

Capítulo 8

Liposomas como Nanotransportadores de Antioxidantes y Estudio de Tasa de Liberación

Matilde Villa-García¹, Eduardo San Martin-Martinez¹,
Ruth Pedroza-Islas²

¹Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, México.

²Universidad Iberoamericana, México.

maty_vg@yahoo.com.mx, sanmartinedu@hotmail.com,
ruth.pedroza@uia.mx

Doi: <http://dx.doi.org/10.3926/oms.294>

Referenciar este capítulo

Villa-García, M., San Martin-Martinez, E., & Pedroza-Islas, R. (2015). *Liposomas como Nanotransportadores de Antioxidantes y Estudio de Tasa de Liberación*. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: OmniaScience. 215-254.

Resumen

Actualmente, se ha visualizado que los complementos alimenticios del futuro seguirán la tendencia de la nanoencapsulación aplicada, generándose productos nuevos, con características determinadas como por ejemplo, erradicación de incompatibilidades, solubilización o enmascaramiento de sabores u olores desagradables y protección de compuestos activos sensibles a condiciones físicas y químicas adversas. Con respecto a los compuestos activos aplicables en alimentos, los retos a enfrentar son la inclusión, osmolaridad, biodisponibilidad, estrés térmico y oxidativo durante el procesamiento y almacenamiento, insolubilidad de compuestos liposolubles, degradación enzimática y condiciones de acidez durante el tracto gastrointestinal.

Los alimentos funcionales donde se incorporan los nanoencapsulados pueden proporcionar un efecto benéfico para la salud además de contribuir a la nutrición, ejemplo de ellos son aquellos que contienen de manera natural o a los que se les ha adicionado un ingrediente funcional nanoencapsulado como los ácidos grasos, carotenoides, flavonoides, isotiocianatos, fenoles, polioles, fitoestrógenos, minerales, vitaminas, sustancias biológicamente activas como probióticos, fitoquímicos y antioxidantes.

Los antioxidantes al ser sustancias capaces de neutralizar a los radicales libres causantes de los procesos de envejecimiento y de algunas otras enfermedades, que por la incapacidad del cuerpo de neutralizarlos obliga a recurrir a alimentos que los contengan para tratar de contrarrestar sus efectos negativos.

Podemos encontrar antioxidantes y disponer de ellos en frutas, verduras u hortalizas las cuales son ricas en betacarotenos, vitamina C, licopeno, glutatión, clorofila, vitamina E, ácido linolénico (ω -3) y flavonoides. Sin embargo estos compuestos son sensibles a factores físicos, químicos y/o enzimáticos por lo cual sus propiedades pueden minimizarse e incluso anularse.

Ante ello se han desarrollado y usado nuevos sistemas de estabilización que permiten proteger y prolongar el tiempo de vida de una sustancia con el objetivo de mejorar su eficacia, los sistemas más utilizados para proteger y controlar la liberación de compuestos activos son los sistemas de secuestro matricial y sistemas de encapsulación.

Los liposomas pertenecen al sistema de encapsulación y han demostrado ser eficientes en la captación, protección y biodisponibilidad de una gran variedad de sustancias activas hidrosolubles, liposolubles o anfifílicas. Estos sistemas pueden desarrollarse dependiendo de la naturaleza y uso del compuesto activo a través de diversos métodos, entre los más comunes se encuentran: evaporación en fase reversa (REVs) e hidratación de película – Bangham, los cuales generan liposomas unilamelares o plurilamelares respectivamente a escala micro o nanométrica.

Así, las investigaciones sobre encapsulación a escala micro y nano están desarrollando estudios de compatibilidad con los nutrientes a encapsular, pruebas de estabilidad y capacidad de atrapamiento así como su vectorización dentro de nuestro organismo. Estas investigaciones se han incrementado en los últimos años generándose oportunidades de innovación en el área de alimentos.

En este capítulo se describirán las características, eficiencia de atrapamiento, estabilidad y liberación de compuestos activos,

antioxidantes oleosos (β -caroteno) y acuosos (antocianinas de zarzamora), en liposomas elaborados por REVs en comparación con los obtenidos por el método de Bangham.

Palabras clave

Nanoencapsulación, liposomas, antioxidantes, β -caroteno y antocianinas.

1. Introducción

Actualmente se ha visualizado que los complementos alimenticios del futuro seguirán la tendencia de la nano encapsulación aplicada, generándose productos nuevos, con características determinadas como por ejemplo, erradicación de incompatibilidades, solubilización o enmascaramiento de sabores u olores desagradables y protección de compuestos activos (CA) sensibles a condiciones físicas y químicas adversas, (Fathi, Mozafari & Mohebbi, 2012; Mangematin & Walsh, 2012). Con respecto a los CA aplicables en alimentos, los retos a enfrentar son la inclusión, osmolaridad, estrés térmico y oxidativo durante el procesamiento y almacenamiento, insolubilidad de compuestos liposolubles, degradación enzimática, condiciones de acidez durante su paso a través del tracto gastrointestinal y su biodisponibilidad (BA) (Shimoni, 2009).

Con respecto a la BA y la absorción de nutrimentos la eficiencia es mayor cuando son transportados por vehículos lipídicos como los liposomas, los cuales son vesículas compuestas por fosfolípidos organizados en bicapas. Estas vesículas poseen una fase acuosa interna y están suspendidas en una fase acuosa externa, pueden encapsular en su estructura moléculas o CA de carácter hidrosoluble, liposoluble o anfifílicos ya sea de forma conjunta o separada (Sharma-Vijay, Mishra, Sharma & Srivastava, 2010). Son de gran ayuda como protectores y transportadores de sustancias y CA que presentan problemas de solubilidad o son sensibles a factores físicos, químicos, degradativos y de desactivación (sistema inmunológico) (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010; Fathi et al., 2012; Hollmann, Delfederico, Glikmann, De Antoni, Semorile & Disalvo, 2007). Además presentan biocompatibilidad, biodegradabilidad y no toxicidad (Luzardo, Martínez, Calderón, Álvarez, Alonso, Disalvo et al., 2002).

Si bien estos sistemas han sido extensamente estudiados y usados en el área farmacéutica, actualmente sus fundamentos y resultados han servido como plataforma para los tecnólogos de alimentos que han empezado a utilizarlos (Murillo, Espuelas, Prior, Vitas, Renedo, Goñi-Leza et al., 2001; Yañez,

Salazar, Chaires, Jimenez, Marquez & Ramos, 2002), siendo el diseño y la innovación un reto para aplicaciones específicas como por ejemplo:

- Mejoramiento notorio en el sabor amargo y/o ácido de productos alimenticios mejorando su palatabilidad.
- Distribución uniforme de sustancias solubles en grasa, tales como ciertas vitaminas y antioxidantes, que generalmente no son compatibles con productos a base de agua.
- Protección de nutrimentos de la oxidación prematura y de la degradación ácida o enzimática en el estómago e intestino (Parra, 2010; Suñe, 2002).
- Liberación de contenido cuando los liposomas hayan alcanzado una temperatura predeterminada o valor de pH.
- Marcadores de ciertos tejidos o tipos de células utilizando lípidos para formar la doble capa de un liposoma.
- Aumento de la absorción intestinal cubriendo los liposomas con elementos complementarios externos.
- Entrega de nutrimentos a células, sin embargo, esto es un desarrollo relativamente reciente (Murillo et al., 2001; Sharma-Vijay et al., 2010).

2. Liposomas en el Área de Alimentos

En los alimentos existen naturalmente muchos componentes nutritivos, y a menudo en mínimas cantidades ejercen un efecto benéfico sobre nuestro organismo. En muchos casos el alcanzar los beneficios, depende de la bioaccesibilidad y la biodisponibilidad por lo que las investigaciones en alimentos están realizando un esfuerzo por aumentar o mantener sus contenidos (Shimoni, 2009). Los liposomas, como sistemas de encapsulación, pueden ayudar a este reto. Algunas de las aplicaciones de estos sistemas lipídicos en alimentos han sido reportados por Taylor, Weiss, Davison y Bruce (2005) en el cual citan estudios como:

- Encapsulación de lactoferrina, nisina y un polipéptido antimicrobiano para incrementar la vida de anaquel de productos lácteos.
- Fosvitina atrapada en liposomas para inhibir la oxidación de lípidos en una variedad de productos lácteos y carne molida de cerdo.
- Encapsulación de vitamina C, donde el liposoma mantiene el 50% de su actividad después de 50 días de almacenamiento refrigerado mientras que la no encapsulada perdió su actividad después de 19 días.

Por otro lado Santiago (2005) empleando liposomas, logró encapsular hierro para la fortificación de Téjate deshidratado (Bebida refrescante de Oaxaca, Méx.) para evitar enfermedades como la anemia ferropénica la cual es originada por la deficiencia de hierro en la dieta o por su baja biodisponibilidad.

En maduración de quesos (manchegos), se han empleado liposomas con diferentes enzimas para obtener una característica específica por ejemplo, quesos blandos y menos elásticos (liposomas con quimosina), quesos firmes y elásticos (liposomas con proteinasa de *B. subtilis*) o quesos con sabor intenso (liposomas con cinarasas) (Picon, 1994).

También, se ha estudiado, la estabilidad de los liposomas cubiertos con proteínas de capa-S (PCS) provenientes de *Lactobacillus* utilizados en alimentos lácteos. Estos sistemas fueron expuestos con y sin la presencia de PCS a factores del tracto gastrointestinal (TGI) y los resultados obtenidos indicaron que los liposomas cubiertos con la proteína tienen mayor protección durante su trayecto por el TGI (Hollmann et al., 2007).

Puede entonces afirmarse que los liposomas tienen un gran potencial como vehículos y sistemas de liberación de CA incorporados en materiales alimenticios (Takahashi, Uechi, Takara, Asikin & Wada, 2009), lo cual significa un renacimiento prometedor de la investigación de los liposomas, en este caso en aplicaciones en diversos productos alimenticios, lo que mejorará las propiedades nutritivas, sensoriales y fisicoquímicas, en un futuro cercano (Sharma-Vijay et al., 2010).

3. Liposomas como Nanotransportadores de Compuestos Activos (CA)

La nanotecnología es una área interdisciplinaria de investigación y desarrollo de sustancias o dispositivos en rangos nanométricos (Reza-Mozafari, Johnson, Hatziantoniou & Demetzos, 2008), es un campo relativamente nuevo de investigación, sin embargo, avanza rápidamente en áreas de ciencia y tecnología creando nanomateriales para tratamientos médicos, investigación agrícola, restauración ambiental, aplicaciones energéticas y alimentación (Molins, 2008). En esta última se están realizando diversas investigaciones, entre las que se encuentran el estudio de las características nanométricas sobre la estructura, textura y calidad de los alimentos, desarrollo de nano sensores para monitoreo (transporte, almacenamiento y trazabilidad), envases con propiedades antimicrobianas, liberación de fármacos en puntos específicos y nanoencapsulación de componentes de alimentos (Chaudhry, Scotter, Blackburn, Ross, Boxall, Castle et al., 2008).

Con respecto a las aplicaciones, la nanoencapsulación se ha hecho presente en la incorporación, absorción o dispersión de compuestos bioactivos (Bouwmeester, Dekkers, Noordam, Hagens, Bulder, de Heer et al., 2009), los cuales pueden depositarse en interfaces de emulsiones para mejorar su estabilidad (Prestidge & Simovic, 2006), de esta manera se obtienen sistemas transportadores para encapsulación de compuestos de sabor-aroma, nutracéuticos o sistemas elásticos para el empaque de alimentos (Sozer & Kokini, 2009). La ventaja de estas aplicaciones han tenido impacto sobre la estabilidad del material encapsulado a condiciones ambientales, enzimáticas, químicas, temperatura, fuerza iónicas, enmascaramiento de olores o sabores no deseados (Yurdugul & Mozafari, 2004).

Los nanotraportadores desarrollados en la industria alimentaria son elaborados a base de hidratos de carbono, proteínas o lípidos. Sin embargo, los primeros no tienen un gran potencial a escala debido a que es necesario aplicar diferentes productos químicos o tratamientos de calor que no son del todo controlados. Por otra parte, los vehículos basados en lípidos tienen una

mayor posibilidad de producción industrial así como una mayor eficiencia de encapsulación y baja toxicidad. Entre los sistemas lipídicos encapsulantes más prometedores se encuentran nanopartículas lipídicas solidas (SLNs), transportadores lipídicos nanoestructurados (NLCs), nanoemulsiones y nanoliposomas (Fathi et al., 2012), en los cuales se han logrado encapsular compuestos activos insolubles (Cheong, Tan, Man & Misran, 2008; Jafari, Assadpoor, Bhandari & He, 2008), enzimas (Rao, Chawan & Veeramachaneni, 1994), vitaminas (Gonnet, Lethuaut & Boury, 2010), antimicrobianos (Malheiros, Daroit & Brandelli, 2010) y minerales (Arnaud, 1995).

En específico, a los nanoliposomas y liposomas, se les han atribuido ventajas tales como la biocompatibilidad, biodegradabilidad, posibilidad de producción a gran escala, eficacia de atrapamiento, facilidad de entrega y liberación de fármacos, genes de diagnóstico, ingredientes hidrosolubles, liposolubles, anfífilicos (Drulis-Kawa & Dorotkiewicz-Jach, 2010; Fathi et al., 2012; Hollmann et al., 2007), además de su capacidad de direccionamiento, lo que significa que puede adaptarse, entregar y liberar su carga en un sitio específico dentro y fuera de sistemas *in vivo* (Fricker, Kromp, Wendel, Blume, Zirkel, Rebmann et al., 2010; Navarro, Cabral, Malanga & Savio, 2008). Si bien los liposomas han demostrado ser eficientes en diversos procesos, las futuras investigaciones deberán enfocarse a su producción segura y escalada a bajo costo, así como demostrar el verdadero potencial de liposomas y nanoliposomas para mejorar la calidad y la seguridad de una amplia variedad de productos alimenticios (Reza-Mozafari et al., 2008).

4. Biodisponibilidad y Entrega Liposomal de Nutrientos

La biodisponibilidad (BA) la cual se define como la fracción y la velocidad en que se absorbe un ingrediente activo o fracción activa de un fármaco y se hace disponible en el sitio de acción (FDA, 2000; Gaete, Solís, Venegas, Carrillo, Schatloff & Saavedra, 2003). En específico para alimentos, la BA considera el efecto de los alimentos en la liberación y absorción de la sustancia, realizando un comparativo entre los productos a estudio y los de

referencia, considerando la concentración y actividad de los compuestos activos más importantes y viables analíticamente, evaluados por métodos *in vitro* o *in vivo*. La liberación del CA de los sistemas coloidales a las células puede darse por cuatro mecanismos principales (Figura 1), los cuales son:

1. **Absorción:** Adherirse a la superficie de la pared celular y posteriormente difundirse lentamente al interior de las células y liberando los compuestos activos.
2. **Fusión:** Se funde con la pared celular y liberar su contenido al interior de la célula.
3. **Endocitosis:** Paso de la vesícula (liposoma) al interior de la célula, una vez dentro se rompe el liposoma y el compuesto activo es liberado.
4. **Intercambio de lípidos:** Entre la pared celular y la bicapa lipídica del liposoma liberando los CA al interior.

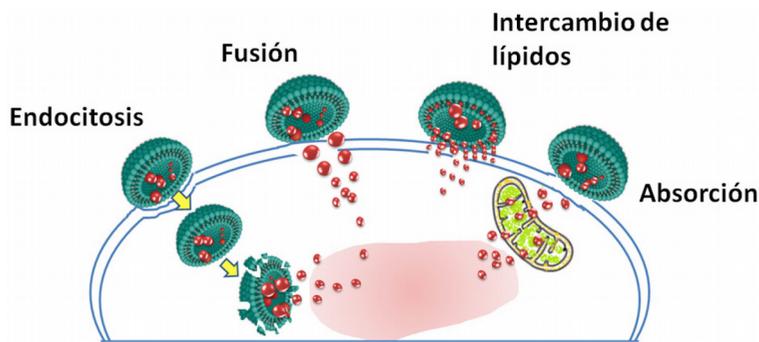


Figura 1. Liberación de los CA de los liposomas a las células

Las etapas que interfieren en la BA son: El desarrollo de un mecanismo de administración que encapsule al CA, insertarlo en el torrente sanguíneo y liberarlo en un punto de interés específico para un máximo efecto. En relación a cápsulas o recubrimientos, los liposomas pueden considerarse como buenos candidatos para mejorar la BA de sustancias activas, nutrientes e ingredientes activos (hidrófilos, hidrófobos y anfífilos) con baja solubilidad para su internalización en membranas celulares; estos sistemas coloidales son capaces de circular por la sangre, atravesar la piel, anclarse o traspasar

mucosas para inducir una respuesta celular determinada o liberar un CA debido a la similitud que tienen con las células (Navarro et al., 2008). También pueden adherirse a la mucosa intestinal, prolongar tiempos de residencia, mejorar o potencializar características terapéuticas y proteger de la degradación enzimática del tracto gastrointestinal (Frézard, Schettini, Rocha & Demicheli, 2005). Ante esto último, se ha encontrado que la encapsulación en liposomas proporciona a los nutrimentos diversas ventajas de BA entre las que se encuentran:

- La transportación y distribución inmediatamente a través del sistema digestivo.
- Asimilación, sin necesidad de romperlos digestivamente.
- Absorción a través del intestino delgado y ser transportados de manera intacta a través del flujo sanguíneo para posteriormente ser metabolizados por las células que los necesitan sin ser sujetos a la degradación digestiva.

Por ejemplo, en estudios realizados con respecto a la BA de la Curcumina, un aditivo alimentario y especie con propiedades potenciales anti-metástasis fue evaluada, formulándose en liposomas los cuales fueron administrados en forma oral a ratas, los resultados mostraron que los sistemas tuvieron una evidente BA, rápida velocidad y gran extensión de absorción, además de una alta actividad antioxidante (Takahashi et al., 2009).

Los liposomas también han sido desarrollados para mejorar la BA oral de CA poco absorbibles mediante el uso de ácido fólico como mediador de captación. El ácido fólico fue acoplado a la superficie del liposoma conteniendo cefotaxima, posteriormente se administró a ratas, obteniéndose un mejoramiento en su BA por lo cual podría considerarse que el acoplamiento de ácido fólico puede ser útil para la suplementación oral por medio de un sistema de liberación liposomal (Ling, Yuen, Magosso & Barker, 2009).

La BA también se ha medido en fosfolípidos a nivel plasma y suero en diversos individuos, donde los ácidos grasos contenidos en los eritrocitos son el mejor indicador de su BA en tejidos. En otro estudio, la administración de

aceites de pescado, oliva y de Krill antártico (*Euphausia superba*) a un grupo de personas, se observó que este último tiene mayor BA reportando altos niveles de EPA y DHA. Por otra parte, un estudio *in vitro* con células de pulmón de rata reportó una mayor respuesta de ácidos grasos en forma de fosfolípidos (García & Agüero, 2015).

5. Liposomas, Aspectos Generales

Los liposomas son vesículas esféricas que contienen una o varias bicapas fofolipídicas concéntricas con compartimientos acuosos alternados (Ball, 1995; De la Maza & Parra, 1993; Frézard et al., 2005; Lanio, Luzardo, Laborde, Sánchez, Cruz-Leal, Pazos et al., 2009). Su formación se produce de manera espontánea cuando moléculas anfifílicas (Figura 2a) como los fosfolípidos se mezclan con agua; su parte polar interacciona con el agua y las cadenas laterales (ácidos grasos) lo hacen con sus homólogos moleculares para formar bicapas (Figura 2b) en las cuales se pueden depositar sustancias lipofílicas y mientras que en la cavidad interna con característica polar, puede situarse agua o sustancias hidrofílicas (Castro, 1999; Clares, 2003; Navarro et al., 2008).

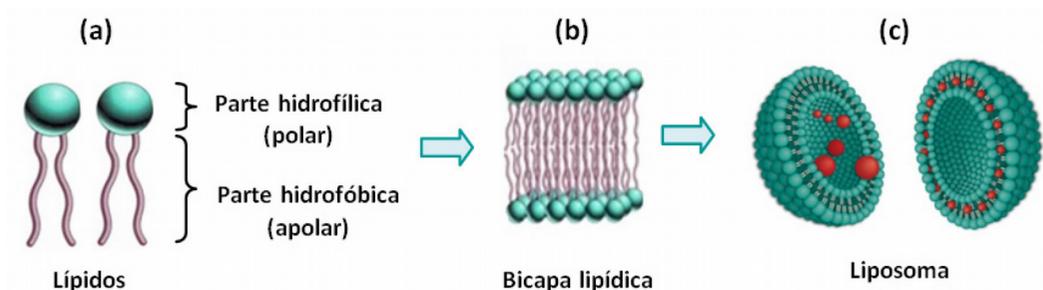


Figura 2. Molécula anfifílica (a), Formación de la bicapa (b), Liposoma (c)

Los liposomas convencionales, típicamente están constituidos de fosfolípidos y colesterol, los primeros son lípidos anfipáticos y presentan una estructura similar a los triglicéridos. Están compuestos por una molécula de glicerol a la que se ensamblan 2 ácidos grasos de diferente longitud y grado de

instauración en las posiciones 1 y 2. En la posición 3 posee una molécula de ácido orto fosfórico al cual puede estar unida una, serina, etanol amina, ciclo inositol, cefalina o una colina, generándose estructuras específicas (García & Agüero, 2015).

Las lecitinas o fosfatidilcolinas pertenecen al grupo de los glicerofosfolípidos y son las comúnmente empleadas para la elaboración de liposomas por ser el principal lípido estructural en membranas biológicas y biomédicas, pueden ser obtenidas de manera sintética o de fuentes naturales: animales (yema de huevo) o vegetales (granos de soya) (Kotyńska & Figaszewski, 2007).

La lecitina de soya posee 21% de fosfatilcolina, 22% de fosfatidiletanoalmina y un 19% de fosfatidilinositol, su parte hidrofóbica se une a la cabeza polar hidrofílica que puede contener un grupo fosfato o algunas unidades de azúcares originando de esta manera la estructura de los liposomas (Lanio et al., 2009; Navarro et al., 2008). Es considerada como un agente tensoactivo no tóxico, aprobado por la FDA (Food and Drug Administration de los EEUU) para el consumo humano, con el estatus GRAS (Generally Recognized As Safe). Se utiliza comercialmente como emulsionante o como revestidor de productos farmacéuticos, además de ser ampliamente usada en el ámbito farmacéutico debido a que disminuye la concentración de colesterol y triglicéridos en el organismo (Iwata, Kimura, Tsutsumi, Furukawa & Kimura, 1993; Jimenez, Scarino, Vignolini & Mengheri, 1990).

Publicaciones recientes demuestran el potencial de los liposomas basados en fosfolípidos para mejorar la BA de CA poco solubles, incluyendo péptidos y proteínas (El-Nesr, Yahiya & El-Gazayerly, 2010; Navarro et al., 2008; Zou, Sun, Zhang & Xu, 2008). Liposomas compuestos de fosfatidilcolina de soya hidrogenada (HSPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), demostraron que son sistemas adecuados para la liberación de vacunas orales, además indican que su presencia en las formulaciones mejoran su estabilidad y las protegen de la descomposición enzimática, otros ejemplos, demuestran que la presencia de fosfolípidos en formulaciones orales pueden alterar la BA retardando su liberación (Fricker et al., 2010).

Por otra parte, el colesterol molécula de ciclopentanoperhidrofenantreno ($C_{27}H_{46}O/C_{27}H_{45}OH$), es un lípido esteroide, constituido por cuatro carbocíclicos condensados o fundidos, posee una cabeza polar constituida por el grupo hidroxilo y una porción apolar formada por los anillos condensados y sustituyentes alifáticos, debido a esta característica es una molécula hidrófoba con una solubilidad en agua de 10^{-8} M y al igual que otros lípidos, es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo.

Puede ser incluido en liposomas como un “aditivo” hasta una concentración molar del 50% para mejorar las características de las bicapas incrementar su microviscosidad, aumentar la rigidez de las membranas en “estado cristalino” (se inserta en las cadenas lipídicas, originando un aumento en el empaquetamiento y una disminución de la permeabilidad y fluidez) y reducir la rigidez de las membranas que no están en “estado gel” (se inserta junto a las cabezas polares, aumentando la permeabilidad y fluidez de las cadenas) (Elsayed, Abdallah, Naggar & Khalafallah, 2007; Frézard et al., 2005; Sharma-Vijay et al., 2010).

6. Métodos de Síntesis de Liposomas

6.1. Liposomas Plurilaminares – Método Bangham

Atendiendo a las características estructurales, en particular al número de bicapas y al tamaño, los liposomas pueden clasificarse en vesículas multilamelares o unilamelares (Ball, 1995; Frézard et al., 2005; Lanio et al., 2009; Navarro et al., 2008). Las vesículas multilamelares, consisten en varias lamelas concéntricas entre las cuales se encuentran volúmenes acuosos; son apropiadas para la incorporación de CA con características hidrofílicas. Los CA se depositan en el interior de las membranas y pueden ser lentamente liberados en el sitio específico (Navarro et al., 2008). Este tipo de liposomas pueden obtenerse mediante el método Bangham (Figura 3), el cual consiste en solubilizar lípidos en un disolvente orgánico y obtener una película delgada por rota-evaporación, la cual es posteriormente rehidratada.

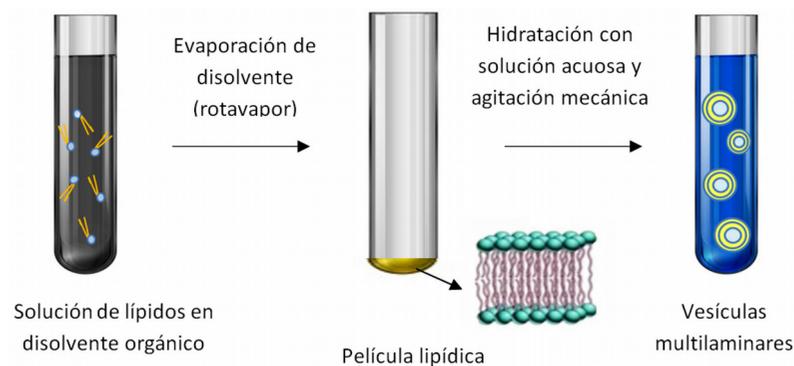


Figura 3. Método de preparación de liposomas tipo MLV (Bangham), basados en el proceso de hidratación de película lípidos

Para un mejor control de lamelaridad y homogeneidad del tamaño de los liposomas obtenidos por este método, es posible aplicar a la suspensión heterogénea un procedimiento de extrusión, el cual consiste en usar membranas de policarbonato para filtrar la solución; el número de veces que se repita esta operación, así como el diámetro de poro determina la lamelaridad y la dispersión de tamaños de la suspensión final de liposomas.

6.2. Liposomas Unilaminares – Método REVs

En 1978, Szoka y Papahadjopoulos desarrollaron un procedimiento de preparación de liposomas al que denominaron “evaporación en fase reversa”, mediante el cual se pueden obtener vesículas con un espacio central acuoso más voluminoso. En este método se parte de una disolución de los fosfolípidos en un solvente orgánico los cuales se mezclan con una fase normalmente acuosa, esta mezcla se emulsifica obteniéndose una suspensión de micelas invertidas, posteriormente se elimina el solvente lo que produce, al mismo tiempo, una agregación de micelas que conduce a la formación de una estructura tipo gel, la cual se rompe cuando se incrementa el grado de vacío aplicado para lograr la completa eliminación del disolvente (Figura 4).

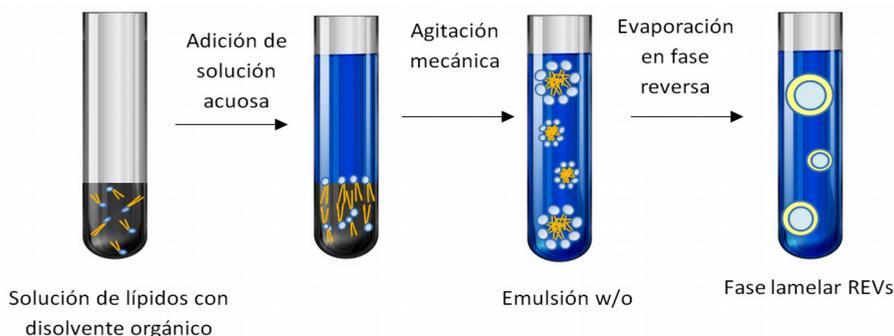


Figura 4. Método de preparación de liposomas del tipo REVs, basado en el proceso de evaporación en fase reversa

En este proceso las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan lo suficientemente cerca unas de otras, como para dar lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas. Las vesículas formadas de esta manera son de tipo uni u oligolaminar, con un tamaño medio alrededor 500 nm aunque bastante heterogéneo. Las vesículas formadas son adecuadas para moléculas hidrosolubles, donde la meta es lograr un alto valor en la relación del volumen de atrapamiento-lípido. Una desventaja es la debilidad mecánica de su única membrana, que puede llevar a su ruptura y pérdida parcial de material, así como representar una tenue barrera para compuestos hidrosolubles.

Ambos métodos se han utilizado para encapsular innumerables CA, con diferentes fines, entre los que se encuentran: transportadores de antimicrobianos, anticancerígenos, agentes quelantes, antibióticos, hormonas, antiinflamatorios, analgésicos, antifúngicos, antineoplásicos, inmunosupresores, así como para administraciones específicas: oral, tópica o respiratoria, además de usarse como marcadores de diagnóstico, o para terapias enzimáticas.

El factor común que persiguen estos sistemas transportadores, es la eficiencia de atrapamiento y estabilidad del CA, lo que puede ser afectado por el tipo de liposoma (convencional, niosoma, catiónicos, recubiertos, etc.), método de elaboración (formulación, procesos de homogenización) y condiciones de almacenamiento (Xia & Xu, 2005). Además debe destacarse, a fin de obtener un porcentaje de incorporación, estabilidad, biodistribución,

estructura y liberación del principio activo el método de preparación debe ser diseñado y optimizado específicamente para cada tipo de sustancia activa (Navarro et al., 2008).

7. Compuestos Activos o Fitoquímicos

Los compuestos activos (CA) o fitoquímicos son definidos como: compuestos que tienen una actividad biológica dentro del organismo, traducida en un efecto benéfico para la salud, actualmente se están promoviendo para aliviar diversas enfermedades, en lugar de los productos farmacéuticos alópatas, tan así que la FDA ha publicado un documento orientado a “productos botánicos con ingredientes activos” con el fin de promover el desarrollo de productos derivados de fuentes naturales. En este ámbito solo dos productos se han registrado y en la actualidad hay muchos productos de origen natural en desarrollo clínico, que se encuentran en vía de registro del Producto Botánico, como fitofármacos que se emplearán para el tratamiento de cáncer, enfermedades inflamatorias y otros padecimientos (Dai, Gupte, Gates & Mumper, 2009).

Dentro de los compuestos activos se encuentran los antioxidantes, que estabilizan los radicales libres que el cuerpo humano produce, la presencia en exceso de estas especies reactivas pueden generar estrés oxidativo y con ello la degeneración del DNA, enfermedades cardiovasculares, disfunción de los procesos mentales, cataratas y la aparición de ciertos tipos de cáncer y tumores (Wang, Ishida & Kiwada, 2007). Como contraparte los efectos benéficos que ejercen los CA antioxidantes sobre la salud humana son: protección del sistema cardiocirculatorio, reducción de la presión sanguínea y riesgos de cáncer, regulación de índice glucémico y colesterolemia, mejoradores de la respuesta inmune, entre otros.

Podemos encontrarlos en proporciones abundantes en frutas, verduras, bacterias (ácido lácticas) y verduras fermentadas. Entre los más reconocidos por sus efectos terapéuticos se encuentran: los isotiocianatos, flavonoides, monoterpenos (D-limoneno, D-carvona), organosulfurados (alildisulfuro),

isoflavonas, lignanos, saponinas, polifenoles y carotenoides (Patras, Brunton, Da Pieve & Butler, 2009; Serraino, Dugo, Dugo, Mondello, Mazzon, Dugo et al., 2003; Tavares, Figueira, Macedo, McDougall, Leitão, Vieira et al., 2012). Un grupo importante de los polifenoles son los flavonoides, los cuales se caracterizan por ser solubles en agua; ejemplo de ellos son las chalconas, los taninos condensados, las flavonas, los flavonoles, los flavanoles y las antocianidinas (Bowen-Forbes, Zhang & Nair, 2010; Kaume, Gilbert, Brownmiller, Howard & Devareddy, 2012).

7.1. β -Caroteno – Antioxidante Lipofílico

El β -Caroteno, (Figura 5a), pertenece al grupo de los carotenoides, se encuentra fundamentalmente en vegetales (zanahoria, tomate, piña, cítricos), flores y semillas (achiote), este así como sus isómeros (α , γ) son compuestos del tipo polienos, con dobles enlaces conjugados (Respetro, 2007), presenta un espectro de absorción entre los 400 y 500 nm, su estructura posee un carácter extremadamente hidrofóbico y muestra una pobre BA en forma cristalina (Ribeiro & Cruz, 2004).

El β -caroteno, α -caroteno y β -criptoxantina, son precursores de la vitamina A y poseen actividad antioxidante lo cual provoca un interés creciente en estos compuestos para aplicaciones terapéuticas. Estudios epidemiológicos han demostrado una asociación entre niveles elevados de carotenoides en la dieta o en la sangre y un efecto protector contra el desarrollo de enfermedades crónicas como ciertos tipos de cáncer, enfermedades cardiovasculares, degenerativas de la mácula y cataratas (Macías, Schweigert, Serrano, Pita, Hurtienne, Reyes et al., 2002), aumentan la eficiencia del sistema inmune, inhiben la oftomutagénesis, actúan como protectores a la radiación ultravioleta y reducen las probabilidades de ataques cardíacos (Bjelakovic, Nikolova, Gluud, Simonetti & Gluud, 2007).

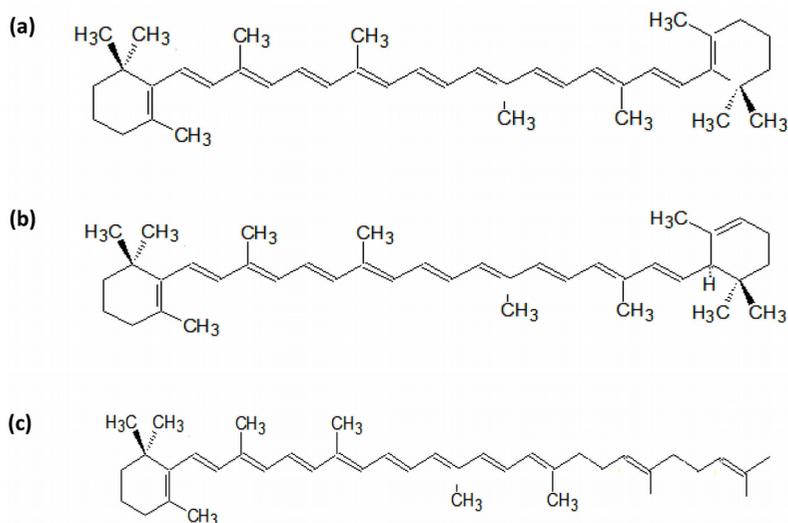


Figura 5. Estructuras del β -Caroteno (a) y sus isómeros α (b), γ (c)

7.2. Antocianinas de Zarzamora (*Rubus Fruticosus*) – Antioxidante Hidrofílico

Las antocianinas son el grupo más importante de compuestos hidrosolubles, responsables de los colores rosa, rojo, púrpura y azul que se aprecian en flores, frutas y verduras. Se localizan principalmente en la piel de las verduras (col y cebolla morada) y frutas tales como: manzanas, peras (Salinas, Rubio & Diaz, 2005) y bayas; estas últimas, han sido ampliamente reconocidas como una gran fuente de compuestos bioactivos fenólicos, entre los que se encuentran: taninos, ácidos fenólicos y flavonoides (Wu, Frei, Kennedy & Zhao, 2010).

Dentro de las bayas se encuentran las zarzamoras, que poseen una alta cantidad de antocianinas, siendo la cianidina-3-glucósido (Figura 6) la predominante (Bowen-Forbes et al., 2010; Kaume et al., 2012; Patras et al., 2009), comparada con las que poseen la grosella y la frambuesa (Pantelidis, Vasilakakis, Manganaris & Diamantidis, 2007; Wang & Lin,

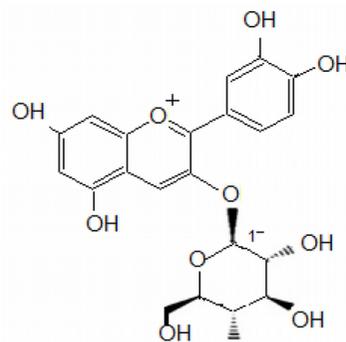


Figura 6. Cianidina-3-glucosido

2000). Por ello la zarzamora es considerada como una importante fuente de antioxidantes.

Como antioxidante o pro oxidante, las antocianinas de la zarzamora pueden ejercer efectos benéficos como antiinflamatorios o quimioprotectores. En un artículo publicado por Dai et al. (2009) se citan diversos estudios prometedores sobre el efecto de estas antocianinas, entre los que se encuentran, la protección de células CaCo-2 de la apoptosis inducida por radicales peróxido, generación de ciclos redox de especies de oxígeno reactivas para disminuir radicales libres, rompimiento oxidativo de la cadena de DNA, generación de sustancias peroxidantes, así como efectos antiproliferativos en células de cáncer (Kaume et al., 2012).

También han mostrado tener diversas bioactividades, tales como: efecto protector contra la disfunción endotelial e insuficiencia vascular in vitro (Serraino et al., 2003), inhibición de cáncer de colon, protector contra el aumento de peso e inflamación asociados con la menopausia (Dai et al., 2009; Kaume et al., 2012). Incluso el interés sobre ellas se ha intensificado debido a sus propiedades farmacológicas y terapéuticas. Por ejemplo, durante el paso del tracto digestivo al torrente sanguíneo, las antocianinas permanecen intactas y ejercen efectos terapéuticos entre los que se encuentran: reducción de la enfermedad coronaria, efectos anticancerígenos, antitumorales, antiinflamatorios y mejoramiento del comportamiento cognitivo (Garzon, 2008; Li, Lim, Lee, Kim, Kang, Kim et al., 2012; Miyazawa, Nakagawa, Kudo, Muraishi & Someya, 1999; Pedreschi & Cisneros-Zevallos, 2007). Sin embargo, a pesar de los grandes beneficios y su poder antioxidante las antocianinas en la dieta presentan una baja BA (Mazza, Kay, Cottrell & Holub, 2002; Wu, Cao & Prior, 2002).

Por lo anteriormente descrito los CA como el **β -caroteno** y las **antocianinas** presentan diversos beneficios en la salud para la prevención de enfermedades, sin embargo son sensibles a factores físicos y químicos originando que sus efectos sean mínimos o nulos. Estos compuestos pueden ser protegidos y potencializar sus efectos con el uso de técnicas de microencapsulación en liposomas, los cuales han demostrado su potencial

como transportadores y protectores de moléculas de fármacos e ingredientes activos aumentando su estabilidad en condiciones deletéreas ambientales incluso las del tracto gastrointestinal. Estudios realizados por Villa, Pedroza y San Martín (2013) comparando dos métodos de elaboración de liposomas (Bangham y REVs) encapsulando las mismas sustancias activas y determinando su eficiencia de atrapamiento y tasa de liberación en fluidos gastrointestinales simulados, observaron que estos sistemas son viables para la conservación de las propiedades antioxidantes.

8. Evaluación de los Liposomas Conteniendo Antioxidantes

Se caracterizaron los CA (β -caroteno y antocianinas) por cromatografía de líquidos de Alta Resolución (HPLC). Los liposomas fueron elaborados por dos tipos de métodos: Bangham y REVs; fueron cargados de manera separada con los CA liposolubles e hidrosolubles, finalmente a las estructuras lipídicas generadas se les determinó la eficiencia de atrapamiento y la tasa de liberación en condiciones gastrointestinales simuladas. Para la dirección e interpretación de los liposomas obtenidos por ambos métodos se utilizó la siguiente nomenclatura, L: Liposoma, B: Método Bangham, R: Método REVs, β : Beta caroteno y A: Antocianinas.

8.1. Espectros de Absorción de los Compuestos Activos por HPLC

Estudios realizados por Villa et al. (2013) reporta que la señal espectral del β -caroteno obtenido por HPLC empleando una fase móvil compuesta por MeOH:Isopropanol:Acetonitrilo (10:80:10 v/v), obtuvo un tiempo de retención (TR) de 4.34 minutos similar al que reportan Olives, Cámara, Sánchez, Fernández y López (2006). Para las antocianinas, extraídas de zarzamora purificadas usando cromatografía preparativa obtuvo el compuesto puro de Cianidina-3-glucósido, su análisis en HPLC generó un TR de 2.37 minutos utilizando como fase móvil: Acetonitrilo: MeOH: Ac. Acético: Ac. Tricloro Acético (8.3: 3.3: 17.0: 0.06 v/v), el TR obtenido fue muy similar al reportado

por Dóka, Ficzek, Bicanic, Spruijt, Luterotti, Tóth et al. (2011) con una señal a los 2.27 minutos. Para el cálculo de la concentración de los compuestos activos encapsulados en los liposomas, con el tiempo de retención de cada CA elaboro curvas en función de la variación de la concentración. El gráfico del modelo ajustado a los datos experimentales tienen un coeficiente de determinación de $R^2=0.998$ y $R^2=0.987$ para β -caroteno y antocianinas respectivamente.

8.2. Liposomas Sintetizados por el Método de Bangham con β -Caroteno y Antocianinas

El análisis por HPLC para determinar la concentración de encapsulación de las muestras con β -caroteno y del material no encapsulado en los liposomas se muestra en la Figura 7. Las diferentes concentraciones del β -caroteno encapsulado (0.6-3.0 mg/ml) en los liposomas, muestra que la cantidad retenida es proporcional a la concentración.

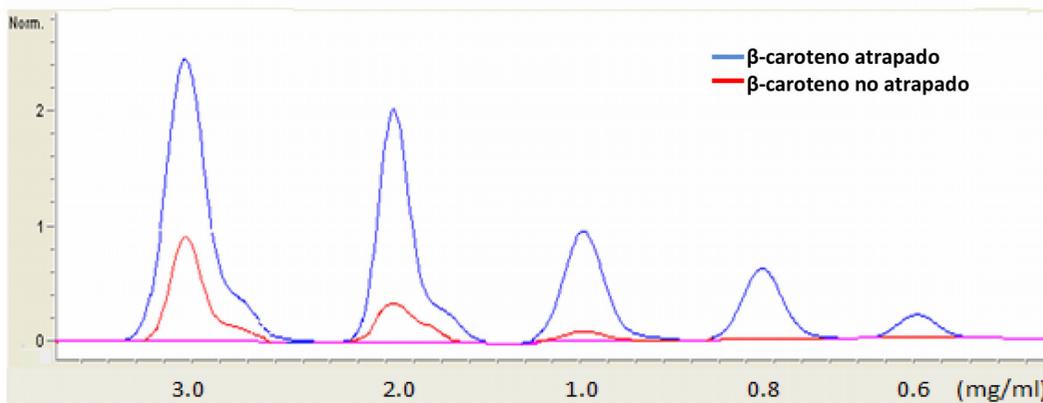


Figura 7. Espectros de eficiencia de atrapamiento del CA por HPL; β -caroteno atrapado (-), no atrapado (-)

Por el cálculo de las áreas de los espectros se observa que a concentraciones de 3.0-1.0 mg de β -caroteno existe una proporción de material que no fue capturado (49.11 – 46.27%). Por otra parte, a concentraciones de 0.8-0.6 mg de β -caroteno no se exhibieron espectros del material no atrapado sugiriendo

que el β -caroteno fue capturado completamente (Tabla 1). Por lo anterior, se consideró que 0.8 mg de β -caroteno correspondía a la máxima cantidad de CA que el liposoma consiguió atrapar.

Tabla 1. Eficiencia de encapsulación de los liposomas

Concentración (mg)	β -caroteno (%)		Concentración (μ l)	Antocianinas de Zarzamora (%)	
	Atrapado	No atrapado		Atrapado	No atrapado
0.6	100.00	0.00	20	98.54	1.456
0.8	100.00	0.00	40	99.37	0.622
1.0	50.89	49.11	60	99.85	0.150
2.0	51.46	48.54	80	99.59	0.410
3.0	53.73	46.27	–	–	–

Con respecto al atrapamiento de las antocianinas, los espectros por HPLC originados poseen un comportamiento similar a los de β -caroteno. La Tabla 1, muestra los porcentajes de antocianinas atrapado, puede observarse que las concentraciones 20, 40 y 80 μ l de antocianinas presentaron los porcentajes más altos de material no atrapado y la concentración de 60 μ l exhibió un porcentaje mayor de atrapamiento (99.85%) sobre un 0.150% del no capturado por lo cual se determinó que la adición de 60 μ l de antocianinas era la máxima concentración que el liposoma podía atrapar.

8.2.1. Tamaño y Potencial Zeta de Liposomas con Los Compuestos Activos

Una vez determinada la concentración adecuada de β -caroteno y antocianinas que los liposomas podían soportar para cada sistema, los

liposomas fueron caracterizados determinando el tamaño y potencial zeta a través de la movilidad electroforética por Zetasizer Nanoseries ZS90 (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) a 20°C (Tabla 2).

Tabla 2. Tamaño y potencial zeta de los liposomas cargados con β -caroteno

Liposoma	Diámetro (nm)	Potencial Zeta (ζ -mV)
LB β	95.40 \pm 0.30	-42.4 \pm 0.49
LBA	98.28 \pm 0.27	-49.1 \pm 0.37
LBCTROL	95.13 \pm 0.51	-59.5 \pm 0.29

LB β = Liposoma con β -caroteno; LBA = Liposoma con antocianinas; LBCTROL = Liposoma sin CA.

Las mediciones derivadas por DLS (Barrido de Luz Dinámica) indican que existe similitud entre los tamaños de los liposomas cargados y el control (sin CA), puede observarse que la incorporación del CA en las vesículas aumenta el tamaño del liposoma, tal y como se muestra en la Tabla 2, el liposoma LBCTROL posee un diámetro menor (95.13 nm) comparado con LB β y LBA (95.40 y 98.2 respectivamente). Entre estos últimos, LBA posee un mayor diámetro que LB β , esta diferencia puede atribuirse a la naturaleza del núcleo (hidrofílico) el cual favorece la solubilidad de la antocianina generando una expansión en el tamaño del liposoma, además de la hidratación sucesiva de material lipídico para formar las multicapas. Por otra parte, comparando el tamaño del LBCTROL y LB β , el CA se deposita en el interior de la capa lipídica provocando su “relajamiento” generándose de esta manera una ligera reducción en su estabilidad y aumento de tamaño. Este comportamiento es similar a lo reportado por Liu y Guo (2007) al elaborar liposomas para encapsular fármacos con diferente polaridad. Con respecto al potencial ζ , ambos CA de forma individual poseen carga positiva antes de su encapsulación en liposomas, siendo el β -caroteno el que ligeramente posee mayor valor en relación con el de la antocianina (2.93 mV y 2.57 mV respectivamente). Cuando los CA se incorporan en liposomas producen una

reducción del potencial ζ , las antocianinas alcanzan un potencial de -49.1 mV y LB β -42.4 ± 0.49 mV, debido a la interacción electrostática con los componentes del liposoma (fosfatidilcolina) tal y como lo indica Xia y Xu (2005) al cargar liposomas con sulfato ferroso.

8.2.2. Tasa de Liberación de los Compuestos Activos en Fluido Gástrico Simulado (FGS) y Fluido Intestinal Simulado (FIS)

Se comparó la digestibilidad de los liposomas con diferentes CA (Villa et al., 2013), los liposomas cargados con β -caroteno fueron sometidos a una digestión simulada de FGS durante 60 minutos (Figura 8a), puede observarse que los liposomas fueron afectados de forma inmediata al inicio de la simulación gástrica manteniéndose constante la concentración del CA durante los primeros 60 minutos. Posteriormente en presencia de fluido intestinal simulado (FIS) se observó una disminución de la concentración del CA en forma escalonada, este comportamiento sugiere que a medida que las capas del liposoma se encuentran en contacto con las enzimas, se degradan de manera secuencial y los CA son susceptibles al estrés intestinal disminuyendo su actividad.

El comportamiento inicial puede explicarse considerando las condiciones ácidas (pH 1.2) las cuales favorecen la transferencia del compuesto lipofílico (β -caroteno) de las micelas al medio acuoso tal y como lo reporta Wang, Liu, Mei, Nakajima y Yin (2012) al evaluar la transferencia de β -caroteno en un modelo de digestión *in vitro*. Con respecto al comportamiento escalonado después de los 60 minutos, este puede ser equiparable a lo reportado por Liu, Ye, Liu, Liu y Singh (2012) quienes observaron que a medida que los liposomas estaban en contacto con el FIS su bioaccesibilidad era marcadamente deteriorada, debido al incremento y decremento del tamaño de las vesículas que finalmente eran destruidas. Estos cambios son atribuidos a la hidrólisis de los fosfolípidos por las enzimas pancreáticas así como a la interacción de las sales biliares con los componentes de los liposomas. Específicamente, la lipasa pancreática cataliza la hidrólisis de un enlace de ácido graso del fosfolípido liberando ácidos grasos y 1-acil lisofosfolípido. Con

respecto a la presencia de las sales biliares, estos funcionan como detergentes rompiendo la integridad liposomal y forma micelas después de un largo tiempo de exposición, dando por resultado la disminución del tamaño (Hu, Li, Decker, Xiao & McClements, 2011; Liu et al., 2012).

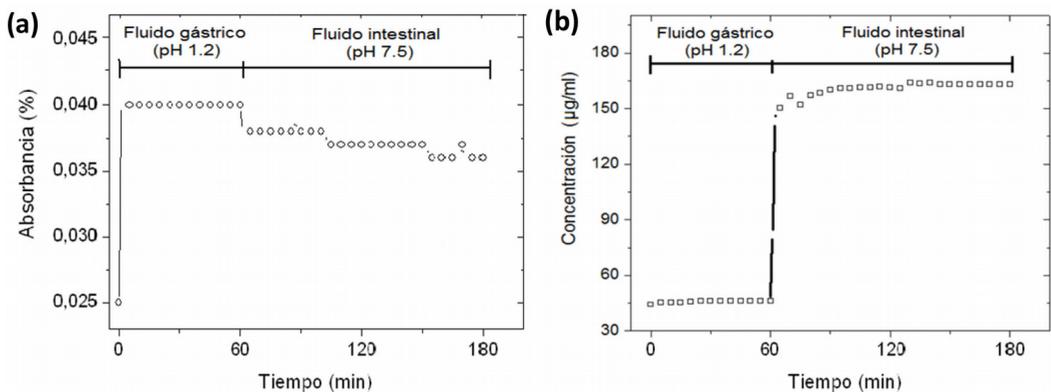


Figura 8. Liberación del β -caroteno (a) y antocianinas (b) a condiciones gastrointestinales simuladas

Por otra parte los resultados obtenidos de los liposomas con antocianinas (Figura 8b) indicaron que los liposomas fueron estables durante la exposición a FGS ya que no mostraron presencia de la concentración del CA, este comportamiento es equiparable a las antocianinas de col morada expuestas a condiciones gástricas por McDougall, Fyffe, Dobson y Stewart (2007). Posteriormente para continuar con el proceso digestivo simulado se adicionó el FIS. Los resultados derivados mostraron la susceptibilidad del lípido a la enzima (lipasa) dando como resultado la repentina y notable presencia de CA manteniéndose estable hasta el final de la prueba intestinal, este comportamiento fue ligeramente similar en los estudios realizados por Hu et al. (2011). La estabilidad del compuesto cianidina-3-glucósido en condiciones intestinales es respaldado por la investigación de Felgines, Texier, Besson, Fraisse, Lamaison y Rémésy (2002) al encontrar restos de este compuesto en su forma glucósido metilado y ácidos fenólicos en heces de ratones suplementados con extracto de zarzamora liofilizado.

8.3. Liposomas REVs con β -Caroteno y Antocianinas

Los liposomas se cargaron a diferentes concentraciones de CA, el análisis espectral por HPLC (Figura 9) sugiere que 0.8-0.6 mg de CA representan la máxima cantidad de β -caroteno que el liposoma puede atrapar (Villa et al., 2013).

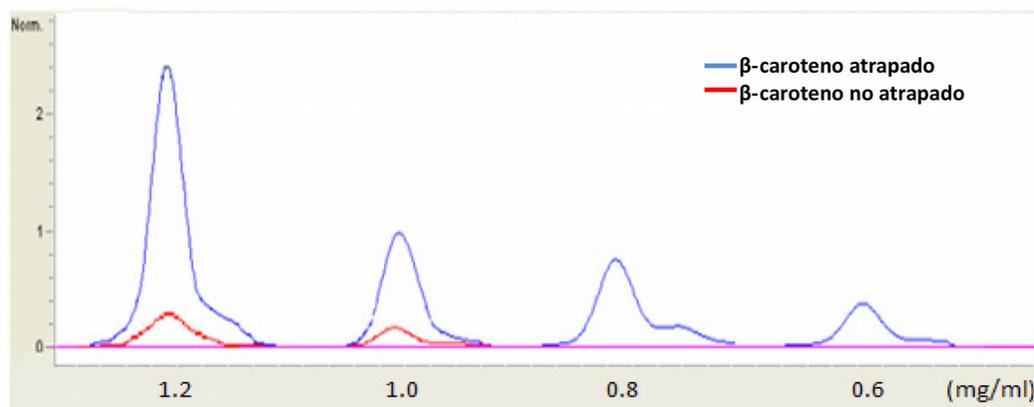


Figura 9. Espectros de eficiencia de atrapamiento del CA por HPLC; β -caroteno atrapado (-), no atrapado (-)

Por otra parte, a concentraciones de 1.0-1.2 mg de CA no se exhibieron espectros del material no atrapado sugiriendo que el β -caroteno está presente en mínimas concentraciones o cantidades despreciables (Tabla 3). Por lo anterior, se consideró que 0.8 mg de β -caroteno representó la máxima cantidad de CA que el liposoma consiguió atrapar al igual que el método de Bangham.

Con respecto a las antocianinas, las señales originadas mostraron que la concentración de 80 μ l presentó un 29.10% de material no encapsulado, por otra parte, la adición de 60 μ l de antocianinas al liposoma fue la máxima proporción que el sistema lipídico pudo atrapar (77.32%), esto se dedujo porque en la porción eluida de las columnas con sefadex-25 existía una cantidad menor de CA que el sistema no capturó (22.68%), por lo tanto esta concentración se consideró como la adecuada para cargar a los liposomas que posteriormente fueron caracterizados.

Tabla 3. Eficiencia de encapsulación de los liposomas

Concentración (mg)	β -caroteno (%)		Concentración (μ l)	Antocianinas de Zarzamora (%)	
	Atrapado	No atrapado		Atrapado	No atrapado
0.6	100.00	0.00	20	25.43	74.56
0.8	100.00	0.00	40	41.80	58.19
1.0	50.45	49.55	60	77.32	22.68
2.0	60.07	39.93	80	70.90	29.10
3.0	66.17	33.83	–	–	–

8.3.1. Tamaño y Potencial Zeta de Liposomas con los Compuestos Activos

Una vez determinada la concentración adecuada de β -caroteno y antocianinas que los liposomas podían soportar para cada sistema por el método REVS, los liposomas generados se caracterizaron determinando el tamaño y potencial zeta, los resultados se muestran en la Tabla 4. Puede observarse que LRA presentó un aumento de tamaño (147.6 nm) con respecto al control (98.52 nm) debido a la presencia del compuesto hidrofílico que se aloja en el núcleo del liposoma (Navarro et al., 2008). Por otra parte la muestra LR β fue la que más aumentó de volumen (225.7 ± 0.30) con respecto al LRCONTROL (98.52 ± 0.51). Posiblemente el incremento se debe a que una vez formada la bicapa principal la fosfatidilcolina libre forman multicapas y el CA se deposita en su interior provocando un relajamiento y aumento de tamaño (Liu & Guo, 2007).

Tabla 4. Tamaño y potencial zeta de los liposomas cargados con β -caroteno, método REVS

Liposoma	Diámetro (nm)	Potencial Zeta (ζ-mV)
LR β	225.7 \pm 0.30	-28.6 \pm 0.17
LRA	147.6 \pm 0.27	-25.9 \pm 0.22
LCTROL	98.52 \pm 0.51	-36.5 \pm 0.04

Con respecto al potencial ζ , el comportamiento fue similar al de los liposomas Bangham. Puede observarse que ambos liposomas, LR β y LRA (-28.6 y -25.9 mV) disminuyeron su potencial con respecto al control (-36.5 mV). Esta disminución se deriva de la influencia del compuesto activo (carga positiva en ambos CA) en el interior del sistema lipídico.

8.3.2. Tasa de Liberación de los Compuestos Activos en Fluidos Gastricos e Intestinales Simulados

La liberación del compuesto hidrofóbico, β -caroteno, de los liposomas durante la exposición a fluidos gastrointestinales simulados, se estudió exponiendo al sistema primero a los FGS con pH 1.2 durante 60 minutos; puede observarse en la Figura 10a que la el FGS no tuvo un efecto significativo sobre los liposomas ya que no se tuvo un aumento de la concentración del CA, sin embargo después de exponerlos al FIS la respuesta de liberación se mostró repentinamente, durante los primeros 30 minutos a pH 7.5. La liberación fue paulatina y después de 40 minutos el CA liberado mostró una ligera disminución manteniéndose constante hasta el final del monitoreo.

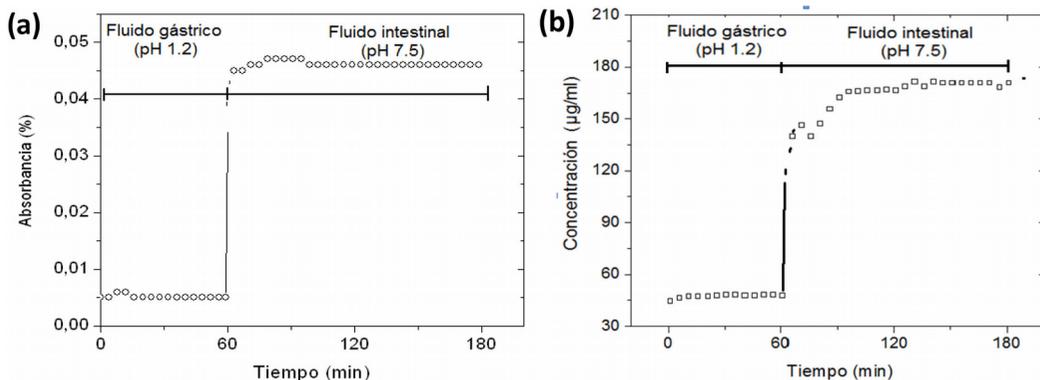


Figura 10. Liberación del β -caroteno (a) y antocianinas (b) en condiciones gastrointestinales simuladas

Este comportamiento sugiere que las sales de biliares facilitan la emulsificación de los lípidos adsorbiéndose en la superficie de los glóbulos y reduciendo la tensión superficial favoreciendo la BA del CA que estaba dentro de membrana lipídica tal como lo indica Wang et al. (2012), posteriormente, debido a la exposición a pH neutros el CA mantiene su actividad reflejado por la estabilidad de la absorbancia del compuesto.

Por otra parte, los liposomas con antocianinas expuestos a los fluidos gastrointestinales (Figura 10b) mostraron una baja liberación durante los primeros 60 minutos en FGS (pH 1.2) y también de forma repentina expresa un aumento en la absorbancia al exponer los liposomas a FIS. Este comportamiento sugiere la fuerte actividad de la lipasa la cual rompió las cadenas de la fosfatidilcolina favoreciendo la liberación del ingrediente activo. Un comportamiento similar reportan Kim y Park (2004) al exponer a fluidos gastrointestinales emulsiones con ciclosporina.

8.4. Biodisponibilidad *In Vitro* del Compuesto Activo

El perfil de liberación de los compuestos activos usando una membrana de diálisis se muestra en la Figura 11. Puede observarse que ambos liposomas no mostraron una liberación significativa dentro de las primeras 25 horas, posteriormente la fórmula LBA exhibió un aumento progresivo de la absorbancia alcanzando un máximo a las 50 horas, después de este tiempo la concentración del CA disminuyó considerablemente en las horas restantes.

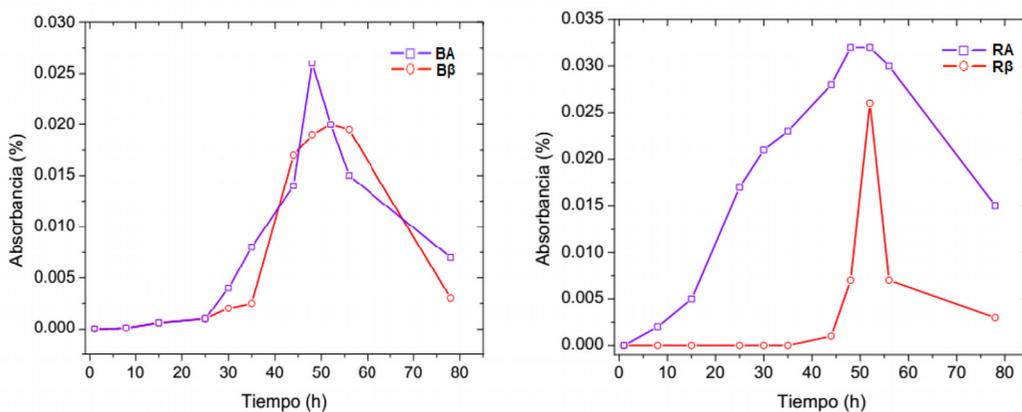


Figura 11. Biodisponibilidad in vitro de antocianinas y β -caroteno usando membranas de diálisis, para ambos métodos de elaboración de liposomas

Con respecto al comportamiento de liberación de la fórmula B β , el inicio de la liberación del CA ocurrió a partir de las 25 horas, posteriormente su liberación fue paulatina alcanzando un máximo a las 53 horas, para finalmente encontrar un descenso en la actividad a partir de las 57 horas. Como puede observarse ambos sistemas presentaron comportamientos similares de liberación, sin embargo el liposoma B β alcanzó su máximo de forma paulatina sugiriendo que debido a la característica hidrófoba del CA había más interacción con las membranas lipídicas y por tanto su solubilidad era menor (Liu & Guo, 2007). Por otra parte el comportamiento de la fórmula BA, puede explicarse debido a que el CA ubicado en el núcleo migraba de la membrana lipídica aumentando su tamaño haciendo que esta creciera favoreciendo su desestabilización generando una señal repentina. En general,

puede observarse que la liberación *in vitro* de los compuestos presentó tiempos tardíos esto podría sugerir que durante las condiciones del experimento los CA se mantienen estables y es necesario un tiempo prolongado alrededor de 25 horas para después iniciarse la liberación sin la presencia de las enzimas del FGS y FIS.

Además, puede observarse que los liposomas LRA tuvieron una actividad de liberación dentro de las primeras 10 horas, la cual fue progresiva hasta alcanzar un máximo dentro de las 50 horas para posteriormente disminuir su actividad. Con respecto a los liposomas LR β iniciaron su liberación dentro de las primeras 35 horas mostrando su máxima liberación a 50 horas con una caída repentina después de 55 horas. La respuesta de liberación dentro de las primeras 10 horas, de las antocianinas sugiere que las vesículas en contacto con los buffer se desestabilizaban por el intercambio de iones y el CA migraba lentamente desde el centro de las vesículas hasta traspasar la membrana de diálisis. Por otra parte en los liposomas LR β , como el CA está alojado en la membrana su estabilidad es mayor disminuyendo su disponibilidad y cuando existe una alta concentración de iones buffer (50 horas) la membrana se desestabiliza haciendo que el CA salga repentinamente. Estos comportamientos pueden explicarse por la teoría de difusión de la doble capa propuesta por Gouy-Chanpman (Xia & Xu, 2005).

Finalmente Villa et al. (2013), con base en los resultados obtenidos pudo concluir que, la técnica de HPLC fue una herramienta analítica que permitió conocer el porcentaje de atrapamiento de CA por las vesículas lipídicas, 0.8 mg de β -caroteno y 60 μ l de antocianinas de zarzamora por ambos métodos de preparación de los liposomas. La incorporación β -caroteno y antocianinas de zarzamora cuya carga es positiva influye en el tamaño y potencial ζ de los sistemas coloidales.

La presencia de enzimas específicas en los fluidos gastrointestinales simulados y el área superficial de contacto influyen en la hidrólisis de la membrana lipídica favoreciendo la liberación y disponibilidad de los CA. La liberación *in vitro* de los compuestos se presentó en tiempos tardíos porque no se llegó a la temperatura de transición del fosfolípido, las vesículas no presentaban la permeabilidad máxima lo cual minimiza la pérdida del

material encapsulado. Los liposomas Bangham y REVs con la adición de extracto de antocianinas de zarzamora fueron los que mostraron mayor resistencia a condiciones de fluidos gastrointestinales y liberación *in vitro*. Ante lo anterior puede sugerirse que los sistemas lipídicos liposomales pueden funcionar como nanotransportadores y protectores de compuestos activos para la administración *in vivo*.

Agradecimientos

Los autores agradecen a CONACYT México, por las becas otorgadas en la realización de esta investigación. También agradecen a la SIP y COFAA del IPN de México, por el apoyo económico y becas PIFI.

Referencias

- Arnaud, J. (1995). Pro-liposomes for the food industry. *Food Technology in Europe*, 2, 30-34.
- Ball, E. (1995). *Liposomas en dermatología*. *Dermatología Venezolana*, 33(1).
- Bjelakovic, G., Nikolova, D., Glud, L., Simonetti, R.G., & Glud, C. (2007). Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: Systematic review and meta analysis. *JAMA*, 297(8), 842-857.
<http://dx.doi.org/10.1001/jama.297.8.842>
- Bouwmeester, H., Dekkers, S., Noordam, M.Y., Hagens, W.I., Bulder, A.S., de Heer, C. et al. (2009). Review of health safety aspects of nanotechnologies in food production. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 53(1), 52-62.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2008.10.008>
- Bowen-Forbes, C.S., Zhang, Y., & Nair, M.G. (2010). Anthocyanin content, antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties of blackberry and raspberry fruits. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23(6), 554-560.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2009.08.012>
- Castro, E.A. (1999). Las drogas liposomales. *Rev. Academica Colombiana de Ciencias*, 23(89), 625-634.
- Clares, B. (2003). *Sistemas de transporte y liberacion de fparamacos de aplicacion tópica: Liposomas multilamerales portadores de acetónido de triamcínolona*. Tesis Doctoral. Universidad de Farmacia, Granada, España.

- Chaudhry, Q., Scotter, M., Blackburn, J., Ross, B., Boxall, A., Castle, L. et al. (2008). Applications and implications of nanotechnologies for the food sector. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 25(3), 241-258.
<http://dx.doi.org/10.1080/02652030701744538>
- Cheong, J.N., Tan, C.P., Man, Y.B.C., & Misran, M. (2008). α -Tocopherol nanodispersions: Preparation, characterization and stability evaluation. *Journal of Food Engineering*, 89(2), 204-209.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2008.04.018>
- Dai, J., Gupte, A., Gates, L., & Mumper, R. (2009). A comprehensive study of anthocyanin-containing extracts from selected blackberry cultivars: extraction methods, stability, anticancer properties and mechanisms. *Food and chemical toxicology*, 47(4), 837-847.
- De la Maza, A., & Parra, J.L. (1993). Permeability alterations in unilamellar liposomes due to betaine-type zwitterionic and anionic surfactant mixed systems. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 70(7), 685-691.
<http://dx.doi.org/10.1007/bf02641004>
- Dóka, O., Ficzek, G., Bicanic, D., Spruijt, R., Luterotti, S., Tóth, M. et al. (2011). Direct photothermal techniques for rapid quantification of total anthocyanin content in sour cherry cultivars. *Talanta*, 84(2), 341-346.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.01.007>
- Drulis-Kawa, Z., & Dorotkiewicz-Jach, A. (2010). Liposomes as delivery systems for antibiotics. *International Journal of Pharmaceutics*, 387(1-2), 187-198.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.033>
- El-Nesr, O.H., Yahiya, S.A., & El-Gazayerly, O.N. (2010). Effect of formulation design and freeze-drying on properties of fluconazole multilamellar liposomes. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18(4), 217-224.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2010.07.003>
- Elsayed, M.M.A., Abdallah, O.Y., Naggar, V.F., & Khalafallah, N.M. (2007). Lipid vesicles for skin delivery of drugs: Reviewing three decades of research. *International Journal of Pharmaceutics*, 332(1-2), 1-16.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.12.005>
- Fathi, M., Mozafari, M.R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 23(1), 13-27.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>
- FDA (2000). *Food and Drugs Administration*. Disponible en:
<http://www.fda.gov/Drug/GuidanceComplianceRegulatoryInformation> (Fecha último acceso: Julio 2014).

- Felgines, C., Texier, O., Besson, C., Fraisse, D., Lamaison, J.-L., & Rémésy, C. (2002). Blackberry Anthocyanins Are Slightly Bioavailable in Rats. *The Journal of Nutrition*, 132(6), 1249-1253.
- Frézard, F., Schettini, D.A., Rocha, O.G.F., & Demicheli, C. (2005). Liposomas: propiedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. *Química Nova*, 28, 511-518.
- Fricker, G., Kromp, T., Wendel, A., Blume, A., Zirkel, J., Rebmann, H. et al. (2010). Phospholipids and Lipid-Based Formulations in Oral Drug Delivery. *Pharmaceutical Research*, 27(8), 1469-1486.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11095-010-0130-x>
- Gaete, L.E., Solís, G.J., Venegas, F.P., Carrillo, C.M.J., Schatloff, B.O., & Saavedra, S.I. (2003). Estudio de biodisponibilidad comparativa de dos formulaciones de risperidona existentes en el mercado chileno. *Revista médica de Chile*, 131, 527-534.
- García, J., & Agüero, S. (2015). Revisión: Fosfolípidos: Propiedades y efectos sobre la salud. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1), 76-83.
- Garzon, G.A. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos biactivos: Revisión. *Acta Biológica Colombiana*, 13, 27-36.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., & Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146(3), 276-290.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.01.037>
- Hollmann, A., Delfederico, L., Glikmann, G., De Antoni, G., Semorile, L., & Disalvo, E.A. (2007). Characterization of liposomes coated with S-layer proteins from lactobacilli. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1768(3), 393-400.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.09.009>
- Hu, M., Li, Y., Decker, E., Xiao, H., & McClements, D. (2011). Impact of layer structure on physical stability and lipase digestibility of lipid droplets coated by biopolymer nanolaminated coatings. *Food Biophysics*, 6(1), 37-48.
<http://dx.doi.org/10.1007/s11483-010-9173-0>
- Iwata, T., Kimura, Y., Tsutsumi, K., Furukawa, Y., & Kimura, S. (1993). The Effect of Various Phospholipids on Plasma Lipoproteins and Liver Lipids in Hypercholesterolemic Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 39(1), 63-71.
<http://dx.doi.org/10.3177/jnsv.39.63>
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., Bhandari, B., & He, Y. (2008). Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. *Food Research International*, 41(2), 172-183.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.002>
- Jimenez, M.A., Scarino, M.L., Vignolini, F., & Mengheri, E. (1990). Evidence that Polyunsaturated Lecithin Induces a Reduction in Plasma Cholesterol Level and Favorable Changes in Lipoprotein Composition in Hypercholesterolemic Rats. *The Journal of Nutrition*, 120(7), 659-667.

- Kaume, L., Gilbert, W.C., Brownmiller, C., Howard, L.R., & Devareddy, L. (2012). Cyanidin 3-O- β -D-glucoside-rich blackberries modulate hepatic gene expression, and anti-obesity effects in ovariectomized rats. *Journal of Functional Foods*, 4(2), 480-488.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.02.008>
- Kim, C.K., & Park, J.S. (2004). Solubility enhancers for oral drug delivery. *American Journal of Drug Delivery*, 2(2), 113-130.
<http://dx.doi.org/10.2165/00137696-200402020-00004>
- Kotyńska, J., & Figaszewski, Z. A. (2007). Adsorption equilibria at interface separating electrolyte solution and phosphatidylcholine-stearylamine liposome membrane. *Biophysical Chemistry*, 127(1-2), 84-90.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bpc.2006.12.008>
- Lanio, M., Luzardo, M., Laborde, R., Sánchez, O., Cruz-Leal, Y., Pazos, F. et al. (2009). Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Revista Cubana de Física*, 2(1), 23-30.
- Li, J., Lim, S.S., Lee, J.-Y., Kim, J.-K., Kang, S.-W., Kim, J.-L. et al. (2012). Purple corn anthocyanins dampened high-glucose-induced mesangial fibrosis and inflammation: possible renoprotective role in diabetic nephropathy. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(4), 320-331.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2010.12.008>
- Ling, S.S.N., Yuen, K.H., Magosso, E., & Barker, S.A. (2009). Oral bioavailability enhancement of a hydrophilic drug delivered via folic acid-coupled liposomes in rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 61(4), 445-449.
<http://dx.doi.org/10.1211/jpp.61.04.0005>
- Liu, T., & Guo, R. (2007). Structure and transformation of the niosome prepared from PEG 6000/Tween 80/Span 80/H₂O lamellar liquid crystal. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 295(1-3), 130-134.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.08.041>
- Liu, W., Ye, A., Liu, C., Liu, W., & Singh, H. (2012). Structure and integrity of liposomes prepared from milk- or soybean-derived phospholipids during *in vitro* digestion. *Food Research International*, 48(2), 499-506.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.04.017>
- Luzardo, M., Martínez, Y., Calderón, L., Álvarez, C., Alonso, E., Disalvo, A. et al. (2002). Características de la encapsulación de EGG, P64k y el conjugado de ambas proteínas en liposomas obtenidos mediante congelación-descongelación. *Biotecnología Aplicada*, 19(3), 149-152.
- Macías, C., Schweigert, F., Serrano, G., Pita, G., Hurtienne, A., Reyes, D. et al. (2002). Carotenoides séricos y su relación con la dieta en un grupo de adultos cubanos. *Rev Cubana Aliment Nutr*, 16(2), 105-113.

- Malheiros, P., Daroit, D.J., & Brandelli, A. (2010). Food applications of liposome encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 284-292.
- Mangematin, V., & Walsh, S. (2012). The future of nanotechnologies. *Technovation*, 32(3-4), 157-160.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.technovation.2012.01.003>
- Mazza, G., Kay, C.D., Cottrell, T., & Holub, B.J. (2002). Absorption of Anthocyanins from Blueberries and Serum Antioxidant Status in Human Subjects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(26), 7731-7737.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf0206901>
- McDougall, G.J., Fyffe, S., Dobson, P., & Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68(9), 1285-1294.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytochem.2007.02.004>
- Miyazawa, T., Nakagawa, K., Kudo, M., Muraishi, K., & Someya, K. (1999). Direct Intestinal Absorption of Red Fruit Anthocyanins, Cyanidin-3-glucoside and Cyanidin-3,5-diglucoside, into Rats and Humans. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1083-1091.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf9809582>
- Molins, R. (2008). *Opportunities and Threats From Nanotechnology in Health, Food, Agriculture and the Environment*. Disponible en:
<http://repiica.iica.int/DOCS/B0688I/B0688I.PDF>
- Murillo, M., Espuelas, S., Prior, S., Vitas, A.I., Renedo, M.J., Goñi-Leza, M.d.M. et al. (2001). Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. *Revista Medica de Universidad de Navarra*, 45(4), 1934.
- Navarro, G., Cabral, P., Malanga, A., & Savio, E. (2008). Diseño de liposomas para el transporte de diclofenac sódico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 37, 212-223.
- Olives, A., Cámara, M., Sánchez, M., Fernández, V., & López, M. (2006). Application of a UV-vis detection-HPLC method for a rapid determination of lycopene and β -carotene in vegetables. *Analytical Nutritional and Clinical Methods*, 95(2), 328-336.
- Pantelidis, G.E., Vasilakakis, M., Manganaris, G.A., & Diamantidis, G. (2007). Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry*, 102(3), 777-783.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.021>
- Parra, R. (2010). Revisión: Microencapsulación de Alimentos. *Revista de la Facultad Nacional de Agricultura*, 63(2), 1631-1640.

Patras, A., Brunton, N.P., Da Pieve, S., & Butler, F. (2009). Impact of high pressure processing on total antioxidant activity, phenolic, ascorbic acid, anthocyanin content and colour of strawberry and blackberry purées. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(3), 308-313.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2008.12.004>

Pedreschi, R., & Cisneros-Zevallos, L. (2007). Phenolic profiles of Andean purple corn (*Zea mays* L.). *Food Chemistry*, 100(3), 956-963.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.11.004>

Picon, A. (1994). *Microencapsulación de proteinasas en liposomas: Aplicación en la maduración acelerada de queso manchego*. Tesis de Maestría. Universidad Complutense, Madrid, España.

Prestidge, C.A., & Simovic, S. (2006). Pharmaceutical Nanotechnology. *International Journal of Pharmaceutics*, 324(1), 92-100.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.06.044>

Rao, D.R., Chawan, C.B., & Veeramachani, R. (1994). Liposomal encapsulation of β -Galactosidase: Comparison of two methods of encapsulation and *in vitro* lactose digestibility. *Journal of Food Biochemistry*, 18(4), 239-251.

<http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4514.1994.tb00500.x>

Respetro, M. (2007). Sustitución de colorantes en alimentos. *Revista Lasallista de Investigación*, 4(1), 35-39.

Reza-Mozafari, M., Johnson, C., Hatziantoniou, S., & Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and Their Applications in Food Nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18(4), 309-327.

<http://dx.doi.org/10.1080/08982100802465941>

Ribeiro, H.S., & Cruz, R.C.D. (2004). Hochkonzentrierte carotinoidhaltige Emulsionen. *Chemie Ingenieur Technik*, 76(4), 443-447.

<http://dx.doi.org/10.1002/cite.200403367>

Salinas, Y., Rubio, D., & Diaz, A. (2005). Extraction and use of pigments from maize grains (*Zea mays* L.) as colorants in yogur. *ALAN*, 55(3), 293-298.

Santiago, P. (2005). *Microencapsulación de hierro para fortificar téjate deshidratado*. Tesis Instituto Tecnológico de Oaxaca.

Serraino, I., Dugo, L., Dugo, P., Mondello, L., Mazzon, E., Dugo, G. et al. (2003). Protective effects of cyanidin-3-O-glucoside from blackberry extract against peroxynitrite-induced endothelial dysfunction and vascular failure. *Life Sciences*, 73(9), 1097-1114.

[http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205\(03\)00356-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0024-3205(03)00356-4)

Sharma-Vijay, K., Mishra, D., Sharma, A., & Srivastava, B. (2010). Liposomes: Present prospective and future challenges. *International Journal of Current Pharmaceutical Review & Research*, 1(2), 6-16.

- Shimoni, E. (2009). *Nanotechnology for foods: delivery systems*. FoST World Congress Book: Global Issues in Food Science and Technology. Elsevier Inc. 411-424.
- Sozer, N., & Kokini, J.L. (2009). Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends in Biotechnology*, 27(2), 82-89.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2008.10.010>
- Suñe, J. (2002). *Formación continua para farmacéuticos de hospital*. (Vol. 3). Barcelona, España: Edit. Foundation Promedic Ed. Ferrer Grupo.
- Szoka, F., & Papahadjopoulos, D. (1978). Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(9), 4194-4198.
- Taylor, T.M., Weiss, J., Davidson, P.M., & Bruce, B.D. (2005). Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45(7-8), 587-605.
<http://dx.doi.org/10.1080/10408390591001135>
- Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., & Wada, K. (2009). Evaluation of an Oral Carrier System in Rats: Bioavailability and Antioxidant Properties of Liposome-Encapsulated Curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(19), 9141-9146.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf9013923>
- Tavares, L., Figueira, I., Macedo, D., McDougall, G.J., Leitão, M.C., Vieira, H.L.A. et al. (2012). Neuroprotective effect of blackberry (*Rubus* sp.) polyphenols is potentiated after simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 131(4), 1443-1452.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.025>
- Villa, M., Pedroza, R., & San Martin, E. (2013). *Sistemas lipídicos microestructurados como transportadores de compuestos activos*. Tesis Doctoral. CICATA Legaria Instituto Politécnico Nacional, DF, México.
- Wang, P., Liu, H.-J., Mei, X.-Y., Nakajima, M., & Yin, L.-J. (2012). Preliminary study into the factors modulating β -carotene micelle formation in dispersions using an *in vitro* digestion model. *Food Hydrocolloids*, 26(2), 427-433.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.11.018>
- Wang, S.Y., & Lin, H.-S. (2000). Antioxidant Activity in Fruits and Leaves of Blackberry, Raspberry, and Strawberry Varies with Cultivar and Developmental Stage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 140-146.
<http://dx.doi.org/10.1021/jf9908345>
- Wang, X., Ishida, T., & Kiwada, H. (2007). Anti-PEG IgM elicited by injection of liposomes is involved in the enhanced blood clearance of a subsequent dose of PEGylated liposomes. *Journal of Controlled Release*, 119(2), 236-244.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2007.02.010>

Wu, R., Frei, B., Kennedy, J.A., & Zhao, Y. (2010). Effects of refrigerated storage and processing technologies on the bioactive compounds and antioxidant capacities of 'Marion' and 'Evergreen' blackberries. *LWT - Food Science and Technology*, 43(8), 1253-1264.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.04.002>

Wu, X., Cao, G., & Prior, R.L. (2002). Absorption and Metabolism of Anthocyanins in Elderly Women after Consumption of Elderberry or Blueberry. *The Journal of Nutrition*, 132(7), 1865-1871.

Xia, S., & Xu, S. (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International*, 38(3), 289-296.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2004.04.010>

Yañez, J., Salazar, J., Chaires, L., Jimenez, J., Marquez, M., & Ramos, E. (2002). Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación. *Avance y Perspectiva*, 21, 313-319.

Yurdugul, S., & Mozafari, M. (2004). Recent advances in micro- and nano-encapsulation of food ingredients. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 9(2), 64-65.

Zou, W., Sun, W., Zhang, N., & Xu, W. (2008). Enhanced Oral Bioavailability and Absorption Mechanism Study of N3-O-Toluyyl-Fluorouracil-Loaded Liposomes. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 4(1), 90-98.

<http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2008.005>