK. Acyclovir liposomes for intranasal systemic delivery: development and pharmacokinetics evaluation. *Drug Deliv.* 2008; 15: 313-321.

Ameller T, Marsaud V, Legrand P, Gref R, Barratt G, Renoir JM, Polyesterpoly (ethylene glycol) nanoparticles loaded with the pure antiestrogen RU 58668: physicochemical and opsonization properties. *Pharm Res.* 2003; 20: 1063-1070.

Anantharam V, Kitazawa M, Wagner J, Kaul S, Kanthasamy AG. Caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cdelta is essential for oxidative stress-mediated dopaminergic cell death after exposure to methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl. *J Neurosci.* 2002; 22: 1738-1751.

Anantharam V, Kitazawa M, Wagner J, Kaul S, Kanthasamy AG. Caspase-3-dependent proteolytic cleavage of protein kinase Cdelta is essential for oxidative stress-mediated dopaminergic cell death after exposure to methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl. *J Neurosci.* 2002; 22: 1738-1751.

Anantharam V, Lehrmann E, Kanthasamy A, Yang Y, Banerjee P, Becker KG, Freed WJ, Kanthasamy AG. Microarray analysis of oxidative stress regulated genes in mesencephalic dopaminergic neuronal cells: relevance to oxidative damage in Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2007; 50(6): 834-847.

Anantharam V, Lehrmann E, Kanthasamy A, Yang Y, Banerjee P, Becker KG, Freed Wj, Kanthasamy AG. Microarray analysis of oxidative stress regulated genes in mesencephalic dopaminergic neuronal cells: relevance to oxidative damage in Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2007; 50: 834-847.

Ansari MJ, Parveen R. Solubility and stability enhancement of curcumin: Improving drug properties of natural pigment. *Drug Dev Ther.* 2016; 7(2): 113-116.

Ansel SM, Harasym IT, Tardi PG, Buchkowsky SS, Bally MB, Cullis PR. Antibody conjugation methods for active targeting of liposomes. En: *Drug targeting: strategies, principles, and applications* (Francis GE, Delgado C. Ed.) Humana Press Inc, Totowa. 2000: 51-67.

Antolovich M, Prenzler PD, Patsalides E, McDonald S, Robards K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst.* 2002; 127(1): 183-198.

Archana A, Maheshwari RK. Formulation development and evaluation of in situ nasal gel of poorly water soluble drug using mixed solvency concept. *Asian J Pharm.* 2011; 5(3): 15-27.

Arima H, Miyaji T, Irie T, Hirayama F, Uekama K. Enhancing effect of hydroxypropyl β -cyclodextrin on cutaneous penetration and activation of Ethyl-4-biphenyl acetate in hairless mouse skin. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 6: 53-59.

Ayen WY, Kumar N. A systematic study on lyophilization process of polymersomes for long-term storage using doxorubicin-loaded (PEG) 3-PLA nanopolymersomes. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 46: 405-414.

Bach D, Miller IR. Hydration of phospholipid bilayers in the presence and absence of cholesterol. *Chem Phys Lipids.* 1995; 136: 67-72.

Badwe RA, Thorat MA. Autoantibodies in prostate cancer. *N Engl J Med.* 2005; 353(26): 2815-2817.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2003; 16: 1-13.

Bangham AD. Membrane models with phospholipids. *Prog Biophys Mol Biol.* 1968; 18: 29-36.

Barenholz Y, Amselem S. *Liposome technology*, 2nd ed. 1993; 1: 527.

Bartus RT, Weinberg MS, Samulski RJ. Parkinson's disease gene therapy: success by design meets failure by efficacy. *Molecular Therapy.* 2014; 22(3): 487-497.

Basnet P, Skalki-Basnet N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. *Molecules.* 2011; 16(6): 4567-4598.

Béduneau A, Saulnier P, Hindré F, Clavreul A, Leroux JC, Benoit JP. Design of targeted lipid nanocapsules by conjugation of whole antibodies and antibody Fab' fragments. *Biomaterials.* 2007; 33: 4978-4990.

- Began G, Sudharshan E, Sankar KU, Appu Rao AG. Interaction of curcumin with phosphatidylcholine: a Spectrofluorometric study. *J Agric Food Chem.* 1999; 47: 4992-4997.
- Belfast M, Lu R, Capen R, Zhong J, Nguyen MA, Gimenez J, Sitrin R, Mancinelli R. A practical approach to optimization and validation of HPLC assay for analysis of polyribosyl-ribitol phosphate in complex combination vaccines. *J Chromatogr B.* 2006; 832(2): 208-215.
- Berger J, Reist M, Mayer JM, Felt O, Peppas NA, Gurny R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm.* 2004; 57(1): 19-34.
- Berger N, Sachse A, Bender J, Schubert R, Brandl M. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *Int J Pharm.* 2001; 223: 55-68.
- Berger N, Sachse A, Bender J, Schubert R, Brandl M. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *Int J Pharm.* 2001; 223: 55-68.
- Bermejo MV. Seminario Liofilización. Baxter (1999).
- Bernacki J, Dobrowolska A, Nierwinska K, Malecki A. Physiology and pharmacological role of the blood-brain barrier. *Pharm Res.* 2008; 60: 600-622.
- Berth G, Dautzenberg H. The degree of acetylation of chitosans and its effect on the chain conformation in aqueous solution. *Carbohydrate Polymers.* 2002; 47: 39-51.
- Bertolotto JA, Roston GB, Ascheri ME, Corral GM. Resolución de la ecuación diferencial de Smoluchowski por métodos de perturbación. *Rev Mecánica Computacional.* 2006; 15: 1033-1038.
- Bertram U, Bodmeier R. In situ gelling, bioadhesive nasal inserts for extended drug delivery: In vitro characterization of a new nasal dosage form. *Eur J Pharm Sci.* 2006; 27: 62-71.

Betageri GV, Parsons DL. Drug encapsulation and release from multilamellar and unilamellar liposomes. *Int J Pharm.* 2006; 81: 235-241.

Bielski BHJ, Cabelli DE, Arudi RL, Ross AB. Reactivity of H₂O₂/O₂ radicals in aqueous solution. *J Phys Chem Ref Data.* 1985; 14: 1041:1100.

Biesalski HK. Polyphenols and inflammation: Basic interactions. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2007; 10: 724-728.

Bigucci F, Luppi B, Cerchiara T, Sorrenti M, Bettinetti G, Rodriguez L, Zecchi V. Chitosan/pectin polyelectrolyte complexes: selection of suitable preparative conditions for colon-specific delivery of vancomycin. *Eur J Pharm Sci.* 2008; 35(5): 435-441.

Boado RJ, Pardridge WM. The trojan horse liposome technology for nonviral gene transfer across the blood-brain barrier. *J Drug Deliv.* 2011.

Boado RJ, Zhang YF, Zhang Y, Pardridge WM. Humanization of anti-human insulin receptor antibody for drug targeting across the human blood-brain barrier. *Biotechnol Bioeng.* 2007; 96: 381-391.

Boado RJ. Blood-brain barrier transport of non-viral gene and RNAi therapeutics. *Pharm Res.* 2007; 24: 1772-1787.

Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47: 323-355.

Bogdanffy MS. Biotransformation enzymes in the rodent nasal mucosa: the value of a histochemical approach. *Environ Health Perspect.* 1990; 85: 177-186.

Bonifacio M, Sutcliffe J, Torrao L, Wright L, P Soares-da-Silva P. Brain and peripheral pharmacokinetics of levodopa in the cynomolgus monkey following administration of picapone, a third generation nitrocatechol COMT inhibitor. *Neurochem.* 2014; 77: 334-341.

Born J, Lange T, Kern W. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci.* 2002; 5: 514-516.

- Bors W, Michel C, Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids. *Biofactors*. 1997; 6: 399-402.
- Bounias M, Kladny J, KnLk I, Michalska T. Hydroxyl radical generation during oxidation of catecholamines and DOPA. *Toxicol Environm Chem*. 1997; 60: 163-169.
- Breen HB. The ubiquitin-proteasome proteolysis pathway: potential target for disease intervention. *J Parenter Enteral Nutr*. 2004; 28(4): 272.
- Brito-Armas JM, Castro-Hernández J, Rodríguez-Díaz M, Castro-Fuentes R. Terapia génica no invasiva en enfermedades neurológicas. *Rev Neurología*. 2011; 52: 603-627.
- Briuglia ML, Rotella C, McFarlane A, Lamprou DA. Influence of cholesterol on liposomes stability and on in vitro drug release. *Drug Deliv Transl Res*. 2015; 5(3): 231-242.
- Butterfield DA, Categhna A, Pocernich CB, Drake J, Scapagnini G, Calfbrese V. Nutritional approaches to combat oxidative stress in Alzheimer's disease. *J Nutr Biochem*. 2002; 13: 444-461.
- Carlsson A. Treatment of Parkinson's with L-DOPA. The early discovery phase, and a comment on current problems. *J Neural Transm (Vienna)*. 2002; 109(5-6): 777-787.
- Carr AC, Frei B. Does vitamin C act as pro-oxidant under physiological conditions?. *Faseb J*. 1999; 13: 1007-1024.
- Ceschek Gc, Maffei P, Porzio S, Melillo G, Caselli GF, Dragani MC, Gentile MM, Clavenna G. In vitro permeation screening of a new formulation of thiocolchicoside containing various enhancers. *Drug Deliv*. 2002; 9(4): 259-263.
- Chana P, Kuntsmann C, Reyes-Parada M, Sáez-Briones P. Delayed early morning turn «ON» in response to a single dose of levodopa in advanced Parkinson's disease: pharmacokinetics should be considered. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009; 75: 1782-1783.

Chang J, Jallouli Y, Kroubi M, Yuan XB, Feng W, Kang CS, Pu PY, Betbeder D. Characterization of endocytosis of transferrin-coated PLGA nanoparticles by the blood-brain barrier. *Int J Pharm.* 2009; 379: 285-292.

Chapman CD, Frey WH, Craft S, Danielyan L, Hallschmid M, Schiöth HB, Benedict C. Intranasal treatment of central nervous system dysfunction in humans. *Pharm Res.* 2013; 30(10): 2475-2484.

Chaudhury A, Dasb S, Leea RFS, Tana KB, Wai-Kiong N, Reginald BH, Gigi NC, Chiua P. Lyophilization of cholesterol-free PEGylated liposomes and its impact on drug loading by passive equilibration. *Int J Pharmacol.* 2011; 430: 167-175.

Chen C, Johnston DT, Jeon H, Gedaly R, McHugh PP, Burke TG, Ranjan D. An in vitro study of liposomal curcumin: Stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. *Int J Pharm.* 2009; 366: 133-139.

Chen L, Wesley J, Bhattachar S, Ruiz B, Bahash K, Babu S. Dissolution behavior of a poorly water soluble compound in the presence of Tween 80. *Pharm Res.* 2003; 20: 797-801.

Chen Y, Dalwadi G, Benson HAE. Drug delivery across the blood-brain barrier. *Curr Drug Deliv.* 2004; 1: 361-376.

Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64(7):640-65.

Chen Y, Liu L. Modern methods for delivery of drugs across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012; 64: 640-665.

Choi H, Jung J, Yong CS, Rhee C, Lee M, Han J, Park K, Kim C. Formulation and in vivo evaluation of omeprazole buccal adhesive tablet. *J Control Rel.* 2000; 68: 405-412.

Choudhury ST, Das N, Ghosh S, Ghosh D, Chakraborty S, Ali N. Vesicular (liposomal and nanoparticulated) delivery of curcumin: a comparative study on carbon tetrachloride-mediated oxidative hepatocellular damage in rat model. *Int J Nanomedicine.* 2016; 18(11): 2179-93.

Choudhury ST, Das N, Ghosh S, Ghosh D, Chakraborty S, Ali N. Vesicular (liposomal and nanoparticulated) delivery of curcumin: a comparative study on carbon tetrachloride-mediated oxidative hepatocellular damage in rat model. *Int J Nanomedicine*. 2016; 18(11): 2179-2193.

Clares B. Sistema de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de Acetónido de Triamcinolona. Tesis Doctoral. Granada. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada (2003).

Clares B. Sistema de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona. Tesis Doctoral. Granada. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Granada (2003).

Clares-Naveros B. Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona. Tesis doctoral. Universidad de Granada (2003).

Contley RT. Espectroscopía Infrarroja. Ed. Alhambra (1979).

Costantino HR, Illum L, Brandt G, Johnson PH, Quay SC. Intranasal delivery: physicochemical and therapeutic aspects. *Int J Pharm*. 2007; 337: 1-24.

Cózar-Bernal MJ, García-Esteban E, Sánchez-Soto PJ, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Surface functionalizing of a lipid nanosystem to promote brain targeting: step-by-step design and physico-chemical characterization. *Pharm Dev Technol*. 2015; 21(7): 823-831.

Cózar-Bernal MJ, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Development and validation of a high performance chromatographic method for determining sumatriptan in niosomes. *J Pharm Biomed Analysis*. 2013; 72: 251-260.

Cózar-Bernal MJ, Rabasco AM, Villasmil S, González-Rodríguez ML. Novedades en inmunoliposomas funcionalizados como sistemas vectores de péptidos a nivel cerebral. *Rev Ind Farm*. 2012; 171: 51-62.

Dahlin M, Jansson B, Bjork E. Levels of dopamine in blood and brain following nasal administration to rats. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 14: 75-80.

Davie CA. A review of Parkinson's disease. *British medical bulletin.* 2008; 86(1): 109-127.

De la Casa B. *Guía informativa de la enfermedad del Parkinson.* 2013.

De la Torre R. Determinación de la actividad de superóxido dismutasa en poblaciones humanas normales y patológicas. Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid (1994).

De Luca MA, Lai F, Corrias F, Caboni P, Bimpisidis Z, Maccioni E, Fadda AM, Di Chiara G. Lactoferrin- and antitransferrin-modified liposomes for brain targeting of the NK3 receptor agonist senktide: preparation and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2015; 479: 129-137.

Deane KH, Spieker S, Clarke CE. Catechol-O-methyltransferase inhibitors for levodopa-induced complications in Parkinson's disease. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004; 4: CD004554.

Decker EA, Warner K, Richards MP, Shahidi F. Measuring antioxidant effectiveness in food. *J Agric Food Chem.* 2005; 53: 4303-4310.

Dehghan MH, Marzuka M. Lyophilized chitosan/xanthan polyelectrolyte complex based mucoadhesive inserts for nasal delivery of promethazine hydrochloride. *Iranian J Pharm Res.* 2014; 13(3): 769-784.

Del Valle EMM. Cyclodextrins and their uses: A review. *Process Biochem.* 2004; 39: 1033-1046.

Dennis MS, Watts RJ. Transferrin antibodies into the brain. *Neuropsychopharmacology.* 2012; 37: 302-303.

Dhakar RC, Maurya SD, Tilak VK, Gupta AK. A review on factors affecting the design of nasal drug delivery system. *Int J Drug Del.* 2011; 3: 194-208.

Dhule SS, Penfornis P, Frazier T, Walker R, Feldman J, Tan G. Curcumin-loaded γ -cyclodextrin liposomal nanoparticles as delivery vehicles for osteosarcoma. *Nanomedicine*. 2012; 8: 440-451.

Dhuria SV, Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci*. 2010; 99(4): 1654-1673.

Ding WX, Qi XR, Fu Q, Piao HS. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of sterylglucoside-modified liposomes for levonorgestrel delivery via nasal route. *Drug Deliv*. 2007; 14: 101-104.

Dinkova-Kostova AT, Talalay P. Relation of structure of curcumin analogs to their potencies as inducers of Phase 2 detoxification enzymes. *Carcinogenesis*. 1999; 20(5): 911-914.

Domínguez-Delgado CL, Fuentes-Prado E, Escobar-Chávez JJ, Vidal-Romero G, Rodríguez-Cruz IM, Díaz-Torres R. Chitosan and pluronic® F-127: pharmaceutical applications. *Biomed Polymers Polymeric Biomat*. 2016; 12: 1513-1535.

Dos Santos J, Dockal E, Cavalheiro E. Thermal behavior of Schiff bases from chitosan. *J Therm Anal Calorim*. 2005; 79: 243-248.

Dua J, Rana A, Bhandari A. Liposomes: methods of preparation and applications. *Int J Pharm Studies Res*. 2012; 3(2): 14-20.

Duncan RJS, Weston PD, Wrigglesworth R. A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins and its use in the preparation of conjugates for immunoassay. *Anal Biochem*. 1983; 132: 68-73.

Ekelund K, Osth K, Pålhorstorp C, Björk E, Ulvenlund S, Johansson F. Correlation between epithelial toxicity and surfactant structure as derived from the effects of polyethylynyoxide surfactants on caco-2 monolayers and pig nasal mucosa. *J Pharm Sci*. 2005; 94:730-44.

Eriksen JL, Wszolek Z, Petrucelli L. Molecular pathogenesis of parkinson disease. *Arch Neurol*. 2005; 62(3): 353.

Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J Pharm Pharm Sci.* 2006; 9(3): 339-358.

Esposito E, Fantin M, Marti M, Drechsler M, Paccamiccio L, Mariani P, Sivieri E, Lain F, Menegatti E, Morari M, Cortesi R. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bromocriptine. *Pharm Res.* 2008; 25(7): 1521-1530.

Estella-Hermoso A, Lasa-Saracibar B, Campanero M. Lipid nanoparticles in biomedicine, encyclopedia of nanoscience and nanotechnology, American Scientific Publishers. 2011: 455-478.

Fan S. The history of dopamine and Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2008; 23(3): 497-508.

Fazil M, Md S, Haque S. Development and evaluation of rivastigmine loaded chitosan nanoparticles for brain targeting. *Eur J Pharm Sci.* 2012; 47: 6-15.

Femenía-Font A, Balaguer-Fernández C, Merino V, Rodilla V, López-Castellano A. Effect of chemical enhancers on the in vitro percutaneous absorption of sumatriptan succinate. *Eur J Pharm Biopharm.* 2005; 51: 50-55.

Feng T, Wei Y, Lee R, Zhao L. Liposomal curcumin and its application in cancer. *Int J Nanomedicine.* 2017; 12: 6027-6044.

Fennema I, Owen R. Principles of Food Science: Part I, Food Chemistry. Marcel Dekker, Inc. 1976; 1: 402-409.

Fernández M, Javaid F, Chudasawa V. Advances in targeting the folate receptor in the treatment/imaging of cancers. *Chem Sci.* 2018; 9: 790-810.

Fernández PL, Moreno-González A, Leza-Cerro JC, Lizasoain-Hernández I. Absorción y distribución de fármacos. En: Velázquez, Farmacología básica y clínica. Ed Médica Panamericana. 2011; 31-32.

Fernández-Romero A, González-Rodríguez ML. Formulación y caracterización de liposomas de curcumina y dexametasona para el tratamiento de la osteoartritis. *Ars Pharm.* 2017; 58: 29-31.

Ficarra R, Ficarra P, Di Bella MR. Study of beta-blockers/betacyclodextrins inclusion complex by NMR, DSC, X-ray and SEM investigation. *J Pharm Biomed Anal.* 2000; 23: 33-40.

Figueiras A, Hombach J, Veiga F, Bernkop-Schnurd A. In vitro evaluation of natural and methylated cyclodextrins as buccal permeation enhancing system for omeprazole delivery. *Biopharm.* 2009; 71: 339-345.

Flora SJ. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. *Oxid Med Cellular Longev.* 2009; 2(4): 191-206.

Foerter-Barth U, Teipel U. Characterization of particles by means of laser light diffraction and dynamic light scattering. *Developments in mineral processing. Proceedings of the XXI International Mineral Processing Congress 13: C1-1–C1-8 (2000).*

Frolich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Turk A, Hoyer S, Zochling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 1998; 105: 423-438.

Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):48-57.

Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood-brain barrier to treat brain diseases. *Neurobiol Dis.* 2010; 37: 48-57.

García-Ramos R, López-Valdez E, Ballesteros L, Jesús S, Mir P. Informe de la fundación del cerebro sobre el impacto social de la enfermedad de Parkinson en España. *Neurol.* 2016; 31(6): 401-413.

Gavini E, Hegge AB, Rassu G, Sanna V, Testa C, Pirisino G, Karlsen J, Giunchedi P. Nasal administration of Carbamazepine using chitosan microspheres: In vitro/in vivo studies. *Int J Pharm.* 2006; 307:9-15.

Gavini E, Rassu G, Ferraro L, Generosi A, Rau JV, Brunetti A, Giunchedi P, Dalpiaz A. Influence of chitosan glutamate on the in vivo intranasal absorption of rokitamycin from microspheres. *J Pharm Sci.* 2011; 100: 1488-1502.

Gavini E, Rassu G, Haukvik T, Lanni C, Racchi M, Giunchedi P. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of cyclodextrins. *J Drug Target.* 2008; 17: 168- 179.

Gavini E, Rassu G, Sanna V, Cossu M, Giunchedi P. Mucoadhesive microspheres for nasal administration of an antiemetic drug, metoclopramide: in-vitro/ex-vivo studies. *J Pharm Pharmacol.* 2005; 57: 287-294.

Gennaro I, Alfonso R. Agentes farmacéuticos y medicinales. En: Remington Farmacia, Ed. Médica Panamericana, 20^a ed, Buenos Aires, Argentina. 2001; 1446.

Genta I, Perugini P, Modena T, Pavanetto F, Castelli F, Muzzarelli RAA, Muzzarelli C, Conti B. Myconazole-loaded 6-oxychitin-chitosan microcapsules. *Carbohydr Polym.* 2003; 52: 11–18.

Gharib R, Greige-Gerges H, Fourmentin S, Charcosset C, Auezova L. Liposomes incorporating cyclodextrin–drug inclusion complexes: Current state of knowledge. *Carbohydrate Polymers.* 2015; 129: 175-186.

Gholizadeh S, Dolman EM, Wieriks R, Sparidans RW, Hennink WE, Kok RJ. Anti-GD2 immunoliposomes for targeted delivery of the surviving inhibitor sepantronium bromide (YM155) to neuroblastoma tumor cells. *Pharm Res.* 2018; 35: 85.

Gilbert GJ, Barenholz Y, Bolotin EM, Bansinath M, Turndorf H, Piskoun B. A novel liposomal bupivacaine formulation to produce ultralong-acting analgesia. *Anesthesiology.* 2004; 101(1): 133-137.

Goding JW. Monoclonal antibodies: principles and practice. Academic Press, Orlando. 1986.

- Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “curcumi” from kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol.* 2008; 75(4): 787-809.
- Goncalves VL, Laranjeira MCM, Favere VT, Pedrosa RC. Effect of crosslinking agents on chitosan microspheres in controlled release of diclofenac sodium. *Polimers.* 2005; 15(1): 6-12.
- González-Rodríguez ML, Arroyo CM, Cózar-Bernal MJ, González-R PL, León JM, Calle M, Canca D, Rabasco AM. Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. *Drug Devmikirova Ind Pharm.* 2016; 42(10): 1683-1694.
- González-Rodríguez ML, Barros LB, Palma J, González-Rodríguez PL, Rabasco AM. Application of statistical design to study the formulation variables influencing the coating process of lidocaine liposomes. *Int J Pharm.* 2007; 7: 336-345.
- González-Rodríguez ML, Mouram I, Cózar-Bernal MJ, Villasmil S, Rabasco AM. Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. *J Pharm Sci.* 2012; 101 (10): 3845–3863.
- González-Rodríguez ML, Mouram I, Cózar-Bernal MJ, Villasmil S, Rabasco AM. Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. *J Pharm Sci.* 2012; **101**(10): 3845-3863.
- González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert Opin Drug Del.* 2011; 8 (7): 1-15.
- González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011; 8(7): 1-15.
- Goodsell D. Molecule of the month: superoxide dismutase. *RCSB PDB Protein Data Bank.* 2007; 1-2.
- Groothuis DR. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro Oncol.* 2000; 2: 45-59.

Guastella AJ, Einfeld SL, Gray KM, Rinehart NJ, Tonge BJ, Lambert TJ, Hickie IB. Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. *Biol Psychiatry*. 2010; 67: 692-694.

Gubernator J, Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A, Doroszkiewicz W, Kozubek A. In vitro antimicrobial activity of liposomes containing ciprofloxacin, meropenem and gentamicin against gram-negative clinical bacterial strains. *Lett Drug Design Discov*. 2007; 4: 297-304.

Guerrero S, Muñiz E, Teijón C, Olmo R, Teijón JM, Blanco MD. Ketotifen-loaded microspheres prepared by spray-drying poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) polymers: characterization and in vivo evaluation. *J Pharm Sci*. 2008; 97: 3153-3169.

Gunawan RC, Auguste DT. The role of antibody synergy and membrane fluidity in the vascular targeting of immunoliposomes. *Biomaterials*. 2010; 31: 900-907.

Gupta H, Velpandian T, Jain S. Ion- and pH-activated novel in-situ gel system for sustained ocular drug delivery. *J Drug Target*. 2010; 18: 499-505.

Hafner A, Filipović-Grcić J, Voinovich D, Jalsenjak I. Development and in vitro characterization of chitosan-based microspheres for nasal delivery of promethazine. *Drug Dev Ind Pharm*. 2007; 33(4): 427-436.

Halliwell B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs Aging*. 2001; 18(9): 685-716.

Haney MJ, Klyachko NL, Zhao Y, Gupta R, Plotnikova EP, He Z, Patel T, Piroyan A, Sokolsky M, Kabanov AV, Batrakova EV. Exosomes as drug delivery vehicles for Parkinson's disease therapy. *J Control Rel*. 2015; 207(10): 18-30.

Hansen CB, Kao GY, Moase EH, Zalipsky S, Allen TM. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochem Biophys Acta*. 1995; 1239: 133-144.

Harikarnpakdee S, Lipipun V, Sutanthavibul N, Ritthidej CG. Spray-dried mucoadhesive microspheres: Preparation and transport through nasal cell monolayer. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2006; 7(1): 79-88.

Harlow E, Lane D. *Antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1998; 23-135.

Harris DC. *Análisis químico cuantitativo.* Ed. Reverté. Barcelona (2001).

Herbert V, Shaw S, Jayatilleke E. Vitamin C-driven free radical generation from iron. *J Nutr.* 1996; 126: 1213-1220.

Hergenbahn M, Bertram B, Wiessler M, Sorg BL. Curcumin derivatives with improved water solubility compared to curcumin and medicaments containing the same. Patents 20030153512. 2003.

Hermanson GT. *Bioconjugate techniques,* 2^a ed. Academic Press, USA. 2008; 783-823.

Higuchi T, Connors KA. Phase solubility techniques. *Adv Anal Chem Instrum.* 1965; 4: 117-212.

Higuchi T, Stella V. *Prodrugs as novel drug delivery systems.* American Chemical Society. Washington, DC, 1975.

Hincha DK. Effects of calcium-induced aggregation on the physical stability of liposomes containing plant glycolipids. *Biochim Biophys.* 2003; 1611: 180-186.

Horvath T, Bartos C, Bocsik A, Kiss L, Veszeka S, Deli MA, Ujhelvi G, Szabo-Revesz P, Ambrus R. Cytotoxicity of different excipients on RPMI 2650 human nasal epithelial cells. *Molecules.* 2016; 21(5): 658.

Hosny KM. Ciprofloxacin as ocular liposomal hydrogel. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2010; 11: 241-246.

Hosseini S, Rezaei M, Zandi M, Ghavi FF. Preparation and functional properties of fish gelatin-chitosan blend edible films. *Food Chem.* 2013; 136: 1490-1495.

<http://www.naukas.com> (consultada el 26-03-2018)

<http://investigacion.ues.es/scisi/sgi/servicios/microscopia/equipamiento> (Fecha de consulta: Febrero 2018).

<http://web.usal.es/~rororo/pract2/paginas/composicion1.htm> (Fecha de consulta: Febrero 2018).

<http://www.britannica.com/EBchecked/media/92244/Phospholipids-can-be-used-to-form-artificial-structures-called-liposomes> (Fecha de consulta: Febrero 2018).

<http://www.cnb.csic.es/fotonica/Diferencias.htm> (Fecha de consulta: Febrero 2018).

<http://www.guiasdeneuro.com.ar/wpcontent/uploads/2009/03/barrera.jpg> (Fecha de consulta: Febrero 2018).

<http://www.javeriana.edu.co/Facultades/Medicina/fisiologia/fw/c563.htm> (Fecha de consulta: Febrero 2018).

http://www.medscape.com/viewarticle/752329_4 (Fecha de consulta: Febrero 2018).

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471489206001172.htm> (Fecha de consulta: Febrero 2018).

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product> (consultada el 21-02-2018)

http://www.waters.com/waters/es_ES/HPLC---High-Performance-Liquid-Chromatography/nav.htm?cid=10048919&locale=es_ES (Fecha de consulta: Febrero 2018).

https://www.researchgate.net/Chemical-structure-of-curcuminoids-curcumin-demethoxycurcumin-and-bisdemetohxy-curcumin_fig1_255695470 (consultada el 11-05-2018)

Huang Y, Donovan MD. Large molecule and particulate uptake in the nasal cavity: the effect of size on nasal absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1998; 29(1-2): 147-155.

Ihara Y, Chuda M, Kuroda S, Hayabara T. Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: relationship to clinical data. *J Neurol Sci.* 1999; 170(2): 90-95.

Illum L. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci.* 2000; 11: 1-18.

Iranzo O. Manganese complexes displaying superoxide dismutase activity: a balance between different factors. *Biorganic Chem.* 2011; 39: 73-87.

Jadhav KR, Gambhire MN, Shaikh IM, Kadam VJ, Pisal SS. Nasal drug delivery system: factors affecting and applications. *Current Drug Ther.* 2007; 2(1): 27-38.

Jadhav UG, Días RJ, Mali KK, Havaladar HV. Development of in situ-gelling and mucoadhesive liquid suppository of ondansetron. *Int J Chem Tech Res.* 2009; 4: 953-961.

Jafarieh O, Md S, Ali M, Baboota S, Sahni JK, Kumari B, Bhatnagar A, Ali J. Design, characterization, and evaluation of intranasal delivery of ropinirole-loaded mucoadhesive nanoparticles for brain targeting. *Drug Dev Ind Pharm.* 2014; 1: 1-8.

Jain AK, Chalasani KB, Khar RK, Ahmed FJ, Diwan PV. Muco-adhesive multivesicular liposomes as an effective carrier for transmucosal insulin delivery. *J Drug Target.* 2007; 15: 417-427.

Jankovic J. Levodopa strengths and weaknesses. *Neurology.* 2002; 58: 19-32.

Jayaprakasha JK, Jena BS, Negi PS, Sakariah KK. Evaluation of antioxidant activities and antimutagenicity of turmeric oil: a product from curcumin production. *Z Naturforsch.* 2002; 57: 828-835.

Jiménez D, Clavijo Y, Beltrán D. Desnaturalización de proteínas. Tesis Doctoral. Facultad del Medio ambiente y Recursos Naturales. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 2014.

Jogani VV, Shah PJ, Mishra P, Mishra AK, Misra AR. Intranasal mucoadhesive microemulsion of tacrine to improve brain targeting. *Alzheimer Dis Assoc Disord.* 2008; 22: 116-124.

John D F, Madelyn H F. Tyrosine, phenylalanine, and catecholamine synthesis and function in the brain. *J Nutr.* 2007; 137(6): 1539-1547.

Jones AR, Shusta JE. Blood brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res.* 2007; 24: 1759-1771.

Jones MN, Hudson MJ. The targeting of immunoliposomes to tumour cells (A431) and the effects of encapsulated methotrexate. *Biochem Biophys Acta.* 1993; 1152(2): 231-242.

Joshi S., Verma A., Mathela C. (2010). Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. *Food and Chemical Toxicology*;48: 37-40.

Jovanovic SV, Boone CW, Steenken S, Trinoga M, Kaskey RB. How curcumin works preferentially with water soluble antioxidants. *J Am Chem Soc.* 2001; 123(13): 3064-3068.

Jovanovic SV, Steenken S, Boone CW, Simic MG. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *J Am Chem Soc.* 1999; 121: 9677-9681.

Juncos JL. Levodopa: pharmacology, pharmacokinetics, and pharmacodynamics. *Neurol Clin.* 1992; 10: 487-509.

Kadar B, Szasz M, Kristof K, Pesti N, Krizsan G, Szentandrassy J, Rokusz L, Nagy K, Szabo D. In vitro activity of clarithromycin in combination with other antimicrobial agents against biofilm-forming *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2010; 57: 235-245.

Kaiser R, Hofer A, Grapengiesser A, Gasser T, Kupsch A, Roots I, Brockmüller J. L -dopa-induced adverse effects in PD and dopamine transporter gene polymorphism. *Neurology.* 2003; 60(11): 1750-1755.

Kalra J, Bally M. Liposomes. En: (Uchegbu I, Schätzlein A, Cheng W, Lalatsa A. eds.) *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*. Springer Science+Business Media. 2013; 27-51.

Kamkaen N, Mulsri N, Treesak C. Screening of Some Tropical Vegetables for Anti-tyrosinase Activity. *Thai Pharm Health Sci J*. 2007; 2(1): 15-19.

Kanazawa T, Kaneko M, Niide T, Akiyama F, Kakizaki S, Ibaraki H, Shiraishi S, Takashima Y, Suzuki T, Seta Y. Enhancement of nose-to-brain delivery of hydrophilic macromolecules with stearate- or polyethylene glycol-modified arginine-rich peptide. *Int J Pharm*. 2017; 530: 195-200.

Kandimalla KK, Curran GL, Holasek SS, Gilles EJ, Wengenack TM, Poduslo JF. Pharmacokinetic Analysis of the Blood-Brain Barrier Transport of ¹²⁵I-Amyloid β Protein 40 in Wild-Type and Alzheimer's Disease Transgenic Mice (APP,PS1) and Its Implications for Amyloid Plaque Formation. *J Pharm Exp Ther*. 2005; 313(3): 1370-1378.

Kang ML, Cho CS, Yoo HS. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. *Biotechnol Adv*. 2009; 27(6): 857-865.

Kankkunen T, Huupponena I, Lahtinen K, Sundell M, Ekman K, Kontturi K. Improved stability and release control of levodopa and metaraminol using ion-exchange fibers and transdermal iontophoresis. *Eur J Pharm Sci*. 2002; 16: 273-280.

Kanhasamy AG, Anantharam V, Zhang D, Latchoumycandade C, Jin H, Kaul S, Kanhasamy A. A novel peptide inhibitor targeted to caspase-3 cleavage site of a proapoptotic kinase protein kinase C delta (PKCdelta) protects against dopaminergic neuronal degeneration in Parkinson's disease models. *Free Radic Biol Med*. 2006; 41: 1578-1589.

Kanhasamy AG, Anantharam V, Zhang D, Latchoumycandane C, Jin H, Kaul S. A novel peptide inhibitor targeted to caspase-3 cleavage site of a proapoptotic kinase protein kinase C delta (PKCdelta) protects against dopaminergic neuronal

degeneration in Parkinson's disease models. *Free Radic Biol Med.* 2006; 41: 1578-1589.

Kapse-Mistry S, Govender T, Srivastava R, Yergeri M. Nanodrug delivery in reversing multidrug resistance in cancer cells. *Frontiers Farmacology.* 2014; 5: 159.

Kaul S, Kanthasamy A, Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration. *Eur J Neurosci.* 2003; 18: 1387-1401.

Kaul S, Kanthasamy A, Kitazawa M, Anantharam V, Kanthasamy AG. Caspase-3 dependent proteolytic activation of protein kinase C delta mediates and regulates 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+)-induced apoptotic cell death in dopaminergic cells: relevance to oxidative stress in dopaminergic degeneration. *Eur J Neurosci.* 2003; 18: 1387-1401.

Kaur P, Garg T, Rath G, Goyal AK. In situ nasal gel drug delivery: A novel approach for brain targeting through the mucosal membrane. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2015; 44(4): 1167-1176.

Kaur P, Smitha R, Aggarwal D, Kapil M. Acetazolamide: future perspectives in topical glaucoma therapeutics. *Int J Pharm.* 2002; 248: 1-14.

Keating GM, Lyseng-Williamson KA. Tolcapone: a review of its use in the management of Parkinson's disease. *CNS Drugs.* 2005; 19(2): 165-184.

Keith S. Advances in psychotropic formulations. *Progr Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 2006; 30: 996-1008.

Kfoury M, Auezova L, Fourmentin S, Greige-Gerges H. Investigation of monoterpenes complexation with hydroxypropyl- β -cyclodextrin. *J Inclusion Phen Macrocyclic Chem.* 2014; 8: 51-60.

Khan AR, Liu M, Khan MW, Zhai G. Progress in brain targeting drug delivery system by nasal route. *J Control Rel.* 2017; 268: 364-389.

- Khor SP, Hsu A. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Curr Clin Pharmacol*. 2007; 2(3): 234-43.
- Kibbe A. Ascorbic acid. En: (Rowe R, Sheskey P, Quinn M eds) *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6^a ed. Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, Great Britain. 2009; 43-46.
- Kladny J, Kruk I, Lichszteld K, Michalska T. Luminescence accompanying peroxidation of DOPA in the presence of iron salts, haemin and cytochrome c. *Toxicol Environm Chem*. 1995; 47: 223-234.
- Klossner RR, Queen HA, Coughlin AJ, Krause WE. Correlation of chitosan's rheological properties and its ability to electrospin. *Biomacromolecules*. 2008; 9(10): 2947.
- Klotz LM, Heiney RE. Introduction of sulfhydryl groups into proteins using acetylmercaptosuccinic anhydride. *Arch Biochem Biophys*. 1962; 96: 605-612.
- Koo YE, Reddy GR, Bhojani M, Schneider R, Philber MA, Rehemtulla A, Ross BD, Kopelman R. Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatfoms. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58: 1556-1577.
- Kook SY, Jeong H, Kang MJ, Park R, Shin HJ, Han SH, Son SM, Song H, Baik SH, Moon M, Yi EC, Hwang D, Mook-Jung I. Crucial role of calbindin-D28k in the pathogenesis of Alzheimer's disease mouse model. *Cell Death Differ*. 2014; 21(10): 1575-1587.
- Korytowski W, Sarna T, Kalyanaraman B, Sealy RC. Tyrosinase-catalyzed oxidation of dopa and related catechol(amine)s: a kinetic electron spin resonance investigation using spin-stabilization and spin label oximetry. *Biochim Biophys Acta*. 1987; 924(3): 383-92.
- Krack P, Benazzouz A, Pollak P, Limousin P, Piallat B, Hoffmann D, Xie J, Benabid AL. Treatment of tremor in Parkinson's disease by subthalamic nucleus stimulation. *Mov Disord*. 1998; 13(6): 907-914.

- Kriera F, Brion M, Debrus B, Lebrun P, Driesen A, Ziemons E, Evrard B, Hubert P. Optimization and validation of a fast HPLC method for the quantification of sulindac and its related impurities. *J Pharm Biomed Anal.* 2011; 5(4): 694-700.
- Kruk I, Lichszteld K, Bounias M, Ladna L, Kubera-Nowakowska L. Formation of active oxygen species during autoxidation of dopa. *Chemosphere.* 1999; 39(3): 443-453, 1999.
- Kruk I, Lichszteld K, Michalska T. Evidence for the generation of singlet molecular oxygen during DOPA and dopamine peroxidation. *Z Naturforsch.* 1989; 44: 39-44.
- Kuesters GM, Campbell RB. Conjugation of bevacizumab to cationic liposomes enhances their tumor-targeting potential. *Nanomedicine.* 2010; 10: 181-192.
- Kulisevsky J, Luquin MR, Arbelo JM, Burguera JA, Carrillo F, Castro A, Chacon J, García-Ruíz PJ, Lezcano E, Mir P, Martínez-Castrillo JC, Martínez-Torres I, Puente V, Sesar A, Valldeoriola-Serra F, Yañez R. Advanced Parkinson's disease: Clinical characteristics and treatment (part 1). *Neurol.* 2013; 28(8): 503-521.
- Kumar K, Jyothi T, Nagendar S, Devipriya S, Vijaya G, Sudhakar A. Stability of liposomes. *Pharmanest.* 2011; 2(4): 2231-0541.
- Kumar M, Misra A, Babbar AK, Mishra AK, Mishra P, Pathak K. Intranasal nanoemulsion based brain targeting drug delivery system of risperidone. *Int J Pharm.* 2008; 358: 285-291.
- Kurita K. Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Mar Biotechnol (NY).* 2006; 8(3): 203-226.
- Kurkov SV, Loftsson T. Cyclodextrins. *Int J Pharmac.* 2013; 30:167-180.
- Kushwaha SKS, Keshari RK, Rai AK. Advances in nasal trans-mucosal drug delivery. *J Applied Pharm Sci.* 2011; 1(7): 21-28.
- Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. The theory and practice of industrial pharmacy, 3^a ed. Lea Febiger. 1986.

Lambert DM. Rationale and applications of lipids as prodrug carriers. *Eur J Pharm Sci.* 2000; 11: 15-27.

Lawrence SM, Alpar HO, McAllister SM, Brown MR. Liposomal (MLV) polymyxin B: physicochemical characterization and effect of surface charge and drug association. *J Drug Target.* 1993; 1: 303-310.

Levine C, Fahrbach K, Siderowf A, Estok R, Ludensky M, Ross S. Diagnosis and treatment of Parkinson's disease: a systematic review of the literature. Evidence Report/Technology Assessment. AHRQ Publication. 2003; 57: 3-40.

Li L, Ahmed B, Mehta K, Kurzrock R. Liposomal curcumin with and without oxaliplatin: effects on cell growth, apoptosis, and angiogenesis in colorectal cancer. *Mol Cancer Ther.* 2007; 6: 1276-82.

Lim GP, Chu T, Yang F, Beech W, Frautschy SA, Cole GM. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci.* 2001; 21: 8370-8377.

Liu HL, Fan CH, Ting CY, Yeh CK. Combining microbubbles and ultrasound for drug delivery to brain tumors: current progress and overview. *Theranostics.* 2014; 4: 432-444.

Loch-Neckel G, Koepp J. La barrera hematoencefálica y la administración de medicamentos en el sistema nervioso central. *Rev Neurología.* 2010; 51: 165-174.

López-Barneo J. Neurodegeneración y Neuroprotección en la Enfermedad de Parkinson. 2011; 126.

López-Nicolás JM, Pérez-López AJ, Carbonell-Barrachina A, García-Carmona F. Use of natural and modified cyclodextrins as inhibiting agents of peach juice enzymatic browning. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(13): 5312-5319.

Loughrey HC, Choi LS, Cullis PR, Bally MB. Optimized procedures for the coupling of proteins to liposomes. *J Immunol Methods.* 1990; 132: 25-35.

Lu W, Wan J, Zhang Q, She Z, Jiang X. Aclarubicin-loaded cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticle for glioma chemotherapy in rats. *Int J Cancer*. 2007; 120: 420-431.

Luppi B, Bigucci F, Mercolini L, Musenga A, Sorrenti M, Catenacci L, Zecchi V. Novel mucoadhesive nasal inserts based on chitosan/hyaluronate polyelectrolyte complexes for peptide and protein delivery. *J Pharm Pharmacol*. 2009; 61(2): 151-157.

Luppi B, Bigucci F, Mercolini L, Musenga A, Sorrenti M, Catenacci L, Zecchi V. Novel mucoadhesive nasal inserts based on chitosan/hyaluronate polyelectrolyte complexes for peptide and protein delivery. *J Pharm Pharmacol*. 2009; 61(2): 151-157.

Luquin MR, Kulisevsky J, Martinez-Martin P, Mir P, Tolosa ES. Consensus on the Definition of Advanced Parkinson's Disease: A Neurologists-Based Delphi Study (CEPA Study). *Parkinsons Dis*. 2017, 4047392.

Lyapunov AN, Bezuglaya EP, Lyapunov NA, Kirilyuk IA. Studies of carbomer gels using rotational viscometry and spin probes. *Pharm Chem J*. 2015; 49: 639.

Maestrelli F, Capasso G, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Ghelardini C, Mura P. Effect of preparation technique on the properties and in vivo efficacy of benzocaine-loaded ethosomes. *J Liposome Res*. 2009; 19(4): 253-260.

Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Rabasco AM, Mura P. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *Int J Pharm*. 2006; 312: 53-60.

Maestrelli F, Zerrouk N, Chemto C, Mura P. Influence of chitosan and its glutamate and hydrochloride salts on naproxen dissolution rate and permeation across Caco-2 cells. *Int J Pharm*. 2004; 271: 257-267.

Magarkar A, Dhawan V, Kallinteri P, Viitala T, Elmowafy M, Rog T, Bunke A. Cholesterol level affects surface charge of lipid membranes in saline solution. *Sci Rep*. 2014; 4: 5005.

- Manca ML, Zaru M, Ennas G, Valenti D, Sinico C, Loy G, Fadda AM. Diclofenac- β -cyclodextrin binary systems: physicochemical characterization and in vitro dissolution and diffusion studies. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2005; 6(3): 464-472.
- Mangolim CS, Moriwaki C, Nogueira AC, Sato F, Baesso ML, Neto AM, Matioli G. Curcumin- β -cyclodextrin inclusion complex: Stability, solubility, characterisation by FT-IR, FT-Raman, X-ray diffraction and photoacoustic spectroscopy, and food application. *Food Chem Vol*. 2014; 153: 361-370.
- Manjappa AS, Chaudhari KR, Venkataraju MP, Dantuluri P, Nanda B, Sidda C, sawant KK, Ramachandra-Murthy RS. Antibody derivatization and conjugation strategies. Application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor. *J Control Rel*. 2010; 1: 2-22.
- Manosroi A, Kongkaneromit L, Manosroi J. Characterization of amphotericin B liposome formulations. *Drug Dev Ind Pharm*. 2004; 30(5): 535-43.
- Manosroi A, Kongkaneromit L, Manosroi J. Characterization of amphotericin B liposome formulations. *Drug Dev Ind Pharm*. 2004; 30(5): 535-543.
- Manosroi A, Podjanasoonthon K, Manosroi J. Development of novel topical tranexamic acid liposome formulations. *Int J Pharm*. 2002; 235(1-2): 61-70.
- Manosroi A, Podjanasoonthon K, Manosroi J. Development of novel topical tranexamic acid liposome formulations. *Int J Pharm*. 2002; 235(1-2): 61-70.
- Manual de aplicación Zeta Master. PCS Applications training course, versión 1.35 software. Malvern Instruments. 1998.
- Marin A, Andrianov A. Carboxymethylcellulose-Chitosan-coated microneedles with modulated hydration properties. *J Appl Polym Sci*. 2011; 121(1): 395-401.
- Martin FJ, Heath TD. Covalent attachment of proteins to liposomes. En: *Liposomes: a practical approach*. New RRC. 1990; 163-182.

Martin FJ, Papahadjopoulos D. Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. An improved method for liposome targeting. *J Biol Chem.* 1982; 257: 286-288.

Martinac A, Filipović-Grcić J, Voinovich D, Perissutti B, Franceschinis E. Development and bioadhesive properties of chitosan-ethylcellulose microspheres for nasal delivery. *Int J Pharm.* 2005; 291(1-2): 69-77.

Martínez-Bedoya D. Visualization of liposomes by magnetic resonance imaging: An opportunity to improve antitumoral liposome therapies. *Rev Cubana Invest Biomed.* 2012; 31(4): 15-31.

Mason HS, Wricht CJ. Chemistry of melanin. V. Oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J Biol Chem.* 1949; 180: 235-247.

Matloob AH, Mourtas S, Klepetsanis P, Antimisiaris SG. Increasing the stability of curcumin in serum with liposomes or hybrid drug-in-cyclodextrin-in-liposome systems: A comparative study. *Int J Pharm.* 2014; 476: 108-115.

McInnes FJ, Thapa P, Baillie AJ, Welling PG, Watson DG, Gibson I, Nolan A, Stevens HNE. In vivo evaluation of nicotine lyophilised nasal insert in sheep. *Int J Pharm.* 2005; 304: 72-82.

McInnes FJ, Thapa P, Baillie AJ, Welling PG, Watson DG, Gibson I, Nolan A, Stevens HN. In vivo evaluation of nicotine lyophilised nasal insert in sheep. *Int J Pharm.* 2005; 304(1-2): 72-82.

Md S, Haque S, Fazil M, Kumar M, Baboota S, Sahni JK, Ali J. Optimised nanoformulation of bromocriptine for direct nose-to-brain delivery: biodistribution, pharmacokinetic and dopamine estimation by ultra-HPLC/mass spectrometry method. *Expert Opin Drug Deliv.* 2014; 11(6): 827-842.

Mercuri NB, Bernardi G. The 'magic' of L-dopa: why is it the gold standard Parkinson's disease therapy? *Trends Pharmacol Sci.* 2005; 26: 341-344.

Meredith ME, Salameh TS, Banks WA. Intranasal delivery of proteins and peptides in the treatment of neurodegenerative diseases. *The AAPS Journal*. 2015; 17(4): 780-787.

Merkus FW, Verhoef JC, Schipper NG, Marttin E. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 1998; 29(1-2): 13-38.

Micheli M, Bovab R, Maginib A, Polidorob M, Emiliani C. Lipid-based nanocarriers for CNS-targeted drug delivery. *Recent Patents on CNS Drug Discov*. 2012; 7(1): 1-16.

Mikirova N, Casciari J, Rogers A, Taylor P. Effect of high-dose intravenous vitamin C on inflammation in cancer patients. *J Transl Med*. 2012; 10: 189.

Miller A. Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills. *Curr Opin Chem Biol*. 2004; 8(2): 162-168.

Mishra B, Patel B, Tiwari S. Colloidal nanocarriers: a review on formulation technology, types and applications toward targeted drug delivery. *Nanomedicine*. 2010; 6(1): 9-24.

Mishra R, Bisht SS. Antioxidants and their characterization. *J Pharm Res*. 2011; 4(8): 2744-2746.

Misra A, Ganesh S, Shahiwalla A, Shah SP. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci*. 2003; 6: 252-273.

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature*. 1997; 388: 882-887.

Morimoto K, Yamaguchi H, Iwakura Y, Morisaka K, Ohashi Y, Nakai Y. Effects of viscous hyaluronate-sodium solutions on the nasal absorption of vasopressin and an analogue. *Pharm Res*. 1991; 8: 471-474.

Moyano JR, Ginés JM, Arias MJ, Rabasco AM. Utilidad de ciclodextrinas y derivados en el campo farmacéutico (I). *Industria Farmaceutica*. 1994; 4: 71-76.

Mughal MA, Iqbal Z, Neau SH. Guar gum, xanthan gum, and HPMC can define release mechanisms and sustain release of propranolol hydrochloride. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2011; 12(1): 77-87.

Mui B, Hope MJ. Formation of large unilamellar vesicles by extrusion. In *liposome Preparation and Related Techniques*. Healthcare, Informa, UK. 2007.

Mukne AP, Nagarsenker MS. Triamterene- β -cyclodextrin systems: preparation, characterization and in vivo evaluation. *AAPS Pharm Sci Tech.* 2004; 5: 19.

Mura P, Maestrelli F, Gonzalez-Rodriguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *Eur J Pharm Biopharm.* 2007; 67: 86-95.

Musfiroh I, Indriyati W, Susilawati Y, Percekawati A. Curcumin quantification in dosage forms using high performance liquid chromatography. *Unpad Open Repository* 2010.

Mythri RB, Bharath MM. Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 2012; 18(1): 91-99.

Na DH, Youn YS, Park EJ, Lee JM, Cho OR, Lee KR, Lee SD, Yoo SD, DeLuca PP, Lee KC. Stability of PEGylated salmon calcitonin in nasal mucosa. *J Pharm Sci.* 2004; 93: 256-261.

Nagayama H, Hamamoto M, Ueda M, Nito C, Yamaguchi H, Katayama Y. The effect of ascorbic acid on the pharmacokinetics of levodopa in elderly patients with Parkinson disease. *Clin Neuropharmacol.* 2004; 27(6): 270-273.

Nakagawa S, Deli MA, Kawaguchi H, Shimizudani T, Shimono T, Kittel A, Tanaka K, Niwa M. A new blood-brain barrier model using primary rat brain endothelial cells, pericytes and astrocytes. *Neurochem Int.* 2009; 54: 253-263.

Navarro G, Cabral P, Malanga A, Savio E. Diseño de liposomas para el transporte de diclofenaco sódico. *Rev Colomb Cienc Quím Farm.* 2008; 37(2): 212-223.

- Neves AR, Queiroz JF, Reis S. Brain-targeted delivery of resveratrol using solid lipid nanoparticles functionalized with apolipoprotein E. *J Nanobiotechnol.* 2016; 14: 1.
- Nigam D. Free radicals and oxidative stress in neurodegenerative disorders. In: Rani V, Yadav U. (eds) *Free radicals in human health and disease.* 2015; 143-158.
- Nilsen-Nygaard J, Strand SP, Varum KM, Draget KI, Nordgard CT. Chitosan: gels and interfacial properties. *Polymers.* 2015; 7: 552-579.
- Nishiho J, Shiota S, Mazima K, Mizuno H, Yoshida J. Interactions of cyclodextrins with dipalmitoyl, distearoyl, and dimyristoyl phosphatidylcholine liposomes. A study by leakage of carboxyfluorescein in inner aqueous phase of unilamellar liposomes. *Chem Pharm Bulletin.* 2000; 48: 48-52.
- Olson F, Hunt CA, Szoka FC, Vail WJ, Papahadjopoulos D. Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1979; 553: 9-23.
- Ortiz-Ortiz MA, Morán JM, Bravosanpedro JM, González-Polo RA, Niso-Santano M, Anantharam V, Kanthasamy AG, Soler G, Fuentes JM. Curcumin enhances paraquat-induced apoptosis of N27 mesencephalic cells via the generation of reactive oxygen species. *Neurotoxicology.* 2009; 30(6): 1008-1018.
- Ortiz-Ortiz MA, Morán JM, Bravosanpedro JM, González-Polo RA, Niso-Santano M, Anantharam V, Kanthasamy AG, Soler G, Fuentes JM. Curcumin enhances paraquat-induced apoptosis of N27 mesencephalic cells via the generation of reactive oxygen species. *Neurotoxicology.* 2009; 30: 1008-1018.
- Ozsoy Y, Gungor S, Cevher E. Nasal delivery of high molecular weight drugs. *Molecules.* 2009; 14: 3754-3779.
- Padlan EA. Anatomy of the antibody molecules. *Mol Immunol.* 1994; 31: 169-217.
- Pahwa R, Lyons K, Koller WC, Jankovic J. Pathophysiology and assessment of parkinsonian symptoms and signs. *Handbook of Parkinson's disease.* 2007: 79-109.

Paramera EI, Konteles SJ, Karathanos VT. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. *Food Chemistry*. 2011; 125: 913-922.

Pardeshi CV, Belgamwar VS. Direct nose to brain drug delivery via integrated nerve pathways bypassing the blood-brain barrier: an excellent platform for brain targeting. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013; 10(7):957-972.

Pardeshi CV. Novel surface modified solid lipid nanoparticles as intranasal carriers for ropinirole hydrochloride: application of factorial design approach. *Drug Deliv*. 2013; 20: 47-56.

Pardridge MW. Blood brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol*. 1999; 5: 556-569.

Pardridge MW. Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron*. 2002; 36: 555-558.

Pardridge MW. The blood brain barrier: bottleneck in brain drug development. *NeuroRx*. 2005; 2: 3-14.

Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery of protein and non-viral gene therapeutics with molecular trojan horses. *J Control Rel*. 2007; 122: 345-348.

Pardridge WM. Delivery of biologics across the blood-brain barrier with molecular trojan horse technology. *BioDrugs*. 2017; 31(6): 503-519.

Pardridge WM. Gene targeting in vivo with pegylated immunoliposomes. *Method Enzymol*. 2003; 373: 507-528.

Pascual-Garvi JM, González-Llanos F, Prieto-Arribas R, Cerdán S, Roda JM. La barrera hematoencefálica: desarrollo de una estructura que permite la heterogeneidad funcional del sistema nervioso central. *Rev Neurología*. 2004; 38 (6): 565-581.

Pasquarelli N, Porazik C, Bayer H, Buck E, Schildknecht S, Weydt P, Fergert B. Contrasting effects of selective MAGL and FAAH inhibition on dopamine depletion

and GDNF expression in a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Neurochem Int.* 2017; 110: 14-24.

Patel HM. Serum opsonins and liposomes: their interaction and opsonophagocytosis. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1992; 9: 39-90.

Patil K, Dhage N, Patil V, Patil S. Formulation and Evaluation of Nasal in situ Gel for Alzheimer Disease. *Int Res J Pharm Biosci.* 2015; 2(2): 41-58.

Patil S, Murthy R. Preparation and in vitro evaluation of mucoadhesive chitosan microspheres of amlodipine besylate for nasal administration. *Indian J Pharm Sci.* 2006; 68: 64.

Patil SB, Sawant KK. Development, optimization and in vitro evaluation of alginate mucoadhesive microspheres of carvedilol for nasal delivery. *J Microencapsul.* 2008; 1-12.

Patil SB, Sawant KK. Mucoadhesive microspheres: a promising tool in drug delivery. *Curr Drug Deliv.* 2008; 5: 312-318.

Paul A, Fathima KM, Nair S. Intranasal in situ gelling system of lamotrigine using ion activated mucoadhesion polymer. *Open Med Chem J.* 2017; 11: 222-244.

Pavelic Z, Skalko-Basnet N, Filipovic-Grcic J, Martinac A, Jalsenjak I. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *J Control Release.* 2005; 106: 34-43.

Piel G, Piette M, Barillaro V C, Evrard B, Delattre L. Study of the relationship between lipid binding properties of cyclodextrin and their effect on the integrity of liposomes. *Int J Pharm.* 2007; 338: 35-42.

Pinheiro M, Lúcio M, Lima JL, Reis S. Liposomes as drug delivery systems for the treatment of TB. *Nanomedicine.* 2011; 6: 1413-1428.

Pisoschi AM, Pop A, Negulescu GP, Pisoschi A. Determination of ascorbic acid content of some fruit juices and wine by voltammetry performed at Pt and carbon paste electrodes. *Molecules.* 2011; 16(2): 1349-65.

Poupot R, Bergozza D, Fruchon S. Nanoparticle-Based Strategies to Treat Neuro-Inflammation. *Materials*. 2018; 11: 270.

Prabhakaran K, Kirchheimer WF. Use of 3, 4-Dihydroxyphenylalanine oxidation in the identification of mycobacterium leprae. *J Bacteriol*. 1966; 92(4): 1267-1268.

Priyadarsini KI, Maity DK, Naik GH, Kumar MS, Unnikrishnan MK, Satav JG, Mohan H. Role of Phenolic O-H and Methylene Hydrogen on the free Radical Reactions and Antioxidant Activity of Curcumin. *Free Radical Biol Med*. 2003; 35: 475.

Putheti RR, Patil MC, Obire O. Nasal drug delivery in pharmaceutical and biotechnology: present and future. *Electron J Sci Technol*. 2009; 4(3): 1-21.

Puzi A, Matynia T, Gawdzik B, Poddubnaya O. Use of contin for calculation of adsorption energy distribution. *Langmuir*. 1999; 15: 6016-6025.

Rajan R, Jose S, Mukund VP, Vasudevan DT. Transfersomes - A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011; 2(3): 138-143.

Rajan R, Jose S, Mukund VPB, Vsudevan DT. Transfersomes -A vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. *J Adv Pharm Technol Res*. 2011; 2(3): 138-143.

Ramos-Cabrer P, Campos F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. *Int J Nanomedicine*. 2013; 8: 951-960.

Rasheed A, Kumar A, Sravanthi V. Cyclodextrins as drug carrier molecule: a review. *Sci Pharm*. 2008; 76: 567-598.

Rathananand M, Kumar D, Shirwaikar A, Kumar R, Sampath Kumar D, Prasad R. Preparation of mucoadhesive microspheres for nasal delivery by spray drying. *Indian J Pharm Sci*. 2007; 69: 651.

Rector E, Schwenck SRJ, Tse TS, Sehon AH. A method for the preparation of protein-protein conjugates of predetermined composition. *J Immunol Methods*. 1978; 24: 321-336.

Rengel R, Karmela Barisic K, Pavelic Z, Zanic T, Cepelak I, Filipovic J. High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *Eur J Pharm Sci.* 2002; 15: 441-448.

Roka E, Ujhelvi Z, Deli M, Bocsik A, Fenyvesi E, Sente L, Fenyvesi F, Vecsernyes M, Varadi J, Feher P, Gesztelvi R, Felix C, Perret F, Bacsikay IK. Evaluation of the cytotoxicity of α -cyclodextrin derivatives on the Caco-2 cell line and human erythrocytes. *Molecules.* 2015; 20(11): 20269-20285.

Rostami E, Kashanian S, Azandaryani AH. Drug targeting using solid lipid nanoparticles. *Chem Phys Lipids.* 2014; 181: 56-61.

Roy C, Pal K, Anis A, Pramanik K, Prabhakar B. Polymers in mucoadhesive drug-delivery systems: a brief note. *Designed Monomers Polymers.* 2012; 12(6): 483-495.

Ruano M. Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Tesis Doctoral. Madrid. Departamento de Química Física I, Universidad Complutense, Madrid (2013).

Ruano M. Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Tesis Doctoral. Madrid. Departamento de Química Física I, Universidad Complutense, Madrid (2013).

Rubin LL, Staddon JM. The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci.* 1999; 22: 11-28.

Rubinson KA, Rubinson JF. Espectrometría de fluorescencia/fosforescencia. En: *Análisis instrumental* (Rubinson KA, Rubinson JF, Eds.), Pearson education S.A., Madrid. 2001; 308-311.

Sakamoto A, Ido T. Liposome targeting to rat brain: effect of osmotic opening of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 1993; 629: 171-175.

Salmani JMM, Asghar S, Lv H, Zhou J. Aqueous solubility and degradation kinetics of the phytochemical anticancer thymoquinone: probing the effects of solvents, pH and light. *Molecules.* 2014; 19: 5925-5939.

Sánchez SA, Gunther G, Triccerri MA, Gratton E. Methyl- β -cyclodextrins preferentially remove cholesterol from the liquid disordered phase in giant unilamellar vesicles. *J Membrane Biol.* 2011; 241: 1-10.

Santos-García D, Fuente-Fernández R, Valldeoriola F, Palasí A, Carrillo F, Grande M, Mir P, De Fabregues O, Casanova J. Polyneuropathy while on duodenal levodopa infusion in Parkinson's disease patients: we must be alert. *J Neurology.* 2012; 259: 1668-1672.

Sapra P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res.* 2003; 42: 439-462.

Saraiva Cláudia, Praça C, Ferreira R, Santos T, Ferreira L, Bernardino L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood-brain barrier to treat neurodegenerative diseases. *J Control Release.* 2016; 235: 34-47.

Sauer I, Dunay IR, Weisgraber K, Bienert M, Dathe M. An apolipoprotein E-derived peptide mediates uptake of sterically stabilized liposomes into brain capillary endothelial cells. *Biochemistry.* 2005; 44: 2021-2029.

Schinid K H, Thieme G. Liposome as drug carriers. Ed Chapman and Hall, New York. 1989.

Schinid KH, Thieme G. Liposome as drug carriers. Ed Chapman and Hall, New York (1989).

Schmolka IR. A comparison of block copolymer surfactant gels. *J Am Oil Chem Soc.* 1991; 68: 206.

Schneider T, Sachse A, Leike J, Rösling G, Schmidtgen M, Drechsler M, Brandl M. Surface modification of continuously extruded contrast-carrying liposomes: effect on their physical properties. *Int J Pharm.* 1996; 132(1-2): 9-21.

Schneider T, Sachse A, Leike J, Rösling G, Schmidtgen M, Drechsler M, Brandl M. Surface modification of continuously extruded contrast-carrying liposomes: effect on their physical properties. *Int J Pharm.* 1996; 132(1-2): 9-21.

- Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRX*. 2005; 2: 99-107.
- Schonfelder U, Radestock A, Elsner P, Hipler UC. Cyclodextrin-induced apoptosis in human keratinocytes is caspase-8 dependent and accompanied by mitochondrial cytochrome c release. *Exp Dermatol*. 2006; 15(11): 883-890.
- Seedher N, Bhatia S. Solubility enhancement of cox-2 inhibitors using various solvent systems. *Pharm Sci Tech*. 2003; 4: 36-44.
- Selkoe J. Cell biology of protein misfolding: The examples of Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nature Cell Biology*. 2004; 6(11): 12-45.
- Shadab M, Bhattmisrab SK, Zeeshana F, Shahzadc N, Mujtabad MA, Mekaa VS, Radhakrishnane A, Kesharwania P, Babootaf S. Nano-carrier enabled drug delivery systems for nose to brain targeting for the treatment of neurodegenerative disorders. *J Drug Del Sci Tech*. 2018; 43: 295-310.
- Shah BM, Misra M, Shishoo CJ. Nose to brain microemulsion-based drug delivery system of rivastigmine: formulation and ex-vivo characterization. *Drug Deliv*. 2015; 22(7): 918-930.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BNG, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2004; 22: 1567-1572.
- Shargh VH, Hondermarck H, Liang M. Antibody-targeted biodegradable nanoparticles for cancer therapy. *Nanomedicine*. 2016; 11: 63-79.
- Sharma L, Sharma A. Influence of cyclodextrin ring substituents on folding-related aggregation of bovine carbonic anhydrase. *Eur J Biochem*. 2001; 268: 2456-2463.
- Sharma N, Baldi A. Exploring versatile applications of cyclodextrins: an overview. *J Drug Deliv*. 2014; 23: 729-747.

Shin BS, Jung JH, Lee KC, Yoo SD. Nasal absorption and pharmacokinetic disposition of salmon calcitonin modified with low molecular weight polyethylene glycol. *Chem Pharm Bull.* 2004; 52: 957-960.

Shingaki T, Inoue D, Furubayashi T, Sakane T, Katsumi H, Yamamoto A, Yamashita S. Transnasal delivery of methotrexate to brain tumors in rats: a new strategy for brain tumor chemotherapy. *Mol Pharm.* 2010; 7: 1561-1568.

Shusta JE. Blood-brain barrier transport of therapeutics via receptor-mediation. *Pharm Res.* 2007; 24: 1759-1771.

Silverstein RM, Webster FX. *Infrared spectrometry: Spectrometry identification of organic compounds.* 6th ed. John Wiley & Sons, New York. 1998.

Sinha V, Singla A, Wadhawan S, Kaushik R, Kumria R, Bansal K, Dhawan S. Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. *Int J Pharm.* 2004; 274: 1-33.

Sinico C, Manconi M, Peppi M, Lai F, Valenti D, Fadda AM. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle-skin interaction. *J Control Release.* 2005; 103: 123-136.

Sinswat P, Tengamnuay P. Enhancing effect of chitosan on nasal absorption of salmon calcitonin in rats: comparison with hydroxypropyl- and dimethyl- β -cyclodextrins. *Int J Pharm.* 2003; 257:15-22.

Skarlatos S, Yoshikawa W, Pardridge WM. Transport of transferrin through the rat blood-brain barrier. *Brain Res.* 1995; 683: 164-171.

Skoog D, Holler J, Nieman T. *Principles of instrumental analysis.* McGraw-Hill. 2001; 5.

Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. Espectrometría de absorción atómica y fluorescencia atómica. En: *Principios de análisis instrumental.* Mc Graw Hill, Madrid. 2001; 219-241.

Smart JD, Kellaway IW, Worthington HE. An in-vitro investigation of mucosa-adhesive materials for use in controlled drug delivery. *J Pharm Pharmacol.* 1984; 36: 295-299.

Smith J, Wood E, Dornish M. Effect of chitosan on epithelial cell tight junctions. *Pharm Res.* 2004; 21: 43-49.

Sofian ZM, Abdullah JM, Rahim AA. Cytotoxicity evaluation of vancomycin and its complex with beta-cyclodextrin on human glial cell line. *Pak J Pharm Sci.* 2012; 25: 831-837.

Song JX, Sun YR, Peluso I, Zeng Y, Yu X, Lu JH, Xu Z, Wang MZ, Liu LF, Huang YY, Chen LL, Durairajan SS, Zhang HJ, Zhou B, Zhang HQ, Lu A, Ballabio A, Medina DL, Guo Z, Li M. A novel curcumin analog binds to and activates TFEB in vitro and in vivo independent of MTOR inhibition. *Autophagy.* 2016; 12(8): 1372-1389.

Sonvico F, Clementino A, Buttini F, Colombo G, Pescina S, Guterres SS, Pohlmann AR, Nicoli S. Surface-Modified nanocarriers for nose-to-brain delivery: from bioadhesion to targeting. *Pharmaceutics.* 2018; 10: 34.

Sood S, Jain K, Gowthamarajan K. Optimization of curcumin nanoemulsion for intranasal delivery using design of experiment and its toxicity assessment. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2014; 113: 330-337.

Spencer T, Parker WD, Bennett JP. L-Dopa increases nigral production of hydroxyl radicals in vivo: potential L-Dopa toxicity. *Neuro Report.* 1994; 5: 1009-1011.

Spuch C, Navarro C. Liposomes for targeted delivery of active agents against neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease). *J Drug Deliv.* 2011; 11: 469-679.

Spuch C, Navarro C. Liposomes for targeted delivery of active agents against neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease). *J Drug Deliv.* 2011.

Stocchi F, Vacca L, Ruggieri S, Olanow CW. Intermittent vs continuous levodopa administration in patients with advanced Parkinson disease: a clinical and pharmacokinetic study. *Arch Neurol*. 2005; 62(6): 905-910.

Sun Y, Chen Z, Yang X, Huang P, Zhou X, Du X. Magnetic chitosan nanoparticles as a drug delivery system for targeting photodynamic therapy. *Nanotechnology*. 2009; 20(13): 135102.

Suresh DK, Yogesh SC, Priyanka B, Mishra P, Shenghani K, Duvvuri P. Degradation studies of curcumin. *Int J Pharm Rev Res*. 2013; 3(2): 50-55.

Suzuki R, Takizawa T, Kuwata Y, Mutoh M, Ishiguro N, Utoguchi N, Shinohara A, Eriguchi M, Yanagie H, Maruyama K. Effective anti-tumor activity of oxaliplatin encapsulated in transferrin-PEG-liposome. *Int J Pharm*. 2008; 346: 143-150.

Swamy NGN, Abbasb Z. Mucoadhesive in situ gels as nasal drug delivery systems: an overview. *Asian J Pharm Sci*. 2012; 7: 168-180.

Swan GA. Structure, chemistry, and biosynthesis of melanins, in: *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Vien-Springer Verlag-New York. 1974; 22.

Swope DM. Rapid treatment of "wearing off" in Parkinson's disease. *Neurology*. 2004; 62(6): 27-31.

Szejtli J. Past, present and future of cyclodextrin research. *Pure Appl Chem*. 2004; 76(10): 1825-1845.

Szejtli J. Utilization of cyclodextrins in industrial products and processes. *J Mater Chem*. 1997; 7: 575-587.

Taylor KMG, Kellaway IW, Taylor G, Stevens J. Drug entrapment and release from multilamellar and reverse phase evaporation liposomes. *Int J Pharm*. 1990; 58(1): 49-55.

Thorne RG, Pronk GJ, Padmanabhan V, Frey WH. Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience*. 2004; 127(2):481-496.

- Tonnesen HH, Masson M, Loftsson T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: solubility, chemical and photochemical stability. *Int J Pharm.* 2002; 244: 127-135.
- Torchilin VP, Weissing V. Surface modification of liposomes. En: *Liposomes* (Torchilin VP, Weissig V, Eds.), Practical Approach, 2nd ed. 2007; 193-229.
- Tsuneji N, Yuji N, Naoki N, Yoshiki S, Kunio S. Powder dosage form of insulin for nasal administration. *J Control Rel.* 1984; 1: 15-22.
- Uekama K, Otagiri M. Cyclodextrins in drug carrier systems. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 1987; 3: 1-40.
- Ugwoke M, Agu RU, Verbeke N, Kinget R. Nasal mucoadhesive drug delivery: background, applications, trends and future perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57: 1640-1665.
- Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *Eur J Pharm Biopharm.* 2009; 71: 251-256.
- Ullah F, Liang A, Rangel A, Gyengesi E, Niedermayer G, Munch G. High bioavailability curcumin: an anti-inflammatory and neurosupportive bioactive nutrient for neurodegenerative diseases characterized by chronic neuroinflammation. *Arch Toxicol.* 2017; 91(4): 1623-1634.
- Umasuthan N, Saranya K, Bathige S, Lim B, Park M, Whang I. A manganese superoxide dismutase with potent antioxidant activity identified from *Oplegnathus fasciatus*: Genomic structure and transcriptional characterization. *Fish Shellfish Immunology.* 2013; 34: 23-37.
- Uster PS, Allen TM, Daniel BE, Mendez CJ, Newman MS, Zhu GZ. Insertion of poly(ethylene glycol) derivatized phospholipid into pre-formed liposomes results in prolonged in vivo circulation time. *FEBS Lett.* 1996; 386: 243-246.

Van Rooy I, Mastrobattista E, Storm G, Hennink WE, Schiffelers RM. Comparison of five different targeting ligands to enhance accumulation of liposomes into the brain. *J Control Rel.* 2011; 150: 30-36.

Varshosaz J, Taymouri S, Pardakhty A, Asadi-Shekaari M, Babaei A. Niosomes of ascorbic acid and α -tocopherol in the cerebral ischemia-reperfusion model in male rats. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 816103.

Veatch SL, Keller SL. Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys Rev Lett.* 2005; 94: 148101.

Venkateswarlu S, Ramachandra MS, Subbaraju GW. Synthesis and biological evaluation of polyhydroxycurcuminoids. *Bioorg Med Chem Lett.* 2005; 13(23): 6374-80.

Vieira DB, Gamarra LF. Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier. *Int J Nanomedicine.* 2016; 11: 5381-5414.

Villasmil S. Desarrollo de formulaciones de liposomas en micropartículas (LEMS) conteniendo succinato de sumatriptán para su administración tópica. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla (2010).

Villasmil-Sánchez S, Drhimeur W, Salas-Ospino SC, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. *Drug Develop Ind Pharm.* 2010; 36(6): 666-675.

Visser CC, Stevanovic S, Voorwinden LH, Bloois LV, Gaillard PJ, Danhof M, Crommelin JA, De Boer AG. Targeting liposomes with protein drugs to the blood-brain barrier in vitro. *Pharm Sci.* 2005; 25: 299-305.

Volk T, Holig P, Merdan T, Müller R, Kontermann RE. Targeting of immunoliposomes to endothelial cells using a single-chain fv fragment directed against human endoglin (CD105). *Biochim Biophys Acta.* 2004; 1663: 158-166.

Vorauer-Uhl K, Fürnschliel E, Wagner A, Ferko B, Katinger H. Topically applied liposome encapsulated superoxide dismutase reduces postburn wound size and edema formation. *Eur J Pharm Sci.* 2001; 14: 63-67.

Wang H, Hussain AA, Wedlund PJ. Nipecotic acid: systemic availability and brain delivery after nasal administration of nipecotic acid and n-Butyl nipecotate to rats. *Pharm Res.* 2005; 22: 556-562.

Wang Y, Maitz PKM. Advances and new technologies in the treatment of burn injury. *Adv Drug Del Rev.* 2018; 123: 1-2.

Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, Lin JK. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *J Pharm Biomed Anal.* 1997; 15: 1867-1876.

Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2008; 1788: 842-857.

Wen MM, El-Salamouni NS, El-Refaie WM, Hazzah HA, Ali MM, Tosi G, Farid RM, Blanco-Prieto MJ, Billa N, Hanafy AS. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: technical, industrial, and clinical challenges. *J Control Release.* 2017; 10(245): 95-107.

Wen Y, Parrish JZ, He R, Zhai RG, Kim MD. Nmnat exerts neuroprotective effects in dendrites and axons. *Mol Cell Neurosci.* 2011; 48(1): 1-8.

Wen Z, Yan Z, Hu K, Pang Z, Cheng X, Guo L, Zhang Q, Jiang X, Fang L, Lai R. Odorranalectin-conjugated nanoparticles: preparation, brain delivery and pharmacodynamic study on Parkinson's disease following intranasal administration. *J Control Release.* 2011; 151(2): 131-138.

Westerink MA, Smithson SL, Srivastava N, Blonder J, Coeshott C, Rosenthal GJ. ProJuvant (Pluronic F127/chitosan) enhances the immune response to intranasally administered tetanus toxoid. *Vaccine.* 2001; 20(5-6): 711-723.

Winden ECA, Zuidam NJ, Crommelin DJA. Strategies for large scale production and optimized stability of pharmaceutical liposomes developed for parenteral use. En: Medical Applications of Liposomes (Lasic DD, Papahadjopoulos D, Eds.), Elsevier. 1998; 567-604.

Woodle MC. Sterically stabilized liposome therapeutics. *Adv Drugs Deliv Rev.* 1995; 16: 249-265.

Wu Y, Wu A. Desarrollo de tecnología robusta. En: Diseño robusto utilizando los métodos Taguchi. Wu ed. 1997; 259-270.

Xia CF, Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous siRNA of brain cancer with receptor targeting and avidin-biotin technology. *Pharm Res.* 2007; 12: 2309-2316.

Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci.* 2002; 22.

Xua X, Khanb M, Burgess D. A quality by design (QbD) case study on liposomes containing hydrophilic API: I. Formulation, processing design and risk assessment. *Int J Pharm.* 2011; 419(1): 52-59.

Yadav AV, Murthy MS, Shete AS, Sakhare S. Stability aspects of liposomes. *Ind J Pharm Edu Res.* 2011; 45(4): 402-413.

Yamagata T, Morishita M, Kavimandan NJ, Nakamura K, Fukuoka Y, Takayama K, Peppas NA. Characterization of insulin protection properties of complexation hydrogels in gastric and intestinal enzyme fluids. *J Control Release.* 2006; 112(3): 343-349.

Yang T, Cui FD, Choi MK, Cho JW, Chung SJ, Shim CK, Kim DD. Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: in vitro and in vivo evaluation. *Int J Pharm.* 2007; 338(1-2): 317-326.

Yang Y, Wang S, Wang Y, Wang X, Wang Q, Chen M. Advances in self-assembled chitosan nanomaterials for drug delivery. *Biotech Adv.* 2014; 32(15): 1301-1316.

- Yetella RR, Min DB. Quenching mechanisms and kinetics of trolox and ascorbic acid on the riboflavin-photosensitized oxidation of tryptophan and tyrosine. *J Agric Food Chem.* 2008; 56(22): 10887-10892.
- Youssef KM, El-Sherbeny MA, El-Shafie FS, Farag HA, Al-Deeb OA, Awadalla SA. Synthesis of curcumin analogues as potential antioxidant, cancer chemopreventive agents. *Arch Pharm.* 2004; 337(1): 42-54.
- Yu H, Huang Q. Enhanced in vitro anti-cancer activity of curcumin encapsulated in hydrophobically modified starch. *Food Chem.* 2010; 119: 669-674.
- Zaitone SA, Hammad LN, Farag NE. Antioxidant potential of melatonin enhances the response to L-dopa in 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine-parkinsonian mice. *Pharmacol Rep.* 2013; 65(5): 1213-26.
- Zaki NM, Mortada ND, Awad GA, Abd ElHady SS. Rapid-onset intranasal delivery of metoclopramide hydrochloride Part II: Safety of various absorption enhancers and pharmacokinetic evaluation. *Int J Pharm.* 2006; 327:97-103.
- Zappia M, Nicoletti A, Muñoz-S D, Tapia-Núñez J. Reconsideraciones en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson con levodopa: evidencias farmacodinámicas. *Rev Neurol.* 2009; 49(1): 33-40.
- Zarranz A. Trastornos neurodegenerativos: Enfermedades neurodegenerativas. *Dossier.* 2004; 17-19.
- Zeevalk GD, Bernard LP, Guilford FT. Liposomal-glutathione provides maintenance of intracellular glutathione and neuroprotection in mesencephalic neuronal cells. *Neurochem Res.* 2010; 35(10): 1575-1587.
- Zhang L, Zhu W, Song L, Wang Y, Jiang H, Xian S, Ren Y. Effects of hydroxylpropyl- β -cyclodextrin on in vitro insulin stability. *Int J Mol Sci.* 2009; 10(5): 2031-2040.
- Zhang M, Wong IG, Gin Jb, Ansari NH. Assessment of methylsulfonylmethane as a permeability enhancer for regional EDTA chelation therapy. *Drug Del.* 2009; 16(5): 243-248.

Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM. Marked enhancement in gene expression by targeting the human insulin receptor. *J Gene Med.* 2003; 5: 157-163.

Zhang Y, Feng J, Cui L, Zhang Y, Li W, Li C, Shi N, Chen Y, Kong W. Investigation into efficiency of a novel glycol chitosan-bestatin conjugate to protect thymopoietin oligopeptides from enzymatic degradation. *J Pharm Sci.* 2016; 105(2): 828-837.

Zhang Y, Zhang F, Bryant J, Charles A, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous RNA interference gene therapy targeting the human epidermal growth factor receptor prolongs survival in intracranial brain cancer. *Clin Cancer Res.* 2004; 10: 3667-3677.

Zhu KX, Lian CX, Guo XN, Peng W, Zhou HM. Antioxidant activities and total phenolic contents of various extracts from defatted wheat germ. *Food Chemistry.* 2011; 126: 1122-1126.

Zidovetzki R, Levitan I. Use of cyclodextrins to manipulate plasma membrane cholesterol content: Evidence, misconceptions and control strategies. *Biochim Biophys Acta Pharm.* 2007; 1768: 1311-1324.

Zuidam NJ, Winden EV, Crommelin DJA. Stability storage and sterilization of liposomes. En *Liposomes* (Torchilin VP, Weissig V, Eds.), Practical Approach, 2nd ed., 149-165 (2007).

Los materiales empleados en el bloque I de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

Ácido silícico. Se presenta en forma de polvo blanco con fórmula empírica $\text{SiO}_2\text{H}_2\text{O}$. Se emplea como componente esencial de la fase estacionaria en la cromatografía en columna (Sigma-Aldrich, Madrid).

Agua Milli-Q® (Milli-Q® Advantage, Millipore).

Cloroformo (Triclorometano estabilizado con etanol). Se presenta en forma de líquido incoloro con fórmula empírica CHCl_3 y con peso molecular 119,38 g/mol. Calidad analítica (Panreac Química, Barcelona).

Cloruro de sodio. Se presenta en forma de sólido blanco cristalino, higroscópico, con fórmula empírica NaCl y peso molecular 58,44 g/mol (Acofarma, Barcelona).

Cloruro férrico hexahidratado (Hierro (III) cloruro 6-hidrato). Se presenta en forma de sólido, con fórmula empírica $\text{FeCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y con un peso molecular de 270,30 g/mol (Panreac Química, Barcelona).

Colesterol (CH). Se presenta como polvo blanco con fórmula empírica $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ y nombre químico 3- β -hidroxi-5-colesteno, con un peso molecular de 386,65 g/mol y con un punto de fusión de 148.5 °C. Se conserva a temperatura ambiente (Sigma-Aldrich, Madrid).

DTNB (5,5'-Ditiobis(ácido 2-nitrobenzoico). Se presenta en forma de polvo de color amarillo claro, con fórmula empírica $\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$ y peso molecular 396,35 g/mol. Se emplea en la determinación de grupos sulfidrilo libres, porque es un reactivo sensible a dichos grupos (Sigma-Aldrich, Madrid).

Edetato disódico (EDTA). Se presenta en forma de polvo blanco cristalino con fórmula empírica $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8$, peso molecular 372,2 g/mol y con una solubilidad en agua de 1:500 (Fagrón, Barcelona).

Éster del ácido 4-(4-Maleimidofenil) butírico N-hidroxisuccinimida éster (SMPB). Se presenta en forma de polvo, con fórmula empírica $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$ y peso molecular 280,23 g/mol. Se conserva a 4 °C (Sigma-Aldrich, Madrid).

Fosfatidilcolina (EPC) (L- α -Fosfatidilcolina de huevo). Se trata de un extracto orgánico de la yema de huevo, que contiene aproximadamente un 60% de PC. El 40% restante está constituido mayoritariamente por fosfatidiletanolamina, con cantidades menores de otros fosfolípidos. Su nombre químico es 1,2-diacil-*sn*-glicero-3-fosfocolina y con un peso molecular de 768 g/mol. Se conserva a 4 °C (Sigma-Aldrich, Madrid).

Fosfatidiletanolamina (PE) (L- α -Fosfatidiletanolamina). Se presenta en forma de solución (10 mg/mL) en cloroformo, con peso molecular 726,076 g/mol. Se conserva a -20 °C (Sigma-Aldrich, Madrid).

Fosfatidilglicerol (PG) (L- α -Fosfatidil-DL-glicerol sódico). Se presenta en forma de polvo blanco, con nombre químico 1,2-Diacil-*sn*-glicero-3-fosfo-(1-*rac*-glicerol). Se trata de un extracto orgánico de la yema de huevo. Se conserva a -20 °C (Sigma-Aldrich, Madrid).

Hepes. Se presenta en forma de polvo blanco, con nombre químico ácido 2-[4(2-hidroxietil)-1-piperacínil] etanosulfónico, con fórmula empírica $C_8H_{18}N_2O_4S$ y peso molecular 238,30 g/mol (Panreac Química, Barcelona).

Hidrógeno fosfato disódico anhidro. Se presenta en forma de sólido blanco, cristalino, con fórmula empírica Na_2HPO_4 y con peso molecular 141,96 g/mol (Panreac Química, Barcelona).

Hidróxido de sodio. Se presenta en forma de perlas blancas duras y quebradizas, muy higroscópico. Agente alcalinizante, muy soluble en agua, con fórmula empírica $NaOH$ y peso molecular 40 g/mol (Panreac Química, Barcelona).

Hidroxilamina. Se presenta en forma de solución al 50 %, con fórmula empírica NH_2OH y peso molecular 33,03 g/mol (Sigma-Aldrich, Madrid).

Metanol. Se presenta en forma de líquido incoloro con fórmula empírica CH_3OH y peso molecular 32,0 g/mol. Calidad analítica (Panreac, Barcelona).

Reactivo Ellmann (RES). Se presenta en forma de solución constituida por 4 mg DTNB en 1 mL de tampón RB (Thermo Scientific, USA).

Rodamina B. Se presenta en forma de polvo rojo con fórmula empírica $C_{28}H_{31}ClN_2O_3$, con un peso molecular de 479,01 g/mol. Es utilizado como marcador fluorescente que es excitado a una longitud de onda de 540 nm y emite a una longitud de onda de 570 nm (Sigma-Aldrich, Madrid).

SATA (Éster del ácido S-acetiltioglicólico N-hidroxisuccinimida). Se presenta en forma de polvo con fórmula empírica $C_8H_9NO_5S$ y peso molecular 231, 23 g/mol. Es soluble en dimetilformamida (DMF) (Sigma-Aldrich, Madrid).

Solución de Inmunoglobulina G-FITC 20 mg/ml. Se presenta en forma de solución acuosa compuesta por 0,01 M de tampón fosfato y 15 mM de azida sódica, pH 7,4. Se trata de una inmoglobulina G conjugada con el marcador fluorescente FICT (Sigma-Aldrich, Madrid).

Solución de molibdeno amónico. Se presenta en forma de líquido constituido por 1,3 % de óxido de molibdeno en una solución de ácido sulfúrico 4,2 M. Es empleado en cromatografía como revelador de placas TLC (Sigma-Aldrich, Madrid).

Tampón Hepes. Se prepara en forma de solución con una concentración 10 mM de ácido 2-[4(2-hidroxietil)-1-piperacil] etanosulfónico a un pH 5,5.

Tampón RB. Se presenta en forma de solución constituida por 0,1 M de hidrógeno fosfato disódico anhidro (Panreac Química, Barcelona) con 1 mM de EDTA.

Tiocianato amónico. Se presenta en forma de sólido que puede absorber la humedad del aire y convertirse en líquido, con fórmula empírica NH_4SCN y peso molecular 76,12 g/mol (Panreac Química, Barcelona).

Trietilamina (TEA). Se presenta en forma de solución, con fórmula empírica $(HOCH_2CH_2)_3N$ y peso molecular 149,19 g/mol (Sigma-Aldrich, Madrid).

Los materiales empleados en el Bloque II de la presente Tesis Doctoral fueron los siguientes:

1,2 Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC): Polvo blanco de fórmula empírica $C_{40}H_{70}NO_8P$, y peso molecular 734.039 g/mol. Se almacena a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Sigma-Aldrich, USA).

Acetonitrilo (ACN): Su fórmula empírica CH_3CN y peso molecular 41,05 g/mol. Calidad HPLC (Panreac, Barcelona).

Ácido acético de forma molecular CH_3COOH y peso molecular 60,05 g/mol.

Ácido acético glacial: Líquido incoloro con un olor picante característico, de fórmula empírica CH_3COOH y peso molecular 60,05 g/mol (Scharlau Chemie S.A., España).

Ácido ascórbico: Polvo o cristales de color blanco, de fórmula empírica $C_6H_8O_6$, y peso molecular 176.12 g/mol (Sigma-Aldrich, China).

Agua Milli-Q® (Milli-Q® Advantage, Millipore).

Celulosa (HPMC, hidroxipropilmetilcelulosa) 7,18 mg por cada inserto. Agente viscosizante.

Chitosan (Poli- β -(1,4)-2-amino-2-deoxy-D-glucosa). Polvo de color blanco, de fórmula empírica $C_{56}H_{103}N_9O_{39}$, y peso molecular 1526,464. Es una poliamina catiónica con gran densidad de carga a un $\text{pH} < 6,5$.

Cloroformo: Triclorometano estabilizado con etanol, de fórmula empírica $CHCl_3$. Calidad analítica (Panreac Química, Barcelona).

Cloruro de cobre (I): Polvo de color verdoso, de fórmula empírica $ClCu$, y peso molecular 99 g/mol (Sigma-Aldrich, China).

Cloruro de sodio: Cristales translúcidos blancos, muy solubles en agua. De fórmula empírica $NaCl$ y peso molecular 58,44 g/mol (Acofarma, Barcelona).

Colesterol (CH): También llamado 3- β -hidroxi-5-colesteno. Polvo blanco de fórmula empírica $C_{27}H_{46}O$, y peso molecular 386,67 g/mol. Punto de fusión $148,5\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se conserva a temperatura ambiente (Sigma-Aldrich, Barcelona).

Colesterol hemisuccinato (CH-HS): Polvo de color blanco, de fórmula empírica $C_{31}H_{50}O_4$, y peso molecular 486,74 g/mol (Sigma-Aldrich, Barcelona).

Curcumina: Obtenida de la raíz de *Curcuma longa* (Turmeric). De fórmula empírica $[HOC_6H_3(OCH_3)CH=CHCO]_2CH_2$ y peso molecular 368.38 g/mol (Acofarma, Barcelona).

D(+)-trehalosa dihidrato. Polvo de color blanco, de fórmula empírica $C_{12}H_{22}O_{11}$, y peso molecular 342,29.

Dicetilfosfato (DCP): Polvo blanco cristalinos, de fórmula empírica $C_{32}H_{67}O_4P$ y peso molecular 546.84 g/mol. Se almacena a $-18\text{ }^{\circ}C$ (Sigma-Aldrich, Alemania).

EDTA: También llamado ácido etilendiaminotetraacético, es una sustancia utilizada como agente quelante. De fórmula empírica $C_{10}H_{16}N_2O_8$, y peso molecular 292,24 g/mol (Acofarma, Barcelona).

Estearilamina (EA): También llamada octadecilamina. Polvo blanco, insoluble en agua, de fórmula empírica $C_{18}H_{39}N$, y peso molecular 269,52 g/mol. Se conserva a temperatura ambiente (Fluka-Biochemika, Suiza).

Etanol 96^º: Líquido incoloro, inflamable y volátil. De formula empírica C_2H_6O , y peso molecular 46.07 g/mol. Debe de conservarse entre 3^º y 35^º, protegiéndose de la luz. (Panreac Química, Barcelona).

Éter: También conocido como dietiléter. Es un líquido incoloro, higroscópico muy volátil, de olor característico. De fórmula empírica $C_4H_{10}O$, y peso molecular 74.12 g/mol (Panreac Química, Barcelona, España).

Fosfatidilcolina (PC): También llamado L-a-Fosfatidilcolina de huevo. Es un extracto orgánico de la yema de huevo que contiene aproximadamente un 60% de PC. El 40% restante está constituido mayoritariamente por fosfatidiletanolamina, con cantidades menores de otros fosfolípidos. Su nombre químico es 1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina y su peso molecular 768 g/mol. Se conserva a $4\text{ }^{\circ}C$ (Sigma-BioChemika, Alemania).

Glicina: Polvo de color blanco, de fórmula empírica $C_2H_5NO_2$, y peso molecular 75,07 g/mol. Tiene una pureza $\geq 98.5\%$. Es soluble en agua 100 mg/mL (Sigma-Aldrich, USA).

Goma Xantana. Agente viscosizante.

Hidróxido de sodio: Perlas blancas duras y quebradizas, muy higroscópicas. Agente alcalinizante, muy soluble en agua. De peso molecular 40 g/mol (Acofarma, Barcelona).

HP- β -ciclodextrina: Polvo blanco cristalino, de fórmula empírica $C_{63}H_{112}O_{42}$, y peso molecular 1396 g/mol (Sigma Aldrich, China).

Lauril sulfato sódico: Polvo fino blanco, con débil olor característico. De fórmula empírica $C_{12}H_{25}NaO_4S$, y peso molecular 288,38 g/mol (Acofarma, Barcelona).

Levodopa: Polvo cristalino, blanco o casi blanco. De fórmula empírica $C_9H_{11}NO_4$, y peso molecular 197,18 g/mol. Poco soluble en agua, prácticamente insoluble en etanol 96%, fácilmente soluble en ácido clorhídrico 1 M, y bastante soluble en ácido clorhídrico 0.1 M (Acofarma, Barcelona).

Medio nasal (SNF, simulated nasal fluid): 7,45mg/ml NaCl, 0,32 mg/ml $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1,29 mg/ml KCl pH 6,5

Metanol: De fórmula empírica CH_3OH y peso molecular de 32,0 g/mol. Calidad analítica (Panreac, Barcelona).

Monoestearato de Sorbitan (Span[®] 60): Pequeñas escamas de color pardo-amarillento claro, tacto ceroso y ligero olor característico, de fórmula empírica $C_{24}H_{46}O_6$, y peso molecular 430,63 g/mol. Punto de fusión de 50°C, aproximadamente. Se conserva a temperatura ambiente (Acofarma, Barcelona).

Nitrotetrazolium blue chloride: Polvo de color amarillo. De fórmula empírica $C_{40}H_{30}Cl_2N_{10}O_6$, y peso molecular 817.64 g/mol. Es sensible a la luz (Sigma-Aldrich, USA).

Pluronic F127

Superóxido dismutasa: Enzima con un cofactor. Es de color blanco. (Sigma-Aldrich, USA).

Tampón Hepes: También llamado ácido 2-[4(2-hidroxietil)-1-piperacil] etanosulfónico (Hepes) de fórmula empírica $C_8H_{18}N_2O_4S$, y peso molecular 238,30 g/mol (Panreac Química, Barcelona).

Tween 80: Líquido viscoso no iónico incoloro o amarillo pardusco de fórmula empírica $C_{64}H_{124}O_{26}$, y peso molecular 1309.7 g/mol (Sigma-Aldrich, Barcelona).

Xantina oxidasa: Proteína de forma de xantina oxidoreductasa. Es de color pardo (Sigma-Aldrich, USA).

Xantina: Polvo de color blanco pardo, de fórmula empírica $C_5H_4N_4O_2$, y peso molecular 152.11 g/mol. Su pureza es $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, China).

ABREVIATURAS

3,4-DFA: Ácido 3,4- dihidroxifenil acético

3-MT: 3-metoxitiramina

3-OMD: 3-orto metil dopa

AA: Ácido ascórbico

ACN: Acetonitrilo

ANOM: Análisis de medias

ANOVA: Análisis de varianzas

BHE: Barrera hematoencefálica

CD: Ciclodextrinas

CH: Colesterol

CH-HS: Colesterol-hemisuccinato

COMT: Catecol O-metil transferasa

CSF: Barrera fluido cerebrospinal

CV: Coeficiente de variación

DA. Dopamina endógena

DAT: Transportador de dopamina

DCP: Dicetilfosfato

DDAB: Bromuro de dimetildidodecilamonio

DDC: Dopamina descarboxilasa

DMF: Dimetilformamida

DMSO: Dimetilsulfóxido

DPPC: 1,2 dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina

DTNB: 5,5-Ditiobis ácido 2-nitrobenzoico

E: Extruido

EA: Estearilamina

EE: Eficacia encapsulación

ELA: Esclerosis lateral amiotrófica

EP: Enfermedad de Parkinson

EPC: Fosfatidilcolina de huevo

EPG: Fosfatidilglicerol de huevo

FAT: Calentamiento y congelación

HPLC: Cromatografía líquida de alta resolución

HPMC: Hidroxipropil metilcelulosa

HVA: Ácido homovanílico

Ig G: Inmunoglobulina G

Ig G-FITC: Inmunoglobulina G- isotiocianato de fluoresceína

IMAO: Inhibidor MAO-B

IP: Índice polidispersión

IR: Espectroscopía infrarrojo

LAAD: L-aminoácido aromático-descarboxilasa

L-dopa: Levodopa

LOD: Límite de detección

LOQ: Límite de cuantificación

LUV: Vesículas unilaminares grandes

MAB: Anticuerpos monoclonales

MAO-B: Mono-amino oxidasa tipo B

MLV: Vesículas multilaminares

MTH: Caballo de troya molecular

NTB: Nitroazul de tetrazolio

PE: L- α -Fosfatidiletanolamina

PEG: Polietilenglicol

PEG400: Polietilenglicol 400

PE-MPB: Maleimidofenil butiril fosfatidiletanolamina

PG: Propilenglicol

RES: Solución del reactivo Ellmann

REV: Evaporación en fase reversa

RSD: Desviación estándar relativa

SAMSA: S-acetilmercaptosuccínico anhídrido

SATA: Ácido S-acetiltioglicólico N-hidroxisuccinamida éster

SD: Desviación estándar

SE: Sin extraer

SMPB: Éster del ácido 4-(4-Maleimidofenil) butírico N-hidroxisuccinimidil

SNC: Sistema Nervioso Central

SOD: Superóxido dismutasa

SON: Sonicación

SPDP: N-succinimidilpiridilditiopropionato

SUV: Vesículas unilaminares pequeñas

TEA: Trietilamina

TEM: Microscopía electrónica de transmisión

TLC: Cromatografía en capa fina

TLE: Evaporación en capa fina

TNB: 2-nitro-5-tiobenzoico

TR: Tiempo retención

X/XOD: Xantina/Xantina oxidasa

XOD: Xantina oxidasa

PUBLICACIONES

RESEARCH ARTICLE

Surface functionalizing of a lipid nanosystem to promote brain targeting: step-by-step design and physico-chemical characterization

M. J. Cózar-Bernal^{1*}, E. García-Esteban^{1*}, P. J. Sánchez-Soto², A. M. Rabasco¹, and M. L. González-Rodríguez¹

¹Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain and ²Institute of Materials Science of Sevilla, Spanish National Research Council (CSIC), Universidad de Sevilla, Sevilla, Spain

Abstract

The use of lipid nanosystems as drug delivery to the central nervous system may be advantageous over the current strategies. The aim of this study was to develop and characterize functionalized liposomes for treatment of brain diseases. The covalent method of coupling IgG to liposomes via the derivatized lipid 1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(*p*-maleimidophenyl)butyramide](MPB-PE) was investigated. Optimized coupling conditions are shown to result in the efficient conjugation of IgG to liposomes containing low concentrations of MPB-PE (3/1 SH:IgG). The qualitative analysis has shown that after the extrusion process, more homogeneous populations of vesicles have been obtained with a nanometric size suitable to be effective to further anchor the protein. Negative values of zeta potential demonstrate that they are stable systems. Lyophilization was used to maintain the stability of the formulation. These very interesting results encourage further investigations to formulate peptide- and protein-loaded immunoliposomes, making targeting of liposomes as an attractive approach for brain drug delivery.

Keywords

Blood brain barrier, molecular Trojan Horse, targeted drug delivery

History

Received 18 May 2015
Revised 10 June 2015
Accepted 12 June 2015
Published online 2 July 2015

Introduction

Receptor-mediated transcytosis (RMT) is an important transport pathway for endogenous peptides, such as insulin, insulin-like factor growth factor and transferrin. It is highly specific and it uptakes macromolecules presented on the luminal side of the brain endothelial cells and delivers them to the brain, with the receptor recycled back to the luminal membrane^{1,2}. The knowledge of functionality of these receptor-mediated transcytosis is crucial in the designing or selecting an appropriate drug delivery system for transporting drugs across blood-brain barrier (BBB): if a receptor is amplified or up-regulated under pathological conditions, it will aid drug transport into the brain via RMT. If the receptor is responsible for transporting nutrients or metabolites, it will not be a good target candidate for drug delivery. Various strategies have been developed to deliver drugs into the brain that would not otherwise be able to cross the BBB. Among them, nanocarriers are an emerging class of drug delivery systems that can be tailored to deliver drugs to the brain³.

Despite a large variety of nanocarriers developed so far, it is noteworthy that only amphiphilic molecule-formed liposomes and polymeric nanoparticles have been extensively exploited for brain drug delivery. Protein-conjugated liposomes have attracted a

great deal of research interest, mainly due to their potential use as targeted drug delivery systems and in diagnostic applications⁴.

The success of the strategy of vector-carrier coupling for brain targeting has been documented with immunoliposomes, which are transported across the BBB via receptor-mediated endocytosis or the efficient uptake of cation albumin-coupled liposomes by brain capillaries via adsorptive endocytosis¹. Antibodies are the most commonly conjugated proteins and, in terms of chemical approach to functionalization, there are several reasons for the design of ligand coated long-circulating drug carriers: the ligand (a peptidomimetic monoclonal antibody, MAb), attached to the carrier surface, may increase the rate of removal from the blood and uptake in the liver and spleen, and longevity of the specific ligand-bearing liposomes may allow for its successful accumulation in targets with diminished blood flow or with low concentration of the surface antigen^{5,6}. The receptor-specific MAb may act as a molecular Trojan Horse (MTH), carrying across the BBB any attached molecule. The most studied systems using liposomes can carry targeting ligands for insulin receptor, transferrin receptor (TR) and EGF receptor, among others⁷. The technological process of obtaining the complexes nanostructures can be divided in several stages, as was collected in Figure 1.

The main objective of this article was to design, characterize and optimize, step by step, the synthesis of immunoliposomes to be targeted to the brain following MTH technology. This tuning makes possible to target any molecule, hydrophilic or lipophilic, or both of them, into the lipid vesicles, focusing a special attractive to drugs acting into the brain.

*These authors contributed equally to this study.

Address for correspondence: M. J. Cózar-Bernal, Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, C/ Profesor García González, no. 2, 41012 Sevilla, Spain. E-mail: cozar@us.es

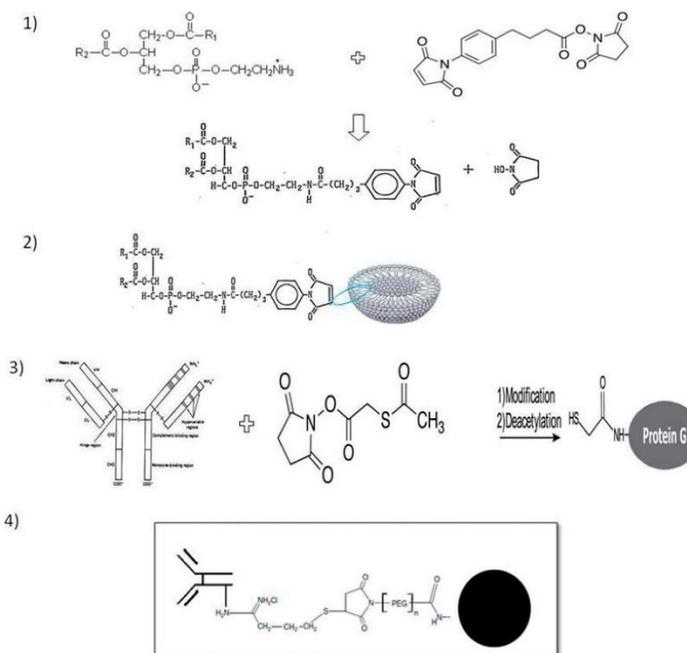


Figure 1. Preparation of functionalized liposomes.

Materials and methods

Chemical and reagents

Synthesis and characterization of liposomes

Egg phosphatidylcholine (EPC), cholesterol (CH), egg phosphatidylglycerol (EPG), 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-*N*-[methoxy-(polyethyleneglycol)-2000] (PEG-PE), triethylamine (TEA), silicic acid, Sodium phosphomolybdate hydrate, Rhodamine B ([9-(2-carboxyphenyl)-6-diethylamino-3-xanthenylidene]-diethylammonium chloride) and 4-(*p*-maleimidophenyl) butyric acid *N*-hydroxysuccinimide ester (SMPB) were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Chloroform, methanol, ferric chloride hexahydrate and ammonium thiocyanate were received from Panreac Chemistry (Barcelona, Spain). Deionized and purified water using a Milli-Q system (Millipore, Mosheim, France) was selected as solvent for the standard solution preparation.

Production of antibody-liposome conjugates

Sodium hydroxide, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) and reaction buffer (RB; 0.1 M sodium phosphate containing 1 mM EDTA) were received from Panreac Chemistry (Barcelona, Spain). Sodium chloride was received from Acofarma (Barcelona, Spain). Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) was obtained from Fagron (Barcelona, Spain). Ig G-FITC solution 20 mg/mL, *S*-acetylthioglycolic acid *N*-hydroxysuccinimide ester (SATA), hydroxylamine and dithiobis-2-nitro-benzoic acid (DTNB – Ellman's reagent) were received

from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Immunoliposomes were functionalized using established procedures by other authors^{8–10}.

Synthesis of *N*-[4-(*p*-maleimidophenyl)-butyryl] phosphatidylethanolamine (SMPB-PE)

Briefly, 10 μmol EPE were dissolved in 1 mL of dried chloroform following the addition of 0.5 mL of dried methanol containing 15 μmol of SMPB and 30 μmol of triethylamine (TEA). The mixture was stirred at room temperature under nitrogen atmosphere for 2 h until the reaction was completed. Thin layer chromatography (TLC) on silica was used to check the progress of the reaction (running solvent: chloroform/methanol/water 65:25:4 v/v/v). From this analysis, the spots were visualized by spraying an ammonium molybdate solution on the TLC plate. This reagent is specific for detection of phosphoric acid derivatives and was used because several authors have demonstrated that the covalently linked derivative eluted faster than free PE. When the reaction was completed (no more free PE on the TLC plate), the mixture was dried down on a rotary evaporator¹⁰.

In order to remove the residual TEA from the derivative lipid sample, a solid-phase extraction process was applied using silicic acid columns. They were prepared dispersing 2 g of silicic acid in 5 mL of chloroform, into a plastic syringe plugged with pressed glass fiber. After remaining for 1 h, the columns were washed with 4 mL aliquots of chloroform/methanol mixtures, as follows: 4:0.25, 4:0.5, 4:0.75 and finally 4:1 (v/v) ratio. This stage must be carried out faster to avoid the hydrolysis of ester linkages caused by the TEA presence, leading to the formation of

lyso-compounds. After adding the phospholipid sample, previously dissolved in chloroform, different fractions were collected from each of elution mixture, being subsequently analyzed by TLC. The resulting product was concentrated by evaporating under reduced pressure in a rotary evaporator to obtain a synthetic and pure lipid MPB-PE that was frozen for further studies.

Preparation and characterization of liposomes

Appropriate amounts of EPC, cholesterol, EPG, PEG-PE and MPB-PE, at a molar ratio of 6.5:2.6:0.8:0.2:0.1 molar ratio⁵ were dissolved in chloroform. The solvent was removed using a rotary evaporator (Büchi rotavapor R-210 with Büchi Heating Bath B-491, Flawil, Switzerland) and the lipid film was dried under vacuum overnight. After adding the buffer solution (10 mM HEPES, 150 mM NaCl at pH 7.4 and mixing five times, for 2 min, following heating at 58 °C for 5 min, vesicles were formed. The temperature of the process was maintained at 58 °C, above the gel–liquid transition temperature (T_c) of the amphiphilic and lipid substances. All formulations were quickly sealed in glass containers and stored in the dark at 4 °C. In order to fluorescently visualize the vesicles, the lipid film was hydrated with a Rhodamine B solution in HEPES buffer.

Liposome size was reduced by extrusion. A 10 mL of MLV sample were placed in a minixtruder (Lipex™ Thermobarrel Extruder, Burnaby, B.C., Canada) thermostated at 58 °C and sequentially passed through 0.8 and 0.4 µm pore size polycarbonate membranes (Millipore) for 10 times to generate large unilamellar vesicles.

Dimensional parameters, polydispersity and zeta potential of Rhodamine B-loaded liposomes were measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano series apparatus (Malvern Instruments, Malvern, UK), at 25 °C and a scattering angle of 90° after at least 1:20-fold dilution with purified water. For the zeta potential measurement, the Zetasizer Nano was equipped with a dip-cell (Malvern Instruments, Malvern, UK). The morphology was observed by optical and fluorescence microscopy (Olympus BX61 (Tokyo, Japan) illuminated by a 100 W mercury lamp for direct observation and an argon–krypton–helium/neon laser). Also, we employed the Stewart assay to determine the amount of phospholipids (PEG-EPE, EPG and MPB-PE) in liposomes, as was previously described by Zuidam et al.¹¹. This assay was utilized due to the ability of phospholipids to form a complex with ammonium ferriothiocyanate in organic solution. The advantage of this method is that the presence of inorganic phosphate does not interfere with this assay and, therefore, PBS buffer or other phosphate buffers can be used. Briefly, 27.03 g of ferric chloride hexahydrate and 30.4 g of ammonium thiocyanate were dissolved in double distilled water to a volume of 1 L, generating the ferriothiocyanate reagent. The standard solution was prepared making up 10 mL of solution of phospholipid in chloroform at concentration of 0.1 mg/mL. After adding increasing volumes of standard solution and chloroform, samples were centrifugated at 1000 rpm to remove the lower layer using a Pasteur pipet, the optical density of standards and samples were read at 485 nm in an UV–visible spectrophotometer.

Thiolation of IgG-FITC with SATA

The IgG-FITC modification with SATA was performed following the next protocol: the antibody dissolved in 0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.6) at a concentration of 5 mg/mL was reacted for 40 min at 25 °C under nitrogen atmosphere and gentle stirring with SATA stock solution which was dissolved in a minimal volume of dimethylformamide (25 mg/mL). Both solutions were mixed at 1:4 IgG-FITC:SATA molar ratio. Unreacted

SATA was removed by dialysis at 4 °C against 1000 volumes of the same buffer over the night. Finally, the IgG-FITC-SATA sample was concentrated to obtain 20 mg/mL and subsequently frozen and stored at –20 °C for further use.

To measure the amount of antibody-linked SATA, aliquots of this complex were deacetylated with hydroxylamine, followed by the determination of free sulphhydryl groups (SH) based on molar absorptivity using Ellman's reagent. A solution of Ellman's reagent [4 mg of DTNB (5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) in 1 mL of reaction buffer (RB) prepared from 0.1 M sodium phosphate pH 8.0 containing 1 mM EDTA], was obtained (RES).

A volume of 50 µL of RES and 2.5 mL of RB were added to each unknown sample to be tested (250 µL). The same volume of RB was added as a control reference. Samples were mixed and incubated at room temperature for 15 min. Samples were measured at 412 nm in triplicate by UV–visible spectrophotometry (spectrophotometer Agilent 8453).

Coupling of thiolated IgG-FITC to liposomes

Immunoliposomes were prepared by attaching the IgG-FITC at the distal terminals of MPB-PE. For this purpose, 100 µL of the IgG-FITC solution was incubated with the activating reagents in hydroxylamine 0.1 M at room temperature for 45 min (3:1 molar ratio of SH to protein). Then, 100 µL of IgG-FITC activated solution was added to 100 µL of liposomes and incubated overnight at room temperature.

Confocal laser scanning microscopy (CLSM) confirmed the success of the coupling reaction and the functionalization reaction was monitored by infrared spectroscopy (IR) and elemental microanalysis.

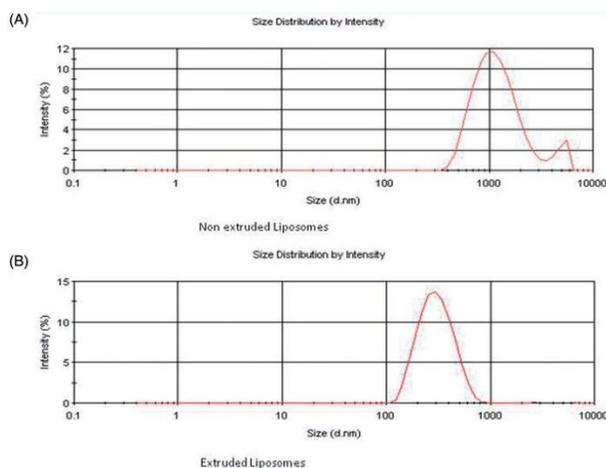
Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was used to direct visualization of IgG coupling to liposomes. For this, immunoliposomes and unlabeled liposomes were dispersed in buffer 10 mM HEPES (1:10 w/v). The equipment used was a Leica TCS SP II confocal unit (Leica, Heidelberg, Germany) equipped with a Krypton–Argon–Helium/Neon laser and mounted on a Leica DM IRE II inverted microscope (Leica, Heidelberg) using HC PL Fluotar Leica lens, with magnifications of 10, 20 × (dry) and HCX PLAN APO Leica lens 40 × (0.85 multi-immersion objective) on its oil position. For fluorophore excitation, 494 or 540 nm laser line (FITC and Rhodamine B, respectively) was used and the fluorescence emission was detected above 520 or 570 nm (FITC and Rhodamine B, respectively).

The experimental conditions used for use the confocal microscope were: magnification 10, 20 and 40×, laser power 5%, scan modus slow, gain values 400–600, x–y–z mode, 488 nm emission line at 31% maximum power, transmission light channel activated and bidirectional scanning pattern.

Samples containing IgG-anchored functionalized liposomes (IgG-SMPB-liposomes) loaded with Rhodamine B in the aqueous compartment were analyzed by using the transmitted light, which will be compared with functionalized liposomes (SMPB-liposomes) without coupled-IgG. Both samples containing Rhodamine B probe were analyzed to obtain images by fluorescence emission^{12,13}.

To determine ligand coupling efficiency, samples of liposomes without IgG and immunoliposomes were analyzed by infrared spectroscopy (IR). This technique was applied qualitatively to identify certain functional groups in our molecule by characteristic bands present in certain regions of the spectrum. The Fourier Transform IR measurements (FTIR) were performed in solid state with a Jasco IRT-5000 FTIR-6200 apparatus (Jasco Co., Tokyo, Japan). The dried samples were crushed with KBr previously heated at 400 °C and pressed into pellets. Spectral scanning was done in the range between 4500 and 200 cm⁻¹.

Figure 2. Size distribution curves obtained from DLS data. (A) Peak shift from liposomes non-extruded. (B) Peak shift from liposomes extruded.



Prior to recording, the spectra were transformed against a KBr background.

Finally, elemental analysis is a traditional, but rather essential tool for determining the composition of organic materials. This technique involves the combustion of the test sample in an oxygen-rich environment. The products of combustion in a CHNS analysis (CO_2 , H_2O , N_2 and SO_2) are carried through the system using the He carrier gas. The combustion products are measured quantitatively by means of a non-dispersive IR absorption detection system, except for the nitrogen (N_2), which is determined via thermal conductivity detector (TCD). The measurements were performed with a LECO CHNS-932 Elemental Analyser (Madrid, Spain).

Stability of immunoliposomes

Lyophilization is the most commonly used technique to improve the physical stability of liposomes. This technique allows to completely removing water without producing any change in its basic structure or composition. In this study, we attempted to identify suitable cryoprotectants for producing stable lyophilized immunoliposomes and to characterize the impact of lyophilization on liposomes. Therefore, cryoprotectants were incorporated in the aqueous phase of liposome or dissolved in freshly prepared liposomes. Trehalose as cryoprotectant has proved more effective in inhibiting the growth of liposome particles during freeze-drying process¹⁴. Trehalose dihydrate (20% w/v) was added as cryoprotectant to liposomes (5:1 molar ratio sugar:lipid). The samples were frozen at -70°C in liquid nitrogen for 20 min, following the lyophilization at -57°C for 24 h at 1 mtorr of pressure (VirTis Benchtop lyophilizer). No secondary drying was performed. The lyophilized samples were stored at -20°C for further characterization.

Results

Characterization of liposomes

Liposomes were prepared according to the thin layer evaporation technique. Liposome batch 1 was prepared without further extrusion, whereas batch 2 was submitted to an extrusion process by 800 nm followed by 400 nm membrane filter diameters.

Regarding the vesicular size distribution, a clear difference between the extruded and non-extruded liposomes was appreciated, as expected (Figure 2).

With respect to dimensional analysis (Table 1), the results after the extrusion process (309.40 ± 1.23 nm) have allowed to conclude that this process results in a population of vesicles according to the size of the pore diameter of the membrane filter used and therefore able to cross biological membranes¹⁵. Extruded liposomes were less scattered in size, having a more homogeneous population, as reflected by PDI values and the narrower distribution curve shown in Figure 3¹⁵⁻¹⁸.

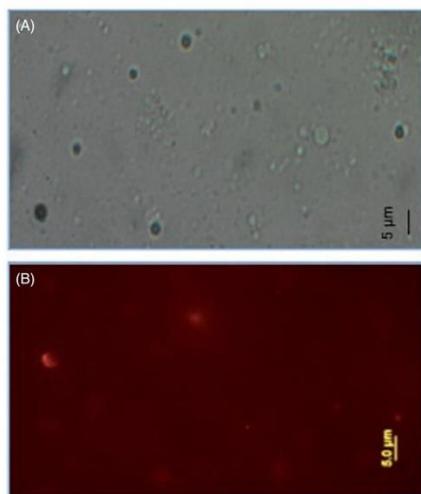
The surface charge of functionalized liposomes was maintained before and after the extrusion, indicating that this parameter was not affected after the extrusion process. According to other authors, we can say that the lipid molecules, giving negative charge to liposome surface, have not been disrupted after the extrusion process^{19,20}. The presence of negative values of zeta potential (about -11 mV) causes repulsive forces that prevent the aggregation and fusion of liposomes. Therefore, the system was stabilized by electrostatic repulsion, as was observed by optical microscopy.

The charge measured of all liposome preparations was slightly negative, ranging from -11.83 to -11.20 mV. From the phosphorus percentage quantification (88% recovered), we can conclude that the extrusion process has been successfully developed.

The morphology of liposomes was observed by optical and fluorescence microscopy (Olympus BX61) illuminated by a 100 W mercury lamp. Optical microscopy was used to verify that the formation of vesicles upon binding of the maleimide group to phospholipid phosphatidylethanolamine (PE). Figure 3(A) shows the different multilamellar bilayer vesicles with regular spherical shape. The vesicles appeared non-aggregated and characterized by smooth surface with narrow size distribution. Samples were also characterized by fluorescence microscopy for further visualization of IgG-FITC-loaded liposomes. In this step, liposomes were developed as control colloidal dispersions and rhodamine B was employed as model drug to be included into the aqueous compartment. Morphological shape of rhodamine-loaded MPB-PE liposome was depicted in Figure 3(B).

Table 1. Experimental sizes, polydispersion index (PI) and Zeta potential (ζ , mV) results of the formulations extruded (E) and non-extruded (NE).

	Liposome characteristics			Functionalized liposome characteristics		
	Size (nm)	PDI	Zeta potential (ζ , mV)	Size (nm)	PDI	Zeta potential (ζ , mV)
NE	958.60 \pm 90.30	0.21 \pm 0.18	-11.20 \pm 0.20	1124.36 \pm 78.32	0.23 \pm 0.16	-9.62 \pm 0.29
E	309.40 \pm 1.23	0.14 \pm 0.08	-11.83 \pm 0.35	495.40 \pm 1.45	0.13 \pm 0.10	-9.87 \pm 0.27

Figure 3. Optical and fluorescence images of liposomes with a particle diameter range approximately 0.5–4 μ m.

We employed the Stewart assay to determine the amount of phospholipids [polyethylene glycol-phosphatidylethanolamine (PEG-PE), phosphatidylglycerol (PG) and MPB-PE] in vesicles, as was previously described^{13,14,21}. Therefore, the results obtained show a recovery of 54% w/v of phospholipids [Phosphatidylcholine (PC), PE and PE-MPB]. Only 12% w/v of phospholipids was lost during development. Therefore, the preparation of liposomes was successfully occurred.

Coupling the labeled protein to liposomes

IgG-FITC was modified with SATA²² in order to thiolate the protein. In order to quantify the effectiveness of thiolation of the protein, Ellman's reagent (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) was used. Ellman's reagent measures thiol residues. To ensure success in protein coupling to liposomes, it is important to know that the protein molecule has the proper degree of thiolation. In general, two or three thiol residues per protein are optimal to the degree of thiolation. The evaluated samples contained 4.256×10^{-8} mol SH groups and minimum amount of SH groups in the sample should be 3.75×10^{-8} mol of SH groups. According to these results, we can conclude that the thiolation process has been successfully produced^{5,8}.

Finally, immunoliposomes functionalized were characterized using different characterization techniques, such as FTIR techniques, fluorescence microscopy, laser scanning confocal microscopy and microanalysis.

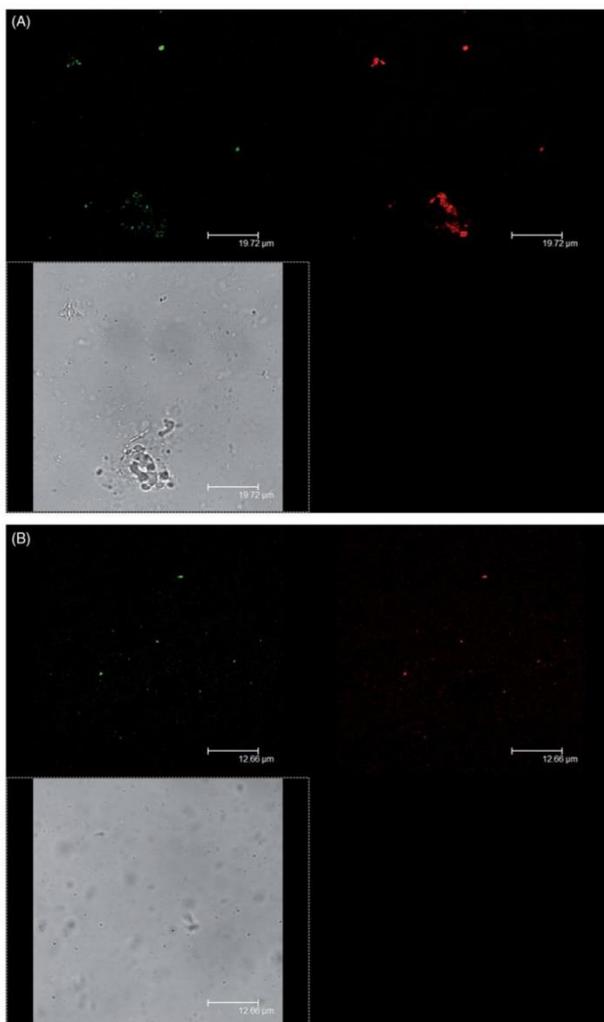
Confocal laser scanning microscopy

Immunoliposomes were prepared by attaching the IgG-FITC at the distal ends of MPB-PE. For determining the extent of antibody coupled to liposomes, samples were correlated to a known quantity of fluorescein-labeled antibody. CLSM was used to directly visualize IgG coupled to liposomes. IgG-MPB-liposomes loaded with rhodamine B in the aqueous compartment were visualized using the transmitted light^{14,22,23}. Confocal analysis was performed to analyze the liposome morphology, to confirm their mean diameter determined by PCS and to verify the linkage between IgG-FITC and the liposomal bilayer. From Figure 4, we can visualize the samples of immunoliposomes in transmission mode (Figure 4A) and fluorescence mode (Figure 4B). In the absence of fluorescence, unilamellar vesicles were detected. When fluorescence phenomenon was applied, a characteristic green halo around the liposome was observed, standing for the antibody (IgG-FITC) attached to the liposome. When the vesicles were aggregated, the fluorescence intensity was higher. Therefore, we can assume that the labeled antibody has been efficiently bound to the liposome surface. Rhodamine B-loaded liposomes were easily visualized by CLSM due to its fluorescent emission properties as well as its high affinity to the lipid bilayer. The obtained results by transmitted light showed a homogeneous vesicle distribution with the presence of some aggregates. When fluorescence was emitted, a clear correlation between the intensity of green fluorescent spots in left upper plane (IgGFITC) and the intensity of red fluorescent spots in right upper plane was observed, corresponding to the entrapped rhodamine B within liposomes (Figure 4). This simultaneous allocation of both fluorescent probes in the CLMS observations corroborated the effective coupling between the liposome and the protein.

FTIR spectroscopy

Infrared spectroscopy (IR) was used to determine ligand coupling efficiency. This qualitative technique was applied to identify certain functional groups in our molecule that show characteristic bands in certain regions of the spectrum. Samples were analyzed by FTIR spectroscopy as a complementary technique to determine the IgG coupled to liposomes. However, no significant results were obtained (Figure 5). Also, we proceeded to study them after being subjected to heating at 120 °C to see any difference. However, some differences were observed with the increase of temperature. It clearly indicates that both FTIR spectra from immunoliposomes and liposomes without IgG showed almost the similar FTIR band except the peak at 1800 cm^{-1} . The broad band that appears near 3500 cm^{-1} was attributed to the presence of water molecules. At 1600 cm^{-1} another band appeared, corresponding to the presence of water molecules in the samples²⁴. Interesting results have been obtained at about 1800 cm^{-1} , where a narrow band appears, related to the stretching of the carbonyl group C=O of the secondary amine attached to the IgG (line blue). As a difference of the IgG free liposomes (line green), this signal indicates the linkage of immunoglobulin structure to liposomes by anchoring to the carbonyl group.

Figure 4. Confocal images obtained for the rhodamine-liposomes.



Elemental microanalysis

CHNS analysis is an important stage in certification of synthesized organic compounds and fundamental for proper authentication of the organic synthesis products at intermediate and final stages, as well as for quality control of the obtained organic compounds.

Data obtained after elemental microanalysis of PE and PE-IgG samples have been collected in Table 2. Considering that the microanalysis study has yielded a result of 2.37 μg sulfur, the coupling efficiency was about 40.37% w/w. Therefore, we can conclude that IgG-liposome coupling process was carried out satisfactorily²⁵.

Stability of immunoliposomes

Lyophilization is technique used to improve the physical stability of liposomes¹⁴. Lyophilization constitutes an excellent method to ensure long-term stability of sensitive pharmaceuticals, such as immunoliposomes^{15,26}. The morphological structure of liposomes was observed by optical microscopy (Figure 6A-batch 1 and Figure 6B-batch 2). The freeze-dried liposome powder was reconstituted with HEPES buffer (1:10) and the morphology was observed by optical microscope. Most vesicles were multilamellar with sizes larger than 1984.70 ± 85.20 and 519.35 ± 1.68 nm (non-extruded versus extruded samples). As reflected, freeze-dried liposomes exhibited significant increase in size and PdI

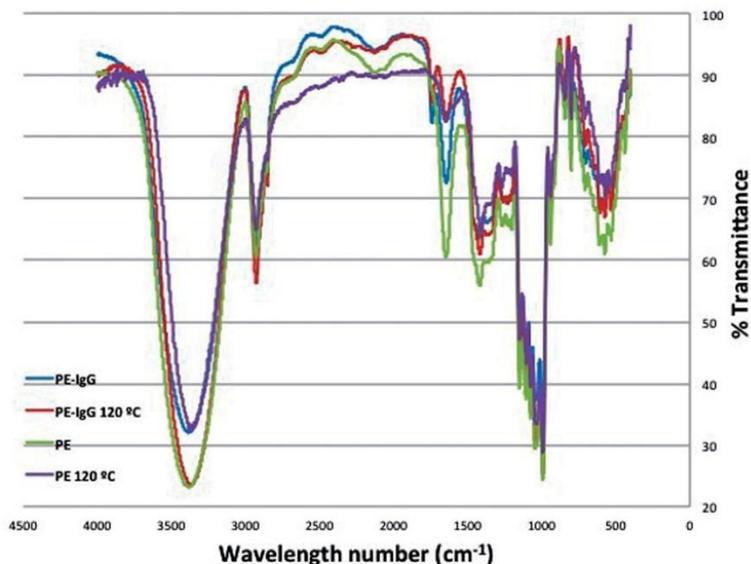


Figure 5. FTIR spectra of free liposomes and liposomes IgG anchored performed at room temperature and 120 °C.

Table 2. Elemental Microanalysis data obtained in PE and PE-IgG.

Sample	Analysis number	S% (w/w)	S% \pm SD (w/w)	% PE-IgG-PE
PE	#1	0.631	0.664 \pm 0.04	–
	#2	0.697		
PE-IgG	#1	0.696	0.705 \pm 0.02	0.042
	#2	0.690		
	#3	0.731		

upon reconstitution. Chaudhury et al.¹⁵ obtained similar results. Immunoliposomes were observed in good conditions after being submitted to freeze-drying. Then, according to the current results, it is evident that lyophilization is a good technique to prolong the stability of these complex systems²⁷.

Discussion

The development of this nanosystem will be able to deliver drugs and macromolecules to the brain, contributing to the advance of non-invasive methods of crossing the BBB. The capture of colloid particles by the reticuloendothelial system (RES) is prevented with the so-called ‘stealth technology’, by chemical binding of polyethylene glycol (PEG) to the nanoparticle surface¹⁹. In addition, the ability of these nanosystems to transport drugs to the brain is relatively enhanced due to their permeability capability through the BBB.

To alter the distribution in the organism, the vector, which is able to direct binding to specific tissues or cells, can be incorporated into liposomal surfaces. Protein-conjugated liposomes have attracted a great deal of interest, mainly due to their potential use as targeted drug delivery systems and in

diagnostic applications. Antibodies are the most commonly conjugated proteins. Conjugation with antibodies makes liposomes more recognizable by endothelial cells, offering the advantages of their possibility to target the drug to the desired location because of the high specificity and affinity of the antibody, reduced side effects and avoidance of the multidrug efflux system^{28,29}. Therefore, to deliver PEG-treated liposomes to the brain, the liposomes undergo an additional modification involving conjugation of monoclonal antibodies to glia, transferring receptors, lactoferrin receptors, low-density lipoprotein receptors or insulin receptors³⁰.

Certain peptidomimetic monoclonal antibodies undergo receptor-mediated transport across the BBB on the endogenous peptide receptor transporters. The peptidomimetic MAb binds exofacial epitopes on the BBB receptor, which triggers transport across the BBB. Since the MAb binding site is different from the binding site of the endogenous ligand, there is no interference with endogenous ligand transport. The peptidomimetic MAb may be used as MTH to carry out macromolecules⁷. Nowadays, this technology has become a widespread approach for DNA delivery to the central nervous system³¹.

Early methods for conjugation, such as the use of amino-reactive homobifunctional reagents or water-soluble carbodiimides that catalyze the formation of an amide linkage between amino groups from phospholipid with carboxyl groups of proteins, are generally inefficient and give rise to the protein polymerization. Actually, the preferred methods are designed in such a way that the protein can react only with the liposome surface. Among them, the reaction of maleimide derives with thiols to produce thioether bonds has supposed an important advance in the peptide conjugation methodology. In this reaction, the thiol-reactive lipids are synthesized using the reagent *N*-succinimidyl-4-(*p*-maleimidophenyl)butyrate (SMPB).

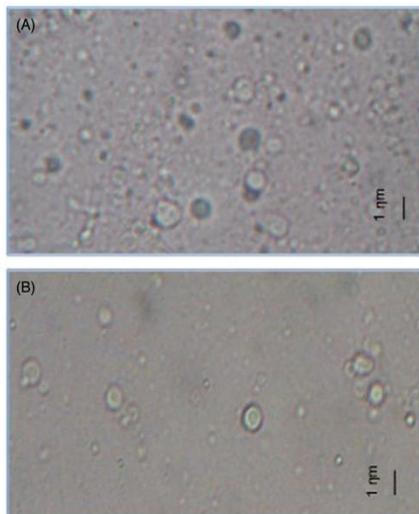


Figure 6. Selected optical microscopy image of lyophilized liposomes: (A) blank-MPBPE liposomes after reconstitution and (B) rhodamine-loaded MPB-PE liposomes after reconstitution.

This approach results in the production of an irreversible thioether linkage.

The studies presented here have been developed by following a procedure for the covalent coupling of MPB to liposomes. It is shown that the method employed allows an efficient coupling in the synthesis of MPB-PE, as was confirmed by TLC. The maleimide group is more specific for SH residues than the other reactive groups. The maintenance of pH 7 enables to maleimide groups to be 1000-fold more reactive toward free sulphydryls than amines.

Functionalized liposomes were prepared with maleimide derivative (SMPB) coupled with PEG2000-DSPE/PE. MPB-PE liposomes were compared to naked liposomes without maleimide linker conjugates with respect to vesicle size, polydispersity index (PDI) and zeta potential (ζ), as illustrated in Table 1, before and after the extrusion process⁵.

In general, a low percentage of molecules about 1–2% is bearing a terminal maleimide functional group, which allows to bind the liposome surface to the thiolated ligands. The ligand acts as MTH and is focused toward the endogenous receptor located at the BBB, such as insulin or transferrin^{32–35}.

In our study, once obtained and characterized maleimide functionalized liposomes, we proceeded to coupling the protein (IgG). Theoretically, transferrin-MAb (OX26 or R17217) coupling to nanoparticles, using maleimide as crosslinker, enables the manufacture of stable systems²⁵. R17217 (CD71) is a type II heterodimeric transmembrane glycoprotein that plays a role in the control of cellular proliferation by facilitating the uptake of iron via ferrotransferrin binding. This clone corresponds to isotype of rat IgG2a,κ. Therefore, in a first approach, we used in this study IgG as MAb control that simulated the structural and morphological properties of R17217.

The presence of SH groups is considered as an interesting functionalization strategy. It is well known that the frequency of these groups in antibodies or proteins is limited compared to other

functional groups, such as amines or carboxylates. The use of SH groups can modify certain sites within a target molecule. Such modification would greatly increase the ability to maintain the activity after conjugation, especially in sensitive proteins as enzymes²⁶. Numerous authors have pointed out the use of succinic acid derivatives to introduce exogenous thiol groups. Therefore, it is necessary to provoke a reaction of a –SH group donor such as *N*-succinimidyl-*S*-acetylthioacetate (SATA) with the monoclonal antibody. This SH reactive reagent is more specific and reacts with free SH residues, such as thiol group of maleimide. SATA has been used to introduce thiol groups employing the *N*-hydroxysuccinimide ester. In this case, the sulfur atom is introduced as a thioester, which is easily unblocked with hydroxylamine. NHS ester terminal group of SATA reacts with amino groups of the monoclonal antibody to form a stable amide linkage. The modified antibody contains a protected SH group. It can be stored without degradation. Since the presence of this amine do not interfere with the subsequent formation of disulphide and thioether bonds, the two reactions can be carried out in the same vessel without having to remove hydroxylamine before adding the protein to the liposome.

Deacetylated complex is incubated with liposomes and, therefore, functionalized to recognize and attach to transferrin receptors located on endothelial cells of the BBB^{36–39}.

The covalent attachment of antibodies to liposomes constitutes a widely used strategy to obtain valuable tools for targeted diagnostic and for the potential targeting of different substances showing a great variety of potential therapeutic uses. The determination of liposomal antibody conjugation efficiency (number of Ig molecules per liposome or Ig mass relative to liposome mass) is an important quality assessment parameter that can be correlated with quantitative measures of liposomal targeting efficiency. The successful procedure of this covalent linkage reaction has been demonstrated once determined the molar concentration of SH in the samples after reacting with the Ellman's reagent and quantified by UV–visible spectrophotometry and overpass the required molar ratio 3/1 with respect to protein content. This efficient coupling reaction between IgG and MPB-PE liposomes has qualitatively explained by fluorescence microscopy, CLSM and FTIR spectroscopy, as was shown in the previous section. According to the structure, free liposomes have a carbonyl group derived from the maleimide and anchored-Ig liposomes show two carbonyl groups present, one from the maleimide and the other one added after thiolation of the protein. Therefore, this technique can discriminate immunoliposomes.

The coupling yield of 40.37% w/w, determined by sulfur elemental microanalysis, showed that this three step strategy of thioether linkage was satisfactorily performed. Maleimide derivatives were linked to phospholipids containing free amino groups (PE). In a second stage, liposomes were prepared with the advantage of the high stability of the amino group containing liposomes, which were functionalized with maleimide derivatives, restricting these groups to the outer surface of the liposome membrane.

Conclusions

In the current study, we report the preparation and characterization of functionalized liposomes for brain delivery of the treatment of brain diseases. The covalent method of coupling IgG to liposomes via the derivatized lipid PE-MPB was investigated, primarily due to the development of a better method of preparing pure PE-MPB. Optimized coupling conditions are shown to result in the efficient conjugation of IgG to liposomes containing low concentrations of PE-MPB (3/1 SH:IgG). These very interesting results encourage further

investigations to formulate peptide- and protein-loaded immunoliposomes, making targeting of liposomes as an attractive approach for brain drug delivery. However, further biological studies are necessary to demonstrate the effective capacity of developed formulations.

Declaration of interest

The authors declare no competing financial interest.

Support from Consejo Andaluz de Colegios Oficiales de Farmacéuticos is acknowledged.

References

- Wiley DT, Webster P, Aaron G, Davis MA. Transcytosis and brain uptake of transferrin-containing nanoparticles by tuning avidity to transferrin receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013;110:8662–8667.
- Cerletti A, Drewe J, Fricker G, et al. Endocytosis and transcytosis of an immunoliposome-based brain drug delivery system. *J Drug Target* 2000;8:435–446.
- Sandip BT, Mansoor MA. A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Curr Drug Deliv* 2006;3:219–232.
- Masserini M. Nanoparticles for brain drug delivery. *ISRN Biochem* 2013;18:238428.
- Van Rooy I, Mastrobattista E, Storm G, et al. Comparison of five different targeting ligands to enhance accumulation of liposomes into the brain. *J Control Release* 2011;150:30–36.
- Manjappa AS, Chaudhari KR, Venkataraju MP, et al. Antibody derivatization and conjugation strategies: application in preparation of stealth immunoliposome to target chemotherapeutics to tumor. *J Control Release* 2011;150:2–22.
- Pardridge WM. Blood-brain barrier delivery of protein and non-viral gene therapeutics with molecular Trojan Horses. *J Control Release* 2007;122:345–348.
- Sapra P, Allen TM. Ligand-targeted liposomal anticancer drugs. *Prog Lipid Res* 2003;42:439–462.
- Martin FJ, Papahadjopoulos D. Irreversible coupling of immunoglobulin fragments to preformed vesicles. *J Biol Chem* 1982;257:286–288.
- Loughrey HC, Choi LS, Cullis PR, Bally MB. Optimized procedures for the coupling of proteins to liposomes. *J Immunol Methods* 1990;132:25–35.
- Zuidam NJ, Vrueth R, Crommelin DJA. Characterization of liposomes. In: Torchilin VP, Weissig V, eds. *Liposomes: a practical approach*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2011:31–78.
- Duncan RJS, Weston PD, Wrigglesworth R. A new reagent which may be used to introduce sulfhydryl groups into proteins and its use in the preparation of conjugates for immunoassay. *Anal Biochem* 1983;132:68–73.
- Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Drosophila* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 2004;22:1567–1572.
- Chaudhury A, Das S, Leea RFS, et al. Lyophilization of cholesterol-free PEGylated liposomes and its impact on drug loading by passive equilibration. *Int J Pharm* 2011;430:167–175.
- Hansen CB, Kao GY, Moase EH, et al. Attachment of antibodies to sterically stabilized liposomes: evaluation, comparison and optimization of coupling procedures. *Biochem Biophys Acta* 1995;1239:133–144.
- Keishi S, Hiroshi U. Detection of nanosized ordered domains in DOPC/DPPC and DOPC/Ch binary lipid mixture systems of large unilamellar vesicles using a TEMPO Quenching Method. *Langmuir* 2013;29:4830–4838.
- Jones MN, Hudson MJ. The targeting of immunoliposomes to tumour cells (A431) and the effects of encapsulated methotrexate. *Biochem Biophys Acta* 1993;1152:231–242.
- Schnyder A, Huwyler J. Drug transport to brain with targeted liposomes. *NeuroRX* 2005;2:99–107.
- Woodle MC. Sterically stabilized liposome therapeutics. *Adv Drugs Deliv Rev* 1995;16:249–265.
- Schneider T, Sachse A, Leike J, et al. Surface modification of continuously extruded contrast-carrying liposomes: effect on their physical properties. *Int J Pharm* 1996;132:9–21.
- Persson D, Thorén PEG, Esbjörner EK, et al. Membrane binding and translocation of cell-penetrating peptides. *Biochem Biophys Acta* 2004;1665:142–155.
- López-Pinto JM, González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Effect of cholesterol and ethanol on dermal delivery from DPPC liposomes. *Int J Pharm* 2005;298:1–12.
- Miyawaki A, Llopis J, Heim R, et al. Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* 1997;388:882–887.
- Varga Z, Mihályi J, Berényi SZ, Bóta A. Structural characterization of the poly(ethylene glycol) layer of sterically stabilized liposomes by means of FTIR spectroscopy. *Eur Polym J* 2013;49:2415–2421.
- Eksperianova LP, Fedorov OI, Stepanenko NA. Estimation of metrological characteristics of the element analyzer EuroVectorEA-3000 and its potential in the single-reactor CHNS mode. *Microchem J* 2011;99:235–238.
- Ayen WY, Kumar N. A systematic study on lyophilization process of polymersomes for long-term storage using doxorubicin-loaded (PEG) 3-PLA nanopolymerosomes. *Eur J Pharm Sci* 2012;46:405–414.
- Glavas-Dodov M, Fredro-Kumbaradzi E, Goracinova K, et al. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *Int J Pharm* 2005;291:79–86.
- Visser CC, Stevanovic S, Voorwinden LH, et al. Targeting liposomes with protein drugs to the blood-brain barrier *in vitro*. *Pharm Sci* 2005;25:299–305.
- Ulbrich K, Hekmatara T, Herbert E, Kreuter J. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). *Eur J Pharm Biopharm* 2009;71:251–256.
- Pardridge WM. Molecular Trojan Horses for blood-brain barrier drug delivery. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:494–500.
- Boado RJ, Pardridge WM. The Trojan Horse liposome technology for nonviral gene transfer across the blood-brain barrier. *J Drug Deliv* 2011;2011:296151 doi:10.1155/2011/296151.
- Pardridge WM. Gene targeting *in vivo* with pegylated immunoliposomes. *Methods Enzymol* 2007;373:507–528.
- Boado RJ. Blood-brain barrier transport of non-viral gene and RNAi therapeutics. *Pharm Res* 2007;24:1772–1787.
- Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM. Marked enhancement in gene expression by targeting the human insulin receptor. *J Gene Med* 2003;5:157–163.
- Xia CF, Zhang Y, Boado RJ, Pardridge WM. Intravenous siRNA of brain cancer with receptor targeting and avidin-biotin technology. *Pharm Res* 2007;12:2309–2316.
- Ramos-Cabrer P, Campos F. Liposomes and nanotechnology in drug development: focus on neurological targets. *Int J Nanomed* 213;8:951–960.
- Cózar-Bernal MJ, Rabasco AM, Villasmil S, González-Rodríguez ML. Novedades en inmunoliposomas funcionalizados como sistemas vectores de péptidos a nivel cerebral. *Rev Ind Farm* 2012;171:51–62.
- Groothuis DR. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. *Neuro Oncol* 2000;2:45–59.
- Misra A, Ganesh S, Shahiwalla A, Shah SP. Drug delivery to the central nervous system: a review. *J Pharm Pharm Sci* 2003;6:252–273.



A comparative study of stabilising effect and antioxidant activity of different antioxidants on levodopa-loaded liposomes

Elena García Esteban, María José Cózar-Bernal, Antonio M. Rabasco Álvarez & María Luisa González-Rodríguez

To cite this article: Elena García Esteban, María José Cózar-Bernal, Antonio M. Rabasco Álvarez & María Luisa González-Rodríguez (2018) A comparative study of stabilising effect and antioxidant activity of different antioxidants on levodopa-loaded liposomes, Journal of Microencapsulation, 35:4, 357-371, DOI: [10.1080/02652048.2018.1487473](https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1487473)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1487473>



Accepted author version posted online: 11 Jun 2018.
Published online: 22 Jul 2018.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 21



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

A comparative study of stabilising effect and antioxidant activity of different antioxidants on levodopa-loaded liposomes

Elena García Esteban, María José Cózar-Bernal, Antonio M. Rabasco Álvarez and María Luisa González-Rodríguez

Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmacy, Universidad de Sevilla, Seville, Spain

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the stability of levodopa liposomes co-loaded with three different antioxidants (curcumin, ascorbic acid, and superoxide dismutase (SOD)). For this purpose, multilamellar liposomes were prepared. Curcumin was added into the lipid bilayer while ascorbic acid and SOD were placed into the aqueous phase. The influence of preparation technique and surface charge were also investigated. Vesicles were characterised and free radical scavenging potential was determined. From stability study, ascorbic acid showed better stabilising effect. These co-loaded liposomes also exhibited potential radical scavenging activity where ascorbic acid played a key role. From the study of different preparation techniques and charge, we concluded that cationic liposomes made by Thin Layer Evaporation following extrusion offered the best physicochemical and stability properties. A dual mechanism of these liposomes implies the chemical stabilisation of levodopa (dose reduction) and the antioxidant effect, with a preventive effect on Parkinson's disease.

ARTICLE HISTORY

Received 25 February 2018
Revised 18 May 2018
Accepted 7 June 2018

KEYWORDS

Ascorbic acid; liposome; levodopa; stability; ABTS

1. Introduction

Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder that affects the body movement (Diaz and Waters 2009). This disease primarily results from the death of dopamine-generating cells in the substantia nigra. Although to date, the reason of cell death has not been completely identified (Davie 2008), however, the potential reasons for this neuronal death were related with oxidative stress, among others (Levy *et al.* 2009, Butterfield *et al.* 2010). In last years, many authors have evidenced in the Parkinson's disease an excess of ROS production, which in conjunction with dopamine autoxidation may further enhance oxidative stress, leading to degeneration of dopaminergic neurons. Recently, numerous monogenic forms have been identified with mutations most of them linked with the dominant form of the disease (Angeles *et al.* 2016). These gene products appear to be in part localised to mitochondria and therefore may contribute towards mitochondrial dysfunction and oxidative stress.

Despite the wide variety of drugs available for the pharmacological therapy, levodopa still remains as the most used drug in controlling the motor symptoms of Parkinson's disease. This molecule, as a precursor of dopamine, is rapidly transformed into dopamine by the

enzyme DOPA-decarboxylase when it reaches the brain (Fahn 2008). Therefore, the efficacy of levodopa reduces with time due to short biological half-life, metabolism, low bioavailability, and fluctuations in plasma levels (Thanvi and Lo 2004). Moreover, high doses of levodopa cause oxidative stress-induced cytotoxicity, resultant from the autoxidation of the levodopa by the free radicals. At this point, the development of new drug strategies with low cytotoxicity becomes crucial.

These strategies have been mainly focussed on the combined therapies with peripheral dopa decarboxylase inhibitors and sustained release systems. However, the presence of oxidative processes in the disease and levodopa itself (Vieira and Gamarra 2016), has opened up new research that has led to new strategies.

Currently, despite the antioxidant compounds prevent the oxidative effects of free radicals by removing the free radical intermediates being oxidising themselves, however, a wide selection of nanocarriers has been developed to improve levodopa stability, increasing its bioavailability, and protecting the drug against the systemic degradation. Among them, liposomes are attractive candidates for increasing the solubility and stability of poorly soluble or unstable molecules. They are also interesting nanocarriers for targeting

purposes. Spuch and Navarro (2011) developed liposomes which provided more effective transport and increased levodopa concentration in the nigrostriatal system. Other studies included several levodopa dimeric prodrugs encapsulated in unilamellar liposomes for intraperitoneally administration (Di Stefano *et al.* 2006).

Oxygen-derived toxicity has been suggested as being involved in the pathogenesis of this disease. Previous studies demonstrated that incorporation of an antioxidant, such as GSH, improved chemical, and physical stability of liposomes (Paromov *et al.* 2011). These systems also revealed promising results for the treatment of degenerative diseases, such as Parkinson's disease, by preventing oxidative stress and maintaining cell functioning (Yang *et al.* 2008). Smeyne and Smeyne (2013) explained how the antioxidant GSH was incorporated to improve liposome stability and drug bioavailability. This study also offered the possibility for loading levodopa and GSH in the same liposomal formulation.

Our study was focussed on the evaluation of several mechanisms for stabilising levodopa in aqueous medium, in order to have a stable formulation capable to be administered by the nasal route in a future. With this aim, liposomes were used as stabilising nanocarriers and also, the behaviour of three antioxidant substances (curcumin, ascorbic acid, and superoxide dismutase (SOD)) in the formulations have been analysed, which have been selected for their contribution in the control of Parkinson's disease.

Curcumin is a lipophilic polyphenol with a variety of biological activities and pharmacological actions such as antioxidant, anti-inflammatory, antiviral, and antifungal properties (Payton *et al.* 2007). As a consequence of its potential anti-oxidative, anti-inflammatory and anti-excitotoxic effects, curcumin may be considered a promising therapeutic agent in the treatment of Parkinson's disease (Esatbeyoglu *et al.* 2012). Curcumin is an antioxidant and can protect neurons from increased ROS production. The induction of antioxidant defence mechanisms and anti-inflammatory effect of curcumin probably plays a central role in its neuroprotective properties (Hatcher *et al.* 2008).

Nagayama *et al.* (2004) demonstrated that ascorbic acid is an interesting agent which enhances the bioavailability of levodopa in elderly patients with Parkinson's disease, possibly by increasing the acidity of gastric fluid and intestinal juice, thus enabling more unionised levodopa (a readily absorbable form) to exist in the gastrointestinal tract. Other authors (Varshosaz *et al.* 2014) have explained that this antioxidant can be effective on neuronal cell protection

due to the effect of ROS on neuronal cell damages and fast consumption of endogenous scavenging antioxidants.

SOD catalyses the dismutation of superoxide anion into molecular oxygen and hydrogen peroxide, thus providing a primary defence against ROS. This enzyme is present at high levels of constitutive expression in neuromelanin-containing dopaminergic neurons of the substantia nigra (Jin *et al.* 2014) but concerning to the erythrocyte SOD activity, there are divergent results. Dias *et al.* (2013) confirmed that patients who receive levodopa therapy have lower activities of SOD in red blood cells and higher H₂O₂ production in neutrophils. Probably, this significant decrease of SOD activity is due to a persistent production of ROS by different ways, either *via* the prooxidant activity of the enzyme because it generates hydrogen peroxide, or the gene alteration of SOD gene expression, or both of them (Ihara *et al.* 1999).

The main objective of this work was focussed on the analysis of the effect of three different antioxidants (curcumin, ascorbic acid, and SOD) on the levodopa stabilisation against oxidation. In addition, we also studied the influence of including levodopa-antioxidant into different lipid vesicles and their stabilising effect on this antiparkinsonian drug. Toward this purpose, we considered it worthy of interest to investigate the role of the vesicle preparation method, the conformation of the bilayer (uni- or multi-lamellar), surface charge, and the use of niosomes as more stable alternative vesicles than liposomes, on their properties as drug carriers.

This study provides additional information about levodopa co-loaded with curcumin, ascorbic acid, and SOD, studying the stability and radical scavenging activity of these antioxidants. This formulation proposal could give a new approach to deliver levodopa and antioxidant which could effectively treat Parkinson's disease together.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Curcumin, ascorbic acid, SOD, egg phosphatidylcholine (EPC), 1,2 dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC), cholesterol (Ch), dicetyl phosphate (DCP), and stearylamine (SA) were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). Levodopa, propylene glycol (PG), and Tween[®] 80 were obtained from Acofarma (Barcelona, Spain). Chloroform, absolute ethanol, methanol, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (Hepes), acetonitrile HPLC degree, and glacial acetic acid were

received from Panreac Chemistry (Barcelona, Spain). Purified water using a Milli-Q system (Millipore, Molsheim, France) was selected as solvent for the buffer solution preparation.

2.2. Preparation of multilamellar liposomes

Multilamellar vesicles were prepared as previously reported by thin film hydration technique with slight modifications (Maestrelli *et al.* 2010). Briefly, appropriate amounts of EPC, Ch, and SA (5:4:1 molar ratio) were dissolved in a chloroform/methanol (2:1) mixture in a round-bottomed flask. The solvent was evaporated using a rotary evaporator (Büchi rotavapor R-210 with Büchi Heating Bath B-491) under vacuum at 58 °C and the lipid film was dried into a dessicator overnight. Then, the lipid film was hydrated with a levodopa solution (1 mg/mL) in an aqueous solution with a composition according to the antioxidant used. After adding the aqueous solution and vortex mixing five times, vesicles were formed. All formulations were quickly sealed in glass containers and stored in the dark at 4 °C. Although the protocol for producing the liposomes was similar, however, there are specific properties to be considered for incorporating the antioxidant compound (curcumin, ascorbic acid, or SOD), all of which have been described in Table 1.

Curcumin is a lipophilic polyphenol which was added to the lipid phase of liposomes. Previous works have demonstrated an increase in the solubility of this compound when it contacted with a solvent mixture specified in Table 1 (data not shown). Then, the lipid film, containing curcumin (2 mg/mL) was hydrated with the levodopa solution (1 mg/mL) in this solvent mixture.

Ascorbic acid was added to the aqueous phase of liposomes. As was reported in literature, levodopa undergoes an oxidation process in aqueous solution. Therefore, with this antioxidant, we studied the influence of buffer composition (Hepes and PBS buffer), pH (7.4 and 6.2), and ascorbic acid concentration (0.2–0.8 mg/mL), in order to minimise this oxidation

phenomenon. Samples were stored at 25 °C away from light for one week.

In the case of SOD, the lipid film was hydrated with 3 mL of a 0.5 mg/mL SOD solution in Hepes buffer pH 7.4. This pH value is used since previous studies carried out by Rengel *et al.* (2002) showed that SOD has its maximum enzymatic activity at this pH.

Control liposomal formulations, without antioxidants, were developed by using similar conditions of the specific protocol that the antioxidants required.

2.2.1. Combined formulations

Once SOD-loaded liposomes were prepared, we proceeded to unify formulation of levodopa/ascorbic acid-loaded liposomes with SOD-loaded liposomes.

Due to incompatibility of SOD to be formulated at high temperatures and low pH, was decided to make two formulations independently, and later unify them in the same formulation.

2.3. Sample characterisation

Dimensional parameters and polydispersity of levodopa-loaded liposomes were measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano series apparatus (Malvern Instruments, Malvern, UK), at 25 °C and a scattering angle of 90° after at least 1:20-fold dilution with purified water. For the zeta potential measurement, the Zetasizer Nano was equipped with a dip-cell (Malvern Instruments, Malvern, UK) and this parameter was obtained by photon correlation spectroscopy.

In order to determine de encapsulation efficiency of levodopa-loaded liposomes, samples were centrifuged at 8000 rpm, 60 min and 4 °C (Eppendorf, 5804R) to separate the non-entrapped drug in the supernatant from the vesicles sediment. Afterwards, this sediment was treated with sodium dodecylsulfate for destroying the liposomes and the entrapped drug was quantified by HPLC (Hitachi Elite LaChrom). The analytical method was optimised by using a column C18

Table 1. Composition of levodopa-loaded liposomes containing different antioxidants.

	Curcumin	Ascorbic acid	Superoxide dismutase
Phospholipid	EPC	EPC	DPPC
Place into the liposome	Lipid phase	Aqueous phase	Aqueous phase
Antioxidant concentration (mg/mL)	2	0.2	0.5
Aqueous phase composition (3 mL)	PEG 400, PG, Tween 80, ethanol, and Hepes buffer pH 7.4 in volumetric ratio 100:100:25:5	Hepes buffer (10 mM, pH 6.2)	Hepes buffer (10 mM, pH 7.4)
Gel-liquid transition temperature (°C)	58	58	40

For curcumin and ascorbic acid, lipid composition was: EPC, Ch, and SA in 5:4:3:1 molar ratio. Curcumin was added into the lipid phase whereas ascorbic acid was added to the aqueous solution. For SOD liposomes, lipids were: DPPC, Ch, and SA in 6:3:0.5 molar ratio. SOD was incorporated to the aqueous compartment of vesicles.

(Zorbax SB-C₁₈ 150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm). The mobile phase consisted of acetonitrile:acetic acid 2%:H₂O mQ (20:50:20 v/v/v). Absorbance was measured at 280 nm and the flow rate was 1 mL/min. The injection volume was 20 μL. Peak areas were measured and HPLC analysis was conducted at room temperature.

2.4. Stability evaluation

The formulations in the presence of the different antioxidants (curcumin, ascorbic acid, and SOD) were stored at 4 °C for 30 days. Samples were collected at predetermined time points (0, 2, 6, 9, 15, and 30 days) and evaluated. The stability of liposomes against standard solution of levodopa-antioxidant was determined by measuring the vesicle size, Pdl, and zeta potential by using dynamic light scattering technique and photon correlation spectroscopy. Percentage of drug entrapped was also measured in this time to investigate any change in the drug content into the liposomes.

2.5. Antioxidant activity

Two different chemical methods namely ABTS and X/XOD assays were used for evaluating the antioxidant activity of the selected compound into the levodopa-loaded liposomes.

2.5.1. ABTS assay

This assay has been used for measuring the antioxidant activity as the ability to scavenge free radicals generated in aqueous and lipophilic phases (Antolovich *et al.* 2002). From this strategy, based on an electron transfer-based procedure, the oxidation product of 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) is used as an oxidising agent to evaluate the antioxidant activity (Pisoschi and Negulescu 2011). The ABTS^{•+} radical was generated by the loss of an electron by the nitrogen atom of ABTS, by mixing 2.98 mM of ABTS and 0.98 mM of K₂S₂O₈ (potassium persulfate) in purified water (Figure 1(A)).

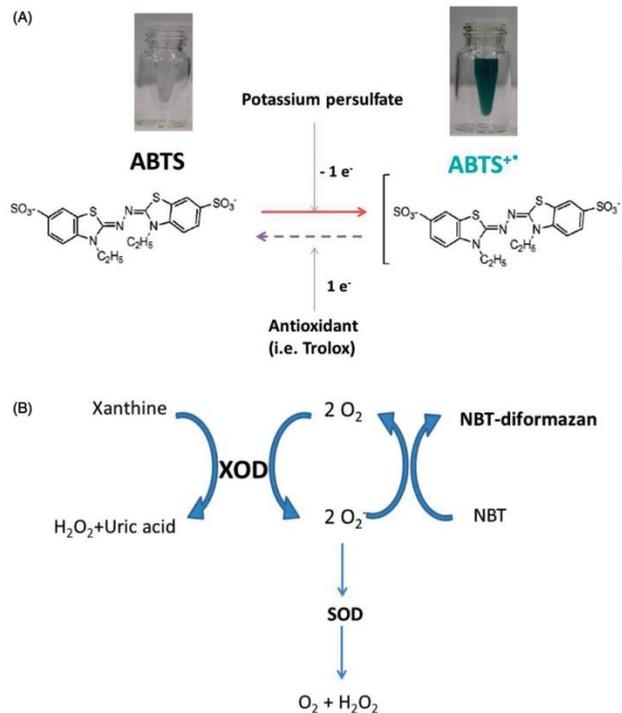


Figure 1. (A) ABTS chemical reaction. (B) Xanthine/xanthine oxidase (XOD) reaction.

This solution, which has a dark blue colour, is reduced by an antioxidant into colourless ABTS because the nitrogen atom quenches the hydrogen atom, yielding the solution decolorisation. The decrease in the absorbance values was monitored and Trolox (1.05 mg/mL in ethanol absolute) was chosen as standard antioxidant.

Afterwards, the assay plates were prepared by pipetting into 96-well plates. A volume of 10 μ L of each sample with different concentrations for curcumin and ascorbic acid was diluted with 90 μ L of ethanol to react with the fresh ABTS solution (100 μ L). Trolox standard stock solution was also prepared in ethanol and was diluted to provide seven different concentrations.

Then, the absorbance was measured 6 min after initial mixing (Sinergy HT Plate Reader). All measurements were performed in triplicate. In the presence of antioxidant in the sample, the blue green colour of the ABTS^{•+} radical cation changed to colourlessness (decrease in absorption) because antioxidant can reduce this radical cation into ABTS and decolorisation of the sample was linear with increasing antioxidant capacity of the sample studied.

The antioxidant activity was defined as EC50, indicative of the equivalent concentration of antioxidant to decrease the initial concentration of ABTS in 50%. Finally, this parameter was expressed as: EC50 compound/EC50 Trolox.

ABTS radical scavenging capacity of the sample was calculated by the following formula:

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = \frac{\text{Absorbance of control} - \text{absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

2.5.2. Xanthine/xanthine oxidase (X/XOD) assay

Xanthine oxidase (XOD) catalyses the dismutation of the superoxide radical (O₂⁻) into hydrogen peroxide (H₂O₂) and oxygen (O₂) (Figure 1(B)); therefore, it provides an important defence against the toxicity of the superoxide radical.

The SOD activity was determined using a spectrophotometric method namely xanthine/xanthine oxidase (X/XOD) assay described earlier with slight modifications (Nagai *et al.* 2003). In brief, a reactive mixture containing 160 mL of 0.1 M glycine–NaOH buffer (pH 9), 6.75 mL of each xanthine (3 mM), EDTA (3 mM), NBT (0.75 mM), and levodopa (0.002 mM), individually, was incubated at 20 °C for 20 min. After this time, the reaction was started by adding 6 mU of XOD

following the incubation at 20 °C for 20 min. Then, 6.75 mL of 6 mM CuCl were added and the reaction was finished to quantify the SOD activity by UV-spectrophotometry (Agilent 8453). In the assay, superoxide ions (O₂⁻), generated by xanthine oxidase (XOD) conversion of xanthine to uric acid and hydrogen peroxide converts NBT to NBT-diformazan, which absorbs light at 560 nm. SOD reduces the superoxide ion concentration and thereby lowers the rate of NBT-diformazan formation. The extent of reduction in the appearance of NBT-diformazan is a measure of SOD activity present in an experimental sample. An enzymatic unit was defined as the amount of SOD required to achieve 50% inhibition on the rate of diformazan dye formation (Umasuthan *et al.* 2013).

2.6. Levodopa–ascorbic acid liposomes

Once selected ascorbic as the most effective antioxidant, we proceeded to study the influence of preparation technique on the encapsulation entrapment and stability of levodopa. In addition, we have demonstrated previously the influence of the surface charge of vesicles on these parameters (Villasmil *et al.* 2010, 2013) and for this reason, positively- and negatively-charged liposomes were also developed.

Liposomes were prepared using a slightly modified protocol according to our previously reported method (Maestrelli *et al.* 2006) by different techniques: thin layer evaporation (TLE), freezing and thawing (FAT), sonication (SON), and extrusion (EXT).

Frozen and thawed multilamellar vesicles (FATMLVs) were obtained by dipping the sample in a nitrogen bath for 30 s following in a water bath at 58 °C for 30 s. The sequence was repeated nine times.

Small uni-lamellar vesicles (SUV) were obtained by sonication technique (Dua *et al.* 2012) submitting the sample to sonication at 100 W for 20 min at 58 °C.

Large uni-lamellar vesicles (LUV) were obtained by extrusion technique (Berger *et al.* 2001). According to this method, 3 mL of MLV obtained by TLE were placed in a minixtruder (LIPEXTM Thermobarrel Extruder, Northern Lipids, Canada) thermostated at 58 °C. Samples passed 10 times through 0.2 μ m pore sized polycarbonate membrane filters, under air flux (González-Rodríguez *et al.* 2016).

In addition, niosomes were also developed with the aim to discard the presence of phospholipid as the instability cause of formulation. They were obtained by a similar technique than for TLE, but the phospholipid was changed by appropriate amounts of Span[®] 60.

With the aim to analyse the influence of charged lipids on levodopa–ascorbic acid-loaded vesicles, liposomal formulations containing different amounts of stearylamine (SA) and dicetyl phosphate (DCP) were produced. It is well-known that DCP tends to increase the vesicle size, providing negative charge and thus, increasing the entrapment efficiency. SA, which has been yet included in the initial composition, will be analysed by adding higher concentration (Villasmil *et al.* 2010).

2.7. In vitro release studies

In vitro release of levodopa from liposomes was performed using dialysis bag method (González-Rodríguez *et al.* 2016) wherein levodopa-loaded liposomes with and without ascorbic acid (equivalent to 1 mg of levodopa) were placed inside the dialysis sacs (SpectraPor 4, MW: 12–14 KD). Standard solution of levodopa-ascorbic acid was used as control solution. Samples were placed into 50 mL PBS buffer pH 6.4 maintained at 37 °C in a shaker (IKA® RT 10) and rotated at 50 rpm. At predetermined time points, 0.5 mL were withdrawn at each time point and replaced with fresh buffer to maintain the sink conditions. Then, samples were analysed using the HPLC previously described.

3. Results and discussion

3.1. Preliminary studies for selecting the liposome composition

In a first stage, we proceeded to select the specific composition of vesicles in order to achieve a suitable incorporation of the antioxidant compounds into the formulation.

From a physicochemical point of view, levodopa is oxidised in aqueous solution, especially at alkaline pH-values meanwhile at acidic pH-values the stability is significantly improved (Kankkunen *et al.* 2002). Aqueous solution of levodopa saturated with air or molecular oxygen undergoes autooxidation to melanins. During the oxidative transformation of levodopa to melanins, reactive oxygen radicals are produced (Kruk *et al.* 1999).

In this study, curcumin was added into the lipid bilayer. The aqueous medium of multilamellar liposomes in which levodopa was dissolved, contained a solvent mixture with solubilising properties. This mixture assures curcumin to maintain dissolved in the formulation. Results of the selection of this mixture have not shown in this paper.

The stability of levodopa in aqueous solution was also studied by adding ascorbic acid into the aqueous compartment of vesicles in increasing concentrations. From results obtained in Figure 2(A), we found that using different buffer solutions and different pH, the minimal concentration of ascorbic acid (0.2 mg/mL) was useful to slow down the oxidation process of levodopa while the oxidative effect was maximised as the antioxidant concentration was increased. As revealed Mikirova *et al.* (2007), there is non-linearity of the protection time with ascorbate concentration for high doses of ascorbic acid. This effect may be caused by the presence of trace metal ions in the buffer used, which formed free radicals from ascorbic acid and additional oxidation of levodopa.

In buffer solutions at pH 7.4, 99.95% of ascorbic acid appears as ascorbate monoanion (AscH^-), 0.05% as dihydroascorbic acid (AscH_2), and 0.004% as ascorbate dianion (AscH^{2-}) as is illustrated in Figure 2(C). AscH^- reacts rapidly with oxidants agents making it and outstanding donor antioxidant (Bors *et al.* 1995). $\text{AscH}^- + \text{R} \rightarrow \text{Asc}^- + \text{RH}$, AscH^- donates a hydrogen atom to an oxidising radical to produce the resonance-stabilized tricarbonyl ascorbate free radical. This demonstrates the antioxidant effect of ascorbic acid on levodopa. Figure 2(B) shows several images corresponding to the evolution of levodopa solutions with time when different buffer at different pH were used: physiological pH (7.4) and pH for a future nasal administration (6.2). It is also possible to observe that Hepes buffer showed better results than PBS. Quantitatively, the difference about both buffers is minimal, but qualitatively the differences were more patent, probably due to the buffer composition.

Once selected Hepes buffer, we can establish from results (Figure 2) that levodopa in Hepes solution (pH 6.2) exhibited lower oxidation process than pH 7.4. This behaviour has been reported by Kruk *et al.* (1999) because when the values of pH are lower, the reaction for producing melanin is slower. This fact is clearly related to the state of ionisation of levodopa and agrees with optimal values of the dissociation constant of hydroxyl groups. We also emphasised that when lower levodopa concentration was employed (1 mg/mL), there was no appreciable difference between the solutions.

In addition, from Figure 2(C) we explored the effect of ascorbic acid on the levodopa stability in these solutions. As postulated by other authors, ascorbic acid decreases its stability at higher pH showing a reduced antioxidant activity (Kibbe 2009). From the equilibrium reaction $2\text{Asc}^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{AscH}^- + \text{DHA}$, the equilibrium

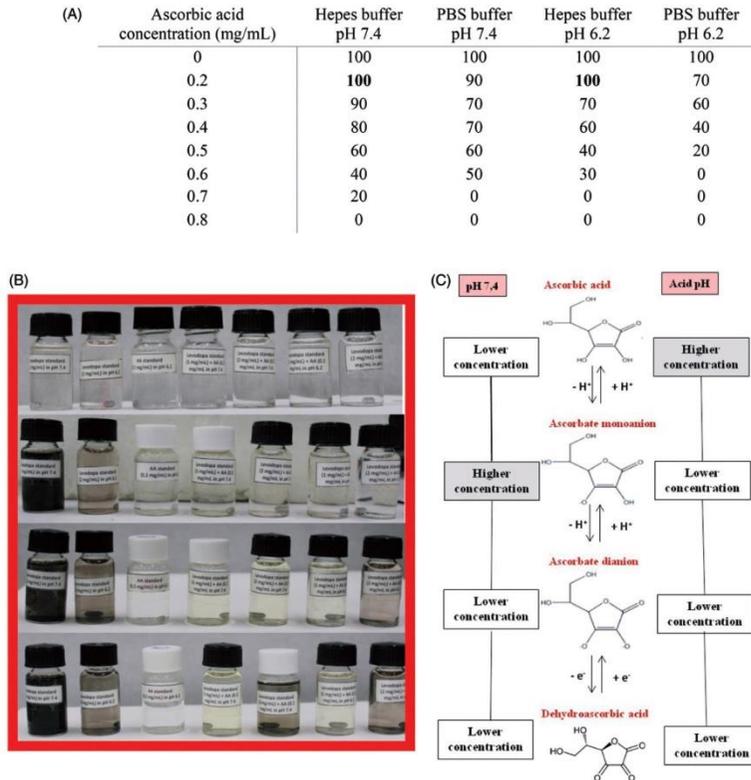


Figure 2. Selection of aqueous composition for levodopa–ascorbic acid loaded liposomes. (A) Percentage of levodopa recovered in samples with increased amount of ascorbic acid in different aqueous media. (B) Images of vials containing levodopa and/or ascorbic acid in different buffer solutions (PBS or Hepes) at different pH (6.2 or 7.4). (C) Effect of pH on ionisation of ascorbic acid and reaction equilibria for the different forms of this antioxidant.

constant for this dismutation is pH-dependent. Thus, higher values of pH formed more Asc⁻, however at higher pH, DHA is more unstable (Buettner and Jurkiewicz 1996).

According to these results, we selected Hepes buffer pH 6.2 and 0.2 mg/mL of ascorbic acid to formulate levodopa-loaded liposomes (1 mg/mL).

3.2. Influence of the antioxidant action on levodopa stability

As Mason and Wricht (1949) postulated many years ago, levodopa oxidation to melanins in aqueous medium is visually characterised because the sample turns from a clear to a black colour with time (Figure 2(B)),

particularly in Hepes buffer pH 7.4. Then, we selected pH 6.2 for further studies.

Our first approach was to improve the stability of the drug by including it into liposomes (Yadav and Jain 2011). However, this strategy was not enough to maintain stable the molecule: levodopa into liposomes was degraded because the drug remains submitted to the oxidation mechanism in the aqueous medium (Spuch and Navarro 2011). Therefore, as previously was demonstrated, we proceeded to add antioxidants into the formulation (Zaitone *et al.* 2013). Levodopa-loaded liposomes were combined with antioxidants as curcumin, ascorbic acid, and SOD in order to elucidate the contribution of the antioxidant to the formulation stability.

3.2.1. Physico-chemical parameters and encapsulation efficiency

The analysis of these parameters can provide key information about the distribution of molecules in the vesicular structure, as well as about the stability of the whole system. Results obtained are detailed in Figure 3.

In the case of curcumin, this polyphenol was included into the levodopa-loaded liposomes (Liplev-cur) without obtaining any difference in the physico-chemical parameters evaluated compared with the formulation without curcumin (Liplev(cur)). However, an important decrease in levodopa entrapment was produced when curcumin was added into the lipid bilayer. This can be explained considering the preparation method, by which curcumin was placed into the bilayer and remains there, providing rigidity to the membrane and reducing the aqueous space for entering levodopa (Choudhury *et al.* 2016).

A different behaviour was perceived when other antioxidants, such as ascorbic acid or SOD, were added into the aqueous compartment of vesicles. In these cases, an increase in size was obtained when the antioxidant was included, as a consequence of adding more molecules into the aqueous phase and

the composition of the lipid bilayer in terms of less rigid structure (Choudhury *et al.* 2016).

Regarding both of these water-soluble antioxidants, a tendency to form more homogeneous samples was shown with ascorbic acid (Pdl 0.13) compared to SOD (Pdl 0.9) in terms of size (Rajan *et al.* 2011). This result can be explained analysing the stability of the samples on the basis of the surface charge. A large difference has been obtained in the zeta potential when SOD was added, whereas with ascorbic acid, the surface charge of vesicles was maintained. From results obtained, we suggested that stable formulations were obtained with both antioxidants, since zeta potential values closed to 30 mV were produced (Villasmil *et al.* 2010).

Finally, an improvement in the encapsulation efficiency of levodopa was obtained after addition of the ascorbic acid. Probably, this feature was indicative of the protecting action of the antioxidant from oxidation to levodopa, trapping the free radicals produced by the drug in its autooxidation process (Butterfield and Louderback 2002).

Although levodopa-ascorbic acid-loaded liposomes were selected on the basis of above favourable results, an additional analysis was carried out to SOD

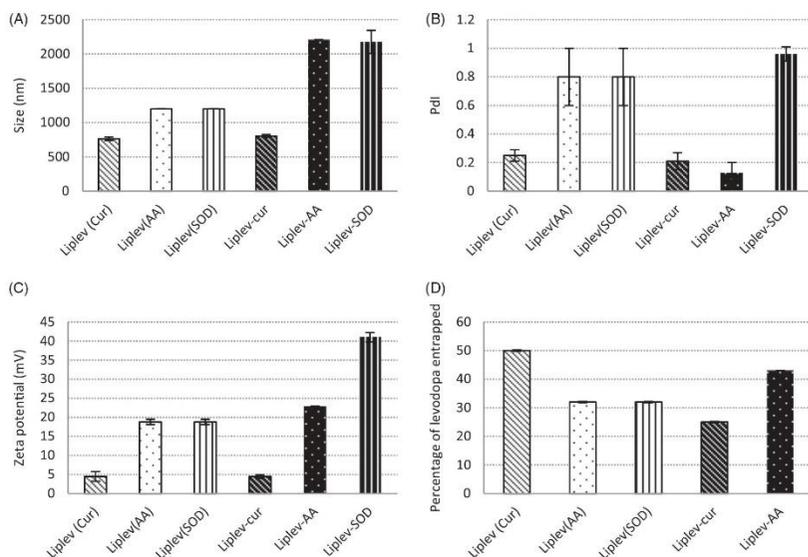


Figure 3. Characterization parameters of liposomal formulation with levodopa and the antioxidants selected for the study. Liplev (cur), Liplev (AA), and Liplev (SOD) refer to liposomes without antioxidant but made with their composition. Liplev-cur, Liplev-AA, and Liplev-SOD refer to levodopa-antioxidant co-loaded liposomes. (A) Vesicle size (nm). (B) Polydispersity index. (C) Zeta potential value (mV). (D) Percentage of entrapment (%).

liposomes. Because the vesicular size obtained was very large (Figure 3(A)), these samples were extruded and the effect of extrusion on Pdl and zeta potential values was evaluated. The extrusion process produced a decrease in the liposome size (707.1 ± 14.50 nm) according to the pore diameter used (800 nm). Similarly, Pdl was reduced (0.06 ± 0.01), indicating a homogeneous sample. Likewise, zeta potential values were lower than the non-extruded batch, in agreement with Villasmil *et al.* (2010) who demonstrated that in the extruded liposomes, the initial bilayer structure is reorganised, and the charges can be oriented so that neutralisation with the medium is favoured, causing lower zeta potential values. Globally, we can conclude that in this case, the extrusion process enhances the stability and homogeneity of the sample.

3.2.2. Stability studies

A comparative study about the stabilising effect of each antioxidant on the levodopa oxidation was realised. Samples were stored at 4 °C and protected from light, and were quantified for levodopa content at pre-determined times along 30 days. Liposomal samples were purified by centrifugation and only the fraction inside liposomes was analysed (PDE). Figure 4(A) and (B) shows a fast degradation of levodopa from standard solutions (Stlev-cur and Stlev-AA) with time, while levodopa-loaded liposomes (Liplev-cur and Liplev-AA) practically remain stable for at least 6 days and then decreases. This result suggested that levodopa included in liposomes was more stable than free drug, indicating a stabilising effect of liposomes for levodopa (Yang *et al.* 2007).

The comparative analysis among the antioxidants exhibited a decrease of levodopa stability in the presence of curcumin. As it is well-known, this polyphenol has poor stability in neutral or alkaline solutions, showing low antioxidant capacity against levodopa with time (Chen *et al.* 2009). This is the cause why curcumin is not able to have an effective antioxidant activity on levodopa under the conditions in which the liposomes have been prepared (Goel *et al.* 2008). Visually, we can also see how levodopa undergoes almost complete degradation in a few days, even in the presence of the antioxidant (Figure 4(A)).

However, after formulated Levodopa-ascorbic acid-loaded liposomes, the drug remained stable for nine days and after twelve days it started to decrease. This was mainly explained because ascorbic acid decreases its antioxidant capacity with time. As was previously detailed, the antioxidant activity of ascorbic acid derives from the displacement of ascorbic acid to its

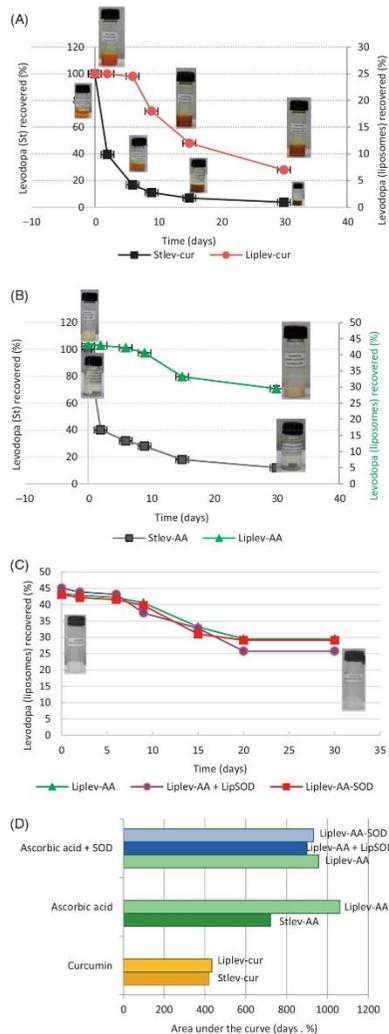


Figure 4. Evolution of percentage of levodopa recovered for 30 days from: (A) Standard solution of levodopa + curcumin (Stlev-cur) and levodopa-curcumin-loaded liposomes (Liplev-cur). (B) Standard solution of levodopa + ascorbic acid (Stlev-AA) and levodopa-ascorbic acid-loaded liposomes (Liplev-AA). (C) Levodopa-ascorbic acid-loaded liposomes (Liplev-AA), levodopa-ascorbic-SOD-loaded liposomes (Liplev-AA-SOD), and levodopa-ascorbic-loaded liposomes and SOD-loaded liposomes, both together (Liplev-AA + Lip-SOD). (D) Comparative analysis of the area under the curve of the stability analysis of all formulations studied.

oxidised form dehydroascorbic, combating free radicals produced by levodopa. As days go by, the balance between ascorbic acid and dehydroascorbic acid is displaced to the right side, the ascorbic acid becoming the dehydroascorbic acid, which is its oxidised form and losing its capacity of free radical scavenger.

Finally, recovery profiles of levodopa-ascorbic acid-in liposomes containing SOD show identical behaviour in all formulations, remaining constant for the first 9 days and starting to decrease from day 12th, as shown in Figure 3(C). From these profiles, we can conclude that there are no significant differences between ascorbic acid formulation and ascorbic acid-SOD formulation.

With this approach, an interesting study was carried out in order to determine if the enzymatic activity of SOD was maintained during the 30 days of assay. This analysis contributed to enlarge the knowledge about the integrity of this sensitive molecule. While in SOD-loaded liposomes, this activity was stable for 6 days (showing values of 46.43, 38.5, and 8.51 for 0, 2, and 6 days, respectively) Levodopa-ascorbic acid-SOD-loaded liposomes lacked from the antioxidant activity of SOD. This result was attributable to the higher temperature (58 °C) and lower pH (6.2) employed for liposomes elaboration, which could affect the enzymatic activity, removing the antioxidant role. In SOD-loaded liposomes, the enzymatic activity SOD was decreasing because the pH affects the stability of the enzyme, causing a possible denaturation. On the other hand, the presence of the ions constituents of the Hepes buffer also affects electrostatic interactions, an important factor to be considered in the prevention of denaturation, as stated by Jiménez *et al.* (2014). Therefore, results obtained in this study throw out the idea that both the levodopa concentration and the enzymatic activity are affected significantly over time, mainly due to the liquid state in which they are found.

Hence, we can conclude that favourable results are not appreciated after adding SOD to the liposome formulation of levodopa and ascorbic acid.

An additional analysis among the stability profiles was realised by comparing them applying the amodelistic parameter area under curve from which, a clear idea we can obtain concerning to the cumulative amount (%) of levodopa recovered in the time analysed (Figure 4(D)). Three interesting features we can highlight: firstly, there is no difference between liposomes (Lipleve-cur) and standard solution (Stlev-cur) in the case of curcumin; secondly, an important stabilising effect of liposomes was denoted in the case of

ascorbic acid (Lipleve-AA) compared to standard solution (Stlev-AA); and thirdly, all the alternatives assayed for including SOD into the formulations behaved similarly to ascorbic-levodopa liposomes (Lipleve-AA-SOD and Lipleve-AA + LipSOD).

3.2.3. Antioxidant activity: ABTS y X/XOD

Concentration dependence was found in the ABTS radical scavenging assay, as shown in Figure 5(A). The activity increased as the concentration increased for each sample. In this assay, curcumin samples at 9.26 ng/mL concentration showed 72.3% and 33.7% for Lipleve-cur and Lipcur, respectively, while trolox used as a standard antioxidant showed 91.8% scavenging activity at this concentration. In addition, ascorbic acid samples (liposomes and niosomes) showed similar scavenging activity than trolox (92% aprox.) but using lower antioxidant concentration (7.6 ng/mL) than trolox (9.26 ng/mL).

Moreover, the EC₅₀ values for all the samples against ABTS radicals are given in Figure 5(B). They exhibited varying degrees of scavenging activity. Ascorbic acid samples showed EC₅₀ at a lower concentration than 0.5 µg/mL while curcumin liposomes showed antioxidant activity as similar to ascorbic acid group with EC₅₀ at 5 µg/mL. The lowest EC₅₀ (0.23 and 0.38 for liposomes and niosomes, respectively) was indicative that ascorbic acid was more effective than Trolox (EC₅₀ 1), indicating its ability to act as a scavenger at low concentrations, compared to

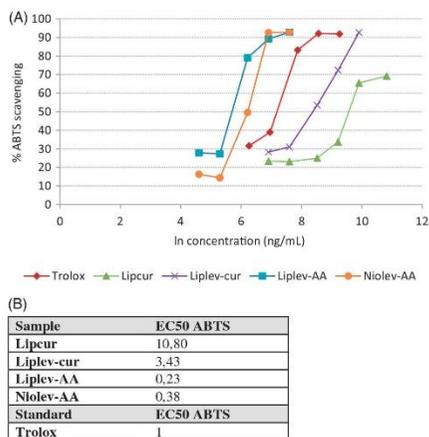


Figure 5. (A) Percentage of ABTS scavenging versus the ln antioxidant concentration. (B) EC₅₀ values of the different formulations evaluated by using as reference Trolox.

curcumin samples, which showed EC50 ranging from 3.4 to 10.8. This result can be explained because curcumin is not able to capture free radicals produced by levodopa in aqueous medium. In this medium, curcumin waste its capacity to remove free radicals when it is in the enolic tautomeric form (Goel *et al.* 2008). Liposomes were obtained at physiological pH, and curcumin at this pH is found in keto tautomeric form, acting as a powerful donor of hydrogen atoms and avoiding the free radicals capture (Jovanovic *et al.* 1999). Similar EC50 values for ascorbic acid–levodopa liposomes and niosomes were indicative of the strong antioxidant effect of ascorbic acid, since it covers this activity as for levodopa as for phospholipids inside liposomes.

Finally, the effects of ascorbic acid–levodopa and liposomal ascorbic acid–levodopa on SOD activity were evaluated. The antioxidant activity was determined indirectly, evaluating the supernatant of the lipid vesicles. A higher antioxidant activity was obtained when the sample was extruded (46.58%) compared to the conventional vesicles (35.38%). These results are in agreement to Umasuthan *et al.* (2013), who obtained SOD activity of 40%. Liposomes with SOD have a favourable enzymatic activity, and can be used as an antioxidant agent in ROS. Therefore, the extrusion process, by which unilamellar vesicles with an aqueous compartment is obtained, is favourable to encapsulate this type of hydrophilic substances. To obtain a 100% activity, references recommend the use of temperatures of 20 °C and pH 9 (Umasuthan *et al.* 2013). However, these conditions are not possible for the preparation of liposomes, since for the formation of lipid vesicles a transition temperature between 40 and 58 °C is needed and the pH must be similar to physiological for its subsequent administration in humans (González-Rodríguez *et al.* 2016).

3.3. Optimization stage

Based on our experience, we decided to select TLE as the adequate preparation method for producing liposomes with a cationic surface charge. At this point, several experiments were planned in order to corroborate this rule, by analysing the effect of some preparation methods and the surface charge on liposomal properties such as zeta potential and encapsulation efficiency. As shown in Table 2, both variables (method and surface charge) affected the stability of formulations.

As was observed, multilamellar vesicles followed a logical sequence in the obtaining of more cationic zeta potential as the SA amount increased, and more negatively charged as the DCP increased. However, in

the small unilamellar liposomes (C), the trend was different in the case of SA.

To explain the PDE variable, we considered the ionisation properties of levodopa (pKa: 2.32; Log *P*: -2.39) and ascorbic acid (pKa 4.74; Log *P*: -2.24). Both substances are placed in the aqueous medium (Hepes pH 6.2) of liposomes. We hypothesised that cationic liposomes are favourable to improve the entrapment of the drug by electrostatic interaction. As Villasmil *et al.* (2010) explained, this increase in the entrapment efficiency occurs because SA may affect specific characteristics such as the membrane permeability or the electric charge density. However, there is a critical amount of SA (1.66) above which the drug was leaked or non-entrapped, probably due to the saturation of the lipid system. Some authors have demonstrated that the presence of the positive charge in the lipid bilayer produces a change in the lateral packing of the liposome bilayer causing a decrease in the entrapment efficiency (Pavelic *et al.* 2005). Similarly with DCP, lower negative values enhance the levodopa encapsulation. The drug encapsulation in these liposomes was lower than positive liposomes, probably due to the direct relationship between charge and the ionisation of levodopa (Manosroi *et al.* 2002, 2004).

The encapsulation of both molecules (i.e. levodopa and ascorbic acid) resulted in appreciable increase of size for MLV and FAT vesicles, in agreement with authors as Maestrelli *et al.* (2006). Moreover, SUV vesicles showed the lowest PDE compared with the other types of liposomes: the reduced volume of the aqueous compartment, with respect to the other formulations can be considered the main factor responsible for this result.

Finally, the entrapment of drug in niosomes followed the same trend than liposomes in the case of cationic systems. However, the addition of DCP into the surfactant bilayer gave rise to a higher leakage of levodopa and lower encapsulation efficiency.

Therefore, we can conclude that cationic and multilamellar vesicles by TLE, FAT, and niosomes, composed of PC:Ch:SA (6.6:10:0.75) mmolar ratio and niosomes composed of Span® 60:Ch:SA (4.6:10:0.75) offered the best encapsulation efficiency of levodopa, and an adequate surface charge (about 20 mV) to assure physical stability.

Once optimal techniques and charge agent are selected, we decided to increase levodopa concentration (2 mg/mL) to improve encapsulation efficiency. In this sense, results showed that whereas increased levodopa concentration produced higher

Table 2. (A) Physico-chemical properties (size, zeta potential, and polydispersity index) and percentages of levodopa entrapped (PDE) in vesicles made from different preparation methods and varying the type and amount of charged lipid. (B) Influence of the extrusion process on the encapsulation efficiency of levodopa-ascorbic acid-loaded liposomes.

SA (mg)	DCP (mg)	Size (nm)	Pdl	Zeta potential (mV)	PDE (%)
(A)					
TLE					
0.83	–	2015 ± 0.7	0.88 ± 0.20	8.76 ± 0.66	35.64 ± 0.25
1.66	–	2210 ± 0.6	0.13 ± 0.07	22.90 ± 0.04	43.15 ± 0.01
3.33	–	2432 ± 0.9	0.23 ± 0.18	29.50 ± 0.46	26.32 ± 0.17
–	0.83	1721 ± 0.5	0.29 ± 0.07	–14.51 ± 0.51	33.77 ± 0.29
–	1.66	1090 ± 0.7	0.94 ± 0.10	–23.22 ± 0.53	27.54 ± 0.12
–	3.33	1303 ± 0.3	0.88 ± 0.20	–27.56 ± 2.05	24.45 ± 0.04
FAT					
0.83	–	969 ± 0.6	0.79 ± 0.51	9.39 ± 1.50	34.34 ± 0.14
1.66	–	949 ± 0.6	0.53 ± 0.07	15.23 ± 0.04	40.11 ± 0.05
3.33	–	708 ± 0.8	1.00 ± 0.31	27.06 ± 2.24	29.80 ± 0.05
–	0.83	832 ± 0.9	0.69 ± 0.32	–15.5 ± 0.81	32.81 ± 0.36
–	1.66	709 ± 0.3	1.00 ± 0.43	–23.2 ± 0.52	17.73 ± 0.21
–	0.33	747 ± 0.3	0.15 ± 0.05	–24.5 ± 1.87	17.44 ± 0.11
SON					
0.83	–	354 ± 0.6	0.11 ± 0.03	17.23 ± 0.09	11.05 ± 0.05
1.66	–	328 ± 0.8	0.12 ± 0.02	23.11 ± 0.08	13.13 ± 0.08
3.33	–	342 ± 0.1	0.10 ± 0.02	21.23 ± 0.01	16.08 ± 0.1
–	0.83	302 ± 0.3	0.16 ± 0.03	–12.38 ± 0.62	8.67 ± 0.04
–	1.66	315 ± 0.5	0.12 ± 0.01	–15.18 ± 0.07	7.59 ± 0.21
–	0.33	335 ± 0.8	0.21 ± 0.03	–21.08 ± 0.95	6.54 ± 0.17
Niosomes					
0.83	–	12254 ± 0.7	0.71 ± 0.24	4.93 ± 0.09	29.71 ± 0.05
1.66	–	12316 ± 0.9	0.23 ± 0.06	20.47 ± 1.31	40.08 ± 0.01
3.33	–	10357 ± 0.6	0.38 ± 0.01	27.14 ± 1.35	31.29 ± 0.12
–	0.83	11345 ± 0.6	0.21 ± 0.14	–18.48 ± 0.56	8.07 ± 0.06
–	1.66	12254 ± 0.1	0.71 ± 0.23	–6.17 ± 0.77	9.24 ± 0.02
–	3.33	12316 ± 0.2	0.20 ± 0.06	–4.93 ± 0.59	6.17 ± 0.01
(B)					
Extrusion		Size ± SD	Pdl ± SD	Zeta ± SD	PDE ± SD
No		2248 ± 0.02	0.17 ± 0.03	22.4 ± 0.08	45.32 ± 0.02
Yes		647 ± 0.05	0.13 ± 0.07	23.23 ± 0.07	62.4 ± 0.01

TLE: thin and layer evaporation; FAT: freezing and thawed; SON: sonication; NIO: niosomes by TLE (NIO). $N = 3$ for all the techniques.

encapsulation efficiency by TLE ($45.32 \pm 0.02\%$), the value decreased by FAT technique (30.59 ± 0.12). Some authors as Kumar *et al.* (2011) studied the ability of multilamellar vesicles obtained by TLE method to protect hydrophilic drugs with an apolar radical.

Note finally the higher vesicular size of the samples analysed and the drawbacks to further administer them by the nasal route. Based on this feature (sizes higher than $1 \mu\text{m}$ in TLE, FAT, and niosomes), we proceeded to submit the samples to an extrusion process with the aim to reduce and homogenise the sizes to adequate sizes. Obviously, a decrease in size was observed after the extrusion process (Table 2(B)).

Size reduction mechanism was suggested to provide vesicles with smaller size when the pore size was $0.8 \mu\text{m}$. However, smaller pore sizes ($0.2 \mu\text{m}$) resulted in vesicle diameters slightly bigger than the nominal pore size. This can be attributed to elastic deformation of the liposome spheres to ellipsoid shape (Lesieur *et al.* 1991), which pass easier through the pores.

Despite the size reduction, during stepwise extrusion, an increase in the PDE was produced (Table 2(B)). According to Schneider *et al.* (1996) and González-Rodríguez *et al.* (2012), these results are explained based on the mechanism of extrusion process on vesicles, because vesicles suffer structural reorganisation during passage through the filters, which cause better drug entrapment.

In order to obtain information on levodopa release from these cationic extruded liposomes, with and without ascorbic acid and compare them with standard solution, the dialysis method was used. The *in vitro*-release profiles of levodopa obtained from the different formulations are shown in Figure 6. The obtained results demonstrated one sudden burst release step followed by a gradual release up to 3 h in the liposome formulations. The burst release was due to the free drug outside the vesicles, which was higher in that formulation with lower encapsulation percentage (see Figure 3). The gradual release of the drug from liposomes could be ascribed to the hydrophilicity

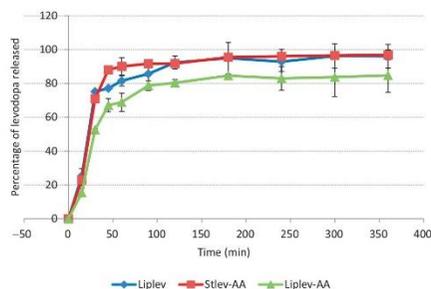


Figure 6. Dialysis release of levodopa from standard solution with ascorbic acid (squares) and liposomes with (triangles) and without ascorbic acid (diamonds).

of levodopa and its diffusion time through the lipid bilayer until reach the dissolution medium. This slight difference could be attributable to the differences in the vesicle size when the hydrophilic antioxidant was added to the formulation. Similar findings were noted recently by Cortesi *et al.* (2017) who showed that levodopa and co-drugs loaded nanostructure systems provided a controlled drug release and an increase of stability against the enzymatic action.

4. Conclusions

Our findings further confirmed ascorbic acid as a strong antioxidant compound compared to curcumin. Liposomal and niosomal formulations, containing Hepes buffer pH 6.2 and ascorbic acid in the aqueous phase, enhanced the stability of levodopa (1 mg/mL) in this aqueous medium. The addition of cationic charge and the extrusion of vesicles also contribute directly in the increase of levodopa entrapped and so to the enhancement of antioxidative properties of the formulation.

To conclude, delivery of levodopa in addition to ascorbic acid with the aid of cationic extruded liposomes can be a potential therapeutic strategy for Parkinson's disease after suitable conditioning the formulations into an adequate solid vehicle which provide a sustained drug release for nasal delivery. This approach will be the purpose of future studies.

Acknowledgements

The authors gratefully thank the technical staff of Biology Service (SGI, Universidad de Sevilla) for the services offered.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

References

- Angeles, D.C., *et al.*, 2016. Antioxidants inhibit neuronal toxicity in Parkinson's disease-linked LRRK2. *Annals of clinical and translational neurology*, 3 (4), 288–294.
- Antolovich, M., *et al.*, 2002. Methods for testing antioxidant activity. *The analyst*, 127 (1), 183–198.
- Berger, N., *et al.*, 2001. Filter extrusion of liposomes using different devices: comparison of liposome size, encapsulation efficiency, and process characteristics. *International journal of pharmaceutics*, 223 (1–2), 55–68.
- Bors, W., Michel, C. and Schikora, S., 1995. Interaction of flavonoids with ascorbate acid determination of their univalent redox potentials. A pulse radiolysis study. *Free radical biology and medicine*, 19 (1), 45–52.
- Buettner, G.R. and Jurkiewicz, B.A., 1996. Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid. *Radiation research*, 145 (5), 532–541.
- Butterfield, D.A. and Louderback, C.M., 2002. Lipid peroxidation and protein oxidation in Alzheimer's disease brain: potential causes and consequences involving amyloid beta-peptide-associated free radical oxidative stress. *Free radical biology and medicine*, 32 (11), 1050–1060.
- Butterfield, D.A., Bader Lange, M.L. and Sultana, R., 2010. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. *Biochimica et biophysica acta*, 1801 (8), 924–929.
- Chen, C., *et al.*, 2009. An in vitro study of liposomal curcumin: stability, toxicity and biological activity in human lymphocytes and Epstein-Barr virus-transformed human B-cells. *International journal of pharmaceutics*, 366 (1–2), 133–139.
- Choudhury, S.T., *et al.*, 2016. Vesicular (liposomal and nanoparticulated) delivery of curcumin: a comparative study on carbon tetrachloride-mediated oxidative hepatocellular damage in rat model. *International journal of nanomedicine*, 11, 2179–2193.
- Cortesi, R., *et al.*, 2017. L-dopa co-drugs in nanostructured lipid carriers: a comparative study. *Materials science and engineering C, materials for biological applications*, 72, 168–176.
- Davie, C.A., 2008. A review of Parkinson's disease. *British medical bulletin*, 86 (1), 109–127.
- Di Stefano, A., *et al.*, 2006. Maleic- and fumaric-diamides of (O,O-diacetyl)-L-Dopa-methylester as anti-Parkinson pro-drugs in liposomal formulation. *Journal of drug targeting*, 14 (9), 652–661.
- Dias, V., Junn, E. and Mouradian, M.M., 2013. The role of oxidative stress in Parkinson's disease. *Journal of Parkinson's disease*, 3 (4), 461–491.
- Diaz, N.L. and Waters, C.H., 2009. Current strategies in the treatment of Parkinson's disease and a personalized approach to management. *Expert review of neurotherapeutics*, 9 (12), 1781–1789.
- Dua, J., Rana, A. and Bhandari, A., 2012. Liposomes: methods of preparation and applications. *International journal of pharmaceutical research*, 3 (2), 14–20.

- Esatbeyoglu, T., et al., 2012. Curcumin-from molecule to biological function. *Angewandte chemie international edition*, 51 (22), 5308–5332.
- Fahn, S., 2008. The history of dopamine and Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Movement disorders*, 23 (S3), S497–S508.
- Goel, A., Kunnumakkara, A.B. and Aggarwal, B.B., 2008. Curcumin as "curcumin" from kitchen to clinic. *Biochemical pharmacology*, 75 (4), 787–809.
- González-Rodríguez, M.L., et al., 2012. Applying the Taguchi method to optimize sumatriptan succinate niosomes as drug carriers for skin delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 101 (10), 3845–3863.
- González-Rodríguez, M.L., et al., 2016. Deformability properties of timolol-loaded transfersomes based on the extrusion mechanism. Statistical optimization of the process. *Drug development and industrial pharmacy*, 42 (10), 1683–1694.
- Hatcher, H., et al., 2008. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and molecular life sciences*, 65 (11), 1631–1652.
- Ihara, Y., et al., 1999. Hydroxyl radical and superoxide dismutase in blood of patients with Parkinson's disease: relationship to clinical data. *Journal of the neurological sciences*, 170 (2), 90–95.
- Jiménez, D., Clavijo, Y. and Beltrán, D., 2014. *Desnaturalización de proteínas*. Thesis (PhD). Bogota University.
- Jin, H., et al., 2014. Mitochondria-targeted antioxidants for treatment of Parkinson's disease: preclinical and clinical outcomes. *Biochimica et biophysica acta*, 1842 (8), 1282–1294.
- Jovanovic, S.V., et al., 1999. H-atom transfer is a preferred antioxidant mechanism of curcumin. *Journal of the American chemical society*, 121 (41), 9677–9681.
- Kankkunen, T., et al., 2002. Improved stability and release control of levodopa and metaraminol using ion-exchange fibers and transdermal iontophoresis. *European journal of pharmaceutical sciences*, 16 (4–5), 273–280.
- Kibbe, A., 2009. Ascorbic acid. In: R.Rowe, P. Sheskey, and M. Quinn, eds. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th ed. Great Britain: Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association, 43–46.
- Kruk, I., et al., 1999. Formation of active oxygen species during autoxidation of dopa. *Chemosphere*, 39 (3), 443–453.
- Kumar, K., et al., 2011. Stability of liposomes. *Pharmanest*, 2 (4), 0541–2231.
- Lesieur, S., et al., 1991. Size analysis and stability study of lipid vesicles by high-performance gel exclusion chromatography, turbidity and dynamic light scattering. *Analytical biochemistry*, 192 (2), 334–343.
- Levy, O.A., Malagelada, C. and Greene, L.A., 2009. Cell death pathways in Parkinson's disease: proximal triggers, distal effectors, and final steps. *Apoptosis*, 14 (4), 478–500.
- Maestrelli, F., et al., 2006. Effect of preparation technique on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen–cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. *International journal of pharmaceuticals*, 312 (1–2), 53–60.
- Maestrelli, F., et al., 2010. New "drug-in cyclodextrin-in deformable liposomes" formulations to improve the therapeutic efficacy of local anaesthetics. *International journal of pharmaceuticals*, 395 (1–2), 222–231.
- Manosroi, A., Podjanasoonthon, K. and Manosroi, J., 2002. Development of novel topical tranexamic acid liposome formulations. *International journal of pharmaceuticals*, 235 (1–2), 61–70.
- Manosroi, A., Kongkanermit, L. and Manosroi, J., 2004. Characterization of amphotericin B liposome formulations. *Drug development and industrial pharmacy*, 30 (5), 535–543.
- Mason, H.S. and Wricht, C.J., 1949. Chemistry of melanin. V. Oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *The journal of biological chemistry*, 180 (1), 235–247.
- Mikirova, N.A., Jackson, J.A. and Riordan, N.H., 2007. The effect of high dose IV vitamin C on plasma antioxidant capacity and level of oxidative stress in cancer patients and healthy subjects. *Journal of orthomolecular medicine*, 22 (3), 153–160.
- Nagai, T., et al., 2003. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. *Food chemistry*, 80 (1), 29–33.
- Nagayama, H., et al., 2004. The effect of ascorbic acid on the pharmacokinetics of levodopa in elderly patients with Parkinson disease. *Clinical neuropharmacology*, 27 (6), 270–273.
- Paromov, V., et al., 2011. Protective effect of liposome encapsulated glutathione in a human epidermal model exposed to a mustard gas analog. *Journal of toxicology*, 2011, 1–11.
- Pavelic, Z., et al., 2005. Development and in vitro evaluation of a liposomal vaginal delivery system for acyclovir. *Journal of controlled release*, 106 (1–2), 34–43.
- Payton, F., Sandusky, P. and Alworth, W.L., 2007. NMR study of the solution structure of curcumin. *Journal of natural products*, 70 (2), 143–146.
- Pisoschi, A.M. and Negulescu, G.P., 2011. Methods for total antioxidant activity determination: a review. *Biochemistry & analytical biochemistry*, 01 (01), 106.
- Rajan, R., et al., 2011. Transfersomes – a vesicular transdermal delivery system for enhanced drug permeation. *Journal of advanced pharmaceutical technology and research*, 2 (3), 138–143.
- Rengel, R., et al., 2002. High efficiency entrapment of superoxide dismutase into mucoadhesive chitosan-coated liposomes. *European journal of pharmaceutical sciences*, 15 (5), 441–448.
- Schneider, T., et al., 1996. Surface modification of continuously extruded contrast-carrying liposomes: effect on their physical properties. *International journal of pharmaceuticals*, 132 (1–2), 9–21.
- Smeyne, M. and Smeyne, R.J., 2013. Glutathione metabolism and Parkinson's disease. *Free radical biology and medicine*, 62, 13–25.
- Spuch, C. and Navarro, C., 2011. Liposomes for targeted delivery of active agents against neurodegenerative diseases (Alzheimer's disease and Parkinson's disease). *Journal of drug delivery*, 2011, 1.
- Thanvi, B.R. and Lo, T., 2004. Long term motor complications of levodopa: clinical features, mechanisms, and management strategies. *Postgraduate medical journal*, 80 (946), 452–458.
- Umasuthan, N., et al., 2013. A manganese superoxide dismutase with potent antioxidant activity identified from *Oplegnathus fasciatus*: genomic structure and transcriptional characterization. *Fish shellfish immunology*, 34 (1), 23–37.

- Varshosaz, J., et al., 2014. Niosomes of ascorbic acid and α -tocopherol in the cerebral ischemia-reperfusion model in male rats. *Biomed research international*, 2014, 1.
- Vieira, D.B. and Gamarra, L.F., 2016. Getting into the brain: liposome-based strategies for effective drug delivery across the blood-brain barrier. *International journal of nanomedicine*, 11, 538–5414.
- Villasmil, S., et al., 2010. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. *Drug development and industrial pharmacy*, 36 (6), 666–675.
- Villasmil, S., Rabasco, A.M. and González-Rodríguez, M.L., 2013. Thermal and ^{31}P NMR studies to elucidate sumatriptan succinate entrapment behavior in phosphatidylcholine/cholesterol liposomes. Comparative ^{31}P NMR analysis on negatively and positively-charged liposomes. *Colloids and surfaces B: biointerfaces*, 105, 14–23.
- Yadav, A. and Jain, D.K., 2011. Preparation and characterization of microparticulate system of propranolol hydrochloride. *Journal of drug delivery and therapeutics*, 1 (2), 15–20.
- Yang, T., et al., 2007. Liposome formulation of paclitaxel with enhanced solubility and stability. *Drug delivery*, 14 (5), 301–305.
- Yang, H., et al., 2008. Preparation, characterization, and use of antioxidant-liposomes. *Methods in molecular biology*, 477 (1), 277–292.
- Zaitone, S.A., Hammad, L.N. and Farag, N.E., 2013. Antioxidant potential of melatonin enhances the response to L-dopa in 1-methyl 4-phenyl 1,2,3,6-tetrahydropyridine-parkinsonian mice. *Pharmaceutical reports*, 65 (5), 1213–1226.
-

