

*Artículo original*

## **Nueva alternativa a la cirugía en la queratopatía neurotrófica. Formulación de liposomas deformables de extracto de membrana amniótica**

**New alternative to surgery in neurotrophic keratopathy. Formulation of amniotic membrane extract-loaded deformable liposomes**

**Rodríguez-Ochoa JL, Arroyo-García CM, Rabasco AM, González-Rodríguez ML\***

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Universidad de Sevilla. Sevilla. España

\*Correspondencia: malugoro@us.es

*Recibido: 01.07.20; aceptado: 08.07.20*

**Resumen:** El objetivo del presente trabajo de investigación fue desarrollar nuevas formulaciones de liposomas deformables de extracto de membrana amniótica (EMA), menos agresivas que un trasplante de placenta para el tratamiento de la queratopatía neurotrófica. Para ello, en primer lugar, se puso a punto el método de extracción de las proteínas totales, seguido de la cuantificación de proteínas utilizando el método del ácido bicinconínico (BCA). Las formulaciones de liposomas se elaboraron mediante la técnica TLE (Thin Layer Evaporation). Para obtener la composición deseada de las vesículas, se realizó un estudio de cribado usando el diseño experimental con una matriz de Taguchi L9, de cuyos experimentos se evaluaron el tamaño, índice de polidispersión (PDI), carga superficial y eficacia de encapsulación (EE). Tras establecer las condiciones de extracción de las proteínas, los resultados del estudio de cribado mostraron que todos los factores evaluados afectaron a las características fisicoquímicas. La etapa de optimización permitió seleccionar como composición para los estudios posteriores: desoxicolato sódico (NaDC) como agente deformable, estearilamina como agente de carga en una cantidad de 0.06 mmol y una dilución al 75% del EMA. Este estudio ofrece nuevas posibilidades para mejorar el tratamiento de la queratopatía neurotrófica (QN) mediante el uso de formulaciones no invasivas.

**Abstract:** The objective of the present research work was to develop a new formulation of amniotic membrane extract (EMA)-loaded deformable liposomes. This pharmacological alternative supposes a less aggressive technology than a placental transplant for the treatment of neurotrophic keratopathy. Firstly, the total protein extraction method was developed, followed by protein quantification using the bicinchoninic acid (BCA) method. Liposome formulations were made using the TLE (Thin Layer Evaporation) technique. To obtain the desired composition of the vesicles, a screening study was realized using the design of experiments and a Taguchi L9 matrix, whose experiments evaluated the size, polydispersity index (PDI), surface charge and encapsulation efficiency (EE). After selecting the suitable conditions for protein extraction, the results of the screening study showed that all the factors evaluated affected the physicochemical characteristics of vesicles. The optimization stage allowed to select as composition for subsequent studies: sodium deoxycholate (NaDC) as a deformable agent, stearylamine as positively-charged agent in an amount of 0.06 mmol and a 75% dilution of the EMA. This study offers new possibilities to improve the treatment of neurotrophic keratopathy through the use of non-invasive formulations.

**Palabras clave:** queratopatía neurotrófica, liposoma, membrana amniótica, transfersoma. **Keywords:** neurotrophic keratopathy, liposome, amniotic membrane, transfersomet.

## 1. Introducción

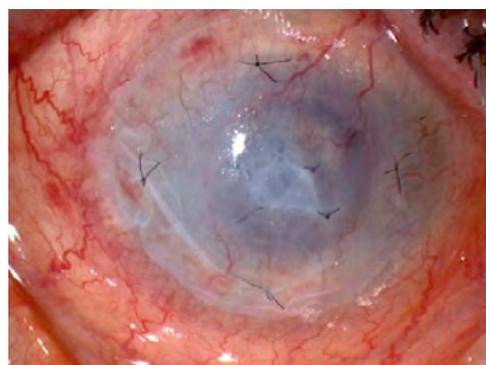
La queratopatía neurotrófica es una enfermedad degenerativa de la córnea que se caracteriza por una hipoestesia corneal producida por un deterioro parcial o total de inervación del trigémino. Esta reducción en la sensibilidad corneal, junto a una regeneración epitelial reducida constituyen los sellos distintivos de esta enfermedad y son responsables de la consiguiente degradación del epitelio corneal, que afecta la integridad de la película lagrimal, el epitelio y el estroma [1]. Aunque no existen datos oficiales de su prevalencia, se estima que esta patología afecta a menos de 5 de cada 10.000 personas [2], por lo que es considerada como una enfermedad rara.

Hasta el momento, no existe un tratamiento efectivo para esta enfermedad. Esto supone que la progresiva degeneración con la que cursa puede desembocar en una ceguera permanente para el paciente. Los objetivos actuales de la terapéutica se centran en evitar la progresión del daño ocular, intentando mantener tanto la estructura como la transparencia de la córnea. Es fundamental, por lo tanto, que se instaure un tratamiento de forma precoz, ya que una vez que se ha producido el daño, la regeneración corneal estaría muy comprometida. Dicho tratamiento varía en función del estadio de la enfermedad, de forma que, en el primer estadio, el objetivo consiste en prevenir la ruptura epitelial y mejorar la calidad epitelial mediante lágrimas artificiales, parches oclusivos y con profilaxis de otras patologías que comprometan la integridad de la superficie ocular. En el estadio 2 se promueve la curación del defecto corneal con antibióticos tópicos, suero autólogo o suero de cordón umbilical. En el último estadio se encuentran los pacientes que no han respondido a los anteriores tratamientos, teniendo que recurrir a técnicas de cirugía como tarsorrafia flap conjuntival o trasplante de membrana amniótica.

La membrana amniótica se compone de una matriz avascular con propiedades antiangiogénicas y antiinflamatorias, considerándose eficaz en la regeneración del epitelio corneal. Es utilizada en oftalmología

para el tratamiento de diversas afecciones, tales como úlceras corneales, glaucoma, quemaduras, leucomas, etc., ya que actúa inhibiendo la neovascularización y la fibrosis [3]. Además, se ha recogido en la literatura que al utilizarla como sustrato para el cultivo de células epiteliales, forman una estructura tridimensional que se asemeja mucho al tejido epitelial de la córnea [4].

Los tratamientos actuales con trasplante de membrana amniótica consisten en la aplicación de un fragmento de ésta sobre la superficie ocular, el cual suele fijarse a los tejidos mediante finas suturas, pudiéndose aplicar como recubrimiento o como injerto. En caso de existir defecto epitelial únicamente, sin afectar al estroma, la membrana amniótica se utiliza recubriendo toda la superficie, de manera que los factores de crecimiento que contiene hacen que las células del epitelio se empiecen a regenerar por su parte interna. Sin embargo, en los casos en que exista una lesión más profunda, con pérdida de estroma, la membrana se injerta en la región carente del mismo. En este caso, las células crecen hasta sustituir dicha membrana, que se va reabsorbiendo progresivamente. Este proceso es más lento y la membrana amniótica provoca cierta opacidad, como se aprecia en la Figura 1, que puede limitar la visión de manera transitoria.



**Figura 1.** Tratamiento de úlcera corneal con injerto de membrana amniótica.

Para evitar los problemas y limitaciones que suponen los trasplantes con membrana amniótica, tanto en lo referente a la intervención

al paciente como en los efectos indeseables que producen en ellos, se han desarrollado estudios en los que se emplean extractos de dicha membrana, habiéndose ampliado su campo de aplicación de la vía tópica sobre piel [5] a la vía oftálmica, los cuales son incorporados en la correspondiente forma de administración para su aplicación en mucosa ocular [6].

Los liposomas han recibido una especial consideración como sistemas transportadores de compuestos terapéuticamente activos en la vía oftálmica, debido a sus características únicas, tales como la capacidad para incorporar fármacos hidrófilos e hidrófobos, biocompatibilidad, baja toxicidad, no activación del sistema inmune y dirigir la liberación de compuestos bioactivos al sitio de acción [7]. Son estructuras vesiculares esféricas compuestas de una bicapa lipídica, uni o multilamelar, que rodea compartimentos internos acuosos.

Sus propiedades de composición y estructura los hacen adecuados para el transporte de proteínas [8]. Recientemente, se han aplicado al tratamiento de diversas patologías, como el cáncer de vejiga [9], cicatrices hipertróficas con papaína [10], infecciones vaginales por el virus del papiloma humano con interferón alfa-2b [11], o para la disolución de los trombos mediante administración del activador tisular del plasminógeno recombinante [12].

Entre los liposomas, los denominados liposomas ultradeformables o transfersomas, gracias a la combinación de los fosfolípidos con compuestos activadores del borde en su composición, presentan una bicapa que es capaz de moldearse a temperatura ambiente. Esto les permite atravesar las membranas biológicas sin llegar a romperse, evitando la liberación espontánea de su contenido [13]. Dichos activadores del borde que confieren esta actividad tan interesante son, por lo general, compuestos de naturaleza tensioactiva. Por tanto, uno de los factores a tener en cuenta a la hora de trabajar con activadores del borde es que, superada una determinada concentración, conocida como concentración micelar crítica (CMC), no sólo se agregan al resto de lípidos formando parte de la estructura de la bicapa, sino que empiezan a constituir por sí mismos distintos tipos de vesículas, conocidas como micelas mixtas (MMs), como demostró Schubert (2003) en sus estudios [14].

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

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Materiales

Fosfatidilcolina (FC), bromuro de didodecildimetilamonio (DDAB), colato sódico (NaC), colesterol (CH), desoxicolato sódico (NaDC), polvo de placenta, taurocolato sódico (NaTC), ácido Bicinconínico, estándar de ovoalbúmina y polvo liofilizado de gonadotropina coriónica humana se adquirieron de Sigma-Aldrich (España). Estearilamina (EA) se obtuvo de Fluka-Biochemika (Suiza). Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico), hidrógeno fosfato de sodio, dihidrógeno fosfato de sodio, acetona, cloroformo, metanol y acetonitrilo fueron proporcionados por Panreac Química (España), siendo los solventes acetona y cloroformo de calidad analítica y el acetonitrilo y el metanol de grado HPLC.

### 2.2. Cuantificación de las proteínas del extracto de placenta

La cuantificación de las proteínas existentes en el extracto de placenta se llevó a cabo mediante dos métodos: el método del ácido bicinconínico (BCA) para proteínas totales, y por HPLC para la gonadotropina coriónica humana (hCG), proteína presente en el extracto de placenta. Para conocer qué porcentaje representaba la hCG (p/p) en el extracto, se cuantificó una muestra por triplicado por ambos métodos.

El fundamento del método BCA consiste en la reacción entre las proteínas presentes en la muestra, con iones  $\text{Cu}^{2+}$  en un medio básico. Esta reacción da lugar a iones  $\text{Cu}^{+}$  los cuales, al reaccionar con el BCA dan lugar a un complejo coloreado púrpura cuyo máximo de absorbancia se encuentra a 562 nm. Este pico de absorbancia

permitió determinar la concentración de proteínas mediante espectrofotometría UV-visible. Para el procedimiento de cuantificación, se añadieron 100 µL de muestra y 2 mL de reactivo previamente preparado (1:50 sulfato de cobre + 49:50 ácido bicinónico). Las muestras se incubaron a 37 °C y en agitación durante 30 minutos (Ret Basic IKA®-WERKE). Posteriormente, se midió su absorbancia a 562 nm en un espectrofotómetro UV-visible (Agilent® 8453).

Para cuantificar hCG por HPLC, se siguió el método descrito por Pithadia et al. (2015) con ciertas modificaciones [15]. El análisis por HPLC fue llevado a cabo utilizando un equipo Hitachi Elite LaChrom. Se utilizó una columna Zorbax SB-C18 (4.6 x 150 mm, 3.5 µm). El flujo se fijó en 1 mL/min y el volumen de inyección en 20 µL. La fase móvil estaba constituida por una solución de tampón fosfato sódico (pH 7.0, 0.05 mM) y acetonitrilo, en proporción 87.5:12.5 % v/v. Para la correcta detección, se requirió un tratamiento previo de la hCG. Para ello, se tomaron 350 µL de muestra a los cuales se adicionaron 700 µL de acetona. Las muestras se agitaron en vórtex (Atom® Atomixer) durante 10 min y se centrifugaron a 4000 rpm/4 °C/10 min (Eppendorf Centrifuge 5804 R). Una vez centrifugadas, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la hCG en 200 µL de tampón Hepes 7.4. Tras ser filtradas las muestras utilizando filtros de acetato de celulosa (Pierce® Spin Cups) adaptados en eppendorf y centrifugadas en las mismas condiciones, estas fueron trasvasadas a un vial de HPLC con inserto incorporado para su posterior cuantificación.

### 2.3. Extracción de las proteínas del polvo de placenta

Para efectuar el proceso de extracción de las proteínas del polvo de placenta, se utilizó un homogeneizador ultrasónico (Ultrasonic Processor UP100H) usando como buffer de homogenizado Hepes pH 7.4, isotónico con NaCl 150 mM.

Se realizó por triplicado la extracción de 40 mg de polvo de placenta en 2 mL de Hepes, aplicando el homogeneizador durante dos tiempos distintos (30 s y 60 s) con el fin de comprobar el efecto del tiempo sobre la eficacia de la extracción. Posteriormente, la muestra se centrifugó en dos

condiciones distintas: 3000 rpm/4°C/10 minutos y 8000 rpm/4°C/10 minutos para comprobar qué condiciones permitían la extracción más favorable. Las muestras resultantes fueron cuantificadas en proteínas totales por el método BCA.

Una vez seleccionadas las condiciones más favorables de extracción aplicando el test estadístico t-student, se estandarizó el método y los sobrenadantes se fueron almacenando en un único matraz con el fin de utilizar en todos los ensayos un extracto con la misma concentración de proteínas.

### 2.4. Elaboración de los liposomas

Para elaborar los liposomas se empleó la técnica de evaporación en capa fina o Bangham (TLE, *Thin Layer Evaporation*), ampliamente utilizada por González-Rodríguez et al. (2016), con el fin de obtener una elevada eficacia de encapsulación de EMA, así como buenas características físicas de las vesículas [16]. El método requiere la formación inicial de una película fina de los lípidos, la cual es posteriormente hidratada en condiciones de agitación y calentamiento a 58 °C (temperatura superior a la temperatura de transición de fases de la FC).

### 2.5. Estudios de caracterización

#### 2.5.1. Análisis dimensional

Para evaluar el tamaño de las vesículas se recurrió a la espectroscopía de correlación fotónica. El equipo utilizado fue un Zetasizer Nano ZS (Malvern Zetasizer), el cual calculó el radio hidrodinámico (RH) de las partículas, así como el índice de polidispersión (PDI). Este último parámetro informa sobre la homogeneidad o heterogeneidad en tamaño de la población analizada, adquiriendo este ensayo especial relevancia a la hora de definir la presencia de MMs por exceso de activador de borde. Las medidas fueron realizadas por triplicado y se aplicó una dilución 1:20 v/v.

#### 2.5.2. Carga superficial: potencial zeta

El potencial zeta ( $\zeta$ ) es una medida de la carga que rodea a las partículas en suspensión. En nuestro estudio, dotar a la superficie de los liposomas de una carga positiva permitiría mejorar la penetración y tiempo de permanencia

en la córnea, al contar esta con una carga superficial negativa [17, 18]. Además, se evitan los fenómenos de agregación durante el almacenamiento. El equipo utilizado fue el mismo que para la determinación de tamaños, así como la preparación de las muestras.

### 2.5.3. Eficacia de encapsulación

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

Para determinar la fracción no encapsulada, las muestras se sometieron a centrifugación en condiciones de 8000 rpm/4°C/60 min.

Posteriormente, se retiró el sobrenadante y se cuantificó mediante el método del BCA.

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

### 2.5.4. Índice de deformabilidad

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

Para ello, se extruyeron las vesículas a través de un filtro de membrana de policarbonato de 800 nm en un extrusor (LIPEX® Thermobarrel Extruder) bajo flujo de nitrógeno [16]. El ID se calculó determinando el flujo (J) de la muestra a través del filtro y la relación del tamaño vesicular obtenido y el tamaño del poro. El flujo se determinó haciendo pasar la formulación, previamente tratada con el filtro de 800 nm, por uno de 100 nm (rp) aplicando una presión de 290 psi durante 10 minutos, y midiendo el radio hidrodinámico por DLS (rv). El ensayo se realizó

por duplicado.

El ID se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$ID = J \times (rv/rp)^2$$

### 2.5.5. Morfología

La caracterización morfológica superficial de la formulación optimizada de liposomas fue evaluada mediante un Microscopio Electrónico de Barrido de Alta Resolución (FEGSEM HITACHI S-5200), el cual posee un detector de electrones el cual permite la observación de la superficie de la muestra. La muestra fue previamente tratada diluyendo 500 µL de ésta en 2,5 mL de tampón Hepes. Posteriormente, se depositó en un soporte de silicio y se dejó secar al aire durante una noche. Al día siguiente fueron recubiertas con platino mediante *sputtering*, con el fin de transformarlas en superficies conductoras.

## 2.6. Estabilidad de las proteínas en las condiciones de trabajo

Debido a la labilidad que presentan las proteínas cuando son sometidas a determinadas condiciones de stress, antes de proceder a desarrollar los ensayos de formulación, se realizó un estudio para evaluar la estabilidad de las proteínas en las condiciones más agresivas que forman parte de la elaboración y caracterización de los liposomas. Los ensayos incluyeron la estabilidad frente al tiempo, la temperatura y la centrifugación.

### 2.6.1. Tiempo

Teniendo como referencia el tiempo de estudio de estabilidad de los liposomas se forma rutinaria, se cuantificó una vez por semana durante un mes la concentración de proteínas de las cuatro extracciones realizadas para el estudio de extracción detalladas en un apartado anterior, utilizando el método BCA.

### 2.6.2. Temperatura

Para estudiar la estabilidad frente a la temperatura, el método de cuantificación con BCA no es válido, ya que tanto la estructura macromolecular de la proteína como cuatro aminoácidos específicos (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) son los responsables de la formación de color en muestras de proteínas cuando son ensayadas con este método. Esto

implica que, aunque las proteínas se encuentren desnaturalizadas, el BCA seguirá reaccionando con estos aminoácidos formando el complejo coloreado.

Por ello, se llevó a cabo la técnica descrita por Cueto et al. (2003) para la determinación de temperatura de desnaturalización de proteínas, mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC Setaram 131) [19].

### 2.6.3. Centrifugación

Para evaluar si las proteínas permanecían estables a las condiciones de centrifugación necesarias para hacer precipitar los liposomas y poder así cuantificar el sobrenadante en la determinación de la eficacia de encapsulación, se realizó una extracción, la cual se separó en dos alícuotas. Una de ellas se cuantificó inmediatamente por el método BCA y la otra se sometió a centrifugación (8000 rpm/4°C/60 min) y se cuantificó. Posteriormente, se compararon los datos obtenidos.

## 2.7. Diseño y optimización de la formulación de transfersomas

### 2.7.1. Determinación de la CMC del ácido cólico

La obtención de transfersomas requiere la adición a la mezcla lipídica de un activador del borde. En el presente estudio se utilizaron las siguientes sales biliares: colato Na (NaC) desoxicolato Na (NaDC) y taurocolato Na (NaTC).

Para determinar la cantidad máxima de sal biliar que pudiese incorporarse sin que se superase la CMC, se llevó a cabo un primer estudio con el NaC para determinar su CMC y, a partir de ahí, establecer las concentraciones adecuadas para su formulación en liposomas.

Para ello, se prepararon 5 lotes de liposomas con composiciones fijas de FC (0.11 mmol) y CH (0.027 mmol) y concentraciones crecientes (3, 6, 12, 25 y 73.3 mM) de ácido cólico. Posteriormente, se caracterizaron en cuanto a tamaño, PDI y carga superficial, y se midió la transmitancia por espectrofotometría UV-visible con el fin de establecer la concentración a la cual comienzan a formarse las micelas. Previamente se hizo un barrido para determinar la longitud de onda de máxima transmitancia.

### 2.7.2. Aplicación del diseño experimental a la etapa de cribado

El objetivo de esta etapa fue determinar la composición de los transfersomas que satisficiera los criterios de calidad en términos de tamaños, PDI, carga superficial y eficacia de encapsulación del EMA. Para ello, se aplicó la herramienta estadística del diseño experimental, la cual permite acercarnos a la composición óptima de la formulación, cribando entre todos los factores analizados, aquellos que influyeron significativamente en las respuestas evaluadas. El estudio se llevó a cabo utilizando el software DOEpack 2000.

Para ello, se fijaron cuatro factores con tres niveles cada uno (Tabla 1). Para el estudio se seleccionó una matriz L9 de Taguchi, generando de esta forma 9 experimentos, cuyas composiciones se recogen en la Tabla 2.

**Tabla 1.** Factores y niveles del estudio.

Factor	Niveles		
	-1	0	+1
Activador del borde (Tipo AB)	NaC	NaDC	NaTC
Agente de carga (Tipo AC)	Ninguno	EA	DDAB
Cantidad de agente de carga (Q, mmol)	0.02	0.04	0.06
Concentración de extracto ([E], mg/mL)	0.125	0.187	0.25

**Tabla 2.** Experimentos correspondientes a la matriz experimental Taguchi L9. TC: taurocolato sódico. C: colato sódico. DC: desoxicolato sódico. EA: estearilamina. DDAB: didodecildimetilamonio.

	Tipo AB	Tipo AC	Q (mmol)	[E] (mg/mL)
1	TC	Sin	0.02	0.125
2	TC	EA	0.04	0.187
3	TC	DDAB	0.06	0.25
4	C	Sin	0.04	0.25
5	C	EA	0.06	0.125
6	C	DDAB	0.02	0.187
7	DC	Sin	0.06	0.187
8	DC	EA	0.02	0.25
9	DC	DDAB	0.04	0.125

Los experimentos se realizaron por duplicado y las formulaciones se caracterizaron en tamaño, PDI, potencial  $\zeta$  y eficacia de encapsulación.

La evaluación de los efectos producidos por la modificación de las variables se realizó mediante el análisis de las medias (ANOM), el cual analiza si las medias de los tratamientos difieren de la media general.

### 2.7.3. Optimización de la formulación

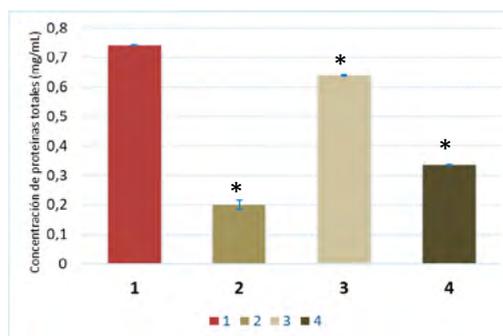
Una vez evaluados los resultados obtenidos en la etapa de cribado, se seleccionaron cuatro combinaciones para seleccionar de entre ellas la composición óptima, siendo los factores críticos: activador de borde (NaC o NaDC) y cantidad de agente de carga (0.04 o 0.06 mmol). Los factores de agente de carga utilizado y concentración del EMA se fijaron en la etapa de cribado. Estas cuatro combinaciones se elaboraron por duplicado y se caracterizaron.

Los objetivos que se plantearon en esta etapa de optimización fue seleccionar la formulación con tamaño próximo a 800 nm, un PDI mínimo, un potencial  $\zeta$  máximo positivo y una eficacia de encapsulación máxima.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Extracción y estudio de estabilidad de las proteínas del polvo de placenta

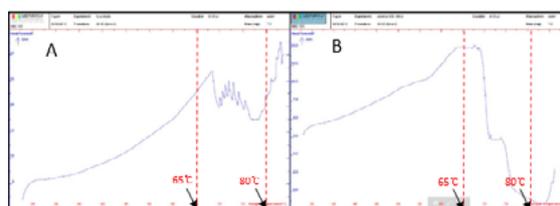
Antes de proceder a la formulación de los liposomas, se realizó un estudio básico a las muestras del extracto con el fin de evaluar la influencia de distintos factores relacionados con el proceso de extracción de las proteínas totales a partir del polvo de placenta comercial y que han sido detallados en el apartado de Metodología. Estas muestras se evaluaron en cuanto a proteínas totales durante un periodo de un mes con el fin de determinar si las condiciones de extracción condicionan el mantenimiento de las concentraciones. En la Figura 2 se puede apreciar cómo el aumento del tiempo de centrifugación afectó considerablemente a la concentración de proteínas extraídas, disminuyéndola. Esto podría deberse a que este proceso induce la precipitación de las proteínas, reduciendo así la cantidad solubilizada recuperada [20]. El tiempo de sonicación parece afectar en menor medida a la cantidad extraída.



**Figura 2.** Condiciones de extracción de las muestras de EMA. **1:** 30 s de sonicación y centrifugación 3000 rpm/4°C/10 min. **2:** 30 s de sonicación y centrifugación 8000 rpm/4°C/10 min. **3:** 60 s de sonicación y centrifugación 3000 rpm/4°C/10 min. **4:** 60 s de sonicación y centrifugación 8000 rpm/4°C/10 min. Los valores medios fueron estadísticamente diferentes comparados con el experimento 1 (\* P<0.0001).

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

A continuación, se llevó a cabo un estudio de recuperación de las proteínas totales de las muestras, las cuales fueron sometidas a las condiciones propias del proceso de elaboración de liposomas, tanto de temperatura (en la obtención de los liposomas) como de tiempo de centrifugación (para la determinación de la eficacia de encapsulación de las proteínas en las muestras). Los resultados obtenidos sobre el efecto de la temperatura se muestran a partir de los termogramas correspondientes a las muestras de extracto de placenta control (A) y tras ser sometida a 80°C durante 30 min (B), como se recoge en la figura 3.



**Figura 3.** Termogramas obtenidos por DSC de la muestra del polvo de placenta. (A) Sin someterla a ningún tipo de tratamiento. (B) Sometida a baño maría a 80 °C durante 30 minutos.

En la figura 3A se pueden observar varios picos en el rango de temperaturas entre 70 y 75°C

aproximadamente, que pueden identificarse con los picos típicos de la desnaturalización de las proteínas [19]. Sin embargo, en la figura 3B no aparecen estos picos al encontrarse las proteínas ya desnaturalizadas.

Dado que en el proceso de elaboración de los liposomas por TLE la temperatura máxima que se requiere es de 58°C [16], el método sería adecuado para trabajar con proteínas.

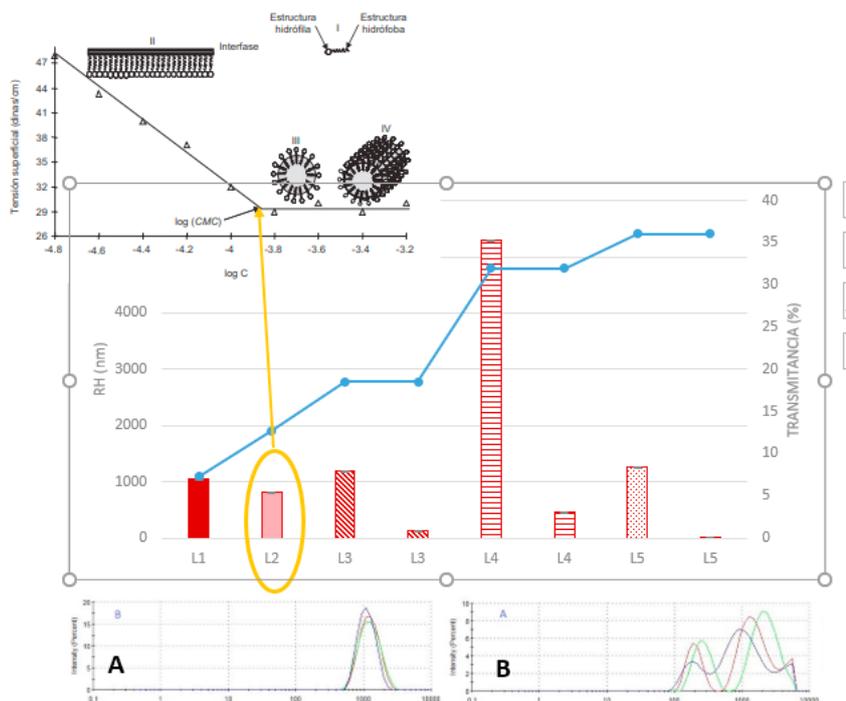
### 3.2. Determinación de la concentración micelar crítica (CMC) del ácido cólico

Este estudio se planteó con idea de determinar la cantidad de activador del borde (sal biliar) a usar en la elaboración de los liposomas, tal que se asegurara su incorporación en la bicapa y se evitara la formación de micelas.

Para ello, se llevó a cabo la determinación de la transmitancia de las muestras con diferente concentración, en el espectrofotómetro,

estableciéndose el máximo en 657 nm. A partir de ahí, se determinó el porcentaje de transmitancia de cada uno de los lotes a esa longitud de onda. Los resultados obtenidos mostraron un incremento del valor de transmitancia a medida que aumentó la cantidad del colato (Figura 4). Ello puede deberse a la formación de micelas que, al tener un menor tamaño que los liposomas, interfieren menos en el paso de la luz [21].

Asimismo, cuando se evaluaron los tamaños de las muestras coloidales por espectroscopía de correlación fotónica, se pudo observar cómo a concentraciones mayores de 6 mM (correspondiente a L2), deja de obtenerse una única población (Fig. 4A), detectándose al menos dos poblaciones distintas en los lotes elaborados con una concentración de NaC de 12 mM o mayor, como se recoge en la Figura 4B. Ello se debe a que al superarse la CMC aparecen las MMs, las cuales poseen tamaños muy dispersos [14].



**Figura 4.** Representación de los radios hidrodinámicos (RH, nm) de los lotes ensayados y valores de transmitancia (%) obtenidos. En la parte superior se esquematiza la organización de las moléculas de activador del borde alrededor de la concentración micelar crítica (CMC): por debajo de la CMC, monómeros; Por encima de la CMC, el activador del borde se encuentra formando micelas. A) Diagrama DLS ilustrativo de lotes con una concentración inferior a 6 mM. B) Diagrama DLS ilustrativo de lotes con una concentración superior a 6 mM.

A la vista de los resultados obtenidos, se fijó en 6 mM la concentración de activador del borde, la cual formará parte de la composición de los distintos lotes de liposomas. Esta concentración permitía la incorporación de la sal biliar en la bicapa sin formación de MMs.

### 3.3. Influencia de los factores variables en la formulación

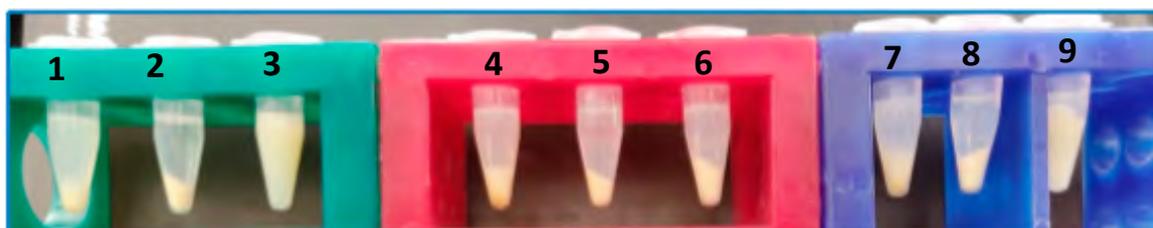
Una vez seleccionada la cantidad de sal biliar a incorporar en la formulación, se continuó el trabajo evaluando la influencia que determinados factores de formulación podrían afectar a las características de los sistemas coloidales obtenidos.

Como se muestra en la sección de metodología, se seleccionaron cuatro factores a tres niveles (Tabla 1), cuya matriz experimental correspondió a una L9 Taguchi (Tabla 2). Los resultados de caracterización de las formulaciones elaboradas se recogen en la Tabla 3.

La caracterización de todos los lotes fue posible, a excepción de los experimentos 3 y 9, como se muestra en la parte inferior de la tabla, los cuales presentaron problemas de poseer numerosas poblaciones de tamaño, desestabilización de las muestras y dificultad en el proceso de centrifugación [22].

**Tabla 3.** Características de los lotes ensayados en el *screening*.

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

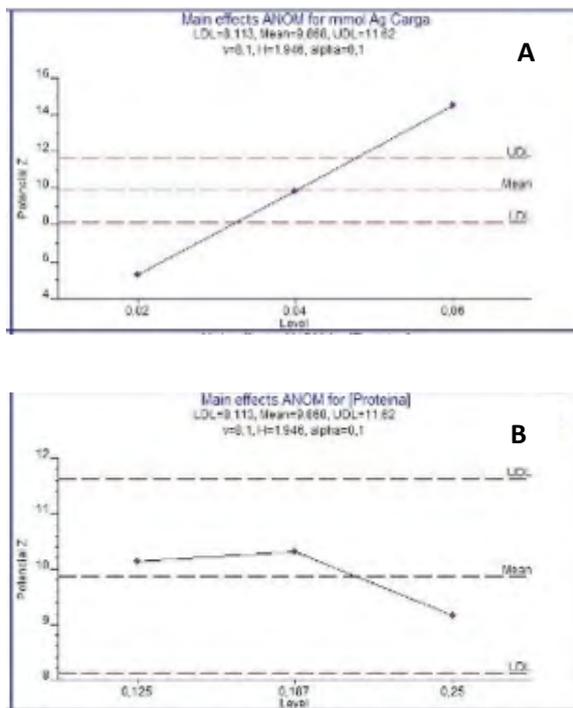


Con el fin de analizar la influencia de los factores de formulación sobre las respuestas de caracterización evaluadas, se aplicó el Diseño de Experimentos y se utilizaron los gráficos ANOM y el análisis de la varianza. Para ello, se establecieron los límites de confianza, superior (UDL) e inferior (LDL), los cuales determinarán la influencia significativa de cada factor en la respuesta evaluada.

#### 3.3.1. Influencia en el potencial $\zeta$

Los valores de carga superficial de los liposomas en las diferentes formulaciones oscilaron entre -9.66 y +28.05 mV.

Con el fin de visualizar gráficamente el efecto de los factores sobre esta respuesta, a título de ejemplo se exponen dos gráficos ANOM, uno con efecto significativo y otro sin él (Figura 5A y 5B, respectivamente). Para el resto de variables, el procedimiento sería similar.



**Figura 5.** Gráficas ANOM del potencial zeta respecto a: A) cantidad del agente de carga y B) concentración de proteínas totales.

Se obtuvo la existencia de diferencia significativa entre la ausencia de agente portador de carga positiva a las vesículas y la presencia de estos compuestos ( $p < 0.001$ ;  $F 28.8$  (-1 v +1) y  $F 202.8$  (-1,+1 v 0), siendo la EA el lípido que aportó mayores valores de potencial. Asimismo, se aprecia con claridad en la figura 5A una relación lineal entre la cantidad de agente de carga añadida y el potencial  $\zeta$ , como también observaron Carrión et al. (1997) [23].

Con respecto a la concentración de proteínas, no existieron diferencias significativas entre los niveles ensayados (Figura 5B).

### 3.3.2. Influencia sobre el tamaño y la polidispersión

Las formulaciones desarrolladas tuvieron tamaños que oscilaron entre 565 y 1992 nm, aproximadamente, con PDI comprendidos entre 0.05 y 0.58. Estos valores tan dispersos se justificaron por la presencia simultánea en algunos lotes de liposomas y micelas.

Los factores que contribuyeron de forma significativa en el tamaño fueron el activador del borde, obteniendo vesículas de menor tamaño al usar NaTC. En cambio, no se observaron

diferencias significativas entre NaC y NaDC. Este resultado puede deberse a la formación de MMs de NaTC, como se pudo comprobar al obtener valores de PDI muy elevados, en concordancia con otros estudios [14].

Por otra parte, el agente de carga que influyó de forma más significativa en el tamaño fue EA, obteniéndose con ésta el mayor tamaño ( $p < 0.001$ ,  $F 24.63$  (-1,+1 v 0). La rigidez de esta molécula en comparación con la naturaleza tensioactiva DDAB puede contribuir a la obtención de vesículas de mayor tamaño al interponerse en la bicapa [13].

La cantidad de agente de carga y la concentración de proteínas no influyeron significativamente en los valores de tamaño obtenidos, si bien respecto a la concentración de proteínas, el nivel intermedio (0.187 mg/mL) fue el que proporcionó un menor PDI de forma significativa.

### 3.3.3. Influencia sobre la eficacia de encapsulación

Los valores obtenidos en los experimentos ensayados oscilaron entre 27.11 y 81.86 % de proteína.

La EA mostró ser el agente de carga más indicado al presentar mayores valores de encapsulación ( $p < 0.001$ ,  $F 36.48$  (-1 v +1);  $F 27.67$  (-1,+1 v 0). Sin embargo, el resultado más revelador fue la obtención de una relación lineal inversa entre la cantidad de agente de carga y la eficacia de encapsulación obtenida ( $p < 0.001$ ,  $F 54.88$  (-1 v +1)). Por otro lado, se observó que NaTC proporcionó el menor valor de fármaco encapsulado de forma significativa y que no existieron diferencias entre NaC y NaDC. Finalmente, el nivel intermedio de concentración de proteínas fue el que presentó un mayor valor de este parámetro ( $p < 0.001$ ,  $F 33.78$  (-1 v +1) y  $F 51.68$  (-1,+1 v 0)).

### 3.4. Optimización de la formulación

Los resultados del cribado permitieron fijar algunos factores de formulación: EA como agente de carga superficial, ya que este lípido permitió obtener los mejores resultados en PDI, potencial  $\zeta$  y eficacia de encapsulación; asimismo, la concentración de proteínas se fijó en 0.187 mg/mL. Sin embargo, fueron necesarios ensayos adicionales para dilucidar el comportamiento de las formulaciones en función del activador

del borde y la concentración del agente de carga. Se descartaron NaTC y la cantidad de agente de carga 0.02 mmol en base a los resultados del apartado anterior.

En esta etapa, se realizó una batería de cuatro experimentos con las distintas combinaciones de NaC y NaDC, a 0.04 y 0.06 mmol de EA.

Los resultados de caracterización obtenidos (Tabla 4) mostraron la presencia de MMs en las formulaciones A y B, haciéndose patente este hecho por la distribución de tamaños y los valores de PDI elevados, motivo por el cual estos lotes fueron descartados. Se fijó, por tanto, NaDC como activador del borde.

**Tabla 4.** Características de los lotes elaborados en la etapa de optimización. A: NaC y 0.04 mmol. B: NaC y 0.06 mmol. C: NaDC y 0.04 mmol. D: NaDC y 0.06 mmol.

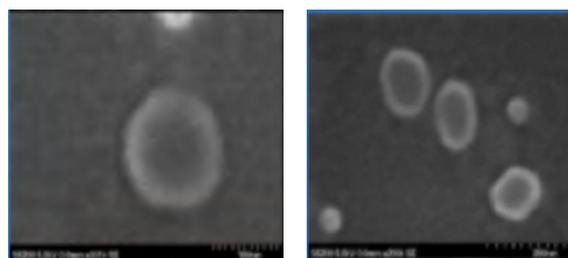
	RH (nm)	PDI	ζ (mV)	EE (%)
A	596.9± 108.8	0.468± 0.187	+ 25.06± 3.37	76.64± 2.47
B	598.2± 58.8	0.357± 0.147	+ 28.50± 3.75	59.67± 29.58
C	879.5± 169.7	0.268± 0.086	+ 21.50± 3.56	76.83± 22.24
D	813.9± 52.1	0.093± 0.033	+ 26.95± 2.90	75.44± 7.23

Como quedó patente en el estudio ANOM, al aumentar la cantidad de agente de carga, el potencial ζ obtenido aumenta de forma lineal, como ya afirmaron Villasmil-Sánchez et al. (2010) [24]. Esto, junto a que los resultados de encapsulación en ambos lotes fueron similares, hicieron que la cantidad añadida en los lotes definitivos fuese el nivel más alto, 0.06 mmol.

Por tanto, la composición definitiva de la formulación se fijó como sigue. Los componentes de la bicapa fueron: FC (0.11 mmol), CH (0.027 mmol), NaDC (0.018 mmol) y EA (0.06 mmol). La fase acuosa de los liposomas estuvo compuesta del EMA (0.187 mg/mL) disuelta en tampón Hepes pH 7.4.

En las microfotografías tomadas mediante FEGSEM (Figura 6) se pudo apreciar la morfología de los sistemas lipídicos obtenidos, confirmando su naturaleza vesicular. Además, la elasticidad conferida por el activador del borde les permite atravesar diámetros de poro mucho menores que sus propios radios. A nivel

biológico, esto se traduciría en su capacidad para atravesar las membranas biológicas reduciendo el riesgo de romperse, liberando el fármaco encapsulado durante el proceso de penetración [25]. El valor de ID obtenido para la formulación optimizada fue de  $4.38 \pm 0.4$ , mientras que la formulación control sin NaDC presentó un valor de  $1.98 \pm 0.1$ , lo que demuestra la elevada flexibilidad de las vesículas obtenidas.



**Figura 6.** Microfotografías obtenidas por FEGSEM de la formulación optimizada.

#### 4. Conclusiones

La determinación de las condiciones óptimas de trabajo para el extracto de polvo de placenta aseguró que las condiciones de elaboración de los liposomas no afectasen a su integridad.

Mediante la aplicación del diseño experimental, se pudo alcanzar una composición óptima para la formulación de liposomas deformables, con unas características fisicoquímicas apropiadas para una futura administración oftálmica. No obstante, estos estudios han de complementarse con otros relacionados con el comportamiento biofarmacéutico del fármaco en las formulaciones.

#### Agradecimientos

Al Ministerio de Educación y Formación Profesional del Gobierno de España, por la concesión de una Beca de Colaboración a JLRO.

#### Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Referencias bibliográficas

1. Dua HS, Said DG, Messmer EM, Rolando M, Benítez-del-Castillo JM, Hossain PN, Shortt AJ, Geerling G, Nubile M, Figueiredo FC, Rauz S, Mastropasqua L, Rama P, Baudouin C. Neurotrophic Keratopathy. *Prog Retin Eye Res* 2018;66: 107–31.
2. Babayán-Sosa A, Baca-Lozada O. Epiteliopatía corneal por alteración sensitiva: queratitis neurotrófica corneal. *Rev Mex Oftalmol* 2018;92(3):117–22.
3. Shimmura S, Shimazaki J, Ohashi Y, Tsubota K. Antiinflammatory effects of amniotic membrane transplantation in ocular surface disorders. *Cornea* 2001;20(4):408–13.
4. Endo K, Nakamura T, Kawasaki S, Kinoshita S. Human amniotic membrane, like corneal epithelial basement membrane, manifests the A5 chain of type IV collagen. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45(6):1771.
5. Choi YK, Din FU, Kim DW, Kim YI, Kim JO, Ku SK, Ra JC, Huh JW, Lee JI, Sohn DH, Yong CS, Choi HG. Amniotic membrane extract-loaded double-layered wound dressing: evaluation of gel properties and wound healing. *Drug Dev Ind Pharm* 2014;40(7):852–9.
6. Liang L, Li W, Ling S, Qiu W, Li C, Liu Z. Amniotic membrane extraction solution for ocular chemical burns. *Clin Exp Ophthalmol*. 2009;37(9):855–63.
7. González-Rodríguez ML, Rabasco AM. Charged liposomes as carriers to enhance the permeation through the skin. *Expert Opin Drug Deliv* 2011;8(7):857–71.
8. Laouini A, Charcosset C, Fessi H, Holdicha RG, Vladisavljevića GT. Preparation of liposomes: a novel application of microengineered membranes—from laboratory scale to large scale. *Coll Surf B: Biointerfaces* 2013;112: 272–8.
9. Vila-Caballer M, Codolo G, Munari F, Malfanti A, Fassan M, Ruggie M, Balasso A, de Bernard M, Salmaso S. A pH-sensitive stearyl-PEG-poly(methacryloyl sulfadimethoxine)-decorated liposome system for protein delivery: an application for bladder cancer treatment. *J Control Release* 2016;238:31–42.
10. Chen YY, Lu YH, Ma CH, Tao WW, Zhu JJ, Zhang X. A novel elastic liposome for skin delivery of papain and its application on hypertrophic scar. *Biomed Pharmacother* 2017;87:82–91.
11. Jøraholmen MW, Basnet P, Acharya G, Škalko-Basnet N. PEGylated liposomes for topical vaginal therapy improve delivery of interferon alpha. *Eur J Pharm Biopharm* 2017;113:132–9.
12. Hsu HL, Chen JP. Preparation of thermosensitive magnetic liposome encapsulated recombinant tissue plasminogen activator for targeted thrombolysis. *J Magn Magn Mater* 2017;188–94.
13. Arroyo CM. Evaluación de nanosistemas lipídicos para coadministración de maleato de timolol y acetazolamida: nueva propuesta en el tratamiento del glaucoma [Tesis Doctoral]. Sevilla: Universidad de Sevilla; 2018.
14. Schubert R. Liposome preparation by detergent removal. *Method Enzymol* 2003;367:46–70.
15. Pithadia AB, Prajapati DM, Jha LL, Tandel F, Patel N. Bioanalytical method development and validation of HCG (Human Chorionic Gonadotropin). *Int J Pharm Pharm Sci* 2015;7(7):390–6.
16. 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 Dev Ind Pharm* 2016;42(10):1683–94.
17. Law SL, Huang KJ, Chiang CH. Acyclovir-containing liposomes for potential ocular delivery. Corneal penetration and absorption. *J Control Release* 2000;63(1–2):135–40.
18. Rabinovich-Guilatt L, Couvreur P, Lambert G, Goldstein D, Benita S, Dubernet C. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: the case of cationic emulsions. *Chem Phys Lipids* 2004;131:1–13.
19. Cueto M, Dorta MJ, Munguía O, Llabrés M. New approach to stability assessment of protein solution formulations by Differential Scanning Calorimetry. *Int J Pharm* 2003;252:159–166.

20. Krishnamurthy R, Lumpkin JA, Sridhar R. Inactivation of lysozyme by sonication under conditions relevant to microencapsulation. *Int J Pharm* 2000;205(1-2):23-34.
21. Svarc FE, Ranocchia RP, Arnejo N. 2012. La química de la perfluorodecalina: potenciales usos en química cosmética. <https://www.researchgate.net/publication/274072852> (June 12, 2019).
22. Liu X, Sun J, Xu X, Alsaedi A. Adsorption and desorption of UV(VI) on different-size graphene oxide. *Chem Engin J* 2019;360:941–50.
23. Carrión EJ, de La Maza A, Parra JL. The influence of ionic strength and lipid bilayer charge on the stability of liposomes. *J Colloid Interface Sci* 1994;164(1):78-87
24. Villasmil-Sánchez S, Drhimeur W, Salas SC, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. *Drug Dev Ind Pharm* 2010;36(6):666–75.
25. Chen H, Pan H, Li P, Wang H, Wang X, Pan W, Yuan Y. The potential use of novel chitosan-coated deformable liposomes in an ocular drug delivery system. *Colloids Surf B: Biointerfaces* 2016;143:455–62.

Este trabajo debe ser citado como:

Rodríguez-Ochoa JL, Arroyo-García CM, Rabasco AM, González-Rodríguez ML. Nueva alternativa a la cirugía en la queratopatía neurotrófica. Formulación de liposomas deformables de extracto de membrana amniótica. *Rev Esp Cien Farm.* 2020;1(1):66-78.