



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO**  
**DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL**

**“DESARROLLO DE ESTRUCTURAS COCLEATO MEDIANTE LA  
MANIPULACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL DE PARTÍCULAS  
COLOIDALES CONSTITUIDAS POR FOSFOLÍPIDOS”**

**T E S I S**

QUE COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN  
CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

**PRESENTA:**

**MARCOS FREDY MORALES CELAYA**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



Chapingo, Estado de México, Noviembre de 2010.

**DESARROLLO DE ESTRUCTURAS COCLEATO MEDIANTE LA  
MANIPULACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL DE PARTÍCULAS  
COLOIDALES CONSTITUIDAS POR FOSFOLÍPIDOS**

Tesis realizada por **Marcos Fredy Morales Celaya** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA**

DIRECTORA:



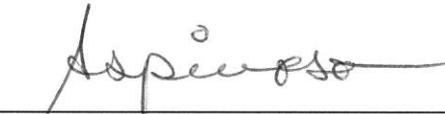
DRA. CONSUELO S. O. LOBATO CALLEROS

ASESOR:



DR. JAIME VERNON CARTER

ASESOR:



DR. TEODORO ESPINOSA SOLARES.

## DEDICATORIAS

*Por la valentía, el coraje, la pasión y el ejemplo  
con el que me han enseñado a enfrentar la vida...*

*...a mis mejores maestros*

*Mis Padres*

*Por lo agradecido que está mi corazón*

*en compartir la misma sangre*

*a Eve y Ana*

## AGRADECIMIENTOS

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento de mis estudios de posgrado.
- A la Universidad Autónoma Chapingo por haberme brindado experiencias, conocimientos y amigos que siempre estarán en mi vida.
- A la Dra. Consuelo Lobato C. Por su amistad, consejos, confianza, comprensión, su constante estímulo y paciencia (mucho)... y sobre todo por permitirme recurrir a su experiencia y capacidad para formarme, sus enseñanzas marcarán sin duda alguna mi futuro profesional y personal.
- Al Dr. Jaime Vernon C. Por su permanente disposición, valiosas, generosas y científicas críticas.
- Al Dr. Teodoro Espinosa S. Por su confianza e incondicional colaboración.
- A la Dra. Ofelia Sandoval C. y M.C César Ramírez S. Por el invaluable y permanente apoyo humano y profesional que en ustedes he encontrado.
- A Grupo Pochteca S. A. de C. V. por la facilitarme muestras experimentales de materias primas
- Al Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por su invaluable apoyo en los estudios de microscopía electrónica.
- A Guillermo Caballero, Mauricio Arellano y muy especialmente a Rosa Carmina Romero, por facilitarme todos los recursos a su disposición.
- A todos mis amigos (as) y compañeros (as) de la 6ta y 8va. generación de la MCyTA que me han brindado su amistad, sus consejos y experiencias; pero sobre todo, me han hecho vivir muy gratos momentos, en especial a Marylú, Mago, Rosy, Elviu, Chuy, Carlos y Feria.

*Con sincero respeto y admiración...*

*Marcos F. Morales Celaya.*

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Marcos F. Morales Celaya, obtuvo el título de Ingeniero Agroindustrial en la Universidad Autónoma Chapingo con la tesis “Determinación de las propiedades estructurales y reológicas de queso tipo Oaxaca mediante un análisis de imágenes”. Ha recibido capacitación profesional en el área de reología de alimentos, calorimetría diferencial de barrido y de titulación, cromatografía de líquidos de alta resolución y en evaluación sensorial de alimentos.

## DESARROLLO DE ESTRUCTURAS COCLEATO MEDIANTE LA MANIPULACIÓN DE LA CARGA SUPERFICIAL DE PARTÍCULAS COLOIDALES CONSTITUIDAS POR FOSFOLÍPIDOS

### DEVELOPMENT OF COCHLEATE STRUCTURES BY MANIPULATING THE SURFACE CHARGE OF COLLOIDAL PARTICLES ESTABLISHED BY PHOSPHOLIPIDS

Morales-Celaya, M. F; Lobato-Calleros, C; Vernon-Carter, J; Espinosa-Solares, T.

#### Resumen

El objetivo de este trabajo fue establecer las condiciones de formación de estructuras cocleato a partir de vesículas liposomales; estas últimas compuestas de fosfolípidos contenidos en lecitina de soya comercial. Determinaciones calorimétricas, reológicas y de potencial  $\zeta$  de la suspensión de vesículas liposomales se realizaron con el fin de establecer las condiciones para que estas se conviertan en estructuras cocleato. Un valor de pH de 7.5, temperatura de 37 °C y 0,11 ml de 0,1 M de disolución de cloruro de calcio por 50 mg de fosfolípidos en disolución buffer de Tris-NaCl produjeron estructuras cocleato. Micrografías de microscopía electrónica de transmisión mostraron que las estructuras cocleato obtenidas tenían un diámetro transversal medio de  $72.8 \pm 12.5$  nm y exhibieron forma cilíndrica en espiral. Las estructuras cocleato desarrolladas pueden ser usadas como agentes de protección y transporte de nutraceuticos en alimentos.

**Palabras clave:** Vesícula liposomal, cocleato, potencial  $\zeta$ .

#### Abstract

The aim of this work was to establish the forming conditions of cochleate structures from liposomal vesicles; these latter are made up of phospholipids contained in commercial soy lecithin. Calorimetric, rheological, and  $\zeta$  potential determinations of the liposomal vesicles suspension were performed in order to establish the conditions to enable them to become cochleate structures. A pH value of 7.5, temperature of 37 °C and 0.11 mL of 0.1 M calcium chloride solution for 50 mg of phospholipids in dissolution of Tris-NaCl buffer produced cochleate structures. Transmission electron micrographs evidenced that the cochleate structures obtained had a transverse mean diameter of  $72.8 \pm 12.5$  nm, and exhibited spiral cylindrical shape. Cochleate structures developed could be used as protecting and carrying agents of nutraceutics in foods.

**Keywords:** Liposomal vesicle, cochleate,  $\zeta$  potential.

## INDICE

<b>Dedicatorias .....</b>	<b>II</b>
<b>Agradecimientos.....</b>	<b>III</b>
<b>Datos biográficos.....</b>	<b>IV</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>V</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>V</b>
<b>Indice .....</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de tablas .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Lista de figuras .....</b>	<b>IX</b>
<b>1.0 Introducción .....</b>	<b>1</b>
<b>2.0 Revisión de literatura .....</b>	<b>4</b>
2.1 Nanotecnología y nanopartículas .....	4
2.2 Encapsulación .....	5
2.2.1 Métodos de encapsulación .....	5
2.3 Lecitina de soya .....	7
2.4 Polimorfismo de fosfolípidos.....	8
2.5 Liposomas .....	11
2.6 Cocleatos: composición, estructura y propiedades .....	12
2.6.1 Mecanismo de liberación .....	15
2.7 Calorimetría diferencial de barrido .....	16
2.7.1 Transiciones térmicas en fosfolípidos .....	17
2.7.2 Calorímetro diferencial de barrido.....	18
2.8 Reología .....	18
2.8.1 Propiedades reológicas .....	19
2.9 Potencial $\zeta$ .....	21
2.10 Microscopia Electrónica de Transmisión .....	24
<b>3.0 Justificación .....</b>	<b>25</b>

<b>4.0 Objetivos.....</b>	<b>26</b>
4.1 Objetivo general .....	26
<b>5.0 Materiales y métodos .....</b>	<b>27</b>
5.1 Concentración micelar crítica de fosfolípidos .....	27
5.2 Potencial $\zeta$ .....	27
5.3 Temperatura de transición.....	28
5.4 Preparación de liposomas .....	29
5.5 Reología de la suspensión liposomal .....	29
5.6 Tamaño de partícula .....	30
5.7 Síntesis de cocleatos .....	31
5.8 Microscopia electrónica de transmisión.....	31
5.9 Diseño experimental.....	32
<b>6.0 Resultados y discusión .....</b>	<b>33</b>
6.1 Concentración micelar crítica .....	33
6.2 Potencial $\zeta$ .....	34
6.3 Temperatura de transición.....	37
6.4 Propiedades reológicas de la suspensión liposomal .....	38
6.4.1 Propiedades viscoelásticas.....	38
6.4.2 Propiedades viscoelásticas en función de la temperatura .....	40
6.5 Tamaño de partícula .....	47
6.6 Estructuras cocleato .....	51
<b>7.0 Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>8.0 Bibliografía .....</b>	<b>57</b>

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** Valores de potencial  $\zeta$  (medias  $\pm$  desviación estándar) de la suspensión liposomal de lecitina de soya en intervalo de pH de 5 a 10. .... 35

**Tabla 2.** Valores medios ( $\pm$  desviación estándar) de los parámetros del modelo de Carreau que obedecieron las suspensiones liposomales. .... 47

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Geometría molecular de fosfolípidos y su posible estructura de autoasociación.....	10
<b>Figura 2.</b> Estructuras liposomales A) multilamelar y B) unilamelar. ....	12
<b>Figura 3.</b> Esquema de la estructura molecular de un cilindro cocleato.....	13
<b>Figura 4.</b> Representación del proceso de fusión de la estructura cocleato con la membrana celular. ....	16
<b>Figura 5.</b> Modelo de distribución de potencial eléctrico en la región de la doble capa en un coloide.....	23
<b>Figura 6.</b> Variación de la absorbancia de disoluciones de lecitina en función de su concentración.....	34
<b>Figura 7.</b> Termograma de la disolución de lecitina de soya determinado mediante calorimetría diferencial de barrido. ....	38
<b>Figura 8.</b> Variación de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de la suspensión liposomal en función de la deformación. ....	40
<b>Figura 9.</b> Variación de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de la suspensión liposomal, en función de la temperatura. ....	43
<b>Figura 10.</b> Variación de los valores de $\tan \delta$ de la suspensión liposomal en función de la temperatura. ....	43
<b>Figura 11.</b> Variación de la viscosidad de suspensiones liposomales en función de su concentración de lecitina de soya. ....	46
<b>Figura 12.</b> Micrografía óptica de las partículas liposomales sin sonicar.....	48

<b>Figura 13.</b> Micrografía óptica de las partículas liposomales sonicadas.....	49
<b>Figura 14.</b> Distribución de tamaño de las partículas liposomales sometidas o no a sonicación. ....	50
<b>Figura 15.</b> Comportamiento de la conductividad eléctrica de la suspensión liposomal, en función del volumen de cloruro de calcio agregado. ....	53
<b>Figura 16.</b> Micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión de las estructuras cocleato. ....	55

## 1.0 INTRODUCCIÓN

Diversas investigaciones han demostrado que un gran número de compuestos naturales exhiben efectos benéficos sobre la salud de los seres humanos. Sin embargo, muchos de estos compuestos son biológicamente inestables, exhiben baja solubilidad en agua y sólo un número reducido de sus moléculas conservan su funcionalidad cuando alcanzan sus sitios de acción (Liolios *et al.*, 2009). El desarrollo científico y tecnológico tendiente a aumentar la efectividad de estos compuestos, ha conducido al diseño de bioempaques novedosos, tales que les proporcionen una barrera protectora ante condiciones adversas y permitan su liberación controlada en sitios específicos (Taylor *et al.*, 2005; Villafuerte *et al.*, 2008; Carlucci *et al.*, 2004). En este sentido, los sistemas coloidales son sistemas dispersos que han experimentado un rápido desarrollo científico y tecnológico, con el fin de que contribuyan significativamente al suministro de sustancias activas de manera controlada y localizada (Villafuerte *et al.*, 2008). Entre los métodos propuestos para la elaboración de estos sistemas, destacan aquellos de nanoencapsulación. La tecnología de nanoencapsulación de compuestos bioactivos permite reducir su reactividad con el ambiente externo, facilita su manipulación, enmascara sabores desagradables, favorece una distribución uniforme del compuesto en el producto final y contribuye a su liberación prolongada en el sitio de acción específico (Liolios *et al.*, 2009; Were *et al.*, 2003).

La manipulación y reestructuración de estructuras a nivel atómico o molecular conduce a una reducción en su tamaño y con ello a la generación de nuevas funcionalidades; estas últimas a su vez brindan cambios en sus propiedades y proporcionan soluciones radicalmente nuevas a nivel de innovación de productos y desarrollo de nuevas oportunidades de mercado (Luykx *et al.*, 2008; Omayma y Youssef, 2008; Chen *et al.*, 2006). Tal es el caso de las moléculas anfifílicas como los fosfolípidos, que al disolverse en disolventes polares como el agua, se autoasocian en diversas estructuras moleculares con diversas propiedades funcionales, como la solubilización de fármacos y nutrimentos y la encapsulación de compuestos bioactivos (Hafez y Cullis, 2001; Tseng *et al.*, 2007; Nieh *et al.*, 2008). Una de las estructuras formadas por los fosfolípidos es la de los liposomas; estructuras formadas por la asociación de las moléculas de los fosfolípidos en bicapas, con capacidad de entrapar tanto moléculas de carácter lipofílico como hidrofílico (Taylor *et al.*, 2005; Nieh *et al.*, 2008). Cuando a los liposomas se les induce deshidratación mediante la acción de cationes divalentes, se transforman en estructuras planas, y por interacción de los cationes con el grupo polar del fosfolípido se originan estructuras cilíndricas multicapa de tamaño micrométrico o nanométrico, llamadas cocleatos, que en su interior son capaces de almacenar una amplia gama de sustancias; entre ellas, compuestos bioactivos (Papahadjopoulos *et al.*, 1975; Zarif, 2002; Syed *et al.*, 2008). En adición, los compuestos bioactivos contenidos en las estructuras de cocleatos, son protegidos contra factores como humedad, oxígeno, luz, enzimas y altas temperaturas de proceso, entre otros (Zarif y Mannino, 2000). Las escasas investigaciones que se han

realizado sobre los cocleatos, han sido enfocadas principalmente al estudio de la liberación controlada de principios farmacéuticos (Dwivedi *et al.*, 2009; Santangelo *et al.*, 2000) y no a su aplicación en el encapsulamiento de compuestos bioactivos para su posterior incorporación en alimentos. Resulta interesante entonces, investigar la formulación y condiciones de elaboración de estructuras de cocleatos a través de la manipulación de la carga superficial de las partículas coloidales, de tal forma que se obtengan estructuras que puedan tener aplicación en la industria alimentaria e impacten positivamente la salud de los consumidores. Dado el alto costo de los fosfolípidos de alta pureza, en esta investigación se propuso el uso de fuentes naturales de fosfolípidos, como la lecitina de soya.

## **2.0 REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Nanotecnología y nanopartículas**

La nanotecnología comprende el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia y la explotación de fenómenos y propiedades de la misma a nano escala (Luykx *et al.*, 2008).

Las nanopartículas son definidas como entidades discretas con una dimensión menor a 100 nm. (Luykx *et al.*, 2008), y pueden consistir de un centro compuesto de una o más sustancias rodeadas por una barrera. Varios tipos de nanopartículas están basados en lípidos, proteínas, polisacáridos, redes poliméricas o combinación de estos compuestos (Langer y Peppas, 2003).

La reducción del tamaño de partícula en un sistema de liberación incrementa la fuerza de adhesividad y tiempo de tránsito gastrointestinal, conduciendo a una más alta biodisponibilidad de los ingredientes activos (Luykx *et al.*, 2008), debido a que fácilmente pueden entrar a la mayoría de las células sin activar ninguna respuesta inmunitaria e interactuar con los materiales biológicos de una manera directa, eficiente y precisa (Omayma y Youssef, 2008).

La nanotecnología mejora la calidad de vida del ser humano, crea trabajo, promueve el crecimiento económico y mejora la seguridad de nuestra sociedad a través del desarrollo de la ciencia, tecnología, industria y economía (Moraru *et al.*, 2003; Baeumner, 2004; Chen *et al.*, 2006).

## **2.2 Encapsulación**

La encapsulación es un proceso mediante el cual ciertas sustancias bioactivas, sabores, vitaminas, aceites esenciales o sustancias de bajo peso molecular o en pequeñas cantidades son introducidas en una matriz o sistema pared, con el objetivo de impedir su pérdida, mejorar su estabilidad química, enmascarar sabores y olores indeseables, mejorar su dispersabilidad en una matriz alimenticia, evitar su degradación gástrica e incrementar su biodisponibilidad impidiendo su contacto con el oxígeno, agua y luz (Palzer, 2009; Yañez *et al.*, 2002; Liolios *et al.*, 2009).

Las cápsulas obtenidas, además fungen como un soporte capaz de liberar gradualmente el compuesto encapsulado a células y tejidos específicos, lo que permite obtener alimentos con mejores características sensoriales, nutricionales y de valor agregado (Ayala-Zavala *et al.*, 2007; Palzer, 2009; Yañez *et al.*, 2002; Luykx *et al.*, 2008).

### **2.2.1 Métodos de encapsulación**

Diversos métodos han sido propuestos para la producción de cápsulas. En general, estos métodos pueden ser divididos en tres grupos:

- Procesos físicos: secado por aspersion, extrusión y recubrimiento por aspersion.
- Procesos fisicoquímicos: coacervación simple o compleja y entrapamiento en liposomas.
- Procesos químicos: polimerización interfacial e inclusión molecular.

Para que un sistema de encapsulación sea eficiente debe desempeñar las siguientes funciones:

- Servir como vehículos de transporte de compuestos bioactivos o funcionales al sitio de acción.
- Proteger al compuesto funcional de la degradación química y biológica para así mantener su funcionalidad.
- Ser capaz de controlar la tasa de liberación en un ambiente específico.
- Ser compatible con los otros ingredientes del sistema.

(Omayma y Youssef, 2008).

La selección del proceso de encapsulación para una aplicación considera el tamaño medio de la partícula requerida y las propiedades fisicoquímicas del agente encapsulante y la sustancia a encapsular, las aplicaciones para el material encapsulado, el mecanismo de liberación deseado y el costo.

En el caso de sabores y aromas, varios métodos han sido desarrollados para encapsularlos y utilizarlos en la industria de los alimentos; el secado por aspersión es el más utilizado (Ré, 1998; Yañez *et al.*, 2002).

Los sistemas de encapsulación basados en lípidos incluyen la ventaja de utilizar materiales de origen natural y la habilidad de entrapar compuestos con diferente solubilidad. Los principales sistemas de encapsulación basados en lípidos son los liposomas, cocleatos y arqueosomas (Luykx *et al.*, 2008; Bummer, 2004; Monzafari *et al.*, 2006).

### **2.3 Lecitina de soya**

Lecitina es el nombre comercial dado a la mezcla de fosfolípidos con actividad superficial encontrados en la membrana celular de plantas y animales (Pomeranz, 1991). El componente principal de la lecitina es la fosfatidilcolina (fosfolípido de carácter neutro), en tanto que los componentes secundarios son la fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y ácido fosfatídico (fosfolípidos de carga negativa) (De Luna, 2007). La longitud de la cadena de ácidos grasos en los distintos fosfolípidos es variable, es posible encontrar ácido estearico, oleico, palmítico, etc. (Oke *et al.*, 2010).

Reportes médicos indican que la lecitina tiene propiedades terapéuticas, principalmente para enfermedades del sistema nervioso, cardiovascular y de órganos que almacenan y transportan grasa en el cuerpo (De Luna, 2007; Zarif *et al.*, 2000).

La lecitina es usada extensamente en la industria de los alimentos como emulsificante, lubricante, reductor de viscosidad y como agente de liberación (Rossi, 2007). Pequeñas cantidades de lecitina son necesarias en los alimentos (0.1-2%), razón por la que su color, olor y sabor no son detectados normalmente en los alimentos (Schneider y Virmani, 2001).

Las fuentes comerciales de lecitina pueden ser de origen vegetal, tales como la soya, el girasol y la colza, o de origen animal como el huevo, la leche y los tejidos cerebrales (Oke *et al.*, 2010).

## 2.4 Polimorfismo de fosfolípidos

Los fosfolípidos son moléculas anfifílicas que poseen tanto propiedades hidrofóbicas como hidrofílicas. Una molécula típica de fosfolípido consiste de dos cadenas hidrocarbonadas solubles en compuestos no polares y una cabeza polar soluble en disolventes polares (generalmente agua). La región hidrofóbica está compuesta por dos ácidos grasos unidos al glicerol. La porción hidrofílica puede ser un grupo -OH, -NH<sub>3</sub> y un grupo -PO<sub>4</sub> (Pomeranz, 1991).

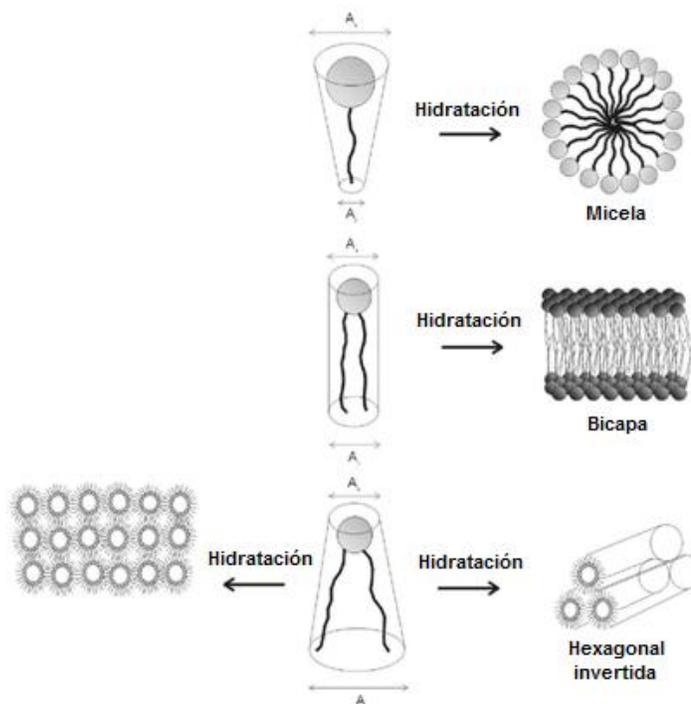
Las moléculas anfifílicas como los fosfolípidos, no están distribuidas aleatoriamente en disolución acuosa, éstas se orientan específicamente acorde a la naturaleza y a la polaridad de las moléculas y de la interfase (Sthal, 1996).

Cuando una cantidad suficiente de surfactante (fosfolípido) es disuelta en un disolvente polar, varias de las propiedades de la disolución cambian significativamente; particularmente la tensión superficial y la habilidad de la disolución para solubilizar cadenas hidrocarbonadas (Sthal, 1996).

Los fosfolípidos no pueden adoptar fácilmente la estructura micelar clásica de las moléculas anfifílicas, debido a que su estructura molecular incluye dos cadenas hidrocarbonadas muy voluminosas (Dwivedi *et al.*, 2009). Estas cadenas se orientan unas a otras formando una doble capa aislada del medio acuoso por las cabezas polares. Este tipo de estructura plana no es estable, y se pliega sobre sí misma para formar estructuras cerradas más estables esféricas u ovals; denominadas liposomas, (González-Pérez, 2004). Los cambios descritos no ocurren mientras no se alcance una concentración mínima de fosfolípidos, llamada concentración micelar crítica (CMC). A bajas concentraciones, inferiores a la CMC, los fosfolípidos existen como

monómeros; conforme se aumenta su concentración, los fosfolípidos forman dímeros, tetrámeros, o grandes estructuras llamadas micelas cuando su concentración es la micelar crítica. Cuando la concentración de fosfolípidos, compuestos anfifílicos, en una disolución rebasa la CMC, sus moléculas se asocian a través de interacciones inter e intramoleculares, dando lugar a distintas fases en equilibrio termodinámico. Estas últimas, se caracterizan como agregados estructurales solubles, como las micelas (Carlucci *et al.*, 2004; Sagalowicz *et al.*, 2006; Sthal, 1996), y son las estructuras primarias a partir de las cuales siguen formándose varias mesofases y finalmente cristales. En algunos casos, la transformación de micela a vesícula ha sido observada como parte de esta secuencia de fases (Svenson, 2004).

Las distintas mesofases formadas por encima de la CMC, también dependen de la geometría de las moléculas implicadas (Fig. 1). Los lípidos con gran área polar y pequeña área de cadena hidrocarbonada tienen una geometría tipo cono, se autoasocian en micelas y se dice que exhiben curvatura de membrana positiva. Los lípidos con geometría cilíndrica, tienen igual área polar y no polar, éstos se asocian en estructuras bicapa. Por su parte, los lípidos con pequeña área polar adoptan fases invertidas, como la hexagonal invertida y la cúbica, y exhiben curvatura de membrana negativa (Hafez y Cullis, 2001).



**Figura 1. Geometría molecular de fosfolípidos y su posible estructura de autoasociación.**

Fuente: Hafez y Cullis, 2001.

La mayoría de los lípidos derivados de las membranas biológicas tienden a formar bicapas en fase acuosa. Estas bicapas (fase lamelar) se sellan en vesículas denominadas liposomas (Lanio *et al.*, 2009; Nieh *et al.*, 2008). Los fosfolípidos exhiben predominantemente fase lamelar, debido a la presencia de dos cadenas hidrocarbonadas mayores a 12 carbonos (Dwivedi *et al.*, 2009). A baja temperatura, los fosfolípidos existen en fase cristalina lamelar ( $L_c$ ); con incrementos de temperatura, la fase  $L_c$  se transforma a una fase gel lamelar ( $L_\beta$ ) y ésta a su vez, en una fase fluida lamelar ( $L_\alpha$ ) a temperatura de transición, en la que las cadenas acílicas funden y se encuentran en movimiento (Dwivedi *et al.*, 2009).

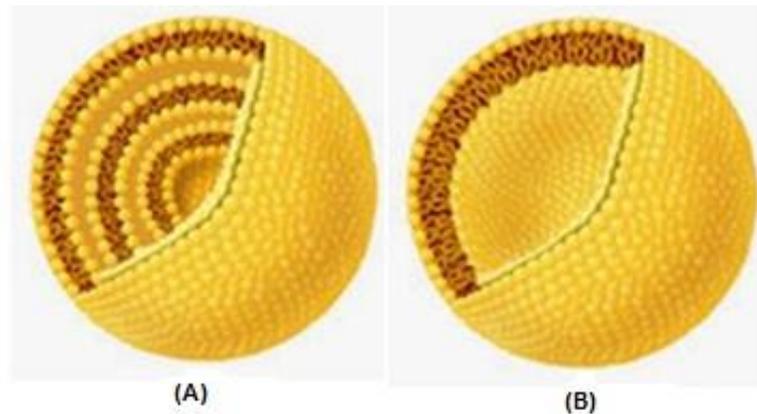
Los lípidos tienen una transición de fase a una temperatura característica. Por debajo de esta temperatura las cadenas lipídicas se disponen en forma ordenada o cristalina. Por encima de esta temperatura las cadenas son fluidas (Gómez-Fernández, 1978).

## **2.5 Liposomas**

La palabra liposoma se forma a partir de las raíces griegas “*lipo*” grasa y “*soma*” estructura (González-Pérez, 2004). De esta manera, los liposomas o vesículas son estructuras coloidales polimoleculares aproximadamente esféricas, con una fase acuosa interna rodeada por una (unilamelar) o más bicapas (multilamelar). Los liposomas (Fig. 2) se forman en disolución acuosa por autoasociación de moléculas de fosfolípidos, donde los grupos polares de las moléculas en cada bicapa están expuestos al medio acuoso y las cadenas no polares forman la parte interna de la bicapa (Takahashi *et al.*, 2007; Lanio *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 2006; Miclea *et al.*, 2007). Es así como los liposomas tienen la habilidad de entrapar moléculas hidrofílicas y lipofílicas, ofreciendo la posibilidad de uso en ciencias médicas y farmacéuticas (Nieh *et al.*, 2008).

El tamaño y la morfología de los liposomas varían dependiendo de las propiedades moleculares de los lípidos usados y de la técnica aplicada para producirlos. La clasificación de los liposomas con base en su morfología es: vesículas grandes unilamelares con tamaño superior a 0.6  $\mu\text{m}$ , pequeñas vesículas unilamelares con un intervalo de tamaño de 0.02 a 0.2  $\mu\text{m}$  y vesículas multilamelares con distribución de tamaño de 0.1 a 5  $\mu\text{m}$  (Stahl, 1996). Los procedimientos más comunes para la preparación de liposomas,

involucran el secado del lípido disuelto en un disolvente orgánico (Ej. cloroformo) por evaporación al vacío y su subsecuente hidratación. Otro método usado es el de inversión de fase, en el cual, una solución acuosa es inyectada a gran presión a una fase orgánica conteniendo los lípidos (Hope *et al.*, 1986).



**Figura 2. Estructuras liposomales A) multilamellar y B) unilamellar.**

Fuente: [www.encapsula.com](http://www.encapsula.com)

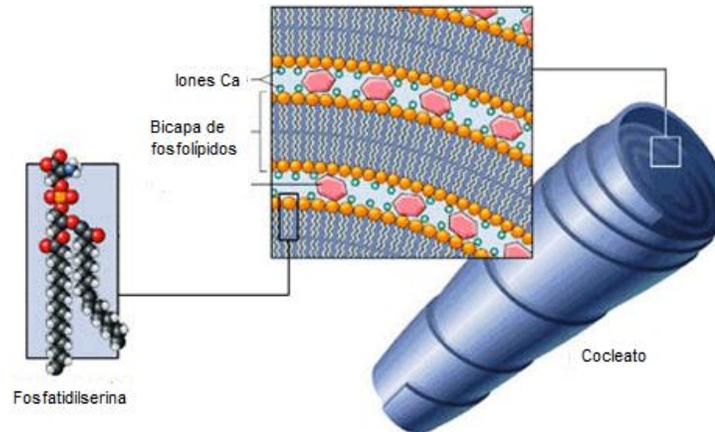
Los liposomas han sido utilizados por los investigadores en estudios de procesos fisiológicos como modelo de membranas biológicas, tanto eucariotas como procariotas (Taylor *et al.*, 2005).

La adición de moléculas cargadas positivamente a liposomas aniónicos puede resultar en una asociación debida a interacciones electrostáticas atractivas, en tanto que la adición a liposomas neutrales puede resultar en una asociación debida a interacciones hidrofóbicas.

## **2.6 Cocleatos: composición, estructura y propiedades**

Los cocleatos son microestructuras cristalinas hechas por fusión de lípidos aniónicos (fosfolípidos) en presencia de cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$

(Fig. 3); estas microestructuras existen como hojas de lípidos sólidos de doble capa enrollados en configuración de espiral con poco o nulo espacio acuoso interno (Dwivedi *et al.*, 2009; Zarif, 2002).



**Figura 3. Esquema de la estructura molecular de un cilindro cocleato.**

Fuente: [www.biodeliverysciences.com](http://www.biodeliverysciences.com)

La síntesis de la estructura cocleato se sitúa como un intermediario durante la formación de vesículas unilamelares grandes (Papahadjopoulos *et al.*, 1975). Cationes divalentes como el calcio, son de importancia en la promoción de la fusión de vesículas de fosfolípidos debido a su posible relación en funciones celulares como la exocitosis (Leung y Ho, 1991). La desestabilización de vesículas por Mg<sup>2+</sup> o Ca<sup>2+</sup> es probablemente debida al hecho de que los cationes se enlazan a las moléculas de fosfolípidos cargados negativamente, ubicados en la superficie de las vesículas; introduciendo así cambios espaciales, los cuales resultan en una condensación estructural y cristalización de los lípidos. Este proceso desestabiliza el ordenamiento molecular inicial en la bicapa por la formación de complejos ion-lípido (Hammoudah *et al.*, 1979). La adición de Ca<sup>2+</sup> a vesículas sonicadas de fosfatidilserina en buffer de NaCl

resulta en la fusión de las vesículas causando la formación de discos bicapa, seguida por la fusión de estos discos en hojas planares (Ramani y Balasubramanian, 2003). La deshidratación de los grupos polares de los fosfolípidos es conocido por ser un proceso vital en iniciar a cerrar la bicapas próximas (Yager *et al.*, 1985), las cuales eventualmente se enrollan alrededor de un punto inicial de pliegue para formar estructuras cilíndricas anhidras (Zarif *et al.*, 2000; Ramani y Balasubramanian, 2003).

Los cationes divalentes mantienen la estructura del cocleato en su forma enrollada, enlazando cada una de las capas sucesivas del lípido aniónico a través de interacción iónica. Una de las dos cargas positivas del catión interactúa con una de las cargas negativas en el grupo polar de una bicapa lipídica y la otra carga con la bicapa opuesta (Dwivedi *et al.*, 2009). El catión divalente utilizado en el enlace de las capas lipídicas induce a la deshidratación de los dominios intercapa, por lo que la cantidad de agua en esta región es baja, y por lo tanto pequeñas moléculas hidrofóbicas o anfifílicas son compatibles para el enlace entre capas del lípido cargado negativamente (Zarif, 2003).

Dado que la totalidad de una estructura cocleato es una serie de capas sólidas y es posible el uso de pequeñas moléculas como agentes enlazantes de los dominios bicapa, los cocleatos pueden ser utilizados como vehículos para la encapsulación y liberación de moléculas bioactivas, materiales de poca solubilidad en agua, proteínas, péptidos y fármacos (Moraru *et al.*, 2003; Syed *et al.*, 2008).

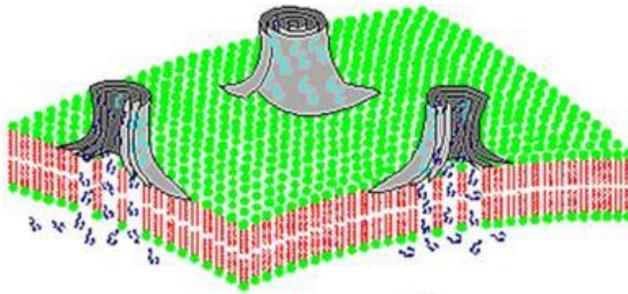
La molécula asociada en el interior del cocleato permanece intacta, pues éste le provee protección, aún cuando las capas externas del cocleato puedan estar expuestas a condiciones adversas como enzimas y pH ácido (Gould-Fogerite *et al.*, 1998; Moraru *et al.*, 2003). Además, el cocleato es impermeable al agua y oxígeno, incrementando así la estabilidad de la molécula asociada (Zarif y Mannino, 2000). Mannino *et al.* (2005) mencionan que otros beneficios de los cocleatos son: su capacidad para cubrir el sabor y el olor desagradable de algunas moléculas, soportan altas temperaturas, altas presiones y humedades atmosféricas, además de poder ser agregados a alimentos en forma cristalizada o en emulsión, sin afectar la integridad de la estructura, sustancia activa o proceso de liberación de la molécula asociada.

Se ha encontrado aplicación de los cocleatos en la liberación de fármacos, proteínas, antibióticos y vacunas (Dwivedi *et al.*, 2009; Santangelo *et al.*, 2000).

### **2.6.1 Mecanismo de liberación**

Los cocleatos liberan su contenido directamente en las células a través de la fusión de la capa externa del cocleato con la membrana celular (Zarif y Mannino, 2000). El calcio contenido en la estructura del cocleato induce perturbaciones en la membrana celular, de la misma manera en que éste está involucrado en diversos procesos de fusión de la membrana. Por lo tanto los cocleatos pueden ser visualizados como intermediarios de la fusión de la membrana (Fig. 4); esta fusión da lugar a la entrega de una pequeña cantidad del material encapsulado al citoplasma de la célula (Zarif y Mannino, 2000; Syed *et al.*, 2008; Leung y Ho, 1991). La perturbación inducida por el calcio en

la membrana celular, provoca un reordenamiento de ésta causando un evento de fusión entre la capa externa del cocleato y la membrana celular. En este evento de fusión, se libera una pequeña cantidad de la molécula asociada al cocleato en el citoplasma de la célula, por lo tanto el cocleato podría estar libre y disponible para otro evento de fusión con la misma u otra célula (Zarif *et al.*, 2000). Sin embargo, altas concentraciones de calcio inhiben la formación de cilindros cocleato debido a la separación espacial de carga con el fosfolípido (Verkleij *et al.*, 1974), al igual que la presencia de impurezas en el lípido (Yager *et al.*, 1985).



**Figura 4. Representación del proceso de fusión de la estructura cocleato con la membrana celular.**

Fuente: Syed *et al.*, 2008.

## **2.7 Calorimetría diferencial de barrido**

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) es una técnica de análisis térmico empleada en la medición de temperaturas y flujos de calor asociados con transiciones de fases de la materia, como cristalización, fusión y evaporación, o con reacciones químicas como hidrólisis y oxidación, como una función del tiempo y de la temperatura. (Jiménez-Márquez y Beltrán-Maza, 2003). Mediante esta técnica se mide la capacidad calorífica relativa de un sistema

determinado cuando sufre una transición inducida por un cambio térmico (Beldarraín, 2001).

Las mediciones en el análisis térmico son llevadas a cabo con el propósito de cuantificar los cambios físicos y químicos que toman lugar como resultado de las reacciones térmicas inducidas en la muestra. Las reacciones normalmente esperadas durante un análisis térmico pueden ser endotérmicas (fusión, ebullición, sublimación, vaporización, etc.) o exotérmicas (cristalización, descomposición oxidativa, etc.). (Tseng *et al.*, 2007).

### **2.7.1 Transiciones térmicas en fosfolípidos**

A baja temperatura, los fosfolípidos existen como una fase lamelar cristalina ( $L_c$ ) con un ajustado empaquetamiento de las cadenas hidrocarbonadas, similar al mostrado por los cristales de lípidos anhidros. Con incrementos de temperatura, a temperatura de sub-transición, la fase  $L_c$  se transforma en una fase lamelar gel ( $L_\beta$ ); mientras que a temperatura de transición se transforma en una fase lamelar fluida ( $L_\alpha$ ) en donde las cadenas lipídicas funden (Dwivedi *et al.*, 2009). En tanto que los fosfolípidos en los liposomas están finamente empaquetados por fuerzas de van der Waals una vez que alcanzan la temperatura de transición de fase funden “cooperativamente”, resultando un estado líquido-cristalino, en donde los fosfolípidos están “libres” debido a la debilidad de las fuerzas de van der Waals entre las cadenas de lípidos, a las débiles interacciones de los grupos polares de los fosfolípidos y a la expansión lateral de las cadenas hidrocarbonadas (Ohline *et al.*, 2001). Por tanto, un liposoma puede existir en un estado ordenado tipo cristalino o bien en un

estado desordenado tipo gel, dependiendo de la temperatura (Tseng *et al.*, 2007).

### **2.7.2 Calorímetro diferencial de barrido**

Un equipo DSC mide la cantidad de energía requerida para mantener a la misma temperatura una celda con muestra y una de referencia cuando se incrementa la temperatura de todo el sistema a tasa constante. La energía extra requerida para calentar la muestra es aplicada a la celda con muestra por el dispositivo auxiliar, de tal forma que se mantenga una diferencia de temperatura de aproximadamente cero entre las dos celdas (Biltonen y Lichtenberg, 1993). La potencia calorífica adicional que proporciona el sistema de control del equipo es proporcional a la diferencia de capacidades caloríficas entre las dos celdas y sus contenidos (Beldarraín, 2001). La calorimetría diferencial no provee información directa acerca del estado estructural de un lípido, pero sí proporciona información útil respecto a la naturaleza termodinámica y cambios energéticos que están asociados con las transformaciones del lípido de un estado a otro (Biltonen y Lichtenberg, 1993).

### **2.8 Reología**

El término reología fue sugerido en 1929 por Eugene Cook Bingham para definir la rama de la Física que tiene por objeto el conocimiento de la deformación o flujo de la materia. Se denomina reología a la ciencia que estudia y formula las leyes del comportamiento mecánico de diversos materiales, y se basa en la respuesta física de estos últimos bajo la aplicación de esfuerzos y deformaciones (Muller, 1973; Lewis, 1987; Steffe, 1996). La

reología estudia la relación entre las fuerzas ejercidas sobre un material y la deformación resultante como una función del tiempo (Rosenthal, 2001).

Las propiedades reológicas de los materiales son determinadas con varios propósitos: conocimiento de su estructura, control de procesos, elaboración, diseño y formulación de productos, diseño de maquinaria, diseño de operaciones unitarias y control de calidad, entre otros (Muller, 1973; Partal *et al.*, 2001).

### **2.8.1 Propiedades reológicas**

Se dice que un sólido es ideal cuando después de haber sido deformado al aplicarle una fuerza externa recupera su forma al desaparecer el esfuerzo. Por el contrario, un fluido ideal se deforma irreversiblemente y fluye cuando es sometido a un esfuerzo (Muller, 1973). Muchos materiales incluyen en su composición una matriz sólida y una fase líquida. Estos materiales presentan un comportamiento reológico que combina características propias de los sólidos y de los líquidos, y se denominan viscoelásticos (Fizman *et al.*, 1983).

Entre los parámetros reológicos destacan el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), que representa el carácter elástico del producto y el módulo de pérdida ( $G''$ ), que representa su carácter viscoso. El módulo elástico ( $G'$ ) es una medida indirecta de la dureza del material, refleja la habilidad de un material para almacenar energía mientras mantiene su integridad estructural. Por su parte, el módulo viscoso ( $G''$ ) representa la habilidad de un material para disipar energía mecánica convirtiéndola en calor a través de movimiento molecular.

$G'$  y  $G''$  pueden ser calculados a partir de la resistencia exhibida por el material ante la aplicación de un esfuerzo. Si  $G' > G''$ , el material exhibe un comportamiento de un semisólido; esto es, tendrá más característica elástica que viscosa; por el contrario, si  $G'' > G'$ , el material se comporta como un semilíquido; la energía usada en la deformación del material es disipada por el flujo y el comportamiento de dicho material se dice que es esencialmente viscoso (Ramos e Ibartz, 2006; Rao, 1986). El factor de cedencia  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ), revela la proporción del comportamiento viscoso al elástico de un material ante la deformación. Un valor de  $\tan \delta$  de 0, corresponde un comportamiento elástico; en contraste, un valor de  $\tan \delta > 0$ , corresponde a una respuesta viscoelástica (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005).

En general las propiedades viscoelásticas de los materiales dependen de la temperatura y de la frecuencia de deformación; por lo tanto, las propiedades viscoelásticas son comúnmente determinadas como una función de la temperatura a una frecuencia dada o viceversa. Sin embargo, el arreglo y la orientación de las partículas que conforman el material juegan un papel importante en el comportamiento reológico (Rodríguez-Abreu *et al.*, 2005).

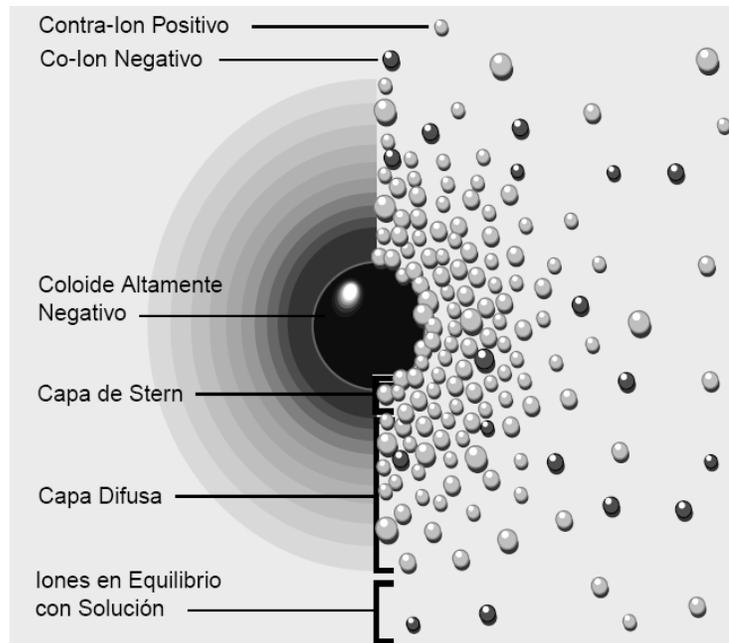
Puesto que una transición térmica está generalmente asociada a una transición estructural microscópica en los cristales líquidos liotrópicos, donde algunas simetrías del sistema cambian en función de la temperatura, la reología puede reflejar las transiciones de fase en un sistema dado (Hu *et al.*, 1998; Rodríguez-Abreu *et al.*, 2005; Svenson, 2004).

## 2.9 Potencial $\zeta$

El potencial Zeta ( $\zeta$ ) es una medida de la magnitud de la repulsión o atracción entre partículas, por lo que su medición es una herramienta importante para el conocimiento sobre los mecanismos de dispersión y atracción de partículas coloidales, tales como los liposomas (Takahashi *et al.*, 2007). Los coloides tienen un tamaño intermedio entre las partículas de una disolución verdadera y las partículas de una suspensión. Por su tamaño microscópico, las fuerzas de unión entre la superficie del coloide y el líquido dispersante son las que determinan su comportamiento. Uno de los mayores efectos de la superficie de las partículas coloidales son los fenómenos electrocinéticos. Cada coloide tiene una carga eléctrica que suele ser de naturaleza negativa. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática entre partículas coloidales adyacentes. Si la carga es suficientemente elevada, las partículas coloidales permanecen discretas, dispersas y en suspensión. El potencial  $\zeta$  se relaciona con la carga superficial de una partícula coloidal, depende directamente de su composición química (Taylor *et al.*, 2007) e influye sobre sus propiedades, tales como estabilidad, interacción con electrolitos, comportamiento mecánico (Villafuerte *et al.*, 2008) y capacidad de interacción (encapsulación) con distintos compuestos activos (Malisiova *et al.*, 2004).

Para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y explicar cómo actúan las fuerzas eléctricas de repulsión, se usa el modelo de la doble capa (Fig. 5). La carga eléctrica negativa superficial del coloide, ejerce atracción hacia algunos iones positivos en disolución, formando estos iones,

denominados como contraiones, una capa adyacente, alrededor de la superficie del coloide; esta capa de contra-iones es conocida como la *capa de Stern*. Otros iones positivos adicionales son todavía atraídos por el coloide negativo, pero éstos son rechazados por la capa de Stern, así como por otros iones positivos que intentan acercarse al coloide. Este equilibrio dinámico resulta en la formación de una *capa difusa* de contra-iones. La concentración de contra-iones es muy elevada cerca de la superficie de la partícula coloidal y disminuye gradualmente con la distancia, hasta que se logra un equilibrio con la concentración de los contra-iones en el seno de la disolución. Los contra-iones de la capa de Stern y de la capa difusa forman la llamada *doble capa eléctrica (EDL)*. El espesor de esta doble capa depende del tipo y de la concentración de los iones de la solución. El coloide negativo y su atmósfera cargada positivamente producen un potencial eléctrico relativo a la disolución. Este potencial presenta un valor máximo en la superficie y disminuye gradualmente con la distancia, aproximándose a cero fuera de la capa difusa. La caída del potencial y la distancia desde el coloide es un indicador de la fuerza repulsiva entre los coloides en función de la distancia a las cuales estas fuerzas entran en juego. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial  $\zeta$  y es una medida de la estabilidad de una partícula e indica el potencial que se requiere para penetrar la capa de iones circundante en la partícula para desestabilizarla. Por lo tanto, el potencial  $\zeta$  es la potencia electrostática que existe entre la separación de las capas que rodean a la partícula.



**Figura 5. Modelo de distribución de potencial eléctrico en la región de la doble capa en un coloide.**

Los liposomas son estabilizados por la cooperación de numerosas fuerzas, entre ellas de van der Waals y electrostáticas (Martínez-Montaña *et al.*, 2007). La teoría DVLO (por Derjaguin, Landau, Verwey y Overwey), considera que la energía potencial entre partículas está asociada a las fuerzas de van der Waals y electrostáticas de las moléculas individuales de cada coloide, las cuales dependen de la fuerza iónica y del pH del medio (Cerpa-Naranjo *et al.*, 2000). Por lo tanto, para el propósito de estabilización de suspensiones coloidales se pueden utilizar varios métodos, tales como cambios en la atmósfera iónica y en el valor de pH, o agregando compuestos activos para afectar directamente la carga del coloide; es decir, mediante la disociación de grupos funcionales o la adsorción de iones del medio (Marí y Jiménez-Torres, 1999). El potencial  $\zeta$  de

una partícula se mueve a positivo a bajo pH, a 0 en el punto isoeléctrico y negativo a alto pH (McClements, 2004).

## **2.10 Microscopia Electrónica de Transmisión**

El microscopio electrónico de transmisión (TEM) opera bajo los mismos principios que el microscopio óptico. La única diferencia radica en que utiliza electrones en lugar de luz. El TEM utiliza electrones con longitud de onda muy pequeña como "fuente de luz", lo cual hace posible obtener una resolución mil veces mejor que con un microscopio de luz.

El TEM usa lentes electromagnéticas para enfocar los electrones en un haz muy fino. El haz de electrones es transmitido a través de la muestra y una imagen es formada, amplificada y proyectada en una pantalla fluorescente (Luykx *et al.*, 2008). Dependiendo de la densidad del material presente, algunos de los electrones se dispersan y desaparecen de la vista, por lo que la estructura de la muestra puede cambiar durante el proceso de preparación (Luykx *et al.*, 2008).

El TEM puede ser utilizado para obtener información acerca de los ensamblajes supramoleculares importantes para el entendimiento de la formación de estructuras más complejas (Hermansson *et al.*, 2000).

### **3.0 JUSTIFICACIÓN**

En la actualidad, diversas moléculas bioactivas han sido reconocidas como promotoras de la salud del ser humano; sin embargo, en su mayoría son biológicamente inestables, poco solubles en agua y pobremente distribuidas a sus sitios de acción en células y tejidos. Ello hace necesario el desarrollo de bioempaques que confieran protección a las moléculas bioactivas contra factores que causan su degradación (agua, oxígeno, luz, digestión gástrica, etc.), preservando así su funcionalidad. Una alternativa de bioempaques novedosos la constituyen los cocleatos; estructuras formadas a partir de fosfolípidos, que permiten encapsular tanto moléculas lipofílicas como hidrofílicas, y cuyos tamaños pueden regularse desde nanómetros hasta micrómetros.

## **4.0 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo general**

Establecer la formulación y las condiciones de preparación de estructuras cocleato a través de la manipulación de la carga superficial de partículas coloidales constituidas por fosfolípidos.

## **5.0 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Concentración micelar crítica de fosfolípidos**

Para determinar la concentración de fosfolípidos tal que induzca la formación de agregados lipídicos en dispersión acuosa, se prepararon disoluciones de lecitina de soya (97.61 % de sólidos insolubles en acetona, 1.5 % humedad y 1.5 % aceite; Metarin P, Cargill Texturizing Solutions, Decatur IL, EUA) en concentraciones que variaron de 0 a 20 % (p/p), en intervalos de 0.5%. Previamente a la preparación de las disoluciones mencionadas, se determinó el porcentaje de sólidos insolubles en acetona, equivalentes al porcentaje de fosfolípidos presentes en la lecitina. Las disoluciones preparadas se sometieron a mediciones de absorbancia a 450 nm, en un espectrofotómetro Spectronic Genesys 5 (Spectronic Instruments, Rochester, NY, EUA). La concentración micelar crítica (CMC) se determinó a partir de gráficas absorbancia-concentración de lecitina de soya, mediante análisis de regresión lineal, y fue aquella correspondiente al cambio de pendiente (Hancer *et al.*, 2002). Esta determinación se realizó por triplicado.

### **5.2 Potencial $\zeta$**

Con el objetivo de conocer el pH en el cual es posible encontrar una mayor carga negativa, disoluciones de lecitina de soya al 5 % se ajustaron a distintos valores de pH, en un intervalo de 5 a 10, con incrementos de 0.5, mediante la adición de NaOH 0.1 N y HCl 0.25 N en las cantidades necesarias. Alicuotas de

3 mL de las disoluciones se colocaron en la celda de cuarzo de un equipo Nanosizer ZS (Malvern, Instruments, Malvern, Worcestershire, Reino Unido) estableciendo un índice de refracción de 1.33. El potencial  $\zeta$  fue determinado, por triplicado, por medición de la dirección y velocidad de los liposomas en el campo eléctrico aplicado, a temperatura ambiente (20-22 °C). (Tseng *et al.*, 2007).

### **5.3 Temperatura de transición**

Diez miligramos de disolución de lecitina de soya al 5 % en buffer TRIS-NaCl [10 mM (HOCH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CNH<sub>2</sub> (Sigma-Aldrich, Inc. St. Louis MO, EUA) 100 mM NaCl (JT Baker, Mallinckdrod Baker, S. A de C. V. México), pH 7.4] se colocaron en una charola de aluminio herméticamente sellada; una charola del mismo material vacía y sellada se utilizó como referencia. La muestra se colocó en un calorímetro diferencial de barrido con sistema de refrigeración (DSC 2010, TA Instruments, New Castle, DE, EUA) y se sometió a calentamiento usando una rampa de temperatura de 4 a 90 °C, aplicando una velocidad de calentamiento de 2 °C/min y un flujo de N<sub>2</sub> de 50 mL/min, Mediante el software Universal Analysis (TA Instruments, New Castle, DE, EUA), se determinó la temperatura de transición, indicada por un pico endotérmico en el termograma, y el cambio de entalpía ( $\Delta H$ ) del calentamiento asociado. Esta última se obtuvo por integración del área bajo la curva del pico endotérmico (Tseng *et al.*, 2007; Aguirre-Mandujano *et al.*, 2009; Chen *et al.*, 1980). Estas determinaciones se realizaron por triplicado.

#### **5.4 Preparación de liposomas**

Cinco gramos de lecitina de soya se disolvieron en 95 gramos de disolución buffer TRIS-NaCl, dejando reposar durante 12 h en oscuridad y refrigeración a 4 °C (Ramani y Balasubramanian, 2003); el valor de pH de la disolución se ajustó a 7.5 (valor determinado previamente como óptimo). Diez mililitros de disolución de lecitina de soya se sometieron a agitación magnética a 37 C° (temperatura superior a la determinada como de transición) por 30 min (Malisiova *et al.*, 2004). La suspensión liposomal obtenida en esta etapa, se llevó a 2 periodos de agitación ultrasónica de 5 min a 50 % de amplitud (sonicador de sonda, VCX 130, Vibra Cell, Sonic's and Materials Inc., Newtown, CT, EUA) (Tseng *et al.*, 2007; Mishra y Singhal, 1990; Chen *et al.*, 1980). Los liposomas se prepararon por triplicado. La formación y evolución en tamaño de los liposomas se monitoreó usando un microscopio óptico (Zb-3000, Zeigen Microscopios, México).

#### **5.5 Reología de la suspensión liposomal**

Mediciones oscilatorias dinámicas se realizaron a la suspensión liposomal utilizando un reómetro de esfuerzo controlado Physica MCR 301 (Anton Paar, Messtechnik, Stuttgart, Alemania). Las propiedades viscoelásticas en la región lineal de la suspensión liposomal, se evaluaron mediante la aplicación de barridos de amplitud (0.01 a 100 % de deformación, 1 Hz de frecuencia) a 4 °C (Partal *et al.*, 2001). Adicionalmente, se efectuaron barridos de temperatura en un intervalo de 4 a 90 °C, aplicando una deformación de 0.6 % (valor correspondiente a la región de comportamiento viscoelástico lineal) y una

velocidad de calentamiento de 2 °C/min (Mezzenga *et al.*, 2005). Para estas dos últimas pruebas se usó una geometría cono-plato (CP50-1 5550) con 49.932 mm de diámetro, ángulo de cono de 0.988° y separación de 0.051 mm entre geometría y peltier. Se determinaron curvas de flujo en un intervalo de tasas de corte de 0.01 a 100 s<sup>-1</sup> utilizando una geometría de cilindros concéntricos (CC27 5430) a 25 °C (Partal *et al.*, 2001). Durante todas las determinaciones, la temperatura se controló mediante el sistema peltier (TEK 150P) del equipo. En todos los casos, los valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida G'', el factor de cedencia ( $\tan \delta = G''/G'$ ) y la viscosidad aparente ( $\eta$ ) fueron obtenidos mediante el software RheoPlus/32 V2.62.

La temperatura en la que los valores de G' igualaron a aquellos de G'', fue referida como temperatura de transición. En tanto que los valores de  $\tan \delta$  fueron utilizados como índices de viscoelasticidad (Tabilo-Munizaga y Barbosa-Cánovas, 2005). Las mediciones reológicas se llevaron a cabo por triplicado.

## **5.6 Tamaño de partícula**

El tamaño de los liposomas, sometidos o no a sonicación, se midió mediante la técnica de difracción de rayo láser, usando un equipo Mastersizer 2000 (Malvern Instruments, Malvern, Worcestershire, RU), estableciendo un índice de refracción de 1.33. Los tamaños de los liposomas se expresaron mediante el parámetro diámetro medio de distribución de volumen o diámetro de De Brouchere ( $d_{4,3}$ ; donde  $d_{4,3} = \frac{\sum d^4}{\sum d^3}$ ), el cual es el diámetro medio de una

esfera con el mismo volumen de la partícula liposomal y es generalmente usado para caracterizar partículas. (Tseng *et al.*, 2007). Las mediciones se realizaron por triplicado a temperatura ambiente.

### **5.7 Síntesis de cocleatos**

Veinte mililitros de la dispersión liposomal sonicada de lecitina de soya al 5 % en buffer TRIS-NaCl se mantuvo en calentamiento a 37 °C con agitación magnética por 3 h, periodo en el cual se agregaron gota a gota 2.22 mL de disolución 0.1 M de CaCl<sub>2</sub> (JT Baker, Mallinckdrod Baker, S. A de C. V. México) (Zarif *et al.*, 2000). Para monitorear la formación de la estructura cocleato, se midió la conductividad eléctrica de la suspensión liposomal con un potenciómetro (modelo HI98240, Hanna Instruments Inc, Rumania). El precipitado se separó por centrifugación (centrífuga, Gerber Instruments AG, Suiza) a 1300 rpm por 30 min. El sedimento se refrigeró a 4 °C en ausencia de luz en solución 1 mM de CaCl<sub>2</sub> hasta su observación microscópica (Ramani y Balasuramanian, 2003).

### **5.8 Microscopia electrónica de transmisión**

Muestras de 2 µl de dilución 1/100 del precipitado obtenido en la síntesis de cocleatos se colocaron en una rejilla de cobre con un valor de malla de 400 y se secaron al aire a temperatura ambiente. Las muestras secas se tiñeron negativamente con acetato de uranilo al 2% (p/v) durante 45 s (Ramani y Balasubramanian, 2003). Las muestras teñidas fueron analizadas y fotografiadas con un microscopio electrónico de transmisión (Jeol 1200EXI, Japón) operado a 90 kV, usando una magnificación de 80 000 x. Las imágenes

resultantes se sometieron a análisis de imágenes para la determinación de sus diámetros lineales ( $D_{1,0}$ ) (Flach y Mendelsohn, 1993).

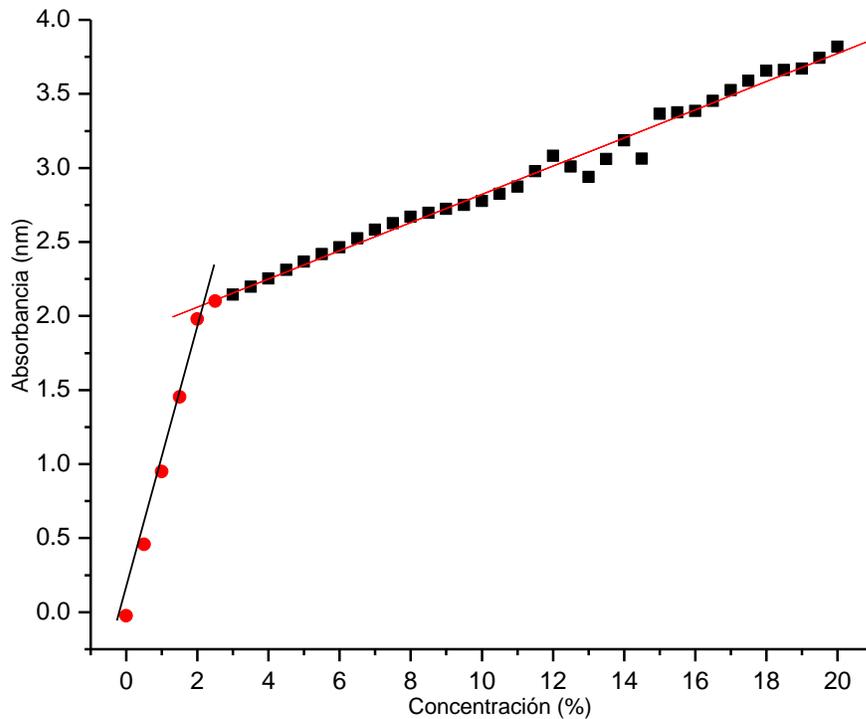
### **5.9 Diseño experimental**

Los datos resultantes de los parámetros de ajuste a modelo de Carreau y potencial  $\zeta$ , se sometieron a análisis de varianza de clasificación simple ( $p \leq 0.05$ ); se aplicó prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) para comparación de medias mediante el software SAS versión 9.0 en español (Instituto SAS, 2002, Cary, North Carolina, EUA).

## 6.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Concentración micelar crítica

La figura 6 muestra la variación de los valores de absorbancia de las disoluciones de lecitina de soya en función de su concentración. Por equivalencia de regresión lineal ( $0.032 + 0.896x = 1.871 + 0.095x$ ) de las pendientes observadas se determinó la concentración micelar crítica (CMC). El valor obtenido de  $2.3 \pm 0.0$  % (p/p), puede considerarse como un criterio de actividad superficial (menor actividad) (De la Maza *et al.*, 1993). Al observar microscópicamente disoluciones de lecitina en una concentración igual a la determinada como CMC, no se encontró la formación de estructuras constituidas por asociación de moléculas lipídicas, por lo que la concentración de lecitina de soya se elevó a 5 % (p/p), concentración en la que fue posible observar estructuras liposomales bajo el microscopio. Lo anterior, debido a que por su carácter anfifílico, los fosfolípidos en medio acuoso y no acuoso tienden a formar agregados a concentraciones mayores a la CMC (Hancer *et al.*, 2002). Takahashi *et al.* (2007) utilizaron disoluciones de lecitina de soya en concentraciones que variaron del 2 al 10 % (p/p) para preparar liposomas con el fin de encapsular compuestos alimenticios.



**Figura 6. Variación de la absorbancia de disoluciones de lecitina en función de su concentración.**

## 6.2 Potencial $\zeta$

El valor de potencial  $\zeta$  de la suspensión liposomal fue negativo en todo el rango de pH estudiado; además la magnitud de este parámetro se incrementó, conforme el valor de pH fue más alcalino (Tabla 1). Estos resultados no concuerdan con lo informado por Were *et al.* (2003) quienes encontraron que la carga superficial de liposomas a base de fosfatidilglicerol a pH de 7.4, tendió a ser igual a cero o negativa, según la concentración utilizada para su preparación. Por su parte, Lanio *et al.* (2009) informaron que el potencial  $\zeta$  de una suspensión a base de fosfatidilcolina tiende a ser negativo en un amplio rango de fuerzas iónicas debido a la presencia de una capa de aniones adsorbida a los dipolos originados en las cabezas polares del zwitterion.

**Tabla 1. Valores de potencial  $\zeta$  (medias  $\pm$  desviación estándar) de la suspensión liposomal de lecitina de soya en intervalo de pH de 5 a 10.**

pH	Potencial $\zeta$
5.0	-44.30 <sup>a</sup> $\pm$ 2.74
5.5	-48.30 <sup>ab</sup> $\pm$ 2.17
6.0	-47.90 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.68
6.5	-47.96 <sup>ab</sup> $\pm$ 1.44
7.0	-49.63 <sup>abc</sup> $\pm$ 2.02
7.5	-51.46 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.36
8.0	-52.10 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.91
8.5	-52.50 <sup>bc</sup> $\pm$ 2.17
9.0	-52.20 <sup>bc</sup> $\pm$ 2.25
9.5	-54.36 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.80
10.0	-54.66 <sup>bc</sup> $\pm$ 1.59

En este estudio, los valores del potencial electrocinético de las moléculas de fosfolípidos variaron de -44.30 mV a pH ligeramente ácido (5.0), hasta -54.66 mV a valores básicos de pH (10.0). Este fenómeno se explica por el carácter anfotérico de las moléculas de fosfolípidos. A valores de pH ácidos, el grupo aniónico fosfato de la molécula de los fosfolípidos se encuentra protonado y por lo tanto el grupo activo es el  $-\text{NH}_4^+$  de la fosfatidilcolina y el grupo  $-\text{NH}_3^+$  para el caso de la fosfatidiletanolamina, presentando ambos carga neta positiva. Por el contrario, a valores de pH alcalinos, el grupo aniónico ( $-\text{PO}_4^-$ ) se encuentra totalmente disociado y en consecuencia cargado negativamente, en tanto que los grupos catiónicos de las bases nitrogenadas no se encuentran cargados, dando como resultado una carga negativa dominante (Marí y Jiménez-Torres, 1999).

Valores negativos de  $\zeta$  en la suspensión liposomal formulada a partir de lecitina de soya, resultan ser de gran importancia para la formación de las estructuras

cocleato, puesto que la carga positiva de los iones  $\text{Ca}^{2+}$  adsorbidos a la superficie del liposoma conducirá a la neutralización de cargas, disminución de la repulsión entre partículas (Verkleij *et al.*, 1974) y con ello a la floculación del sistema, seguida por la deshidratación de las vesículas, dando origen así a la bicapa continua necesaria para la formación del cocleato (Flach y Mendelsohn, 1993). McClements (2004) señaló que iones  $\text{Ca}^{2+}$  adicionados a emulsiones aceite-en-agua estabilizadas con lecitina, se enlazaron a la superficie de las gotas cargadas negativamente, reduciendo el potencial  $\zeta$ . Los compuestos catiónicos exhiben la habilidad de adsorberse a la superficie de partículas coloidales, causando neutralización de sus cargas negativas, supresión del potencial  $\zeta$  y modificación en la superficie de la partícula, ocasionado la desestabilización del sistema (Elsayed *et al.*, 2009).

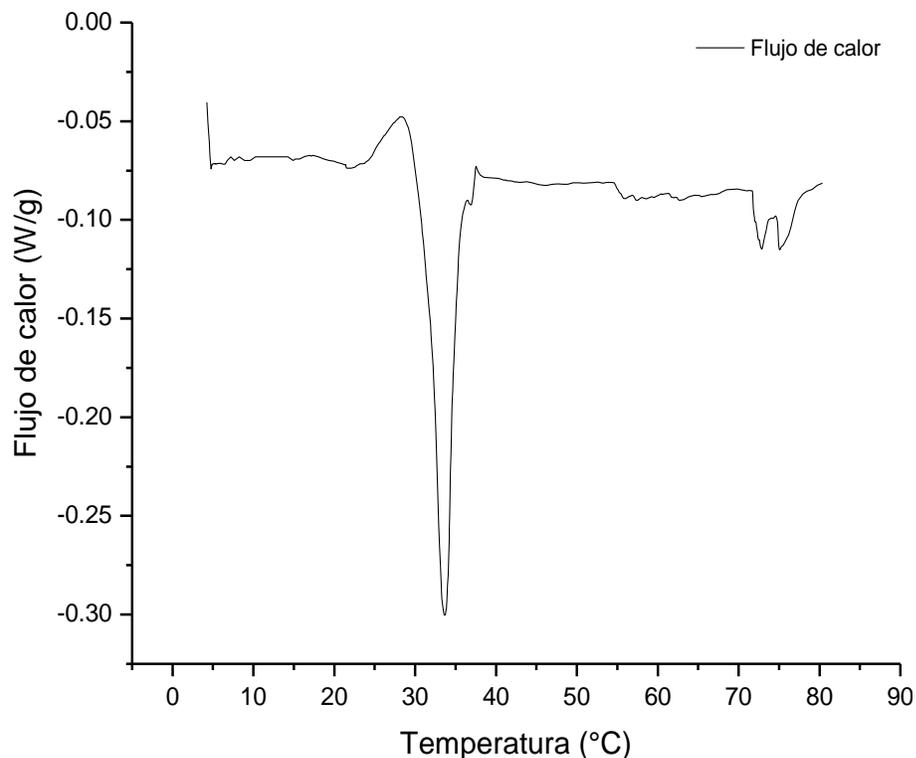
El intervalo de valores de potencial  $\zeta$  de la suspensión liposomal formulada en el presente trabajo concuerda con lo expuesto por Schaupp *et al.* (1991), quienes informaron que a pH de 7.4, el potencial  $\zeta$  de suspensiones de lecitina de soya oscila, según el grado de pureza, entre -40 y -50 mV, y es cercano a cero para el caso de la fosfatidilcolina pura. Sin embargo, Bailey y Sullivan, (2000), atribuyen el carácter negativo a la deprotonación de la fosfatidiletanolamina.

De acuerdo con Márquez *et al.* (2007) es necesario utilizar un rango de pH de 6 a 7 para producir la ionización del grupo fosfato y permitir una carga superficial óptima y minimizar la hidrólisis de la lecitina.

### 6.3 Temperatura de transición

El termograma de la disolución de lecitina (Fig. 7) determinado mediante calorimetría diferencial de barrido, mostró un pico endotérmico bien definido a  $33.6 \pm 0.7$  °C, asociado a una entalpía de  $24.34 \pm 0.74$  J/g. Este último valor indicó un flujo positivo de calor, característico de una transición de estado gel a fase lamelar, asociado a la fusión de agregados de cadenas lipídicas (Heertje *et al.*, 1998; Chapman *et al.*, 1974). Las propiedades termodinámicas de los lípidos hidratados dependen de su estructura molecular (grupo polar, longitud de cadena y el grado y tipo de insaturaciones presentes), así como de la composición de la dispersión (Koynova y Caffrey, 1998; Chapman *et al.*, 1974). Koynova y Caffrey (1998) informaron que la temperatura de transición de estado gel a estado líquido-cristalino, de pequeñas vesículas unilamelares de fosfatidilcolina (16:0-16:0) en dispersión 1 M de NaCl, ocurre a una temperatura de 35.5 °C; temperatura que es ligeramente superior a la encontrada en este trabajo para disoluciones de lecitina al 5 % p/p, con una concentración de NaCl de 100 mM y 10 mM de buffer TRIS.

En el termograma (Fig. 7) también es posible observar un pequeño pico endotérmico de pre-transición a  $24.08 \pm 0.27$ °C asociado con una entalpía de  $2.48 \pm 0.28$  J/g. Esta pre-transición está relacionada con un incremento en la movilidad de la porción polar de los fosfolípidos (Chapman *et al.*, 1974) y en concordancia con lo mencionado por Biltonen y Lichtenberg (1993) ocurre de 5 a 10 °C por debajo de la temperatura de transición, y se considera como una transición del estado gel a una fase ondulada que se observa únicamente en lípidos completamente hidratados.



**Figura 7. Termograma de la disolución de lecitina de soya determinado mediante calorimetría diferencial de barrido.**

## **6.4 Propiedades reológicas de la suspensión liposomal**

### **6.4.1 Propiedades viscoelásticas**

Al observar la variación del módulo de almacenamiento ( $G'$ ) de la suspensión liposomal en función de la deformación (Fig. 8), pueden identificarse tres zonas de comportamiento:

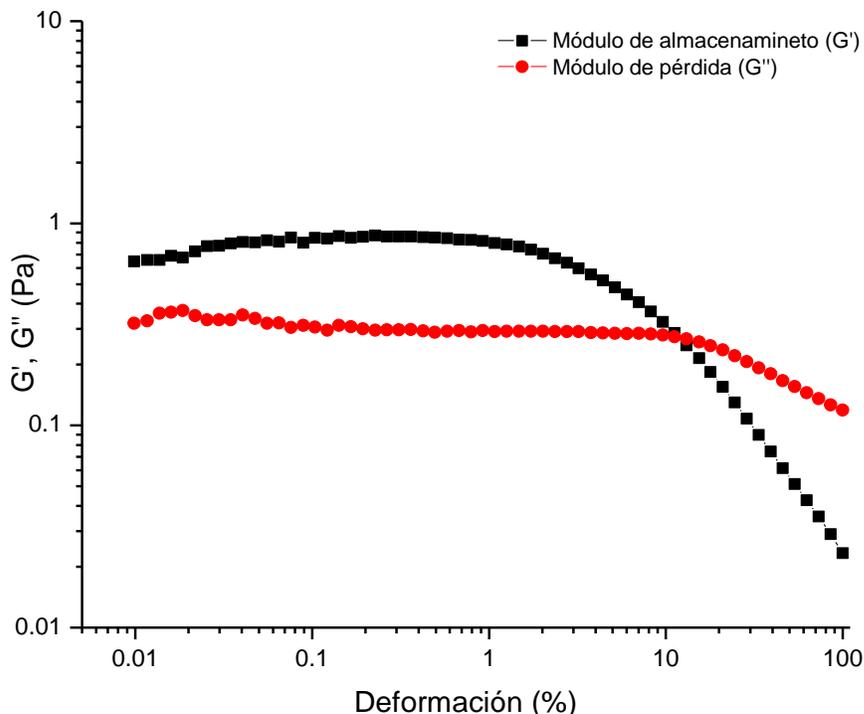
Zona I, a deformaciones de 0.01 % hasta alrededor de 0.6 %, en la que los valores de  $G'$  permanecieron prácticamente constantes, por lo que esta zona fue identificada como la zona de comportamiento viscoelástico lineal.

Zona II, a deformaciones mayores de 0.6 % hasta aproximadamente 12 %, en la que los valores de  $G''$  tendieron a disminuir muy poco; mientras que aquellos

de  $G'$  decrecieron de forma más pronunciada. A pesar del decremento en los valores de  $G'$  la suspensión liposomal mantuvo un carácter viscoelástico predominantemente sólido. Lo anterior, posiblemente debido a una disgregación parcial de la estructura liposomal, ocurriendo reformación de algunos enlaces intermoleculares.

Zona III, a valores de deformación mayores de 12 %, en la que tanto los valores de  $G'$  como los de  $G''$  disminuyeron progresivamente, cruzándose sus curvas, y en la cual el comportamiento viscoelástico de la suspensión liposomal cambió de predominantemente sólido a predominantemente líquido. Estos resultados permiten inferir la ocurrencia de una disgregación importante de la estructura de los liposomas, tal que dio origen a pequeños agregados o moléculas individuales que fluyeron libremente bajo las deformaciones correspondientes a esta zona.

Los cristales líquidos lamelares presentan una estructura altamente desarrollada, tal que cuando les es aplicada una cizalla o esfuerzo cortante; su respuesta reológica depende de rearrreglos que ocurren en su estructura durante la aplicación de dicho esfuerzo. Las propiedades reológicas de estos sistemas pueden ser descritas por dos parámetros: el módulo de almacenamiento ( $G'$ ), que es una medida de su naturaleza elástica y el módulo de pérdida ( $G''$ ), que está relacionado con su naturaleza viscosa (Franco *et al.*, 1995).



**Figura 8. Variación de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de la suspensión liposomal en función de la deformación.**

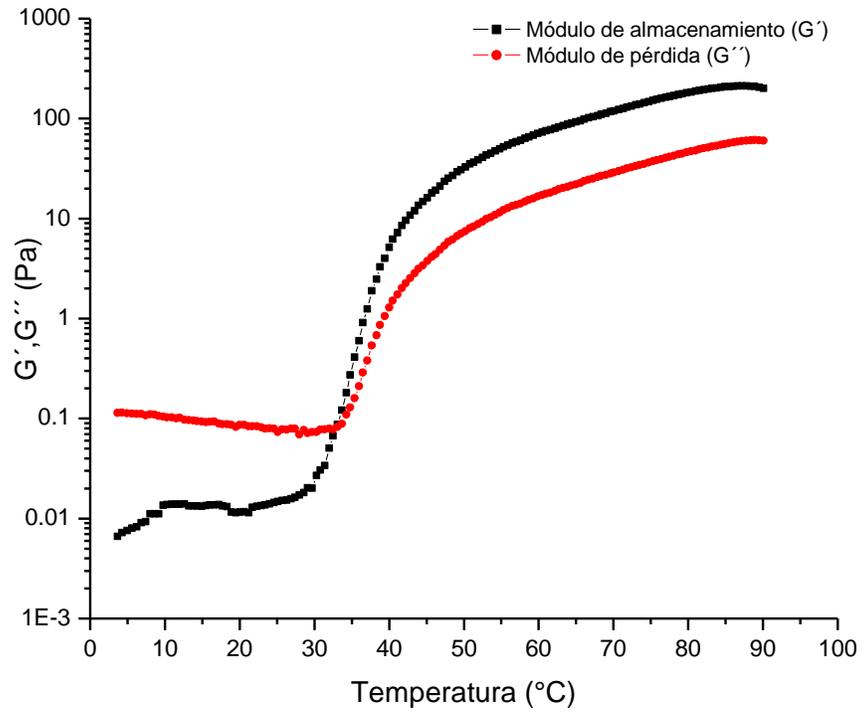
#### 6.4.2 Propiedades viscoelásticas en función de la temperatura

Los valores de los módulos de almacenamiento (G') y de pérdida (G'') de las suspensión liposomal, permanecieron prácticamente constantes a partir de 4 °C hasta aproximadamente 28 °C (Fig. 9); presentando la suspensión liposomal carácter viscoelástico predominantemente líquido, al ser los valores de G'' de mayor magnitud que aquellos de G' en todo ese rango de temperatura. Al incrementarse la temperatura a valores mayores de 28 °C, se observó aumento en los valores de ambos módulos, siendo más pronunciado para el caso de G', de tal manera que a 33.7 °C las curvas de ambos módulos se cruzaron. Los cambios en los valores de G' y G'' indicaron la ocurrencia de cambios importantes en la estructura de la suspensión liposomal. El parámetro reológico

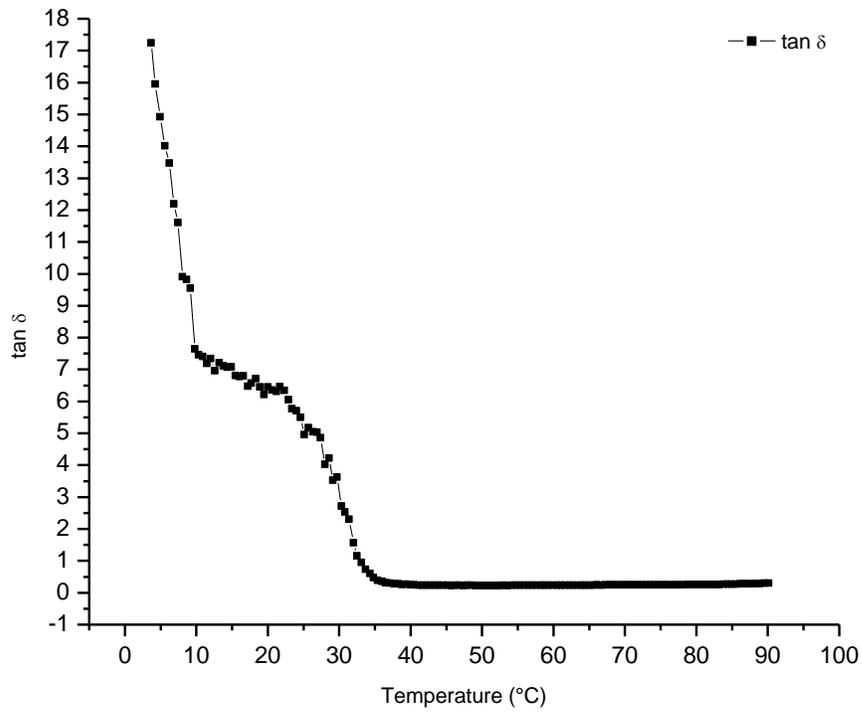
tan  $\delta$ , en el momento de entrecruzamiento de las curvas de  $G'$  y  $G''$  alcanzó un valor igual a la unidad (Fig. 10), asociado a la existencia de un equilibrio entre los componentes viscoso y elástico de la suspensión liposomal. Bajo incrementos sucesivos de temperatura, mayores a 33.7 °C, los valores de  $G'$  de la suspensión liposomal fueron mayores que los correspondientes a  $G''$ , señalando la transición de la suspensión liposomal de carácter predominantemente líquido a carácter predominantemente sólido. De esta manera, el incremento de la temperatura provocó un desarrollo gradual de una estructura más rígida y elástica. Los resultados obtenidos coinciden con lo informado por Mezzenga *et al.* (2005), quienes en un estudio reológico sobre la formación de distintas fases cristalinas de monoglicéridos (Dimodan U/J) con distintas longitudes de cadena e insaturaciones encontraron que incrementos en temperatura están directamente relacionados con aumentos en la flexibilidad y re-arreglo de las cadenas lipídicas del surfactante, ocasionando una contracción de la estructura debido a la reducción del espacio de latice.

El estado viscoso en el que se encontró la suspensión por debajo de los 33.7 °C corresponde al mostrado por un gel cristalino; el que por definición consiste en una estructura rígida (Chapman *et al.*, 1974), en la que las partículas en suspensión presentan poca interacción con el agua. En cambio, por arriba de la temperatura de transición, en este caso de 33.7 °C, la suspensión se encuentra en un estado líquido cristalino, cuya capacidad de enlace de agua es mayor (Chapman *et al.*, 1974; Heertje *et al.*, 1998). En adición, bajo la temperatura de transición se favorece la fusión de los liposomas, debido a un incremento de colisiones entre partículas (Mishra y Singhal, 1990; Taylor *et al.*, 2007),

llevando ello a un entrapamiento mayor de agua, con lo que se modifica el estado viscoso del sistema. Yang (2002) menciona que cuando las micelas lipídicas se encuentran bajo esfuerzo cortante, se rompen y reforman; bajo esta teoría, los liposomas pueden actuar de manera similar, con la ventaja que en el proceso de “reformación” asociado al mismo proceso de auto-asociación, podrían entrapar más agua y formar estructuras más grandes que reducen la cantidad de agua libre en el sistema y con ello aumentos en los valores de los parámetros reológicos. Franco *et al.* (1995), informaron que el estado reológico de las fases lamelares liotrópicas está relacionado con la orientación de las partículas y que una de las formas de orientación en la fases lamelares son las vesículas multilamelares; la formación de esta estructura produce un significativo incremento en la viscosidad. Por su parte Svenson (2004) informó que la flexibilidad de la membrana (fase lamelar) en el estado líquido cristalino favorece la formación de vesículas. En tanto que Partal *et al.* (2001) y Medronho *et al.* (2010) encontraron que la tasa de corte aplicada a las suspensiones conduce a la formación de vesículas.



**Figura 9. Variación de los módulos de almacenamiento ( $G'$ ) y de pérdida ( $G''$ ) de la suspensión liposomal, en función de la temperatura.**



**Figura 10. Variación de los valores de  $\tan \delta$  de la suspensión liposomal en función de la temperatura.**

### 6.4.3 Curvas de flujo

En la figura 11, se muestran las variaciones de la viscosidad aparente de las suspensiones liposomales conteniendo distintos porcentajes de lecitina (3.5 a 10 % p/p), en función de la tasa de corte. En estas curvas puede observarse que la viscosidad de las suspensiones liposomales independientemente de su concentración en lecitina, presentó variaciones similares en función de la tasa de corte. A valores de tasa de corte bajos ( $\leq 0.01 \text{ s}^{-1}$ ), la viscosidad tendió a ser constante, indicando un comportamiento newtoniano de las suspensiones liposomales. En contraste, a valores de tasas de corte  $> 0.01 \text{ s}^{-1}$ , la viscosidad varió con incrementos en los valores de tasa de corte; estos resultados señalan un comportamiento no-newtoniano de las suspensiones liposomales (Steffe, 1996). Las suspensiones liposomales mostraron disminuciones pronunciadas en su viscosidad aparente bajo la aplicación de tasas de corte progresivamente mayores, por lo que puede inferirse que su comportamiento de flujo fue del tipo llamado como “shear thinning” o adelgazamiento al corte. La zona de comportamiento newtoniano de fluidos a tasas de corte bajas, se ha atribuido a la formación de una estructura reversible en estado de reposo (Lobato-Calleros *et al.*, 2004). La variación en la viscosidad de las suspensiones liposomales bajo la aplicación de esfuerzo cortante (i.e. tasa de corte) indica que las partículas liposomales comenzaron a desintegrarse en unidades más pequeñas, existiendo mayor área interfacial (Franco *et al.*, 1998) y disminuyendo su viscosidad aparente.

Los datos del comportamiento de flujo de las suspensiones liposomales se ajustaron al modelo matemático de Carreau ( $R^2 = 0.92$  a  $97.9$ ) (Ec. 1):

$$\eta = \frac{\eta_0 - \eta_\infty}{(1 + (\lambda\dot{\gamma})^2)^n} + \eta_\infty \dots\dots\dots \text{Ec.1. (Rao, 1999)}$$

Donde:

$\eta_0$ : Viscosidad a tasa de corte cero

$\eta_\infty$ : Viscosidad a tasa de corte infinita

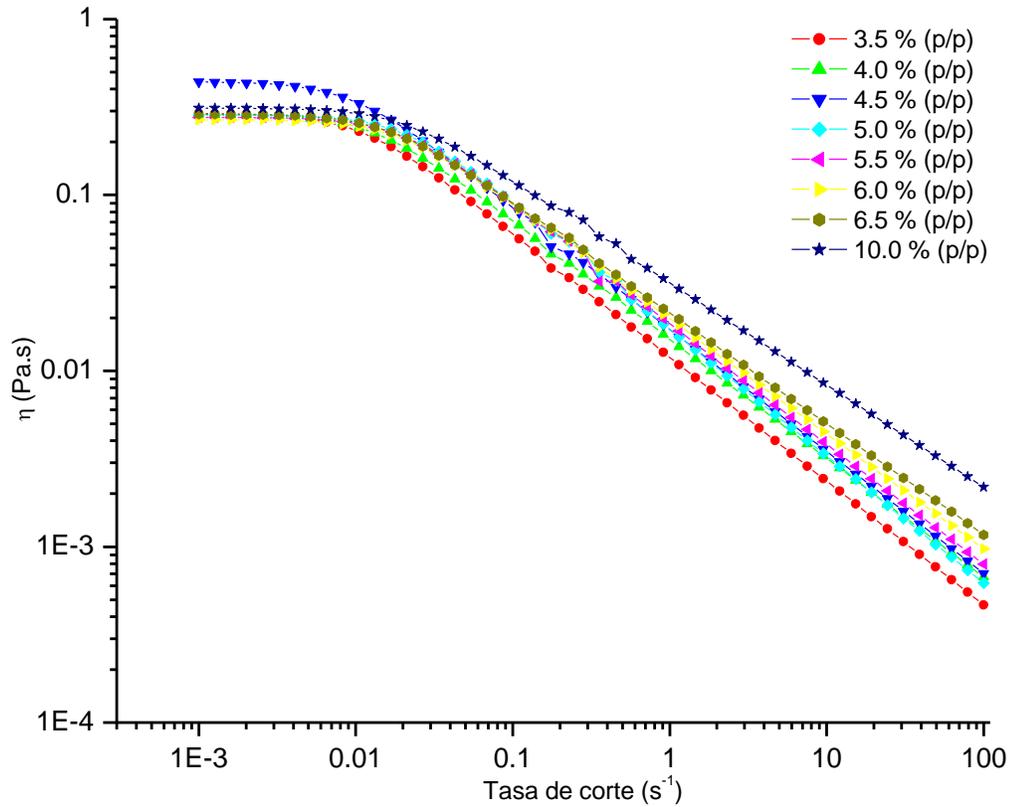
n: Índice de ley de potencia

$\lambda$ : Tiempo constante asociado al tiempo de relajación

$\dot{\gamma}$ : Tasa de corte (Steffe, 1996).

El modelo de Carreau se utiliza para describir el comportamiento reológico de fluidos pseudoplásticos, cuya viscosidad aparente decrece pronunciadamente al incrementarse la tasa de corte (McClements, 2004). Los valores de los parámetros del modelo de Carreau presentados por las suspensiones liposomales se muestran en la Tabla 2, donde se observa que las suspensiones no exhibieron diferencias significativas en sus valores de la relación  $\eta_0 - \eta_\infty$ , a pesar de que la  $\eta_0$  tendió a ser mayor ligeramente, conforme la concentración de lecitina fue mayor (Fig. 11). Los valores del tiempo de relajación ( $\lambda$ ) tendieron a disminuir conforme la concentración de lecitina de soya aumentó.  $\lambda$  está relacionado con la tasa de corte que marca el fin de la tasa de corte de la región newtoniana y el establecimiento de la tasa de corte de la región adelgazante, por lo que incrementos en la concentración de lecitina de soya estuvieron relacionados con mayor carácter pseudoplástico en las suspensiones liposomales. En concordancia, el índice de ley de potencia (n) tendió a disminuir conforme la concentración de lecitina aumentó de 3.5 a 6.5 % (p/p), para luego aumentar ligeramente cuando la concentración de lecitina

se elevó al 10 % (p/p) (Tabla 1); no obstante, todas las suspensiones mostraron valores de  $n < 1.0$ , indicando ello que tuvieron un comportamiento pseudoplástico (Rao, 1986; Steffe, 1996).



**Figura 11. Variación de la viscosidad de suspensiones liposomales en función de su concentración de lecitina de soya.**

**Tabla 2. Valores medios ( $\pm$  desviación estándar) de los parámetros del modelo de Carreau que obedecieron las suspensiones liposomales.**

Concentración de lecitina (%, p/p)	$\eta_0 - \eta_\infty$ (Pa.s)	$\lambda$	n
3.5	$0.341 \pm 0.07^b$	$100.350 \pm 9.31^{ab}$	$0.362 \pm 0.00^{ab}$
4.0	$0.289 \pm 0.04^b$	$79.288 \pm 0.61^{cd}$	$0.337 \pm 0.00^{bc}$
4.5	$0.452 \pm 0.01^a$	$110.300 \pm 3.80^a$	$0.355 \pm 0.01^{ab}$
5.0	$0.282 \pm 0.00^b$	$48.438 \pm 0.69^g$	$0.357 \pm 0.00^{ab}$
5.5	$0.282 \pm 0.01^b$	$69.501 \pm 1.43^{de}$	$0.338 \pm 0.00^{bc}$
6.0	$0.282 \pm 0.02^b$	$90.564 \pm 2.17^{bc}$	$0.319 \pm 0.01^c$
6.5	$0.281 \pm 0.01^b$	$63.683 \pm 1.02^{ef}$	$0.307 \pm 0.00^c$
10.0	$0.316 \pm 0.00^b$	$52.014 \pm 1.02^{fg}$	$0.366 \pm 0.00^{ab}$

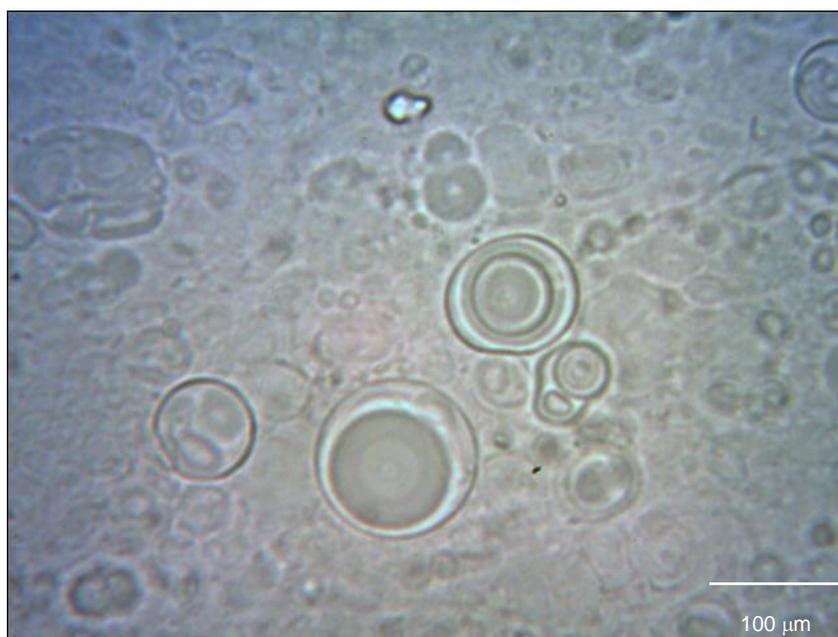
Diferentes superíndices en una misma columna indican que las medias difieren significativamente ( $p \leq 0.05$ ).

### 6.5 Tamaño de partícula

El tamaño de las partículas liposomales (Fig. 12) sin sonicar, determinado como diámetro medio de distribución de volumen ( $d_{4,3}$ ), mostró una distribución bimodal en un intervalo de 0.4 a 50  $\mu\text{m}$  (Fig. 14). Las dos poblaciones reveladas en el tamaño de los liposomas sin sonicar corresponden a distribuciones entre 0.4-2.5  $\mu\text{m}$  y 2.5-50  $\mu\text{m}$ , con diámetro medio ( $d_{4,3}$ ) de  $1.99 \pm 0.1 \mu\text{m}$ . Las dos poblaciones y el amplio rango de distribución son indicativos de un alto índice de polidispersidad en el tamaño de los liposomas.

Las vesículas multilamelares con intervalos de tamaño de 1 a 3  $\mu\text{m}$ , se forman espontáneamente en agua en exceso; sin embargo, también es posible la formación de vesículas unilamelares gigantes con tamaños de hasta 20  $\mu\text{m}$  mediante el método de hidratación (Pautot *et al.*, 2003; Tseng *et al.*, 2007). El análisis del tamaño de las partículas liposomales, mostró que el 90 % de ellas

tuvo un diámetro menor a  $6.76 \pm 0.8 \mu\text{m}$  y el 50 % de las mismas exhibió un diámetro mayor a  $0.22 \pm 0.0 \mu\text{m}$ . Con lo que se hace evidente que los datos de tamaño de partícula obtenidos, presentan cierta concordancia con los obtenidos por los autores anteriormente citados. En la figura 12, se muestran estructuras liposomales sin sonicar en las que se observa la variabilidad en el tamaño de las partículas así como la presencia de liposomas multilamelares, que de acuerdo con Miclea *et al.* (2007), presentan una estructura tipo “dona”.

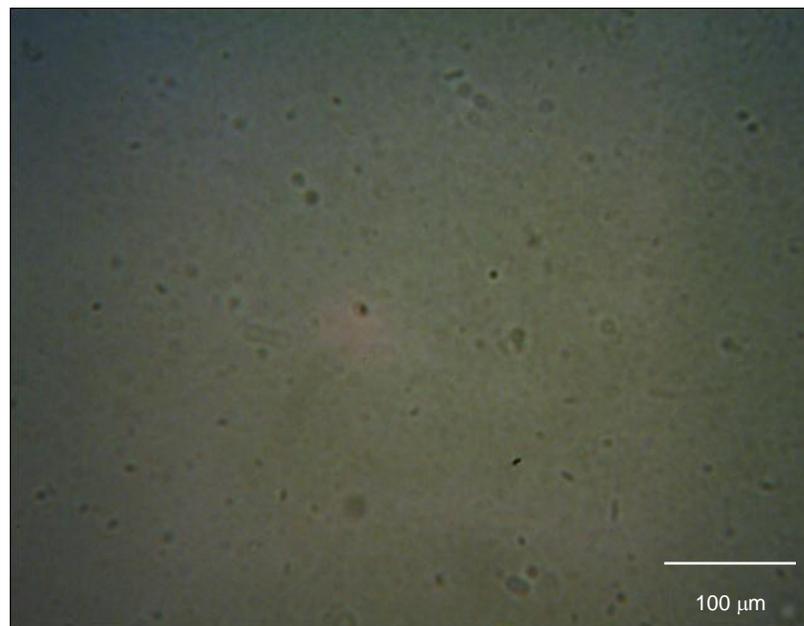


**Figura 12. Micrografía óptica de las partículas liposomales sin sonicar.**

El proceso de sonicación al que se sometió la suspensión liposomal, modificó el tamaño de las vesículas (Fig. 13) (Armengol y Estelrich, 1995). Aún cuando se observó una distribución bimodal en el diámetro  $d_{4,3}$  de las partículas o vesículas, ésta fue menos pronunciada que para el caso de las partículas liposomales que no se sometieron a sonicación (Fig. 14). Las dos poblaciones

reveladas en el tamaño de los liposomas sometidos a sonicación corresponden a distribuciones que variaron entre 0.03-0.5 y de 0.5-6  $\mu\text{m}$  con un  $d_{4,3}$  medio de  $0.27 \pm 0.0 \mu\text{m}$ . Varios autores han informado que el uso de la energía ultrasónica produce pequeñas vesículas unilamelares y distribuciones de tamaño homogéneos (Pautot *et al.*, 2003; Liolios *et al.*, 2009).

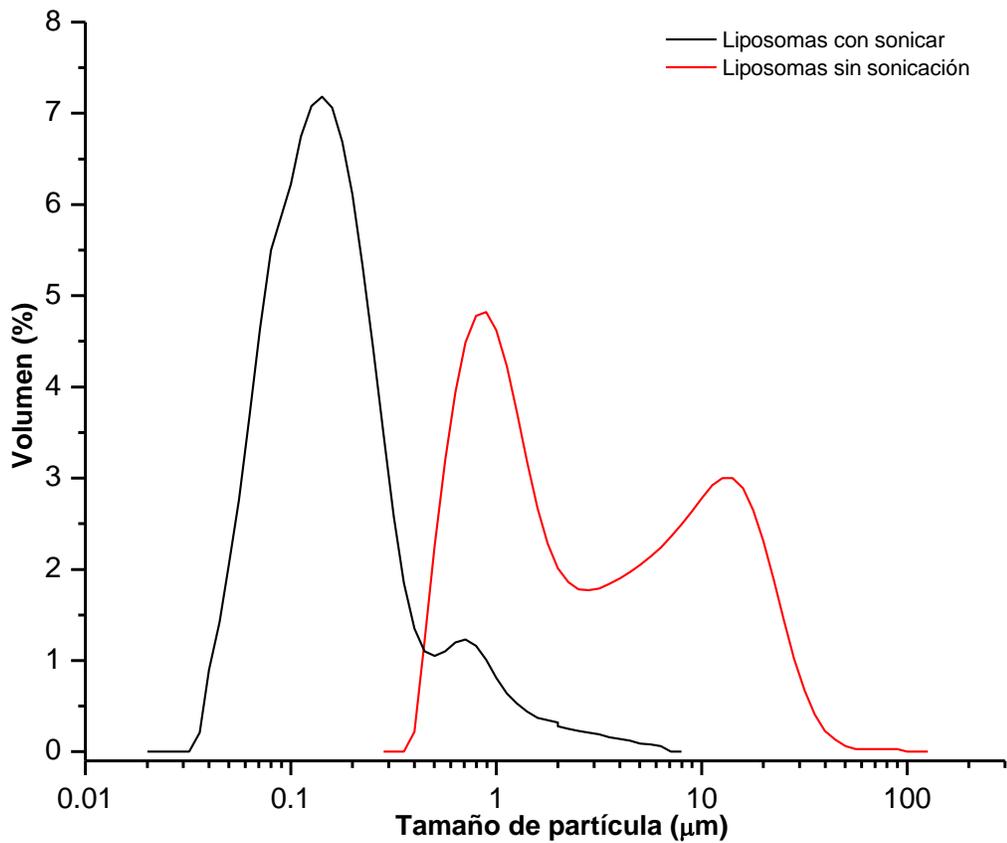
Tseng *et al.* (2007) clasificaron a las partículas liposomales en: vesículas unilamelares pequeñas (SUV), con un intervalo de tamaño de 0.03 a 0.2  $\mu\text{m}$  y vesículas unilamelares grandes (LUV), con un intervalo de tamaño de mayor a 0.5  $\mu\text{m}$ , pero menor de 1  $\mu\text{m}$ . En este trabajo, el 50 % del volumen de las partículas liposomales tuvo un diámetro inferior a  $0.14 \pm 0.0 \mu\text{m}$ .



**Figura 13. Micrografía óptica de las partículas liposomales sonicadas.**

La reducción del tamaño de partícula en los liposomas resulta de suma importancia para la elaboración de estructuras cocleato, puesto que se

incrementa la capacidad del volumen del compuesto a encapsular (Du Plessis *et al.*, 1994; Armengol y Estelrich, 1995) y acelera la fusión y deshidratación del liposoma inducida por los iones  $\text{Ca}^{2+}$  para la formación de la bicapa continua (Ramani y Balasubramanian, 2003). En contraste, la reducción del tamaño de las partículas liposomales resulta en un incremento de área superficial, lo cual aumenta la susceptibilidad de los fosfolípidos a la oxidación (Loveday y Singh, 2008).



**Figura 14. Distribución de tamaño de las partículas liposomales sometidas o no a sonicación.**

## **6.6 Estructuras cocleato**

### **6.6.1 Comportamiento de la conductividad eléctrica de la suspensión liposomal en función de la adición de iones calcio**

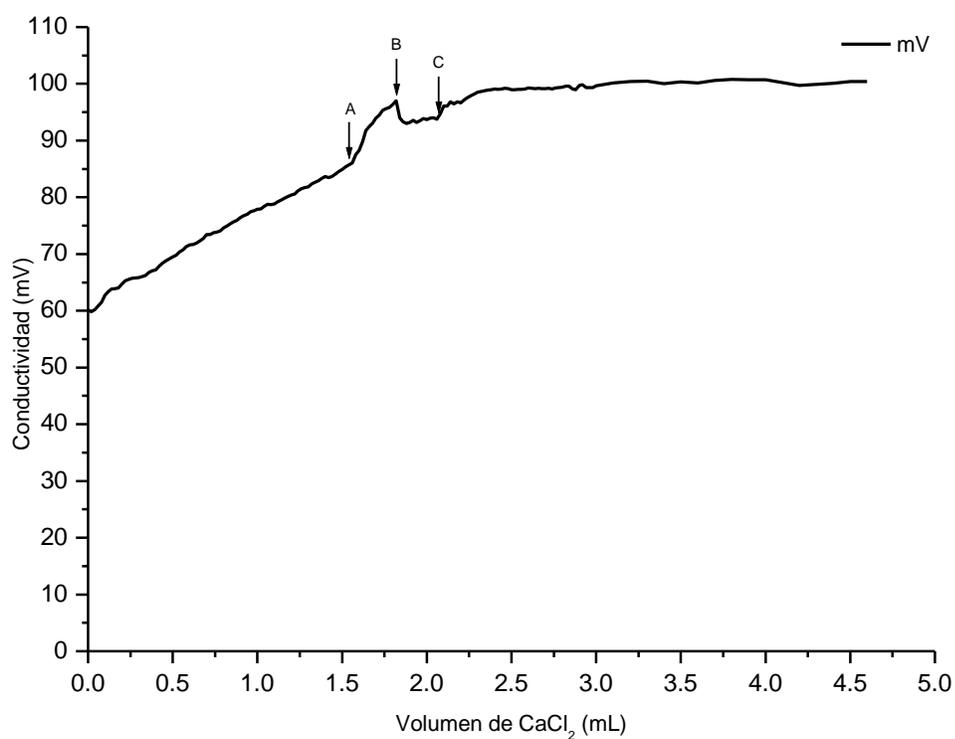
La adición de iones metálicos como el calcio induce al colapso y fusión de liposomas cargados negativamente, formándose grandes hojas lipídicas organizadas en bicapas las cuales espontáneamente se enrollan para dar origen a estructuras cocleato (Zarif y Tan, 2003).

Debido a que la transformación de las estructuras liposomales en estructuras cocleato depende de la presencia de iones calcio, y es evidenciada por la precipitación de estas últimas estructuras, mediante la saturación con iones calcio de las estructuras liposomales, la cantidad adecuada de iones calcio a agregar durante esta transformación puede ser determinada mediante conductividad eléctrica de la dispersión liposomal tras aplicar un campo eléctrico. En tanto la presencia de electrolitos altera la naturaleza de las interacciones coloidales entre los liposomas cargados, la conductividad eléctrica de la fase acuosa depende de la concentración de electrolitos presentes en la misma.

En la figura 15 se muestra el comportamiento de la conductividad eléctrica de la suspensión liposomal sonicada y con agitación magnética constante a 37 °C, en función del incremento de iones calcio. Sin la adición de cloruro de calcio, la dispersión coloidal mostró una conductividad de  $60.16 \pm 1.48$  mV; valor asociado a los grupos ionizables de los fosfolípidos y a los iones del buffer (TRIS-NaCl) (Bordi *et al.*, 2006; Chen, 2010). El incremento de la conductividad de la suspensión liposomal fue proporcional al incremento en volumen de cloruro de calcio en la dispersión hasta el punto A de la figura 15. En este

punto, con la adición de  $1.58 \pm 0.02$  mL de  $\text{CaCl}_2$  y una conductividad de  $87.57 \pm 1.82$  mV, la dispersión mostró un incremento importante en su viscosidad, adquiriendo una consistencia de gel; esta viscosidad pudiera estar relacionada con la fusión de los liposomas y la formación de la bicapa continua. Bordi *et al.* (2006) asocian un cambio en la conductividad eléctrica en los liposomas formados en NaCl en diversas concentraciones cuando éstos se fusionan y liberan su contenido hacia la solución dispersante; en tanto, McClements (2004), informa que el incremento de la viscosidad en una emulsión es conducido por la floculación de las gotas. La disminución de la conductividad a partir del punto B hasta el C, podría estar relacionada con la formación de la estructura cocleato, durante la cual una parte de iones  $\text{Ca}^{+2}$  son utilizados para el enrollamiento de la bicapa, quedando estos iones “encapsulados” en la estructura cocleato, la cual al ser una estructura impermeable al agua (Zarif y Mannino, 2000). La reducción de la cantidad de iones  $\text{Ca}^{+2}$  libres en la fase acuosa de la dispersión se refleja en la reducción de la conductividad eléctrica de la misma. Lidgate *et al.* (1993) informaron sobre la relación entre reducciones en la conductividad eléctrica de suspensiones liposomales con el incremento en el volumen de captura en el centro acuoso de estas estructuras. Después del punto C, el ligero incremento de la conductividad y su posterior mantenimiento se puede asociar al exceso de calcio que ya no es útil para la formación de estructuras cocleato y a que la dispersión ha alcanzado la conductividad máxima que puede ofrecer el cloruro de calcio a la concentración dada. Zarif *et al.* (2000), menciona que para la formación de estructuras cocleatos a partir de fosfatilserina es necesaria una relación molar lípido-calcio

de 2:1, reportando un gasto de 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{CaCl}_2$  para una dispersión de 10 mg de lípido por gramo; en esta investigación, el gasto para una concentración de 50  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  fue de 0.11 mL de cloruro de calcio, cantidad que resultó superior a la planteada por los investigadores antes mencionados; sin embargo, es justificable debido a que Los fosfolípidos y por lo tanto los liposomas, cuando tienden a pH básico y potenciales  $\zeta$  negativos, pueden encontrarse cargados negativamente (Marí y Jiménez-Torres, 1999), por lo que mayor carga positiva será necesaria para neutralizarlos.



**Figura 15. Comportamiento de la conductividad eléctrica de la suspensión liposomal, en función del volumen de cloruro de calcio agregado.**

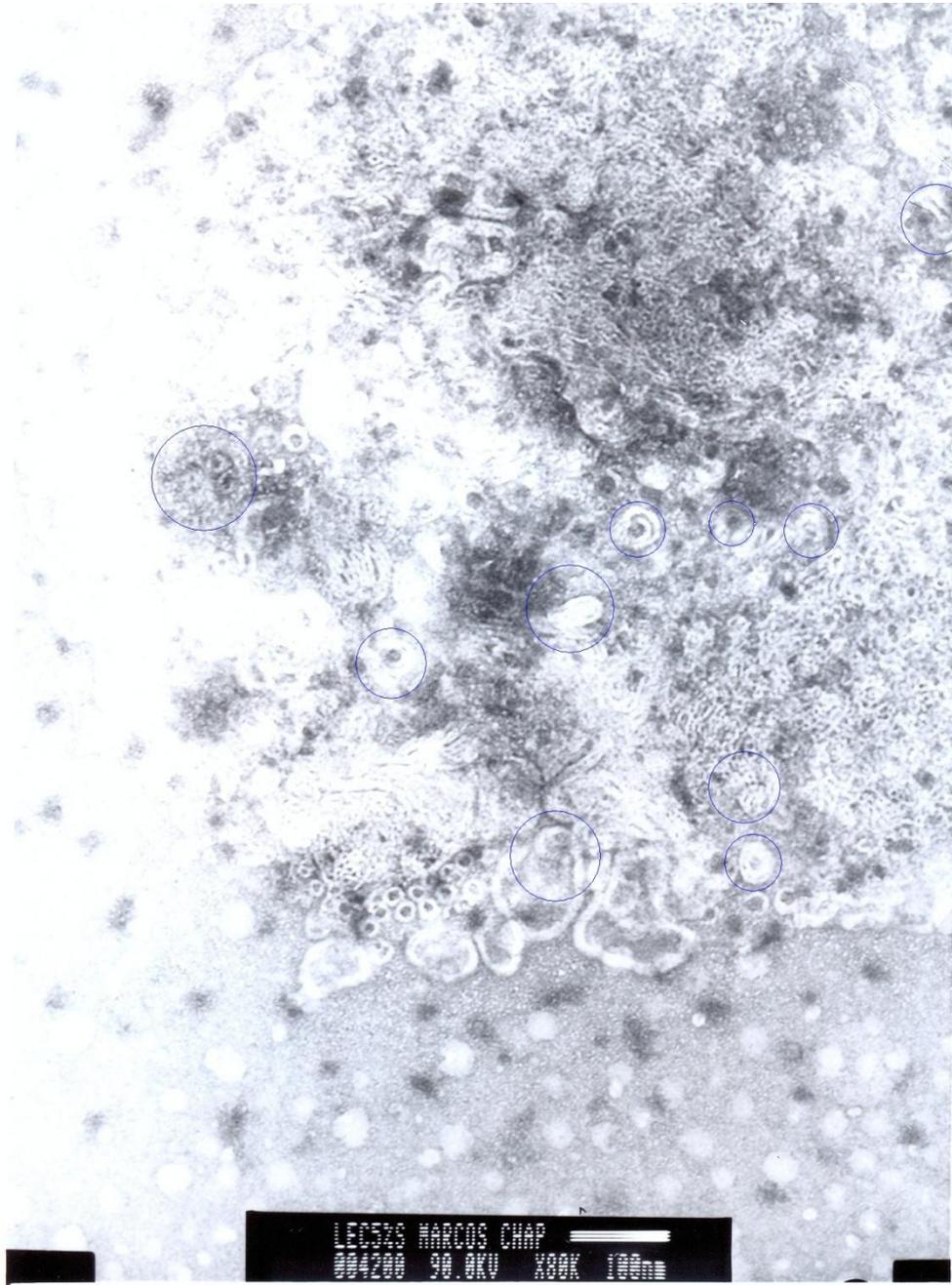
### 6.6.2 Microestructura

La microscopía electrónica provee herramientas para describir como un estructura particular está diseñada, y por lo tanto, cómo se relaciona con las propiedades del producto (Hermansson *et al.*, 2000). La figura 16, muestra la sección transversal de estructuras cocleato, que se muestran como agregados enrollados en una serie de capas sólidas que se enrollan a partir de un punto inicial para formar la estructura característica; así también se observaron algunas estructuras elongadas de diferentes tamaños consistentes con las imágenes de microscopia electrónica de cocleato informadas por diversos autores (Papahadjopoulos *et al.*, 1975; Zarif *et al.*, 2000; Evans y Zasadzinski, 2003; Syed *et al.*, 2008)

El análisis de las imágenes mostró una distribución de tamaño de la sección transversal que varía de 27.5 a 115 nm, con una media de  $72.8 \pm 12.5^1$  nm.

---

<sup>1</sup> Media aritmética para datos agrupados.



**Figura 16. Micrografía obtenida por microscopía electrónica de transmisión de las estructuras cocleato.**

## 7.0 CONCLUSIONES

- A partir de disoluciones de lecitina de soya en una concentración de 5 % p/v, se obtuvieron estructuras liposomales unilamelares, con un diámetro medio de distribución de volumen ( $d_{4,3}$ ) igual a 0.27  $\mu\text{m}$ .
- Se establecieron las condiciones de pH, temperatura y concentración de iones  $\text{Ca}^{2+}$ , tales que provocaron la transformación de las estructuras liposomales en estructuras cocleato con diámetros medios en su sección transversal de 72.8 nm.
- La metodología desarrollada para la formación de estructuras cocleato a partir de una fuente comercial de bajo costo de fosfolípidos, puede contribuir a la manufactura de nanoestructuras novedosas que sirvan como medio de transporte y de protección a moléculas nutraceuticas que se desee lleguen al consumidor a través de los alimentos.

## 8.0 BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre-Mandujano, E., Lobato-Calleros, C., Beristain, C. I., García, H. S., Vernon-Carter, E. J. 2009. Microstructure and viscoelastic properties of low-fat yoghurt structured by monoglyceride gels. *Food Science and Technology*, 42 (5): 938-944.
- Armengol, X., Estelrich, J. 1995. Physical stability of different liposome compositions obtained by extrusion method. *Journal of Microencapsulation*, 12 (5): 525-535.
- Ayala-Zavala, J., Villegas-Ochoa, M., del Toro-Sánchez, L., Álvarez-Parrilla, E., González-Aguilar, G. 2007. Microencapsulated essential oils: A natural option to preserve fruit quality and freshness. *Industria Alimentaria*, 29(5)12-20.
- Baeumner, A. 2004. Nanosensors identify pathogens in food. *Food Technology*, 58 (8):51-55.
- Bailey, A., Sullivan, S. 2000. Efficient encapsulation of DNA plasmids in small neutral liposomes induced by ethanol and calcium. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1468:239-252.
- Beldarraín, A. 2001. Aplicaciones de la Calorimetría Diferencial de Barrido al estudio de la estabilidad de las proteínas. *Bioteología Aplicada*, 18(1):10-16.
- Biltonen, R. L., Lichtenberg, D. 1993. The use of Differential Scanning Calorimetry as a tool to characterize liposome preparations. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64:129-142.
- Bordi, F., Cametti, C., Sennato, S., Viscomi, D. 2006. Conductometric evidence for intact polyion-induced liposome clusters. *Journal of Colloid and Interface Science*, 304:512–517

- Bummer, P. M. 2004. Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery-solid lipid nanoparticles. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier System*, 21:1-20.
- Carlucci, A. M., Cicconi-Vidal, M., Bregni, C. 2004. Las microemulsiones como vehículos para administración de drogas. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23(4): 550-557.
- Cerpa-Naranjo, A., Tartaj-Salvador, P., García-González, M. T., Garcell-Puyans, L, Serna-Pereda, C. J. 2000. Efecto de la concentración y naturaleza del electrolito sobre el potencial Z y el esfuerzo cortante inicial en suspensiones lateríticas. *Tecnología Química*, 20(3):52-62.
- Chapman, D., Urbina, J., Keough, K. 1974. Biomembrane phase transitions. *The Journal of Biological Chemistry*, 249 (8):2512-2521.
- Chen, H., Weiss, J., Shahidi, F. 2006. Nanotechnology in nutraceuticals and functional foods. *Food Technology*, 60 (3):30-36.
- Chen, S. B. 2010. Electrophoretic mobility of a spherical liposome. *Journal of Colloid and Interface Science*, 348:177-182.
- Chen, S. C., Sturtevant, J. M., Gaffney, B. J. 1980. Scanning calorimetric evidence for a third phase transition in phosphatidylcholine bilayers. *Proceedings of the National Academy of Science*, 77(9):5060-5063.
- De la Maza, A., Parra, J. C., Carrión, F. J. 1993. Permeability alterations in unilamellar liposomes due to betaine-type zwitterionic and anionic surfactant mixed systems. *Journal of the American Oil Chemists Society*, 70:685-691.
- De Luna, A. 2007. Composición y procesamiento de la soya para consumo humano. *Investigación y Ciencia*, 15 (37):35-44.
- Dwivedi, N., Arunagirinathan, M.A., Sharma, S., Bellare, J. 2009. Nanoferrite embedded magnetocochleate microstructures to encapsulate insulin macromolecules. *The Journal of Physical Chemistry B*, 113:13782-13787.

- Du Plessis, J., Ramachandran, C., Weiner, N., Müller, D. G. 1994. The influence of particle size of liposome on the deposition of drug into skin. *International Journal of Pharmaceutics*, 103:277-282
- Evans, C. C., Zasadzinski, J. 2003. Encapsulating vesicles and colloids from cochleate cylinders. *Langmuir*, 19:3109-3113
- Elsayed, A., Remawi, M. A., Qinna, N., Farouk, A., Badwan, A. 2009. Formulation and characterization of an oily-based system for oral delivery of insulin. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 73: 269-279.
- Fizman, S. M., Costell, E., Durán, L. 1983. Medida del comportamiento reológico de alimentos sólidos. *Revista de Agroquímica y Tecnología Alimentaria*, 23(3):303-309.
- Flach, C. R., Mendelsohn, R. 1993. A new infrared spectroscopic marker for cochleate phases in phosphatidylserine-containing model membranes. *Biophysical Journal*, 64:1113-1121.
- Franco, J. M., Muñoz, J., Gallegos, C. 1995. Transient and steady flow of lamellar liquid crystalline surfactant/water system. *Langmuir*, 11:669-673.
- Franco, J. M., Raymundo, A., Sousa, I., Gallegos C. 1998. Influence of processing variables on the rheological and textural properties of lupin protein-stabilized emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 3109-3115.
- González-Pérez, M. 2004. Los liposomas: usos y perspectivas. *Revista Cubana de Química*, 16(1):8-33.
- Gómez-Fernández, J. C. 1978. Las bases moleculares de la estructura de las biomembranas. *Anales de la Universidad de Murcia*, 36(1-4):189-206.
- Gould-Fogerite, S., Kheiri, M. T., Zhang, F., Wang, Z., Scolpino, J., Feketeova, E., Canki, M., Mannino, R. 1998. Targeting immune response induction with cochleate and liposome-based vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 32:237-287.

- Hafez, I. M., Cullis, P. R. 2001. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 47:139-148.
- Hancer, M., Patist, A., Kean, R. T., Muralidhara, H. S. 2002. Micellization and adsorption of phospholipids and soybean oil onto hydrophilic and hydrophobic surfaces in nonaqueous media. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 204: 31–41.
- Hammoudah, M. M., Nir, S., Isac, T., Kornhauser, R., Stewart, T. P., Hui, S. W., Vaz, W. L. C. 1979. Interactions of  $\text{La}^{3+}$  with phosphatidylserine vesicles binding, phase transition, leakage and fusion. *Biochimica et Biophysica Acta*, 558:338-343.
- Heertje, I., Roijers, E. C., Hendrickx, H. A. C. M. 1998. Liquid crystalline phases in the structuring of food products. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 31:387–396.
- Hermansson, A., Langton, M., Lorén, N. 2000. New approaches to characterizing food microstructures. Material Research Society Bulletin. [www.mrs.org/publications/bulletin](http://www.mrs.org/publications/bulletin), consultado 25-04-10.
- Hope, M. J., Bally, M. B., Mayer, L. D., Janoff, A. S., Cullis, P. R. 1986. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 40:89-107.
- Hu, Y. T., Boltenhagen, Ph., Pine, D. J. 1998. Shear thickening in low concentration solutions of wormlike micelles. 1. Direct visualization of transient behavior and phase transitions. *Journal of Rheology*, 42 (5):1185-1208.
- Jiménez-Márquez, A., Beltrán-Maza, G. 2003. Aplicación de la Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB) en la caracterización de aceite de oliva virgen. *Grasas y Aceites*, 54 (4):403-409.
- Koynova, R., Caffrey, M. 1998. Phases and phase transitions of the phosphatidylcholines. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1376:91-145.
- Langer, R., Peppas, N. A. 2003. Advances in biomaterials, drug delivery and bionanotechnology. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 49:2990-3006.

- Lanio, M. E., Luzardo, M. C., Laborde, R., Sánchez, O., Cruz-Leal, Sánchez, O., Cruz-Leal, Y., Pazos, F., Tejuca, M., Valle, A., Alonso, M. E., Fernández, L. E., Álvarez, C. 2009. Las vesículas liposomales: Obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomédica. *Revista Cubana de Física*, 26 (1):23-30.
- Leung, S. O., Ho, J. T. 1991. Effect of membrane phase transition on long-time calcium-induced fusion of phosphatidylserine vesicles. *Chemistry and Physics of Lipids*, 57:103-107.
- Lewis, M. J. 1987. *Physical properties of foods and food processing systems*. (1st. Ed.). Alemania: Ellis Horwood Ltd & Weinheim.
- Lidgate, D. M., Hegde, S. G., Maskiewicz, R. 1993. Conductivity measurement as a convenient technique for determination of liposome capture volume. *International Journal of Pharmaceutics*, 96:51-58.
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I. 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 112:77-83.
- Lobato-Calleros, C., Martínez-Torrijos, O., Sandoval-Castilla, O., Pérez-Orozco, J. P., Vernon-Carter, E. J. 2004. Flow and creep compliance properties of reduced-fat yoghurts containing protein-based fat replacers. *International Dairy Journal*, 14:777-782.
- Loveday, S. M., Singh, H. 2008. Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 19:657-668.
- Luykx, D., Peters, R., van Ruth, S., Bouwmeester, H. 2008. A review of analytical methods for the identification and characterization of nano delivery systems in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:8231-8247.
- Malisiova, F., Hatziantoniou, S., Dimas, K., Kletstas, D., Demetzos, C. 2004. Liposomal formulations from phospholipids of Greek almond oil.

Properties and biological activity. *Zeitschrift für Naturforschung*, 59:330-334.

- Mannino, R. J., Krause-Elsmore, S. L., Gould-Fogerite, S., Delmarre, D., Tan, F. 2005. Cochleate preparations of fragile nutrients. United States Patent Application Publication US 2005/0008686 A1.
- Marí, A. A., Jiménez-Torres, N. V. 1999. Formulación de unidades nutrientes parenterales. En Jiménez-Torres, N. V (Ed.) *Mezclas intravenosas y nutrición artificial*. (4ta. Ed.). (pp.469-501). Godella, Valencia: Convaser CEE.
- Márquez, R., Forgiarini, A., Bullon, J. 2007. *Emulsiones parenterales*. Cuaderno FIRP 5485-A. Universidad de los Andes, Mérida, Venezuela.
- Martínez-Montaño, M. L. C., Muñoz-Sánchez, J. L., Baeza-Ramírez, I. 2007. Asociación molecular y función del agente tensoactivo pulmonar de ternera. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*, 41(2):237-245.
- McClements, D. J. 2004. *Food emulsions: Principles, practices and techniques*. (2nd. Ed.) Boca Raton, FL: CRC Press.
- Medronho, B., Rodrigues, M., Miguel, M. G; Olsson, U., Schmidt, C. 2010. Shear-induced defect formation in a nonionic lamellar phase. *Langmuir*, 26 (13):11304-11313.
- Mezzenga, R., Meyer, C., Servais, C., Romoscani, A., Sagalowicz, L., Haywar, R. 2005. Shear rheology of lyotropic liquid crystals: A case study. *Langmuir*, 21:3322-3333.
- Miclea, R. D., Varma, P. R., Peng, A., Balu-Iyer, S. V. 2007. Development and characterization of lipidic cochleate containing recombinant factor VIII. *Bichimica et Biophysica Acta*, 1768:2890-2898.
- Mishra, R. K., Singhal, G. S. 1990. Calcium and magnesium induced changes in the relative fluidity of phosphatidylcholine liposomes. *Journal of Biosciences*, 3:193-197.
- Monzafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. E., Singh, H. 2006. Recent trends in the lipid-based

nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 86:2038-2045.

- Moraru, C. I., Panchapakesan, C. P., Huang, Q., Takhistove, P., Liu, S., Kokini, J. L. 2003. Nanotechnology: A new frontier in food science. *Food Technology*, 57(12):24-29.
- Muller, H. G. 1973. *Introducción a la Reología de los alimentos*. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
- Nieh, M., Katsaras, J., Qi, X. 2008. Controlled release mechanisms of spontaneously forming unilamellar vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778: 1467-1471.
- Ohline, S. M., Campbell, M. L., Turnbull, M. T., Kohler, S. J. 2001. Differential Scanning Calorimetric study of bilayer membrane phase transitions: A Biophysical Chemistry experiment. *Journal of Chemical Education*, 2001, 78(9), 1251-1256.
- Oke, M., Jacob, J. K., Paliyath, G. 2010. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. *Food Research International*, 43: 232–240.
- Omayma, E. S., Youssef, M. M. 2008. Applications of nanotechnology in food industry: an overview. *Alexandria Journal for Food Science and Technology*, 5:31-42.
- Palzer, S. 2009. Food structures for nutrition, health and wellness. *Trends in Food Science and Technology*, 20:194-200.
- Pautot, S., Frisken, B. J., Weitz, D. A. 2003. Production of unilamellar vesicles using an inverted emulsion. *Langmuir*, 19:2870-2879.
- Papahadjopoulos, D., Vail, W. J., Jacobson, K., Poste, G. 1975. Cochleate lipid cylinders: Formation by fusion of unilamellar lipid vesicles. *Biochimica et Biophysica Acta*, 394(3):483-491.
- Partal, P., Kowalski, A. J., Machin, D., Kiratzis, N., Berni, M. G., Lawrence, C. J. 2001. Rheology and microstructural transitions in the lamellar phase of cationic surfactant. *Langmuir*, 17(5):1331-1337.

- Pomeranz, Y. 1991. *Functional properties of food components*. (2nd. Ed.). San Diego, CA: Academic Press Limited, Inc.
- Rao, M. A. 1999. *Rheology of fluid and semisolid foods: Principles and applications*. (1st. Ed.) Gaithersburg, MA: Aspen Publishers Inc.
- Rao, M. A. 1986. *Engineering properties of foods*. (1st. Ed.) Nueva York, NY: Marcel Dekker Inc.
- Ramani, K., Balasubramanian, S. 2003. Fluorescence properties of Laurdan in cochleates phases. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1618: 67-78.
- Ramos, A., Ibartz, A. 2006. Comportamiento viscoelástico de pulpa de membrillo en función de la concentración de sólidos solubles. *Ciencia e Tecnología de Alimentos*, 26(1):214-219.
- Ré, M. I. 1998. Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology*, 16: 1195-1126.
- Rodriguez-Abreu, C., Acharya, D. P., Aramaki, K., Kunieda, H. 2005. Structure and rheology of direct and reverse liquid-crystal phases in a block copolymer/water/oil system. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 269:59-66.
- Rosenthal, J. A. 2001. *Textura de los alimentos medida y percepción*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Rossi, M. 2007. Use of lecithin and lecithin fractions. In *Bioactive egg compounds* (pp. 229–238). Berlin Heidelberg: Springer Publication.
- Sagalowicz, L., Leser, M. E., Watzke, H. J., Michel. M. 2006. Monoglyceride self-assembly structures as delivery vehicles. *Trends in Food Science and Technology*, 17:204-214.
- Santangelo, R., Paderu, P., Delmas, G., Chen, Z., Mannino, R., Zarif, L., Perlin, D. 2000. Efficacy of oral cochleate-amphotericin B in a mouse model of systemic candidiasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44:2356-2360.
- Schaupp, K., Polzer, J., Kerbl, J., Lanthaler, K., Davis, S., Washington, C. 1991. Emulsión estable apropiada para la administración

farmacéutica, procesamiento para su obtención y emulsión para la aplicación como medicamento. Oficina Española de Patentes y Marcas. No. Patente ES2064801.

- Schneider, M., Virmani, K. 2001. Phospholipids. En J. Young (Ed.). *Guide to functional food ingredients* (pp. 276–291). Londres: Leatherhead Publishing.
- Stahl, P. H. 1996. Drug solubilization with organic solvents, surfactants and lipids. En C. G. Wermuth (Ed.) *The practice of medicinal Chemistry* (pp.631-648)(2nd. Ed.). Londres: Academic Press.
- Steffe, J. F. 1996. *Rheological methods in food process engineering*. (2nd. Ed.). East Lansing, MI: Freeman Press.
- Svenson, S. 2004. Controlling surfactant self-assembly. *Current Opinion in Colloid and interface Science*, 9:201-212.
- Syed, U. M., Woo, A., Plakogiannis, F., Jin, T., Zhu, H. 2008. Cochleates bridged by drug molecules. *International Journal of Pharmaceutics*, 363:118-125.
- Tabilo-Munizaga, G., Barbosa-Cánovas, G. V. 2005. Rheology for the food industry. *Journal of Food Engineering*, 67:147-156.
- Takahashi, M., Inafuku, K., Miyagi, T., Oku, H., Wada, K., Imura, T., Kitamoto, D. 2007. Efficient preparaton of liposomes encapsulating food materials using lecithins by a mechanochemical method. *Journal of Oleo Science*, 56:35-42.
- Taylor, T. M., Davidson, P. M., Bruce, B. D., Weiss, J. 2005. Ultrasonic spectroscopy and differential scanning calorimetry of liposomal encapsulated nisin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53-8722-8728.
- Taylor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D., Weiss, J. 2007. Characterization of antimicrobial-bearing liposomes by  $\zeta$ -potential, vesicle size and encapsulation. *Food Biophysics*, 2:1-9.

- Tseng, L., Liang, H., Chung, T., Huang, Y., Liu, D. 2007. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 27(1):29-34.
- Verkleij, A. J., De Kruijff, B., Ververgaert, P. H. J.Th., Tocanne, J. F., Van Deenen, L. L. M. 1974. The influence of pH, Ca<sup>2+</sup> and protein and the thermotropic behaviour of the negatively charged phospholipid, phosphatidylglycerol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 339:432-437.
- Villafuerte, L., García, B., Garzón, M., Hernández, A., Vázquez, M. 2008. Nanoparticulas lipídicas sólidas. *Revista Mexicana de Ciencias Farmaceuticas*, 39:38-52.
- Were, L. M., Bruce, B. D., Davidson, P. M., Weiss, J. 2003. Size, stability, and entrapment efficiency of phospholipid nanocapsules containing polypeptide antimicrobial. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:8073-8079.
- Yager, P., Schoen, P. E., Davies, C., Price, R., Singh, A. 1985. Structure of lipids tubules formed from a polymerizable lecithin. *Biophysical Journal*, 48:899-906.
- Yang, J. 2002. Viscoelastic wormlike micelles and their applications. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 7:276-281.
- Yañez, J., Salazar, J., Chaires, L., Jimenez, J., Márquez, M., Ramos, E. 2002. Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21: 313-319.
- Zarif, L. 2003. Nanocochleates cylinders for oral and parenteral delivery of drugs. *Journal of Liposome Research*, 13:109-110.
- Zarif, L., Mannino, R. 2000. Cochleates: Lipid-based vehicles for gene delivery-concept, achievements and future development. En H. Kluber (Ed.). *Cancer Gene Therapy: Past achievements and future challenges*.(pp.83-93.) Nueva York, NY: Plenum Publishers.
- Zarif, L., 2002. Elongated supra-molecular assemblies in drug delivery. *Journal of Control Release*, 81:7–23.

- Zarif, L., Graybill, J. R., Perlin, D., Najvar, L., Bocanegra, R., Mannino, R. J. 2000. Antifungal activity of amphotericin B cochleates against *Candida albicans* infection a mouse model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(6):1463-1469.
- Zarif, L., Tan, F. 2003. Cochleates made with purified soy phosphatidylserine. U. S. patent: US 2003/ 0219473 A1.