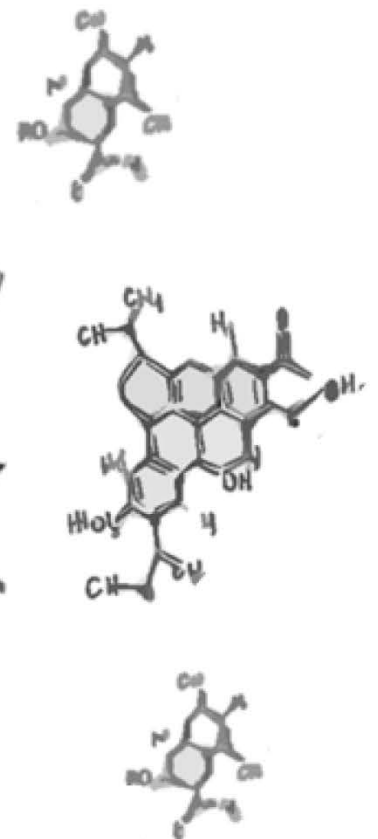


Sistemas nanoestructurados con bevacizumab para o tratamento de oftalmopatías: interaccións lípido-fármaco.

Nanostructured carriers with bevacizumab for the treatment of eye diseases: lipid-drug interactions.

Emi Vázquez Lage



Curso académico
2024-2025

Autor deseño da portada, *Sementeira de ideas*: Carlos Javier Illanes Bordomás.

ÍNDICE

Agradecementos	2
Resumo	3
Palabras chave	3
Introdución	5
OFTALMOPATÍAS: DEXENERACIÓN MACULAR.....	5
<i>Anatomía e fisioloxía do ollo.</i>	5
<i>Oftalmopatías do segmento posterior. AMD.</i>	6
FARMACOTERAPIA DA AMD: PARADIGMA ACTUAL E DESAFÍOS.....	9
<i>Farmacoloxía da nAMD.</i>	9
<i>Desafíos biofarmacéuticos e farmacocinéticos na AMD.</i>	11
SISTEMAS COLOIDAI S DE LIBERACIÓN INTRAVÍTREA.....	11
FISICOQUÍMICA DE SUPERFICIES: MONOCAPAS	13
<i>Conceptos chave en Termodinámica de superficies. As interfaces.</i>	13
<i>Obtención e caracterización de monocapas.</i>	17
<i>Aplicacións farmacéuticas dos estudos en superficie.</i>	19
Obxectivos	20
Material e métodos	21
MATERIAL	21
MÉTODOS.....	22
<i>Compresión de monocapas.</i>	22
<i>Cálculos baseados nas isothermas.</i>	23
<i>Estudos de penetración (cinética π-t).</i>	25
Resultados e discusión	26
1. CARACTERIZACIÓN DOS LÍPIDOS DOS NLC: COMPRESIÓN DE MONOCAPAS DE EXTENSIÓN.	26
1.1. <i>Monoestearina (GMS)</i>	27
1.2. <i>Compritol 888 ATO (C8A)</i>	28
1.3. <i>Mestura equimolar CMS/C8A</i>	32
2. INTERACCIÓN LÍPIDOS/ANTICORPO: CINÉTICA DE PENETRACIÓN.	35
Conclusiones	38
Bibliografía	39

Agradecementos

Á profesora Matilde Casas, titora deste traballo, apoio permanente e opinión sabia cando máis se precisa. Grazas por apostar por min e por seguirme acompañando.

Á profesora Isabel Sánchez Macho, Bebel, mestra e mentora, por ter confiado en min desde un principio, terme integrado no seu grupo de investigación de Biomembranas e terme guiado, ensinado e aconsellado pacientemente todos estes anos. Grazas.

Ao resto do departamento de Físicoquímica da Facultade de Farmacia co que tiveren a sorte de convivir: Susana (por terme axudado con paciencia e por todo este tempo), José Luís, Monty, Arturo, Olga, Cid e Jado (q.e.p.d.). Grazas tamén a Tiago e a Mercedes P. pola súa colaboración e boa disposición, e a León pola súa axuda e amizade.

Ao profesor Francisco Otero Espinar, Fran. Pola súa axuda, confianza e man sempre tendida e polo seu papel imprescindíbel neste traballo. Tamén ao resto de compañeiros de Tecnoloxía Farmacéutica, especialmente Axel, Mariana, Victoria e Xurxo.

Ao persoal e profesorado da Facultade que me animou día a día, e en especial a Paz, por todo o vivido. *A Juanjo, profesor J.J. Giner Casares, de la Universidad de Córdoba, por su permanente receptividad y su desinteresada ayuda, y por dejarme compartir con él mi curiosidad y mi gusto por las monocapas.*

A quem fez do Porto e da FFUP un lugar aonde querer voltar: a Marina Pinheiro, supervisora e amiga, por ficar sempre aí. À Rosa Couto, por ter-me acompañado e pela sua valiosa amizade. À Cláudia Nunes, pela cumplicidade e a afinidade pela Físicoquímica. Ao resto das “meninas”: Catarina P-L, Pris, Joana, João A., José A., Rita, Andreia, Nini, Alexandre, Luíse... e mais à Inês R. e ao persoal todo de Química Aplicada. À Professora, Salette Reis, por ter-me orientado e axudado e ter-me acolhido com braços abertos no MB², fico por sempre obrigado. A Cristiano, Marta, Jair, Paolo, Borja, Flávia, Lena, Yang e ao OUP, especialmente o Hermínio e o Tiago. E ao Prof. Costa Lima (q.e.p.d.), quem começou isto todo no Luso-Galego do 2014 com o seu clásico sorriso alegre, e que ficará comigo sempre no recordo. Imensamente obrigado.

Ás persoas que me apoian e apoiaron nesta etapa. Anna, Carlos, Marta y *los demás*, de antes Ari e Jose C., e máis tarde Jorge P., Diego, Jacobo, Alba C., Vini, Diana, Pedro e tantas persoas, a partir de agora tamén compañeiras de profesión, que me axudaron polo camiño. Aes compañeiros de militancia e representación estudantil. Á SXGQ. Ao *Welcome*, moi especialmente Marina Buján (**ありがとう!**) e Ángela. A Concerto Tempo. E a Alex, Deli, Pau, Rita, Rubén, Mica, Delia, Nerea, Cris A., Helen, Mery M., Iván, Jess, ... e co tempo Jorge M., JuanDi, Anxo, Andrés e Iker. Sen vós non habería Emi. Grazas.

A miña *maj*, persoa que admiro, compañeira de fatigas e o meu primeiro apoio. Seguimos.

Resumo

Este traballo estuda a interacción entre dous tipos de lípidos sólidos a temperatura ambiente (monoestearina e Compritol 888 ATO) que forman parte de sistemas nanoestruturados de liberación de fármacos, e entre estes e un principio activo, o anticorpo monoclonal bevacizumab, empregado para o tratamento intravítreo da dexeneración macular asociada á idade (AMD), unha retinopatía que causa perda de visión. A razón deste estudo reside na necesidade de aumentar a biodispoñibilidade do fármaco no humor vítreo a través dunha liberación sustentada, a fin de espaciar o máximo posíbel no tempo a realización de procedementos invasivos ao paciente, como é a inoculación do medicamento na cámara vítrea do ollo. Para a análise dos lípidos e das súas interaccións co fármaco procedeuse á obtención e estudo de filmes dunha molécula de espesor formados por tensioactivos insolúbeis en auga, chamados monocapas de Langmuir, mediante a súa deposición na interface ar/auga. Estas monocapas poden ser comprimidas lateralmente, dando lugar a isotermas presión superficial-área molecular (π -A), coas que se pode caracterizar o comportamento molecular dos tensioactivos depositados e a penetración no filme de fármacos hidrosólúbeis. Estas isotermas tamén foron tratadas matematicamente, a fin de extraer máis información sobre a rixidez, interaccións e estabilidade en filmes de varios compoñentes. Os resultados mostran que ambos os dous lípidos forman monocapas estábeis, que a súa mestura equimolar é favorábel mecánica e termodinamicamente e que o bevacizumab interacciona preferencialmente cos filmes mixtos, o que permite optimizar a composición de vectores nanoestruturados de fármacos con propiedades máis adecuadas ás necesidades clínicas.

Palabras chave: terapia biolóxica, sistemas nanoestruturados, interaccións, monocapas, fisicoquímica.

Abstract

This work studies the interaction between two kinds of solid lipid components of nanostructured drug carriers (glycerol monostearate and Compritol 888 ATO), and between these lipids and the monoclonal antibody bevacizumab. This drug is used in the treatment of age-related macular degeneration, a disease of the retina that causes vision loss. The motivation for this study is the increase of drug bioavailability in the vitreous humour through sustained delivery, in order to minimise how often patients must undergo invasive procedures such as the inoculation of the drug into the vitreous body of the eye. For the analysis of the lipids and their interactions with the antibody, one-molecule thick films of surfactant molecules spread at the air/water interface, called Langmuir monolayers, were obtained and studied. These monolayers can be laterally compressed, yielding surface pressure-molecular area (π -A) isotherms, which are used to characterise the behaviour of the surfactant species in the film, as well as their interaction with water-soluble drugs. The isotherms were mathematically processed in order to obtain more information on rigidity, interactions and stability in monolayers of more than one component. Results show both types of lipids form stable monolayers, their equimolar mix is favoured both mechanically and thermodynamically, and bevacizumab interacts preferentially with mixed films. This information allows for the optimisation of the composition of nanostructured drug carriers so they may better respond to clinical needs.

Key words: *Biological therapy, nanostructured systems, interactions, monolayers, physical chemistry.*

Introdución

OFTALMOPATÍAS: DEXENERACIÓN MACULAR

Anatomía e fisioloxía do ollo.

O ollo humano, órgano bilateral encargado da visión, é anatómica e fisioloxicamente complexo. Para entender mellor o seu funcionamento, podemos dividir as múltiples estruturas que o conforman en zonas ao longo de distintos eixos. No eixo exterior-interior, e tomando o ollo como unha estrutura cuasiesférica estratificada, o globo ocular está constituído por tres capas concéntricas que, do exterior cara ao interior, denominamos esclerótica, coroides e retina [1] (Figura 1). A capa máis externa, a esclerótica, esclera ou túnica fibrosa, é de cor branca, opaca e pouco vascularizada, e na parte anterior do ollo (en contacto co ar) adopta unha forma abombada e transparente, baixo o nome de córnea. A esclerótica ten función eminentemente protectora e de soporte (ten un espesor de 0,5-1 mm) e está recuberta pola conxuntiva, unha estrutura altamente irrigada que rodea o ollo (Figura 1). A coroides, ou túnica vascular, interior á esclerótica, cun grosor de 0,2 mm, ten función nutricional e preséntase moi vascularizada. Finalmente, a retina ou túnica nerviosa, a capa máis interna, contén células con función fotorreceptora, responsábeis últimas da visión.

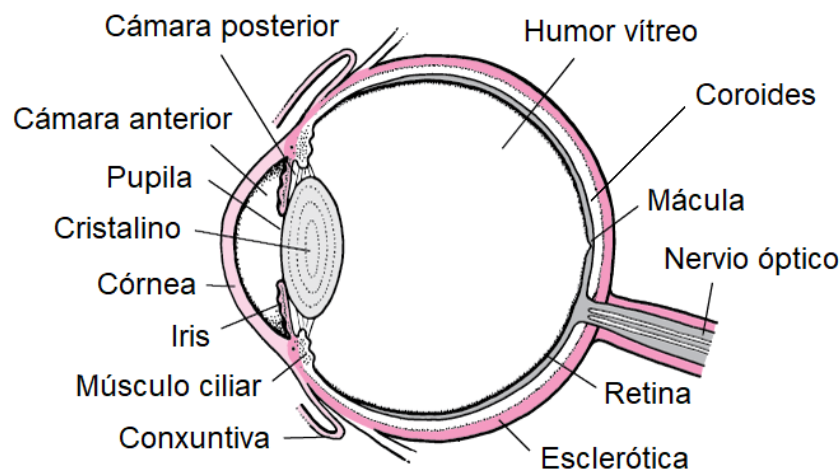


Figura 1. Estrutura anatómica do ollo (sección transversal). Adaptada de [2].

Se optamos por observar o ollo de forma transversal (Figura 1), o globo ocular divídese en dúas zonas diferenciadas: os segmentos anterior e posterior. O segmento anterior do ollo abrangue a superficie ocular (córnea), iris, cristalino, corpo ciliar e as cámaras anterior e posterior, bañadas por humor acuoso. Os dous terzos restantes do globo ocular constitúen o segmento posterior, que inclúe o humor vítreo (xel con fibras de coláxeno e ácido hialurónico, maioritariamente), a

retina (ligada ao nervio óptico) e a coroides [3,4]. A esclerótica ocupa 5/6 da superficie total do globo ocular, polo que é común aos dous segmentos [1].

Dentro do segmento posterior, a **retina** é unha capa de especial interese, por ser a estrutura encargada da recepción e transdución de estímulos fotoquímicos que permiten a visión. Está á súa vez conformada por dez capas, divididas en dúas unidades funcionais: a unidade funcional externa, máis afastada da luz, que contén os conos e bastóns que actúan como fotorreceptores (estrato neuroepitelial), e a interna, en contacto co humor vítreo e máis próxima á luz, encargada da transmisión do estímulo sensorial xa transformado polo proceso fotoquímico (estrato cerebral).

Nunha área da retina posicionada cara ao centro da mesma atópase unha rexión cunha concentración particularmente elevada de fotorreceptores de tipo cono, denominada mácula lútea (“mancha amarela”) ou simplemente **mácula**, que corresponde ao punto de visión máis nítida (Figura 1). Trátase dunha zona ovalada e aplanada duns 5 mm² de extensión que recibe o seu adxectivo pola súa pigmentación amarela, debida a unhas xantófilas carotenoides que protexen os conos da mácula do deslumbramento [5].

Oftalmopatías do segmento posterior. AMD.

As patoloxías do segmento posterior defínense como os trastornos que afectan estes tecidos e que, ao estar a retina nesta zona, teñen en común que ocasionan discapacidade visual en grao variábel. As doenzas máis prevalentes do segmento posterior son, por orde de maior a menor, a dexeneración macular asociada á idade, o glaucoma e outras, como a retinopatía diabética [4].

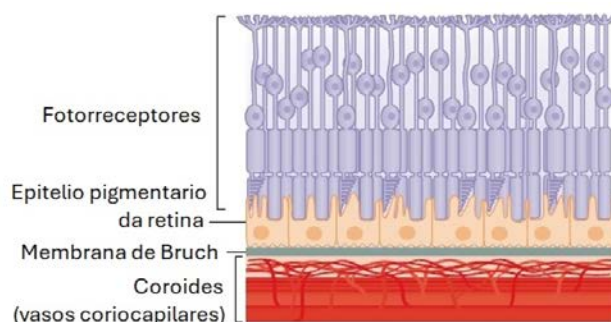


Figura 2. Estrutura simplificada do estrato neuroepitelial e anexos na mácula da retina, da parte externa (inferior na imaxe) á interna (superior). Adaptada de [6].

A **dexeneración macular asociada á idade (AMD)** polo acrónimo en inglés, *age-related macular degeneration*), de feito, é a causa máis común de perda de visión en persoas de máis de 50 anos

nos países occidentais [7,8]. É responsábel dun 6-9% da cegueira en todo o mundo, e estímase que a súa prevalencia global proxectada ao 2040 sexa de arredor de 288 millóns de persoas [6,9]. A AMD afecta principal mais non exclusivamente á mácula da retina; máis concretamente, ao complexo formado polos fotorreceptores, o epitelio pigmentario da retina (RPE), a membrana de Bruch e a coroides (Figura 2). A patoloxía caracterízase pola acumulación de drusas, ou depósitos de refugallo dos fotorreceptores, na lamela basal do RPE e na membrana de Bruch (Figura 3), acompañadas de hiperpigmentación [7] asociada ou non a disfunción do RPE. Ademais, tamén se detectan depósitos máis difusos, ou drusenoides, no espazo subepitelial do RPE (máis próximo ás capas de fotorreceptores), chamados depósitos subretinais [6]. A progresión da doenza vén dada, a nivel fisiopatolóxico, polo tamaño das drusas, que a medida que aumenta pasamos de falar de AMD temperá a intermedia (Figura 3). Por mor da perturbación da estrutura da retina causada por estes depósitos, a doenza pode evoluir cara a unha AMD avanzada, na cal pódense orixinar dúas situacións (Figura 3, imaxes 4a e 4b) [10]. A primeira e máis habitual (arredor dun 80% dos casos), coñecida como AMD “seca” ou **atrofia xeográfica** (Figura 3.4a), cursa con atrofia concomitante de fotorreceptores, do RPE e dos capilares máis internos da coroides (vasos coriocapilares), e asóciase na clínica con escotoma, ou perda de visión parcial ou total localizada nunha zona do campo visual [6,11]. Estas zonas atrofiadas aumentan a súa superficie co tempo, levando a unha perda progresiva de visión central.

Unha segunda forma de AMD está asociada a unha perda inicial de vasculatura coroidea e irrigación reducida por estenose de vasos de maior calibre. Isto xera hipoxia no RPE, que libera de forma reactiva substancias proanxioxénicas, promovendo así a formación de vasos a partir dos coriocapilares [7]. Estes novos vasos acaban invadindo o extremo exterior da retina, no que se coñece como neovascularización coroidea (CNV) ou, na mácula, neovascularización macular (MNV) (Figura 3.4b), dando lugar á denominada **AMD neovascular (nAMD)**. A evolución deste tipo de dexeneración macular cara a unha fase exudativa, que se dá en chamar AMD “húmida”, vén dada pola rotura destes novos vasos ou por extravasación, que resulta en edema (por hemorraxias e acumulación de fluído) e elevación da retina, co conseguinte deterioro da visión [8]. Aínda sendo este tipo de AMD moito menos prevalente que o anterior (10-20% dos casos), aglutina a maior parte de esforzos de investigación en AMD (entre eles, este traballo) por ser a

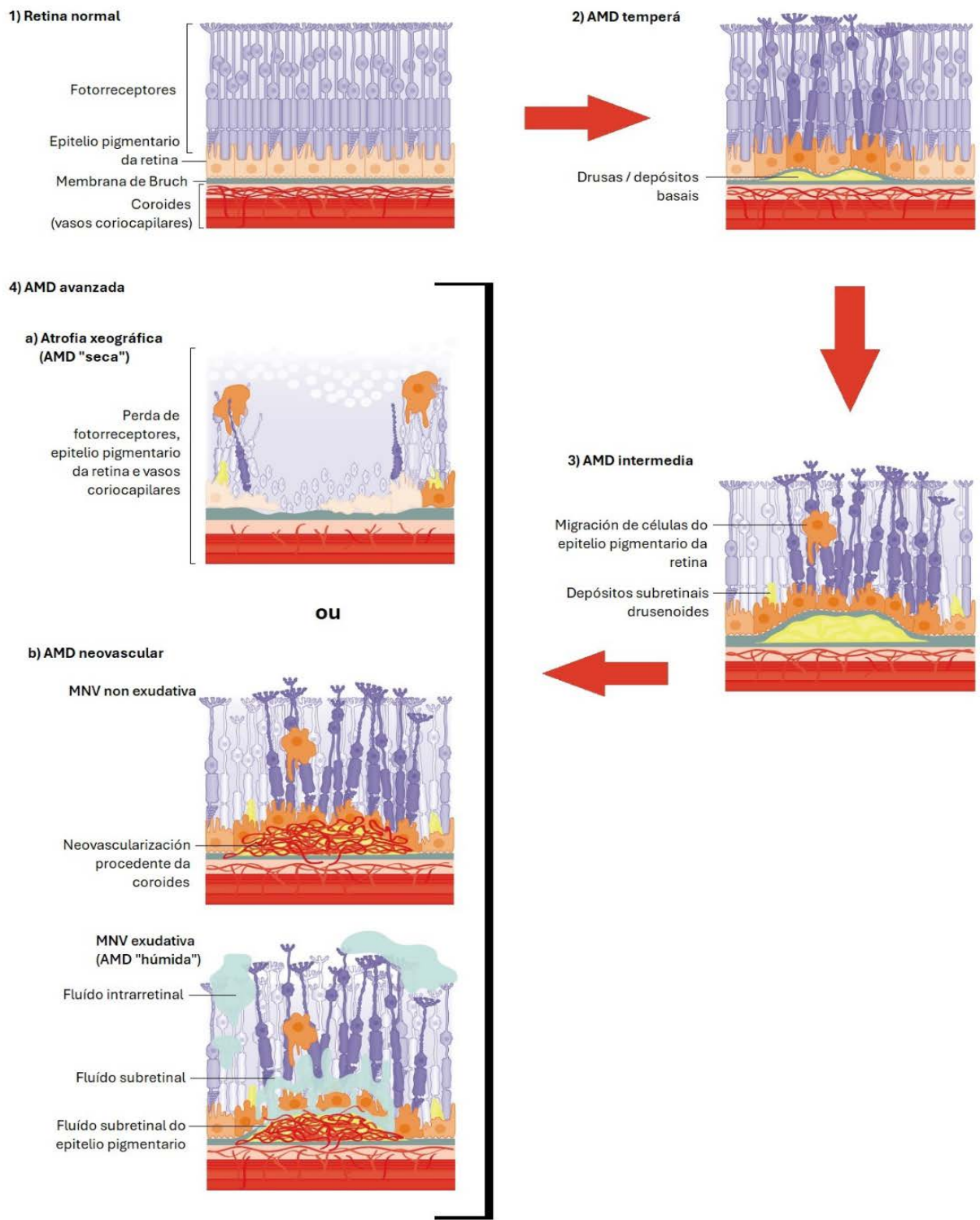


Figura 3. Esquema das mudanzas fisiopatolóxicas que teñen lugar na retina no decorrer da AMD. Adaptada de [6].

causa da maioría de casos de perda severa de visión. A nAMD exudativa adoita progresar a unha extensa fibrose con perda severa de visión central [10]; sen tratamento, estímase que o 16% dos pacientes de nAMD desenvolverán cegueira no prazo de dous anos [8].

En termos epidemiolóxicos, cómpre mencionar que a AMD, malia estar por definición asociada á idade, é en realidade unha doenza multifactorial na que xogan un papel importante aspectos alén da idade, como a susceptibilidade xenética e diversos factores ambientais de risco, entre os que salientan o tabaco, a dieta, o exercicio físico e o risco cardiovascular, moitos deles relacionados entre si [6]. Por iso, resultan fundamentais as medidas de prevención primaria baseadas nos hábitos de vida relativos a estes factores.

FARMACOTERAPIA DA AMD: PARADIGMA ACTUAL E DESAFÍOS

Farmacoloxía da nAMD.

O carácter anxioxénico da AMD neovascular é o fundamento dunha das principais aproximacións terapéuticas para o seu tratamento farmacolóxico. A formación de novos vasos está mediada por **factores de crecemento do endotelio vascular (VEGF, vascular endothelial growing factors)**, que para exercer o seu efecto fisiolóxico débense unir ao seu correspondente receptor (VEGFR). Por este motivo, tanto os VEGF como os seus receptores son albos terapéuticos no tratamento da AMD neovascular [6].

A **terapia anti-VEGF** (nome xenérico para os fármacos que actúan nesta ruta de sinalización celular) con fármacos biolóxicos comezou coa súa aprobación no ano 2006 e, aínda que ningún é quen de previr a atrofia [6], si son eficaces contra a perda de visión secundaria a nAMD, o que a converteu no estándar terapéutico para o seu tratamento, aínda en vigor a día de hoxe [8].

Os fármacos que se empregan actualmente na nAMD son:

- Anticorpos monoclonais enteiros: **bevacizumab**. Anticorpo humanizado tipo IgG₁ de 149,2 kDa (Figura 4). Únese ao VEGF, inhibindo así a interacción deste cos receptores VEGFR 1 e 2, situados na superficie das células endoteliais [12].
- Fragmentos de anticorpos: **ranibizumab, brolucizumab**. O ranibizumab (49 kDa) é un fragmento da fracción de unión a antíxeno (Fab) do bevacizumab, que se une só á isoforma A do VEGF (VEGF-A). Ao ser máis pequeno, penetra con maior facilidade que o bevacizumab nas capas da retina [13]. O brolucizumab é tamén un fragmento de anticorpo humanizado, de cadea única, que se une con alta afinidade ao VEGF-A, evitando a súa unión con VEGFR 1 e 2 [8].

- **Proteínas de fusión: aflibercept.** Proteína recombinante de 97 kDa que contén porcións dos receptores VEGFR 1 e 2 fusionados coa fracción cristalizábel (Fc) da IgG, humana. As porcións VEGFR da proteína únense con alta afinidade (200 veces superior ao ranibizumab) a VEGF-A, VEGF-B e a outros factores. Esta unión substitúe a unión aos receptores endóxenos, bloqueando así múltiples rutas implicadas na neovascularización [13,14].

A capacidade de todos estes principios activos de impedir a acción do VEGF a nivel ocular reside en seren administrados por vía intravítrea, o que permite atinxir unha biodisponibilidade adecuada no ollo. Grazas a este bloqueo da ruta do VEGF, evítase a formación de novos vasos na coroides e as lesións neovasculares, mellorando o edema a nivel da retina [8,14].

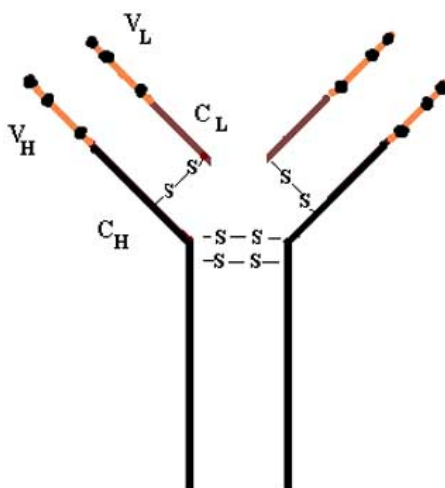


Figura 4. Estrutura esquematizada do bevacizumab [15].

No Estado español, só o ranibizumab e o aflibercept foron autorizados (en 2007 e 2012, respectivamente) con indicación para AMD [8]. O bevacizumab (Figura 4) está indicado para conseguir unha regresión da vascularización tumoral en diversos procesos cancerosos, segundo a súa ficha técnica na Axencia Española de Medicamentos e Produtos Sanitarios (AEMPS) [12]. Porén, emprégase fóra de ficha técnica, ao ter demostrado eficacia comparable a outros antianxioxénicos tamén no contexto da nAMD, e sendo ademais máis barato que o resto de fármacos [7]. Por este motivo, o tratamento de referencia son as inxeccións intravítreas de aflibercept (Eylea®, Bayer AG) e ranibizumab (Lucentis®, Novartis), sumadas ao bevacizumab (Avastin®, Roche) *off-label*. O principio activo de máis recente introdución fronte á nAMD é o brolucizumab (Beovu®, Novartis), que ten demostrado non inferioridade fronte a aflibercept e está financiado no Estado español desde o 2021 [8].

Desafíos biofarmacéuticos e farmacocinéticos na AMD.

Un dos problemas do tratamento da AMD está relacionado coa vía de administración intravítrea, por tratarse dunha vía invasiva: a administración realízase inxectando unha disolución ou suspensión de fármaco, ou un implante intraocular, na cámara vítrea. A principal vantaxe desta vía reside en que, ao administrar o principio activo directamente na zona destinada á acción farmacolóxica, permite atinxir concentracións terapéuticas no humor vítreo de forma inmediata [14]. Isto súmase á vantaxe da administración local en calquera zona do organismo, en tanto que evita efectos adversos a nivel sistémico. Porén, si hai efectos adversos locais, como endoftalmite ou desprendemento de humor vítreo. Ademais, alén do carácter invasivo do procedemento e a dor e malestar que pode causar nos doentes, no ollo existen barreiras anatómicas entre o vítreo e a retina ou a coroides, polo que a simple presenza do fármaco no vítreo non garante que teña lugar o efecto terapéutico. Así e todo, segue sendo a mellor vía de administración para oftalmopatías do segmento posterior [4].

Neste contexto, é lóxico que unha das prioridades da investigación en AMD sexa reducir ao mínimo imprescindíbel o número de inxeccións realizadas, que diminuíra o risco de efectos adversos asociados á administración e contribuirá a optimizar os recursos económicos do sistema de saúde [10,16]. Con este fin, tense investigado sobre o uso de sistemas de liberación para a cesión controlada no tempo de principios activos na terapia intravítrea.

SISTEMAS COLOIDAIS DE LIBERACIÓN INTRAVÍTREA

Os principais sistemas de liberación obxecto de estudo para administración intravítrea son hidroxelos, liposomas, sistemas particulados (micropartículas e nanopartículas), implantes e combinacións de dous deles (Figura 5) [10].

No relativo á composición destes sistemas, os vectores lipídicos, como os liposomas ou sistemas particulados de natureza lipídica, veñen chamando a atención de moitos grupos de investigación por presentaren certas vantaxes, entre as que salientan a súa biocompatibilidade coa superficie ocular, a súa lipofilia, a súa capacidade de atravesar barreiras fisiolóxicas ou a relativa simplicidade da súa elaboración. Ademais, algúns destes sistemas son facilmente escalábeis para a súa produción industrial e presentan unha boa relación efectividade/custo, o que tamén facilita a súa introdución no mercado [17].

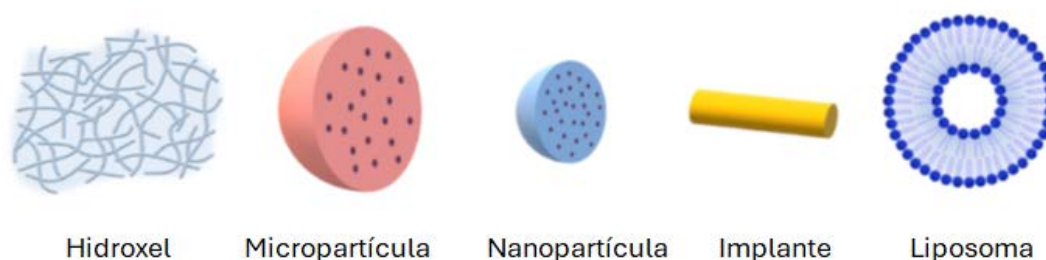


Figura 5. Algúns tipos de sistemas de liberación controlada de anticorpos anti-VEGF no humor vítreo. Adaptada de [10].

Entre estes sistemas lipídicos de liberación salientan os liposomas, as nanopartículas de lípidos sólidos (SLN, *solid lipid nanoparticles*) ou os transportadores lipídicos nanoestruturados (NLC, *nanostructured lipid carriers*) [18]. Mentres que os liposomas son vesículas formadas maioritariamente por fosfolípidos e colesterol e as SLN son nanopartículas formadas por lípidos sólidos a temperatura ambiente, que lles confiren maior rixidez e cohesión, os NLC están conformados por unha mestura de lípidos sólidos e líquidos a temperatura ambiente. Esta combinación característica dos NLC permite superar problemas dos outros dous sistemas, especialmente das SLN: os lípidos sólidos mestúranse cos líquidos creando unha matriz máis fluída e amorfa que a das SLN, que aumenta considerabelmente a capacidade de carga, evita a expulsión precoz do fármaco por mor da cristalización dos lípidos e presenta menor contido en auga, mellorando por tanto as propiedades do sistema como vector de fármacos [17,18]. É por este motivo que o sistema escollido para simular neste traballo son os NLC cargados con bevacizumab. Máis concretamente, foron seleccionados varios lípidos das NLC, nomeadamente a monoestearina, ou monoestearato de glicerilo (GMS), emulsionante alimentar amplamente utilizado e produto do metabolismo dos triglicéridos [19], e empregado na literatura tamén como componente de nanopartículas lipídicas, entre elas NLC [20,21]. O outro lípido é o Compritol 888 ATO, produto comercial mestura de tres ésteres de ácido behénico (ácido graxo saturado de 22 átomos de carbono) co glicerol [22].

A escolla do sistema de liberación é importante porque determina a cinética de cesión do principio activo, cuestión de grande relevancia na farmacocinética dos anticorpos no humor vítreo, e particularmente no seu intervalo posolóxico. Un dos factores que inflúe de forma crucial na cinética de liberación dun determinado principio activo contido nun sistema de liberación é a interacción entre o fármaco e o vector. Un fármaco con moi alta afinidade polo sistema de liberación que o contén pode non liberarse ao ritmo adecuado para a terapia ou para o paciente, mentres que unha interacción débil diminuírá a capacidade de carga do vector e poderá

favorecer unha liberación prematura ou abrupta, impedindo o control da velocidade de liberación [23].

Existen diversas técnicas para analizar a interacción entre dúas ou máis substancias, dependendo das propiedades do sistema que se midan en cada caso. Un exemplo destas propiedades é a calor intercambiada na interacción, magnitude na que se basean as técnicas calorimétricas, como a calorimetría de valoración isotérmica (ITC) ou a calorimetría diferencial de varrido (DSC) [24]. Outra das opcións é observar as alteracións que se producen nun filme de moléculas agregadas nunha interface baixo distintas condicións, entre elas a presenza dunha das substancias obxecto de estudo. Este último caso é o aplicado neste traballo, no que a este agregado supramolecular nunha interface lle chamamos **monocapa** [25].

FISICOQUÍMICA DE SUPERFICIES: MONOCAPAS

Conceptos chave en Termodinámica de superficies. As interfaces.

Na Fisicoquímica de coloides e interfaces enténdese por monocapa, ou capa monomolecular, un filme dunha molécula de espesor disposto nunha interface. Dado que a obtención de monocapas debe ter lugar nunha interface, a que permite unha manipulación máis precisa para este fin, e ademais é fácil de conseguir, é a interface ar/auga.

Cando falamos de **interface** falamos da rexión espacial (superficie xeométrica), aparentemente bidimensional, que separa dúas fases [26]. J. William Gibbs (EUA, 1839–1903) propuxo

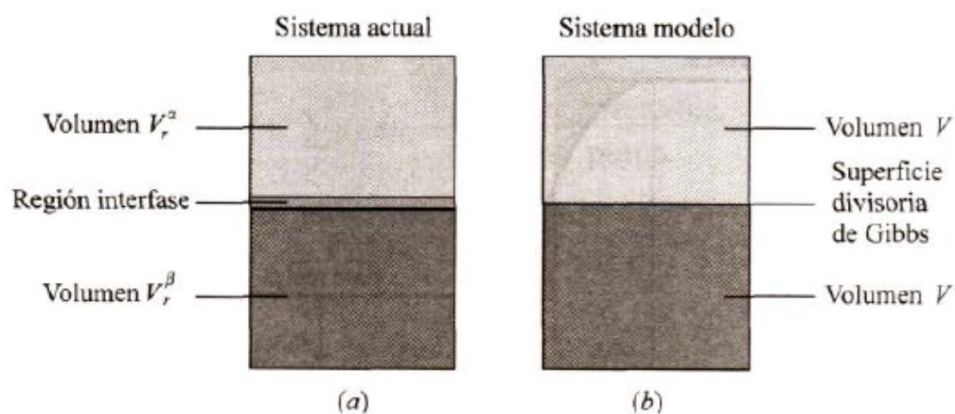


Figura 6. Modelo actual de interfaces, proposto por Guggenheim (a) fronte ao modelo proposto por Gibbs (b) [27].

que as interfaces se podían abordar como sistemas bidimensionais, de espesor nulo (“superficie divisoria de Gibbs”) (Figura 6). Porén, experimentalmente compróbase que a interface real ten

volume non nulo, e as propiedades da interface son diferentes ás das dúas fases que separa, como postularon outros autores [26,27]. Cómpre mencionara que as interfaces dun determinado sistema serán tanto máis relevantes no comportamento e propiedades dese sistema canto maior é a proporción de moléculas que se atopan na interface con respecto do total de moléculas que o conforman, isto é, canto maior é a súa razón **superficie/volume**, como é o caso dos coloides [28].

Nas interfaces fase condensada/gas, como a interface ar/auga, as interaccións entre as moléculas na fase gas son practicamente desprezábais en relación á magnitude das interaccións intermoleculares que se manifestan na fase condensada, ao ser moito menor a probabilidade dunha molécula dun gas aparecer na interface con respecto dunha molécula dun líquido. Por este motivo, xérase unha descompensación nas forzas intermoleculares (Figura 7) que afecta as moléculas que se localizan na interface. Dado que, segundo o potencial de Lennard-Jones, as forzas de atracción intermoleculares provocan unha diminución da enerxía do

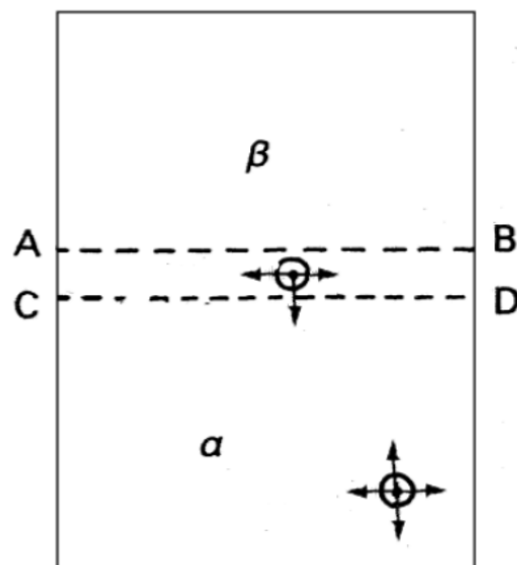


Figura 7. Representación das forzas de atracción exercidas sobre unha molécula na interface (de sección ABCD) e no seo da fase condensada, α [27].

sistema, as moléculas que experimentan sobre si unha menor interacción atractiva, como é o caso das que se localizan na interface, posuirán unha enerxía media maior que as moléculas que se atopan no seo do líquido [27]. En vista disto, dedúcese que as interfaces son rexións de maior enerxía que a fase volume, e por tanto: (a) o sistema tratará de reducir a súa extensión, a fin de minimizar o número de moléculas con esta cantidade superior de enerxía, e (b) un aumento da

área da interface implicará necesariamente a chegada de enerxía en forma de traballo sobre o sistema, necesaria para que máis moléculas da fase volume pasen a estar na interface.

A tendencia do sistema a minimizar as súas interfaces ponse de manifesto a través dunha forza neta non nula, resultante da suma vectorial de forzas aplicadas sobre cada molécula da interface (Figura 7), con dirección perpendicular á interface e sentido cara ao interior de cada fase, neste caso da fase condensada (nótese que esa mesma suma vectorial, no caso da molécula que está na fase volume rodeada doutras, dá como resultado unha forza neta nula). Esta forza, referida á unidade de lonxitude, recibe o nome de **tensión interfacial** ou tensión superficial:

$$\gamma = \frac{F}{r} \quad \text{(Ecuación 1)}$$

onde γ é a tensión interfacial, F a forza neta e r a lonxitude ou desprazamento. Isto obsérvase con maior facilidade desde o punto de vista termodinámico: dado que o traballo se define como a forza multiplicada polo desprazamento, definimos a tensión interfacial como o **traballo** (w) necesario para aumentar infinitesimalmente a área σ dunha interface [25]. Obtemos a expresión multiplicando numerador e denominador da ecuación 1 polo desprazamento:

$$\gamma = \frac{F}{r} = \frac{F r}{r^2} = \frac{w}{\sigma} \quad ,, \quad \gamma \equiv \frac{\delta w}{d\sigma} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

As unidades da tensión superficial son, por tanto, as de forza por unidade de lonxitude (N/m no Sistema Internacional, sendo de uso habitual o submúltiplo mN/m).

Este traballo w (ecuación 2) pódese relacionar con outras magnitudes termodinámicas, como a enerxía libre. A variación de enerxía libre dun sistema aberto vén dada pola ecuación fundamental da Termodinámica Química (ecuación 3) [26]. Os tres primeiros termos corresponden ao traballo expansión-compresión, á calor intercambiada e ás mudanzas na composición do sistema, respectivamente. Porén, en Fisicoquímica de superficies e coloides a compoñente interfacial é fundamental, polo que á coñecida expresión se lle engade un cuarto termo referido á área das interfaces do sistema, ficando:

$$dG = V dP - S dT + \sum \mu_i dn_i + \gamma d\sigma \quad \text{(Ecuación 3)}$$

onde G é a enerxía libre, V é o volume, P a presión, S a entropía, T a temperatura absoluta, μ_i o potencial químico do compoñente i , n_i a cantidade dese compoñente, γ a tensión interfacial e σ a área que ocupa a interface. Isto implica que, nun sistema aberto de composición fixa, en condicións de presión e temperatura constantes, verifícase a ecuación

$$dG_{P,T,n_i} = \gamma d\sigma \quad \text{(Ecuación 4)}$$

na que G se coñece como **enerxía libre interfacial** [25]. Así, a tensión superficial pódese expresar tamén como

$$\gamma = \left(\frac{\partial G}{\partial \sigma} \right)_{P,T,n_i,j} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

isto é, como a variación da enerxía libre de Gibbs do sistema debida á variación na área das súas interfaces.

As moléculas que conformaren a monocapa deben ter a propiedade de permanecer na interface, isto é, de seren activas en superficie ou tensioactivas. Os **tensioactivos** (Figura 8) son moléculas anfifílicas (na que parte da molécula é hidrofílica e outra parte é hidrofóbica) que reducen significativamente a tensión interfacial do medio ao substituíren na interface as moléculas das

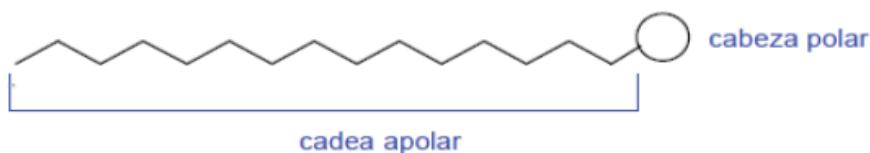


Figura 8. Estrutura xeral dunha molécula de tensioactivo. Adaptada de [29].

substancias que conforman as distintas fases que separa e que, como vimos, experimentaban unha descompensación de forzas de atracción cara a outras moléculas. Deste xeito, na interface ar/auga, cando as moléculas de tensioactivo están na interface, a parte hidrofílica da molécula experimenta atracción cara ás moléculas de auga e a parte hidrofóbica dispónse cara ao ar. Isto elimina o contacto entre fases que xeraba a asimetría de interaccións intermoleculares e daba orixe á tensión superficial. Como se pode ver na ecuación 4, ao diminuír a tensión interfacial, a área constante, diminúe a enerxía libre interfacial, facendo o sistema enerxeticamente máis favorábel [25,27].

No estudo das monocapas de tensioactivos, unha magnitude de especial utilidade, derivada da tensión superficial, é a **presión superficial** (π). Defínese como a diferenza de tensión interfacial do sistema debida á presenza da monocapa:

$$\pi = \gamma_0 - \gamma \quad \text{(Ecuación 6)}$$

onde γ_0 é a tensión superficial do líquido coa interface limpa e γ é a tensión superficial medida co filme [27,30]. As súas unidades, ao ser unha resta de tensións interfaciais, son as mesmas que as desta magnitude. A presión superficial mídese experimentalmente, igual que a tensión superficial, como a forza neta exercida sobre un elemento acoplado a unha balanza ou dinamómetro, que pode ser unha placa pendurada (de platino ou papel, chamada placa de Wilhelmy), un anel metálico, etc. Deste xeito, existen varios métodos [25], cuxa explicación detallada excede os obxectivos deste traballo.

Obtención e caracterización de monocapas.

En función do método de obtención, falamos de dous tipos diferentes de filmes: monocapas de adsorción ou de Gibbs e monocapas de extensión ou de Langmuir. A efectos destas técnicas, a fase líquida sobre a que se dispón o filme recibe o nome de **subfase** [25,27].

Nas monocapas de **adsorción**, a subfase é unha disolución acuosa do tensioactivo do que se quere obter unha monocapa. Dado que, como comentabamos, as interfaces son rexións enerxeticamente desfavorábeis, os tensioactivos pasan do seo da disolución a colocarse na interface de forma espontánea, formando unha monocapa.

No caso das monocapas de **extensión**, que son as que se obtiveron na realización deste traballo, a fase líquida será auga ou unha disolución acuosa carente de solutos activos en superficie, sobre a cal será depositado o tensioactivo de interese. Esta deposición realízase disolvendo previamente o tensioactivo insolúbel en auga nun disolvente, que chamaremos de extensión, que deberá ser un disolvente orgánico moi volátil, de tal maneira que se poida evaporar e deixar o tensioactivo na interface sen outros residuos. Esta disolución é depositada pinga a pinga sobre a subfase coa axuda dunha microxiringa ou micropipeta. Após deixar o disolvente evaporar, a monocapa está formada [25,27].

Unha vez na interface, a monocapa pódese caracterizar a través de técnicas espectroscópicas, microscópicas, reolóxicas, electroquímicas, etc., en función das propiedades do filme que se midan en cada caso. A forma máis inmediata, non obstante, é a súa compresión nunha balanza de Langmuir, tamén chamada de Langmuir-Pockels (Figura 9), que o enxeñeiro estadounidense Irving Langmuir e a súa colega Katharine Blodgett obtiveron perfeccionando o modelo previamente construído pola científica italo-alemá Agnes Pockels.

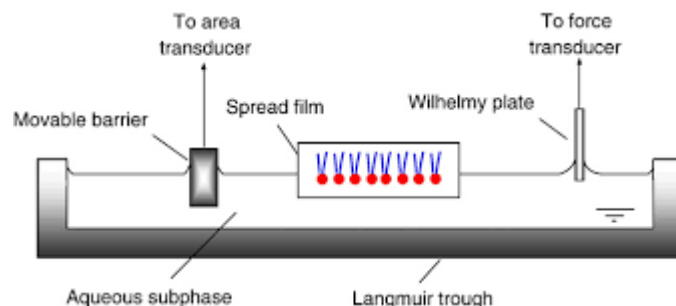


Figura 9. Esquema da balanza de Langmuir-Pockels, en vista transversal [31].

A compresión isotérmica da monocapa estendida na interface mediante unha ou dúas barreiras permite, de forma análoga a como acontece a compresión dun gas en tres dimensións, a aproximación progresiva dunhas moléculas da monocapa a outras, mudando de estado de agregación superficial (análogos aproximados aos estados sólido, líquido e gas en tres dimensións). As interaccións entre as moléculas do filme dán lugar a distintas conformacións das mesmas na interface, o que altera a forza que exercen sobre o sensor de presión superficial e dán lugar a diferentes curvas de presión (π) que, representadas fronte á área media que ocupa cada molécula na interface (A), reciben o nome de **isotermas π -A** e constitúen a caracterización fundamental dun tensioactivo insolúbel en monocapa [25,28].

Na figura 10 represéntase unha isoterma de compresión típica dun tensioactivo en monocapa. A representación do rexistro da compresión comeza na parte inferior dereita da gráfica, a valores altos de área por molécula e baixas presións superficiais. A medida que a compresión avanza, a área molecular diminúe (ao reducirse a área total por acción das barreiras da balanza) e, ao aumentar a forza exercida polos tensioactivos sobre a placa de Wilhelmy, aumenta a presión superficial. No transcurso da compresión, en virtude das interaccións entre as moléculas de tensioactivo na interface e a medida que estas se aproximan entre si, falamos de estados de agregación **gasoso**, no que as moléculas se acostuman a dispor en paralelo á interface con abundante espazo entre elas; **expandido**, no cal comezan a elevar da interface as súas cadeas apolares por falta de espazo, ou **condensado**, coas moléculas próximas entre si e coas cadeas orientadas cada vez máis próximas á vertical. Nalgúns compostos pódese atinxir un estado **sólido**, no que o eixo das cadeas hidrofóbicas se dispón en perpendicular á interface. O fenómeno coñecido como colapso da monocapa ten lugar cando as moléculas non se poden aproximar máis entre si e pérdese a estrutura do filme, ben por formación de multicapas ou ben por desorción (solubilización na subfase) do tensioactivo [27].

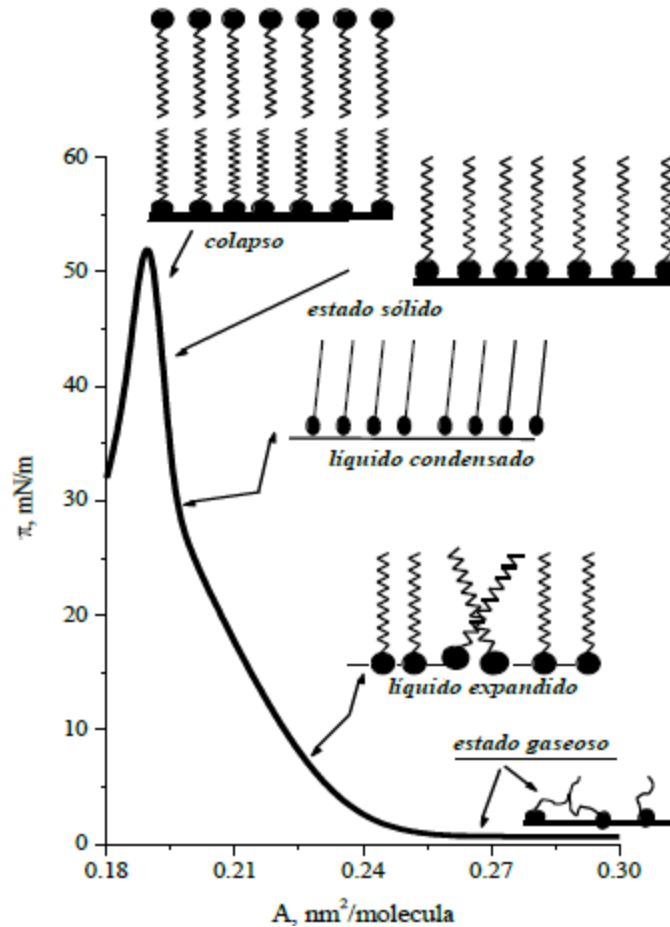


Figura 10. Isotherma típica da compresión dunha monocapa [27].

Aplicacións farmacéuticas dos estudos en superficie.

Os tensoactivos, por mor da súa particular estrutura (Figura 8), presentan unha serie de propiedades de grande interese, que permiten o estudo dunha grande variedade de sistemas e procesos importantes no eido farmacéutico.

Particularmente, as monocapas de Langmuir empréganse como modelos na simulación de membranas biolóxicas (membranas celulares, surfactante pulmonar, etc.) e de moitos outros agregados supramoleculares e de natureza coloidal, como micelas e vesículas, dado que a disposición das moléculas de tensoactivo nunha monocapa é **análoga** á que ocupan no agregado, que se mantén cohesionado grazas ás mesmas forzas intermoleculares que se poñen de manifesto no filme. O seu estudo a través de monocapas permite obter **información sobre a cohesión** do agregado e o efecto sobre ela de distintos factores como o pH, a temperatura, a forza iónica, etc. Por outra banda, a obtención de monocapas mixtas, ou de varios compoñentes,

permite estudar as interaccións entre distintas substancias, como pode ser un fármaco e unha membrana ou agregado [32,33].

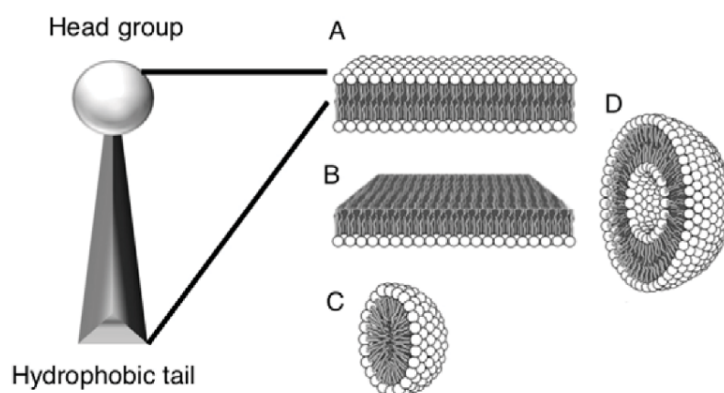


Figura 11. As monocapas (B) empréganse para simular o comportamento doutros agregados supramoleculares de substancias anfifílicas, como bicapas (A), micelas (C) ou vesículas (D) [34].

Neste traballo, a técnica de monocapas de Langmuir emprégase para estudar a **interacción entre varias substancias**, nas que unha é un tensioactivo insolúbel e outra pode ser ou ben insolúbel tamén (incorporándose á monocapa) ou ben solúbel, como é o caso de proteínas e moitos fármacos. Neste último caso estúdase a **adsorción** da substancia en cuestión, disolta ou dispersa na subfase, á monocapa, e a súa posíbel **penetración** no filme. Isto ponse de manifesto nunha variación da presión superficial, medida fronte ao tempo (cinéticas π -t) [35]. Un aumento da presión superficial implica unha maior forza exercida sobre o sensor pola presenza de máis moléculas na interface, indicativo da incorporación do soluto ao filme. A forma e a pendente da curva π -t permiten tamén inferir os procesos que teñen lugar na interface subfase/monocapa.

Obxectivos

Os obxectivos do presente traballo son:

1. Caracterizar na interface ar/auga dous lípidos activos en superficie compoñentes de sistemas nanoestruturados de liberación de fármacos, e a súa mestura equimolar.
2. Establecer que interaccións se poñen de manifesto, de ser o caso, entre estes lípidos e o principio activo encapsulado polos NLC dos que forman parte.
3. Constatar a utilidade das técnicas baseadas na fisicoquímica de superficies para o estudo de sistemas e procesos de interese farmacéutico.

Material e métodos

MATERIAL

Os dous lípidos empregados son ésteres de ácidos graxos con glicerilo), cuxa estrutura se reflicte na Figura 12.

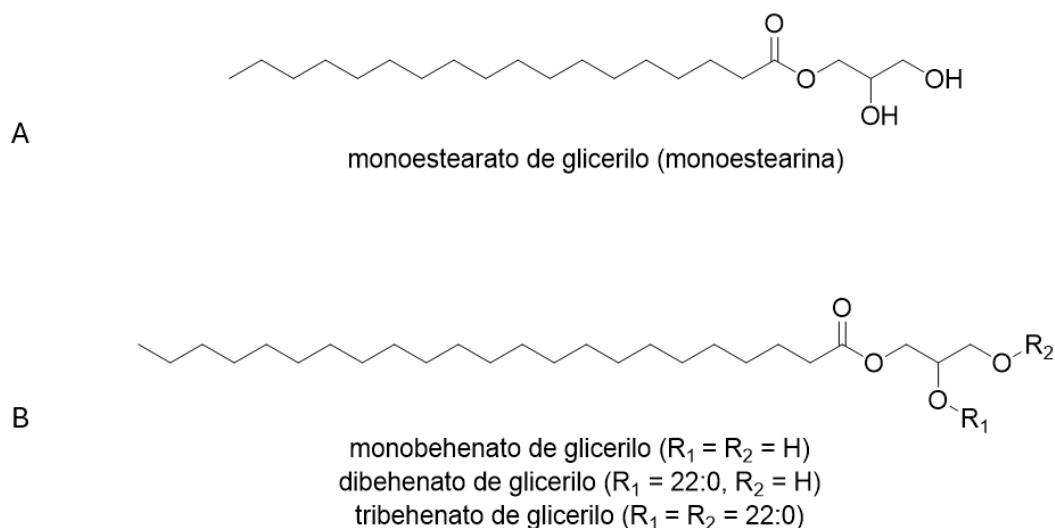


Figura 12. Estrutura molecular dos lípidos empregados, (A) monooleína (M_m : 358,6 g/mol [37]) e (B) os ésteres que conforman o Compritol 888 ATO ($\langle M_m \rangle$: 782,4 g/mol)** na proporción indicada na Táboa 1. A estrutura do fármaco, bevacizumab (M_m : 149.196,88 g/mol [38]), aparece na figura 4.

**A masa molar promedio do Compritol foi calculada como media ponderada das masas molares dos ésteres que o forman en cadansúa proporción [22].

O **monooleato de glicerilo**, ou **monooleína (GMS)** (Guinama, Valencia) e o **Compritol 888 ATO (C8A)** (Gattefossé SAS, Francia) foron empregados sen modificacións. O **bevacizumab (BVZ)** (Zirabev®, Pfizer, EUA) foi purificado por ultrafiltración previamente ao seu uso a través dun filtro Amicon® de 100 kDa coa axuda dunha centrífuga Centrifuge 5804 R (Eppendorf, Alemaña) a 3000 rpm durante 10 min (dúas veces) e posteriormente reconstituído, a fin de eliminar os tensioactivos antiaglomerantes do produto comercial, susceptíbeis de alterar as monocapas.

Para a limpeza da balanza de Langmuir e a cubeta de penetración empregouse auga ultrapura de condutividade 18,2 M Ω cm (Milli-Q, MilliPore SAS, Merck, Francia). O cloroformo e o metanol utilizados para facer as disolucións e o etanol para a limpeza da balanza e da cubeta foron adquiridos a Sigma-Aldrich (Merck, Francia) e empregados tamén sen alteracións.

Táboa 1. Composición dos produtos empregados en ésteres de ácidos graxos con glicerol ou glicerina (propano-1,2,3-triol). A porcentaxe (*) fai referencia á proporción promedio de cada éster no produto final empregado, segundo indicado polo fabricante [36].

ÁCIDOS GRAXOS			ÉSTERES RESULTANTES			
Nome común	Nome químico	Nº átomos C (:) nº insaturacións	Estequiometría ácido/glicerol	Nome (... de glicerilo)	%*	Produto final
Ácido behénico	Ácido docosanoico	22:0	1/1	monobehenato	12-18	Compritol 888 ATO
			2/1	dibehenato	40-60	
			3/1	tribehenato	21-35	
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	18:0	1/1	monoestearato	100	GMS

MÉTODOS

Compresión de monocapas.

As **isotermas π -A** foron obtidas por compresión de monocapas de lípidos nunha balanza de Langmuir de politetrafluoroetileno (PTFE ou teflón) de 470 cm² de superficie efectiva, modelo NIMA 611 (NIMA, Coventry, Inglaterra) (Figura 13A), cunha barreira de teflón. A balanza limpouse con etanol e aclarouse dúas veces con auga ultrapura antes de proceder a realizar cada experiencia. Para obter as monocapas estendéronse os tensioactivos na interface ar/auga a través da deposición manual sobre ela, pinga a pinga, de 100 μ L dunha disolución de concentración 0,64 mM do lípido ou lípidos de interese en cloroformo, cun 10% (v/v) de metanol como cosolvente, coa axuda dunha microxiringa (Hamilton, EUA), dando deste xeito filmes de $3,86 (\pm 0,01) \times 10^{16}$ moléculas. Unha vez depositada a monocapa esperouse 10 minutos para asegurar a total evaporación do disolvente de extensión, para despois o filme a unha velocidade de 15 cm²/min. A compresión foi rexistrada a través da medida da presión superficial (π) grazas a un sensor de tipo placa de Wilhelmy feito de papel de cromatógrafo (Whatman Chr1, UK). A presión superficial foi representada graficamente como ordenada fronte á área promedio que ocupa cada molécula no filme (A). A temperatura á que se realizaron as experiencias foi de $30 \pm 1^\circ\text{C}$, controlada a través dun baño termostaticado (Julabo GmbH, Alemania) acoplado á balanza.

Cálculos baseados nas isothermas.

As isothermas π -A foron tratadas matematicamente con posterioridade co programa OriginLab 2019 (Origin) para poder obter a representación do seu **módulo de compresibilidade superficial** (C_s^{-1}), unha medida da resistencia que ofrece o filme á compresión [27,30], fronte á presión superficial. Dado que o seu significado físico é oposto ao da compresibilidade (facilidade coa que se pode comprimir un sistema), calcúlase como a súa inversa. Se a unha temperatura T a compresibilidade, C , dun sistema en tres dimensións [26] vén dada pola ecuación

$$C = -\frac{1}{V} \left(\frac{\partial V}{\partial P} \right)_T \quad (\text{Ecuación 7})$$

onde V é o volume do sistema e P a presión que se exerce sobre el, pasar isto a dúas dimensións (substituíndo o volume por área, A , e a presión por presión superficial, π) dános a compresibilidade superficial, C_s , definida como:

$$C_s = -\frac{1}{A} \left(\frac{\partial A}{\partial \pi} \right)_T \quad (\text{Ecuación 8})$$

Calculando a súa inversa temos a expresión do módulo de compresibilidade superficial:

$$C_s^{-1} = -A \left(\frac{\partial \pi}{\partial A} \right)_T \quad (\text{Ecuación 9})$$

que ten unidades de presión superficial (mN/m). O valor do módulo de compresibilidade garda relación, como se observa na ecuación 9, coa pendente da curva π -A, e dá unha indicación do estado de agregación superficial das moléculas da monocapa: canto maior sexa o estado de agregación, maior tamén será a resistencia a unha maior compresión do filme. Esta relación aparece reflectida na táboa 2.

A curva final do módulo de compresibilidade foi obtida após o procesamento da curva obtida en bruto (por aplicación da ecuación 9) a través dunha dupla suavización, ou mellora da relación sinal/ruído, por promediación ponderada entre puntos adxacentes (*adjacent-averaging smoothing*).

Táboa 2. Relación entre o valor do módulo de compresibilidade e o estado de agregación da monocapa. Os valores dos intervalos varían lixeiramente en función dos autores; estes son os valores propostos por Davies e Rideal. Adaptada de [27,30].

Estado de agregación da monocapa	C_s^{-1} (mN/m)
Gasoso (G), transicións de fase de orde 1, colapso	~ 0
Gas denso ou líquido de baixa densidade	0-25
Líquido expandido (LE)	25-50
Líquido intermedio ou de transición (I)	50-100
Líquido condensado (LC)	100-250

Así mesmo, calculáronse tamén dúas funcións de exceso, isto é, variacións que experimenta unha magnitude física entre o valor que adoptaría nunha mestura ideal de dúas substancias en monocapa e o valor desa magnitude correspondente á mestura real, medido experimentalmente.

Por unha banda, a área molecular de exceso (A^{exc}), que é a diferenza de área promedio por molécula entre a mestura ideal, calculada pola regra da aditividade, cuxa expresión é

$$A^{ideal} = A_1x_1 + A_2x_2 \quad (\text{Ecuación 10})$$

e a área real, recollida na isoterma de compresión da mestura GMS/C8A. A ecuación da área de exceso fica entón:

$$A^{exc} = A^{real} - A^{ideal} = A_{1,2} - (A_1x_1 + A_2x_2) \quad (\text{Ecuación 11})$$

A variación de exceso da enerxía libre de Gibbs (ΔG^{exc}) calcúlase segundo a aproximación proposta por Goodrich [39] e Pagano e Gershfeld [40]:

$$\Delta G^{exc} = N \int_{\pi^*}^{\pi} A^{exc} d\pi = N \int_{\pi^*}^{\pi} A_{1,2} - (A_1x_1 + A_2x_2) \quad (\text{Ecuación 12})$$

onde N é o número de Avogadro, π a presión escollida para a cal se estuda a enerxía libre de exceso, e π^* é a presión superficial á cal se entende que os compoñentes se mesturan de forma ideal, que se pode asumir que é a presión cero ($\pi^* = 0$ mN/m) [41].

Estudos de penetración (cinética π -t).

Para o estudo das interaccións lípido/anticorpo, obtivéronse curvas da cinética de penetración (π -t) do bevacizumab en monocapas de lípidos nunha cubeta cilíndrica de PTFE de 70 mL de capacidade e superficie de 30 cm² acoplada a un sensor de presión superficial (ambos os dous equipamentos de NIMA, Coventry, Inglaterra) (Figura 13B).

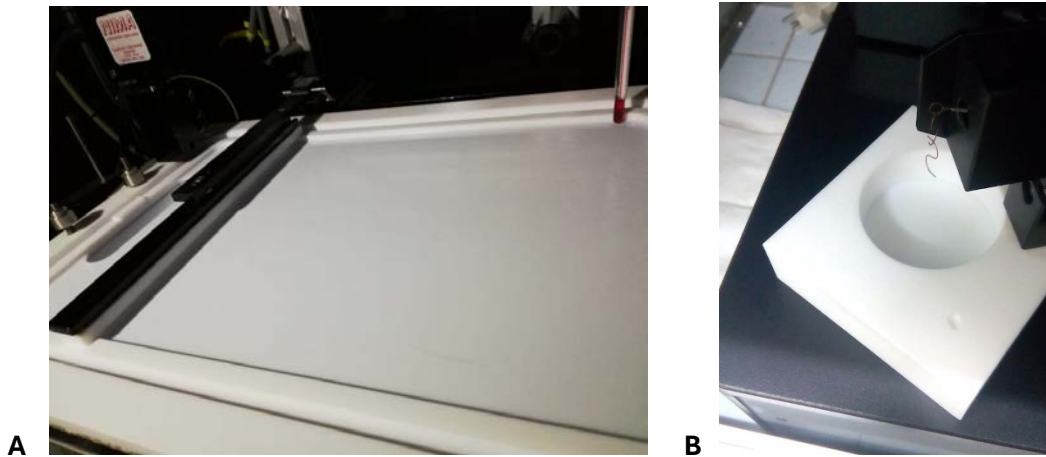


Figura 13. Balanza superficial de Langmuir-Pockels (A) e cubeta para estudos de penetración (B).

Na superficie da auga vertida no interior da cubeta da figura 13B depositáronse, en primeiro lugar, monocapas do número de moléculas necesario para atinxir $\pi = 10$ mN/m na interface en cada caso. Isto obedece á necesidade da monocapa de estar nun estado de agregación pouco condensado, a fin de facilitar a penetración da proteína no filme [42]. Após 10 minutos de estabilización do filme e evaporación do disolvente, inxectouse o anticorpo en disolución acuosa por baixo da monocapa, obtendo unha concentración de anticorpo na subfase de 0,48 μ M, e mediuse a presión superficial fronte ao tempo durante 10 horas. A inxección realizouse empregando o canal que a tal efecto ten a cubeta, coa axuda dunha xiringa Terumo® acoplada a unha agulla hipodérmica Sol-M™, e retirando previamente un volume idéntico ao inxectado para evitar cambios de π debidos a unha variación do volume de subfase. Os estudos de penetración realizáronse a temperatura ambiente (21 \pm 1 °C).

Resultados e discusión

1. CARACTERIZACIÓN DOS LÍPIDOS DOS NLC: COMPRESIÓN DE MONOCAPAS DE EXTENSIÓN.

As monocapas de Langmuir dos dous lípidos e da súa mestura equimolar deron isothermas de compresión (Figura 14) e o seu módulo de compresibilidade (Figura 15).

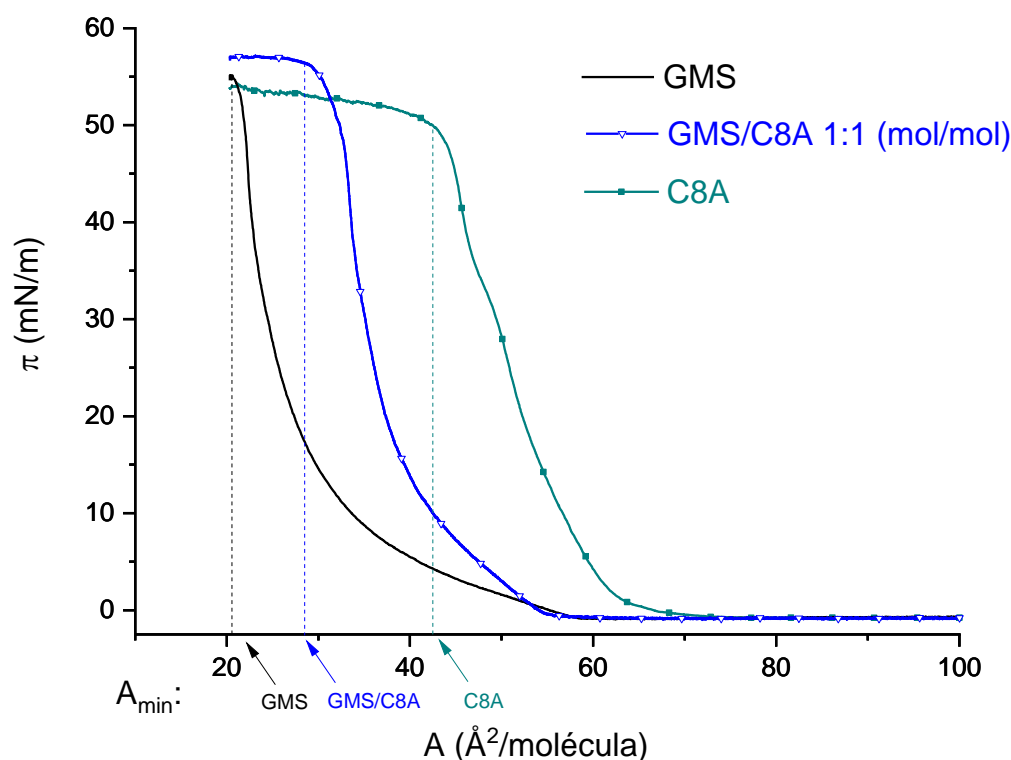


Figura 14. Isothermas de compresión dos filmes compostos por monoestearina (GMS), Compritol (C8A) e a súa mestura equimolar.

Táboa 3. Valores de área promedio por molécula a distintas presións superficiais e valores da presión de colapso dos tres sistemas.

	GMS	GMS:Compritol 1:1 (mol:mol)	Compritol 888 ATO
A ($\pi = 0$ mN/m) [Å ² /molécula]	55,2	54,0	66,6
A ($\pi = 20$ mN/m) [Å ² /molécula]	27,4	37,4	52,3
A ($\pi = 40$ mN/m) [Å ² /molécula]	22,8	33,6	45,9
A_{min} [Å ² /molécula]	20,6	28,5	42,5
π_{cot} [mN/m]	55,1	56,4	50,0

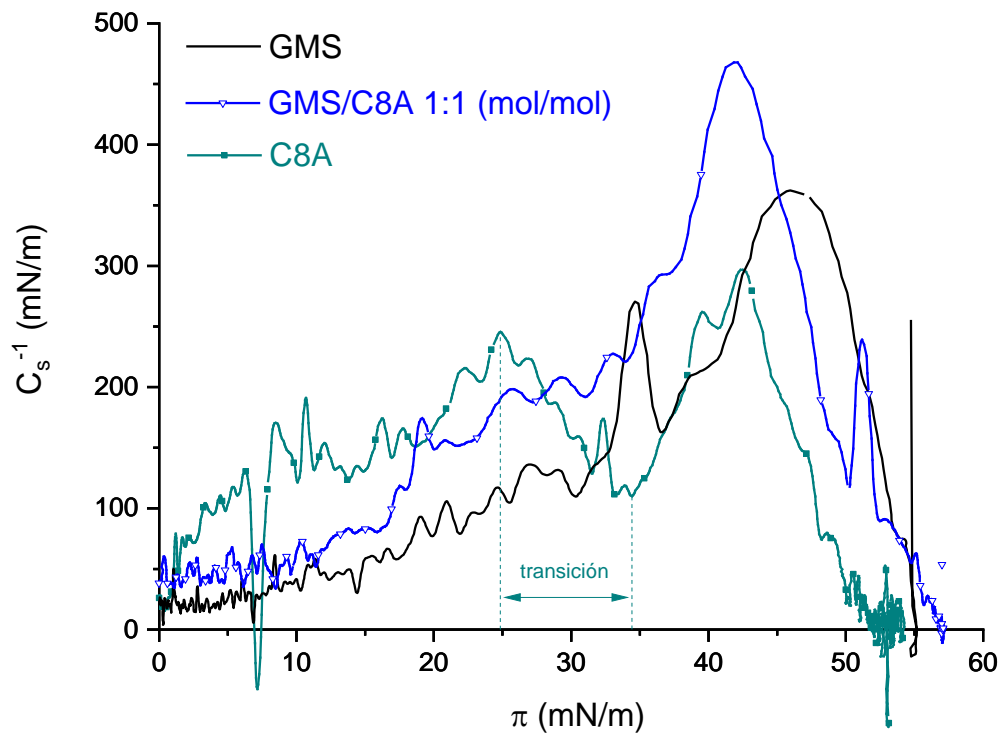


Figura 15. Módulo de compressibilidade dos tres sistemas fronte á presión superficial.

1.1. Monoestearina (GMS)

As isotermas da compresión de GMS na interface a/w (en cor negra, sen símbolos, na Figura 14) presentan unha forma e unha presión de colapso concordantes coa literatura [19,20]. A temperaturas inferiores ou iguais a 30°C, a monocapa de monoestearina non mostra indicios de transicións de fase, probabelmente porque xa coexistan a moi baixas presións a fase condensada e a fase expandida ou desordenada [19].

A isoterma reflicte unha área por molécula no final da compresión de 20,6 Å²/molécula, lixeiramente maior que a do ácido esteárico (aprox. 20,3 Å²/molécula) descrita en estudos anteriores [43-45]. Na Figura 16 apréciase onde ten lugar o colapso da monocapa, segundo se confirma co módulo de compressibilidade: o colapso acontece á presión para a cal a curva do módulo chega ou se aproxima a 0 (punto de máxima compressibilidade, indicativa da perda da estrutura da monocapa) [27,30]. Despois o módulo aumenta novamente, mostrando que aínda hai compresión posterior ao colapso (Figura 16).

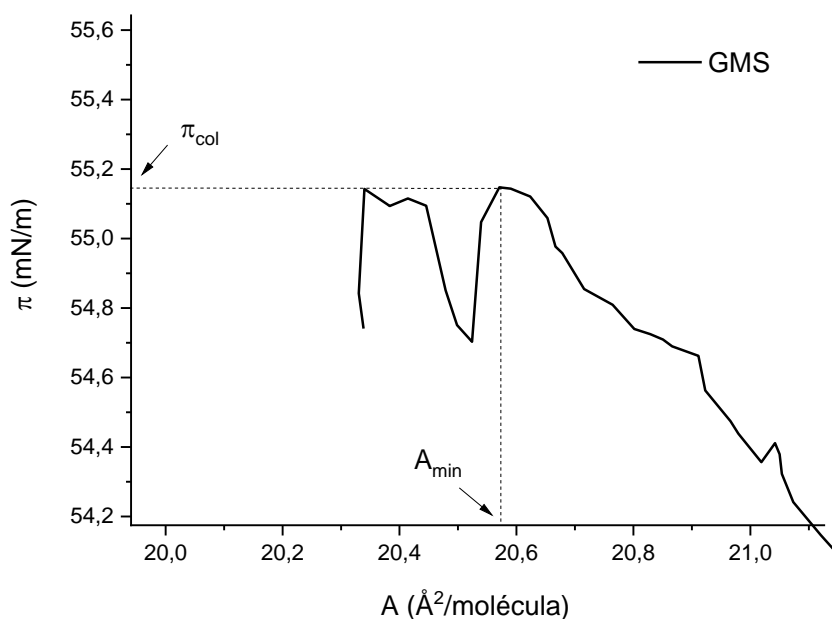


Figura 16. Detalle da isoterma de compresión da monoestearina no seu extremo final, no que se pode observar o colapso da monocapa e a área mínima por molécula do GMS.

A nivel molecular, isto vén corroborar que a única parte hidrofóbica da monoestearina, que fica no aire cando se coloca na interface aire/auga, é a cadea hidrocarbonada de 18 átomos de carbono, a mesma que na monocapa do propio ácido graxo [43] (Figura 17). Nesta figura tamén se pode apreciar que o grupo hidrofílico da monoestearina (glicerol), que permanece mergullado na auga, presenta maior volume que o grupo carboxilo do ácido graxo, explicando así a diferenza de área mínima entre as dúas substancias. A estabilidade da monocapa de GMS vén dada polas forzas de dispersión entre cadeas apolares, e tamén polos enlaces de hidróxeno intermoleculares que se establecen entre os grupos glicerilo, e que explican en parte tamén a elevada presión de colapso deste lípido fronte ao seu ácido graxo homólogo [19,43]. Tamén explica que a monoestearina teña o máximo do seu módulo de compresibilidade a presións maiores que os outros dous sistemas (46,0 mN/m, fronte aos 42,5 mN/m do C8A e 42,1 mN/m da mestura).

1.2. Compritol 888 ATO (C8A)

A isoterma de compresión do C8A (en azul verdoso e cadrados na Figura 14) posúe a mesma forma xeral que a descrita por Pérez et col. [46] e achega valores de área por molécula significativamente superiores aos do GMS. Este achado é consistente coa distinta composición deste produto, que inclúe tamén as especies di- e triacilglicérido, que ocupan maior superficie

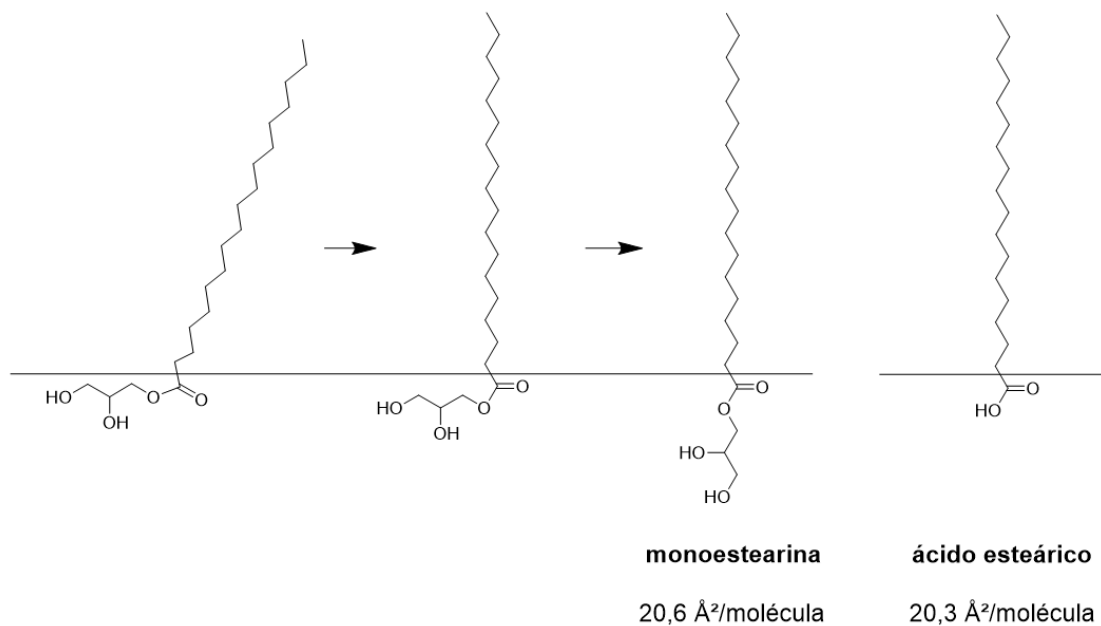


Figura 17. Variación da conformación dunha molécula de monoestearina na interface ar/auga a medida que avanza a compresión da monocapa, en concordancia con [19], e comparación da súa área mínima coa do ácido esteárico.

que o monoacilglicérido (Táboa 1 e Figura 18).

Un factor importante que explica o comportamento do Compritol desde o comezo da compresión até ~ 28 mN/m, é a elevada lonxitude das cadeas alifáticas destes acilglicéridos, que fai que o C8A conforme unha monocapa nun estado superficial máis condensado que o da monoestearina (4 átomos de carbono máis curta, equivalentes a ~ 5 Å [47]) (Figura 18). Isto explícase pola existencia de maiores interaccións de London entre os grupos metileno, máis numerosos no Compritol [48]; por este motivo, vemos que a monocapa de C8A é a máis rixida (maior C_s^{-1} , Figura 15) neste intervalo de presións. A isto súmase que, tendo depositado o mesmo número de moléculas dos tres sistemas, as moléculas de Compritol son as que máis área ocupan cada unha, mostrando maior resistencia á compresión. Esta tendencia só se ve interrompida pola transición xa comentada, que fai caer a curva do módulo de compresibilidade até acadar un pico máximo inferior ao da monoestearina, coherente con outros achados na literatura para acilglicéridos análogos [49].

A meseta ou *plateau* que se aprecia na isoterma en forma de “ombro”, que o módulo de compresibilidade confirma entre os 24,9 e 34,5 mN/m (Figura 15), mostra unha diminución da magnitude de pendente, o que implica que nese intervalo a compresión está tendo outro efecto sobre a monocapa alén de subir a presión superficial. Habitualmente, isto é indicativo dunha

resultado faise comprensíbel facendo a comparación entre o Compritol e o ácido behénico: este ten unha sección transversal semellante á do ácido esteárico [47], e moito máis afastada dos valores do Compritol ca no caso do ácido esteárico e o GMS. A explicación reside en que o Compritol ten un promedio aproximado de 2,13 cadeas/molécula segundo a súa composición en acilglicéridos (Táboa 1), mentres que a monoestearina só ten 1 cadea/molécula:

Táboa 4. Comparación da relación entre o número de cadeas promedio por molécula e entre a área mínima por molécula no Compritol e na monoestearina.

	GMS	C8A	Ratio C8A/GMS
Nº cadeas/molécula	1	2,13	2,13
A_{min} [Å ² /molécula]	20,6	42,5	2,06

Como se observa na Táboa 4, cando as moléculas están altamente empaquetadas, a relación entre número de cadeas e entre seccións transversais das mesmas coincide no valor aproximado de 2,1, o que significa que na fase máis condensada as moléculas de Compritol adoptan as conformacións que ocupen menor área posíbel: as moléculas de monobehenina adoptan a orientación máis perpendicular á interface; as de dibehenina, ou dibehenato de glicerilo, unha conformación equivalente a esta; mentres que a tribehenina terá unha conformación “en E”, tamén chamada “en tridente” ou “en cepillo”, tal como se ten descrito para outros triacilglicéridos de cadea longa, na que cada cadea ocupa o mesmo que un ácido graxo do mesmo número de átomos de carbono [49,50] (Figura 18).

A última característica principal da isoterma de Compritol é o cambio de pendente que se produce a altas presións, evidente na súa isoterma (Figura 14). O trazado irregular e a diminución abrupta na magnitude da pendente apuntan ao colapso da monocapa, que se confirma no módulo de compresibilidade a unha presión de 50,0 mN/m. A partir de aí, a isoterma responde á compresión dun filme formado por mono- e multicapas coexistindo na interface [27,49]. Cabe mencionar que o Compritol mostra o valor máis baixo de presión de colapso dos tres sistemas lipídicos (Táboa 3), probabelmente por ser o lípido con menos enlaces de hidróxeno entre os seus grupos polares, que estabilizan a monocapa como se viu para o GMS.

1.3. Mestura equimolar CMS/C8A

En terceiro lugar, os filmes da mestura equimolar das dúas substancias dán lugar a unha isoterma (azul con triángulos brancos, Figura 14) con características intermedias entre as outras dúas: a forma aseméllase á da monoestearina, mentres que presenta un cambio de pendente despois do colapso como o que presenta o C8A, aparecendo neste caso a presións máis altas (~ 56 mN/m) ca no C8A (~ 50 mN/m). Como naquel caso, nin esta presión nin a presión máxima representan o colapso, que acontece a unha presión inferior (Táboa 3).

A diferenza do Compritol, non hai transición de fase ou alteración perceptíbel da conformación interfacial na mestura, mais si cabe salientar que a mestura do GMS co C8A parece estabilizar en certa maneira o estado de gas denso asociado á etapa da compresión inmediatamente anterior á suba de presión superficial (*lift-off*) [19], diminuindo a área á que isto ten lugar fronte á isoterma de monoestearina pura (Táboa 3). Isto pode atopar explicación nas interaccións atractivas que se comentarán despois.

O módulo de compresibilidade da mestura, como o dos lípidos por separado, mostra unha curva ascendente que culmina nun pico para despois baixar até o colapso da monocapa, mais existen diferenzas significativas entre as tres curvas a altas presións (Figura 15). A 28 mN/m, coa transición do C8A, a mestura de lípidos pasa a ser o sistema que ofrece maior resistencia a ser comprimido, tendencia que se mantén até presións moi altas ($\pi > 45$ mN/m), e adopta un valor máximo de C_s^{-1} moi superior aos dous produtos puros. É notábel que este máximo aparece aproximadamente á mesma presión que o do Compritol, o que leva a pensar que, en termos de presión superficial, é este lípido (e as cadeas de 22 átomos de carbono) o que goberna a compresibilidade da mestura. O aumento tan significativo da rixidez en relación aos compoñentes por separado, pola súa parte, pode ser debido a interaccións atractivas que se poñan de manifesto entre os acilglicéridos que conforman ambas as dúas substancias (Figura 18). Para comprobalo, calculouse a área de exceso (A^{exc}) e, para interpretar termodinamicamente este comportamento, a variación de exceso da enerxía libre (ΔG^{exc}) [27].

A gráfica da área de exceso da mestura (Figura 19) mostra que, agás nas proximidades do colapso, a calquera presión a monocapa de GMS/C8A **ocupa menos área** que a que correspondería a un comportamento ideal da mestura dos dous lípidos. Isto indica unha **condensación da monocapa**, isto é, apunta á existencia de maiores forzas atractivas (ou menores forzas repulsivas) que as que habería se a monoestearina e o Compritol se comportasen na mestura como se comportan en solitario. Isto é consistente cos datos que

indican unha **maior estabilidade** da monocapa, tales como unha presión de colapso maior que a dos compoñentes por separado (Táboa 3) ou o valor máximo do módulo de compresibilidade (Figura 15) [27,30].

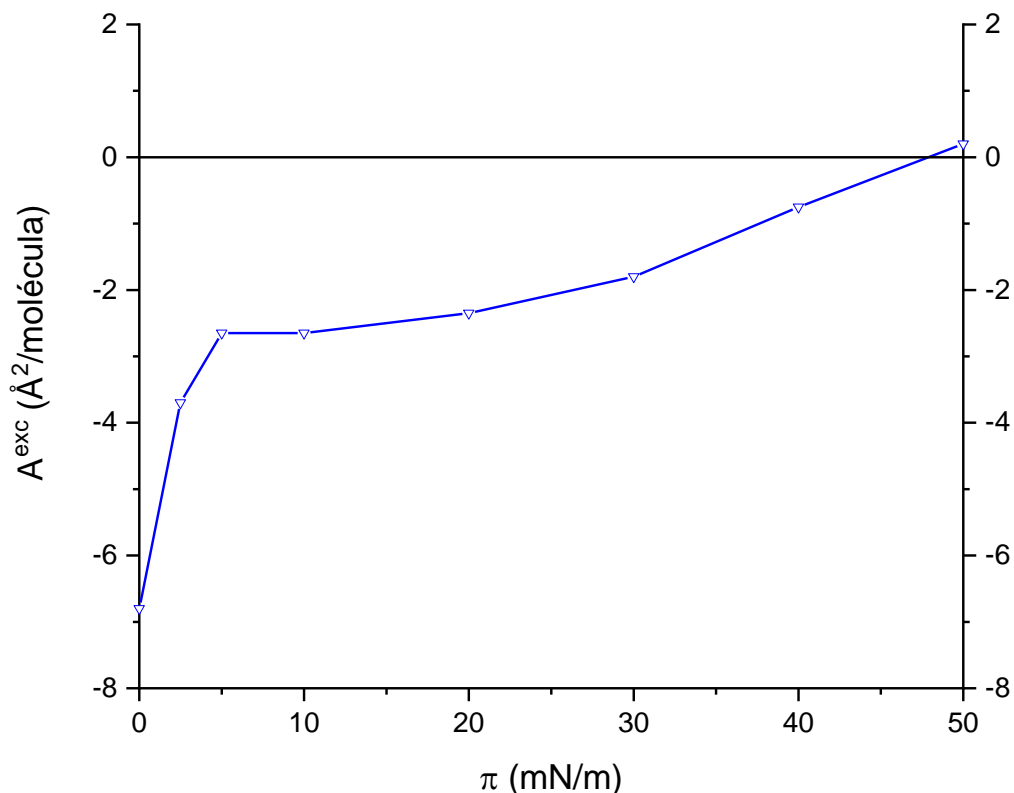


Figura 19. Área de exceso da mestura GMS/C8A fronte á presión superficial.

No estudo termodinámico destas interaccións a través da variación de exceso da función de Gibbs (Figura 20) confírmase o fenómeno que mostra a área de exceso. Isto permite interpretar que a mestura dos dous produtos é termodinamicamente favorábel, tanto máis canto máis próximas están as moléculas unhas ás outras, e que se trata dunha mestura con desviacións negativas do comportamento ideal, isto é, que o proceso de mestura ten lugar de forma espontánea, o que fai o sistema GMS/C8A máis estábel que os compoñentes por separado.

Este resultado é coincidente co da interacción entre mono- e diacilglicéridos do ácido esteárico (estando o noso sistema composto nun $\sim 86\%$ por mono- e diacilglicéridos e asumindo miscibilidade) que dán unha gráfica idéntica en forma e semellante en magnitude á Figura 20 e confirman a contracción da monocapa explicada coa A^{exc} [51]. Alén diso, a análise termodinámica do traballo de De la Fuente e Patiño [51] complementábase con valores de $\Delta S^{exc} < 0$ que

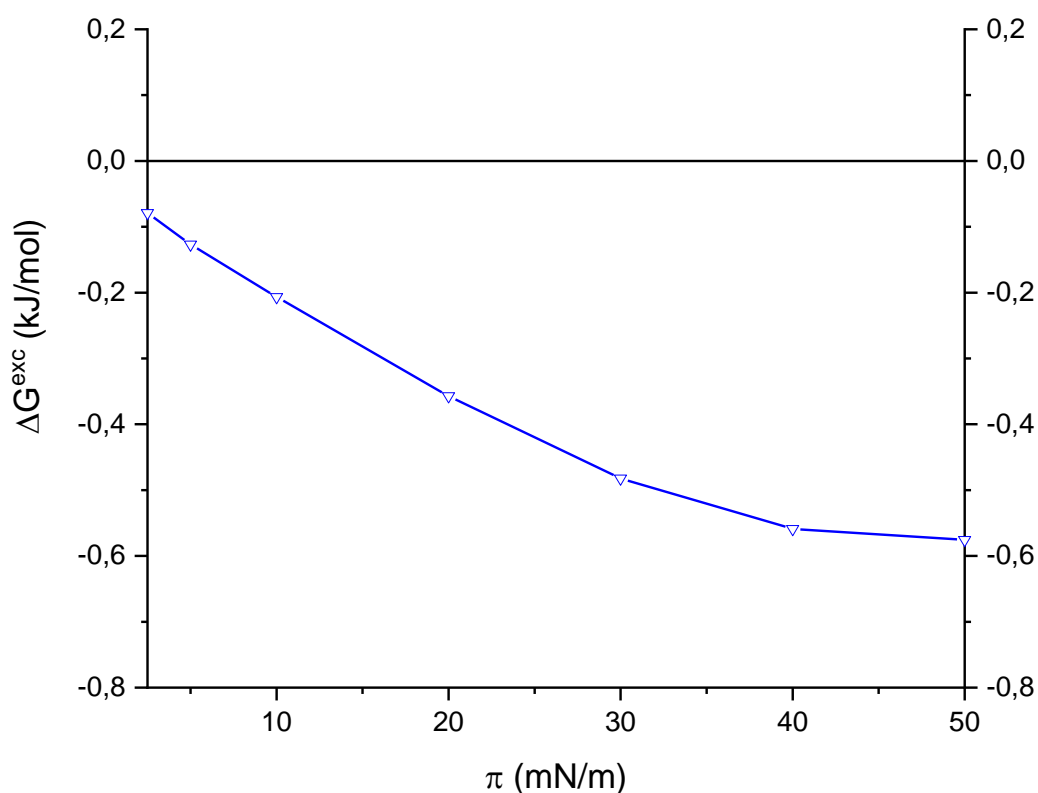


Figura 20. Variación de exceso da enerxía libre da mestura GMS/C8A fronte á presión superficial.

dán, necesariamente, unha $\Delta H^{\text{exc}} < 0$. Estes datos implican, respectivamente, que na monocapa mixta se forman estruturas superficiais máis ordenadas, e que isto ten lugar a través do establecemento de interaccións atractivas máis fortes que as dos lípidos individualmente.

Asumindo a grande semellanza entre os nosos sistemas, podemos extrapolar dentro da prudencia as conclusións xerais desta análise a este traballo, ficando como interese futuro a súa ampliación a outras temperaturas para calcular estoutras magnitudes termodinámicas de exceso.

Desde un punto de vista molecular, esta información pódese interpretar a través das forzas intermoleculares de atracción que se poñen de manifesto no sistema GMS/C8A. No referente á rexión formada polas cadeas alifáticas, sábese que son miscíbeis entre si por estudos da enerxía de cohesión [52-54] e polos resultados da ΔG^{exc} negativa (Figura 20), dado que as interaccións daranse só se os compoñentes da monocapa son miscíbeis entre si [27]. Sumando a isto que a repulsión efectiva é independente do número de átomos de carbono da cadea [50], semella que as respostas ao comportamento diferencial da mestura destes lípidos deben radicar nas cabezas polares.

No relativo a estoutra parte da monocapa, a elevada resistencia á compresión do filme mixto pode vir dada pola repulsión que nace da estrutura ríxida debida aos enlaces de hidróxeno, que poden impedir a adopción de estados cristalinos que noutras circunstancias se darían por parte do triacilglicérido e o monoacilglicérido [49,50]. Alén disto, é posíbel que se dea unha reconfiguración das ligazóns de hidróxeno no sistema equimolar, motivado por unha banda pola maior achega de grupos carboxilo cós que ten a monoestearina, que posúe átomos que poden participar deste tipo de interacción, e por outra banda por ter máis grupos hidroxilo có Compritol. Non obstante, habería tamén que considerar as variacións nas forzas dipolo-dipolo ou de orientación e nas forzas de indución (dipolo-dipolo inducido), para o cal faise necesario un estudo máis pormenorizado que se podería levar cabo mediante técnicas espectroscópicas no infravermello (IR) e estudos *in silico* por dinámica molecular [55].

2. INTERACCIÓN LÍPIDOS/ANTICORPO: CINÉTICA DE PENETRACIÓN.

Unha vez caracterizadas as monocapas de lípidos, quíxose coñecer o seu comportamento na presenza do principio activo, bevacizumab (BVZ), a fin de dilucidar as interaccións lípido/proteína nos NLC. A este fin, inxectouse o anticorpo en disolución acuosa por baixo dunha monocapa a unha presión superficial aproximada de 10 mN/m.

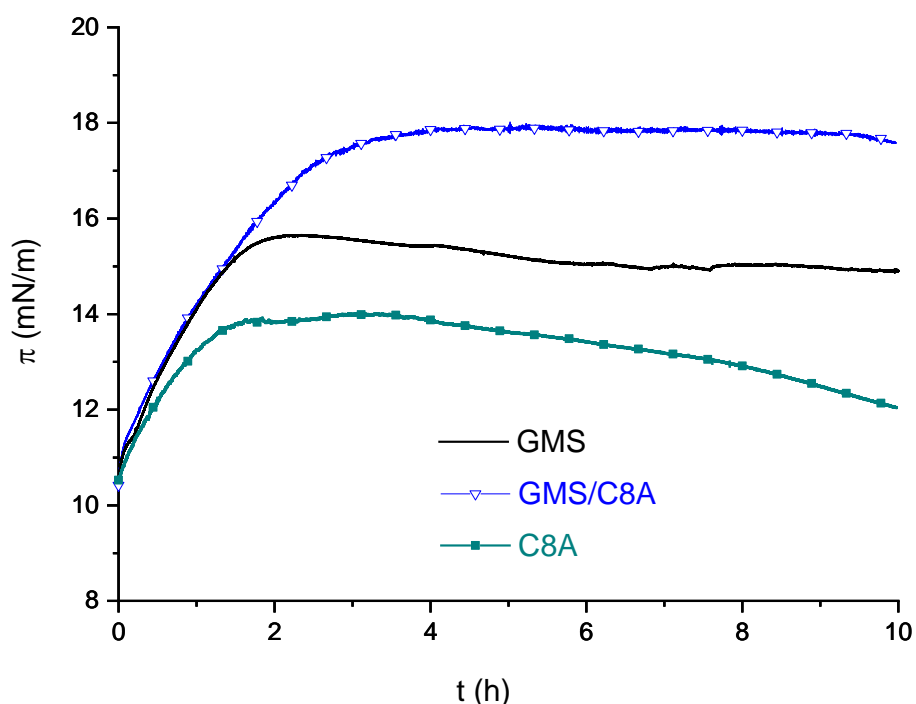


Figura 21. Curvas de penetración do BVZ en monocapas dos tres sistemas lipídicos estudados.

As curvas π -t da Figura 21 mostran os distintos perfís de penetración do BVZ na monocapa de lípidos. En todos os casos vemos que inmediatamente despois da inxección de BVZ ($t = 0$) prodúcese un aumento da presión, o que leva a pensar que, no momento que o anticorpo entra na subfase, difunde até adsorber na interface monocapa/auga, constituíndo a primeira etapa do proceso de penetración, representada pola pendente positiva entre $t_0 = 0$ e t_i (Táboa 5):

Táboa 5. Valores do tempo ao que muda a pendente da curva de penetración (t_i) e da presión máxima atinxida para a penetración de BVZ na monocapa de cada sistema.

	GMS	GMS/C8A 1:1 mol/mol	C8A
t_i [h]	2,1	3,9	1,5
π_{\max} [mN/m]	15,6	17,9	14,0

Pasado este tempo, a gráfica describe unha curva cunha pendente moi próxima a cero até as 9,4h, no caso da monocapa mixta, e lixeiramente negativa no caso dos lípidos por separado, tendo maior magnitude no caso do C8A.

Estas dúas etapas na penetración de substancias solúbeis en monocapas de Langmuir, que lle dán á curva a súa forma pseudologarítmica, están presentes en moitos procesos de adsorción/penetración, como o da β -lactoglobulina [35], lisozima [56] ou péptidos antimicrobianos [57] a modelos de membranas biolóxicas, e responden ás distintas etapas da penetración: migración do soluto cara á monocapa (pendente positiva), posterior inserción e interacción co filme lipídico (cambio de pendente) e formación dun sistema mixto máis ou menos estábel (rexión estacionaria).

Os valores da Táboa 5 permiten analizar de maneira diferencial a interacción do BVZ cos tres filmes lipídicos estudados. Á presión superficial escollida, a fluidez de cada monocapa, que se pode correlacionar coa capacidade para acoller novas moléculas [42], vai na mesma orde cá súa compresibilidade, e por tanto inversa á recollida na Figura 15: $\text{GMS} > [\text{GMS}/\text{C8A}] > \text{C8A}$, sendo a monocapa de monoestearina a máis fluída e a de Compritol a máis ríxida nestas condicións. Porén, tanto t_i como π_{\max} establecen unha correlación diferente, na cal a eficiencia de penetración vai na orde: $[\text{GMS}/\text{C8A}] > \text{GMS} > \text{C8A}$.

En ambos os dous casos, o Compritol é a monocapa menos preferida, en teoría (Figura 15) e na realidade (Figura 21), para a penetración do anticorpo. Sendo o do C8A o filme con máis

cadeas/molécula (2,13; Táboa 4) e con menos grupos hidroxilo/molécula dos tres (0,87; calculado da Figura 18), isto pode facer pensar nunha afinidade do BVZ cara a ambientes máis fluídos e hidrofílicos. Non obstante, o anticorpo non manifesta a súa maior interacción coa monocapa que presenta estes atributos en maior medida (monoestearina), senón coa mestura equimolar de ambos lípidos, polo que a interacción entre fármaco e lípidos debe ter consecuencias que fan desta mestura en monocapa moito máis atractiva para a proteína.

O tempo no que decorre a primeira etapa (pendente positiva na Figura 21), é moito maior no filme mixto ca no caso tanto da monoestearina coma do C8A (Táboa 5). Isto evoca unha adsorción máis lenta mais que, segundo π_{\max} , permite un maior grao de penetración ca no GMS.

É razoábel inferir, en vista dos resultados das isothermas e magnitudes derivadas enriba expostos, que o filme mixto ten unha serie de propiedades que poden ser de interese para a interacción co BVZ. Por unha banda, a monocapa da mestura posúe suficientes grupos OH (1,44 grupos/molécula de media) como para establecer interaccións hidrofílicas, incluso ligazóns de hidróxeno, cos residuos polares da inmunoglobulina, alén da dispoñibilidade doutros grupos como o carboxilo (1,56 grupos/molécula). Isto resulta favorábel, xa que se sabe que o resto de lisina Lys445 (cuxa cadea lateral remata nun grupo amino primario, ionizado a pH próximos á neutralidade) e residuos adxacentes establecen interaccións electrostáticas con grupos aniónicos, como o fosfato, estabilizadas por ligazóns de hidróxeno [58]. Ademais, tamén está estudado que as ligazóns de hidróxeno e electrostáticas gobernan a interacción do bevacizumab con polisacáridos coma o quitosano [59].

Por outra banda, a tribehenina e, en menor medida, a dibehenina, teñen o esqueleto carbonado de propano do glicerol máis exposto que os monoacilglicéridos (Figura 18), que pode interaccionar con residuos hidrofóbicos. Isto pode ser de utilidade, se non na primeira etapa, si na inserción do anticorpo na monocapa e na súa estabilización, a xulgar pola pendente practicamente nula da curva da mestura a partir das 4 h, a diferenza da pendente lixeiramente negativa do GMS, e máis aínda do C8A especialmente a partir das 8 h (Figura 21).

Conclusións

1. A monoestearina e o Compritol 888 ATO, compoñentes de NLC, forman monocapas estábeis na interface ar/auga, e a súa mestura equimolar, que forma un filme máis condensado que a dos dous produtos por separado, vese termodinamicamente favorecida de maneira directamente proporcional á presión superficial do filme.
2. O bevacizumab interacciona coas monocapas de C8A, GMS e a súa mestura equimolar de forma diferencial e en orde crecente, mostrando maior penetración nesta última, co probábel concurso de ligazóns de hidróxeno e electrostáticas, orientando así a composición do vector lipídico coloidal.
3. A interacción favorable entre os compoñentes lipídicos dun sistema nanoestruturado de liberación de fármacos, e entre o principio activo e estes compoñentes, pódese usar para informar a toma de decisións na formulación de novos medicamentos con mellores propiedades farmacocinéticas, e permite a súa optimización en base a criterios fisicoquímicos.

Bibliografía

1. Doménech Berrozpe J, Martínez Lanao J, Peraire Guitart C. Tratado general de biofarmacia y farmacocinética. Madrid: Síntesis; 2013.
2. Manual MSD [10 febrero 2025]. <https://www.msdmanuals.com/home/eye-disorders/biology-of-the-eyes/structure-and-function-of-the-eyes>
3. Martínez Pacheco R, Álvarez Lorenzo C, Alonso Fernández MJ. Tratado de tecnología farmacéutica. Madrid: Síntesis; 2016.
4. Varela-Fernández R, Díaz-Tomé V, Luaces-Rodríguez A, Conde-Penedo A, García-Otero X, Luzardo-Álvarez A, et al. Drug Delivery to the Posterior Segment of the Eye: Biopharmaceutic and Pharmacokinetic Considerations. *Pharmaceutics*. 2020;12(3).
5. Parafita Mato MA, Fernández Otero M del P. Anatomía y fisiología del aparato ocular. Madrid: [editor non identificado]; 1981.
6. Fleckenstein M, Keenan TDL, Guymer RH, Chakravarty U, Schmitz-Valckenberg S, Klaver CC, et al. Age-related macular degeneration. *Nat Rev Dis Primers*. 2021; 7(31).
7. Estarreja J, Mendes P, Silva C, Camacho P, Mateus V. Off-Label Use of Bevacizumab in Patients Diagnosed with Age-Related Macular Degeneration: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pharmaceutics*. 2024; 17(8), 1000.
8. Informe de Posicionamiento Terapéutico 40/2021 de Brolocizumab (Beovu®) en degeneración macular neovascular asociada a la edad. V2. 2021. AEMPS.
9. Wong WL, Su X, Li X, Cheung CMG, Klein R, Cheng CY et al. Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2014; 2(2): e106-e116.
10. Luaces-Rodríguez A, Mondelo-García C, Zarra-Ferro I, González-Barcia M, Aguiar P, Fernández-Ferreiro A, et al. Intravitreal anti-VEGF drug delivery systems for age-related macular degeneration. *International Journal of Pharmaceutics*. 2020; 573: 118767
11. Clínica Universidad de Navarra: Diccionario médico. [17 de agosto 2024] <https://www.cun.es/diccionario-/medico/terminos/escotoma>
12. Ficha técnica Zirabev 25 mg/ml concentrado para solución para perfusión [Internet]. CIMA - aemps.es. 2024 [consultado 28 de Agosto de 2024].
13. Gote V, Sikder S, Sicotte J, Pal D. Ocular drug delivery: present innovations and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther*. 2019; 370(3): 602–624.
14. Luaces-Rodríguez A, del Amo EM, Mondelo-García C, Gómez-Lado N, Gonzalez F, Ruibal Á, et al. PET study of ocular and blood pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab and aflibercept in rats. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2020; 154: 330–337

15. Ranieri G, Patruno R, Ruggieri E, Montemurro S, Valerio P, Ribatti D. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a Target of Bevacizumab in Cancer: From the Biology to the Clinic. *Current Medicinal Chemistry*. 2006; 13(16): 1845–57.
16. Castro-Balado A, Mondelo-García C, Zarra-Ferro I, Fernández-Ferreiro A. Nuevos sistemas de liberación de fármacos a nivel ocular. *Farm Hosp*. 2020; 44(4): 149-157.
17. Varela-Fernández R, García-Otero X, Díaz-Tomé V, Regueiro U, López-López M, González-Barcia M, et al. Lactoferrin-loaded nanostructured lipid carriers (NLCs) as a new formulation for optimized ocular drug delivery. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2022; 172: 144–156.
18. Kaur S, Nautyal U, Singh R, Singh S, Devi A. Nanostructured Lipid Carrier (NLC: the new generation of lipid nanoparticles. *Asian Pac. J. Health Sci*. 2015; 2(2): 76-93.
19. Pantoja-Romero WS, Estrada-López ED, Picciani PHS, Oliveira ON, Lachter ER, Pimentel AS. Efficient molecular packing of glycerol monostearate in Langmuir monolayers at the air-water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2016; 508: 85–92.
20. Vollhardt, D, Brezesinski, G. Phase Characteristics of 1-Monopalmitoyl-rac-glycerol Monolayers at the Air/Water Interface. *Langmuir*. 2016; 32(29): 7316–25.
21. Hu FQ, Jiang SP, Du YZ, Yuan H, Ye YQ, Zeng S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *International Journal of Pharmaceutics*. 2006; 314(1): 83–9.
22. Aburahma MH, Badr-Eldin SM. Compritol 888 ATO: a multifunctional lipid excipient in drug delivery systems and nanopharmaceuticals. *Expert Opinion on Drug Delivery*. 2014; 11(12): 1865–83.
23. Zeng L, An L, Wu X. Modeling drug-carrier interaction in the drug release from nanocarriers. *Journal of Drug Delivery*. 2011; 2011(1), 370308.
24. Valls Planells O, Castillo García B del, Girona V. Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. 4a ed. Barcelona: Piro; 1998
25. Barnes GT, Gentle IR. Interfacial Science. An Introduction 1ª Ed. Nova Iorque: Oxford University Press; 2005.
26. Levine IN. Fisicoquímica 5ªed. Volumen I. McGraw-Hill; 2004.
27. Miñones Trillo J. La Interfase aire-agua: monocapas de extensión. Santiago de Compostela: Real Academia de Farmacia, Sección Galicia; 2002.
28. Shaw DJ. Introducción a la química de superficies y coloides. 1ª ed. Madrid: Alhambra; 1969.
29. Solé Cabanes A. Tensioactivos en la industria textil. *3C Tecnología*. 2014; 10(3):137–151
30. Oliveira ON Jr, Caseli L, Ariga K. The Past and the Future of Langmuir and Langmuir-Blodgett Films. *Chem Rev*. 2022 Mar 23; 122(6): 6459-6513.

31. Zuo YY, Veldhuizen RA, Neumann AW, Petersen NO, Possmayer F. Current perspectives in pulmonary surfactant — Inhibition, enhancement and evaluation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 1778(10): 1947–1977.
32. Lage EV, Magalhães J, Pinheiro M, Reis S. Effect of the alkyl group in the piperazine N-substitution on the therapeutic action of rifamycins: A drug-membrane interaction study. *Chemico-Biological Interactions*. 2018; 289: 75–80.
33. Hąc-Wydro K, Dynarowicz-Łątka P. Interaction between nystatin and natural membrane lipids in Langmuir monolayers—The role of a phospholipid in the mechanism of polyenes mode of action. *Biophysical Chemistry*. 2006; 123(2-3): 154–161.
34. Maurer SE, Monnard P-A. Primitive Membrane Formation, Characteristics and Roles in the Emergent Properties of a protocell. *Entropy*. 2011; 13(2): 466-484
35. Vollhardt D, Fainerman VB. Penetration of dissolved amphiphiles into two-dimensional aggregating lipid monolayers. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2000; 86(1-2): 103–151.
36. Ficha de datos - Compritol 888 ATO. Gattefossé SAS. 2024. Disponible en: https://www.gattefosse.com/files/2119/tds_compritol_888_ato_936.pdf
37. PubChem. Glycerol Monostearate [Internet]. Nih.gov. PubChem; 2024 [consultada 28 agosto 2024]. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/24699>
38. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) DRUG: Bevacizumab [Internet]. Genome.jp. 2024 [consultada 28 agosto 2024]. Disponible en: https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?drug:D06409
39. Proceedings, 2nd International Congress on Surface Activity. FC Goodrich - Vol. I, 1957
40. Pagano RE, Gershfeld NL. A millidyne film balance for measuring intermolecular energies in lipid films. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1972; 41(2): 311–317.
41. Sández Macho MI, Gil González A, Suárez Varela A. Mixed Monolayers of Cyclosporin-A and Phospholipids at the Air–Water Interface. *Journal of Colloid and Interface Science* [Internet]. 2002; 235(2): 241–246.
42. Larios C, Miñones J, Haro I, Alsina MA, Busquets MA, Miñones Trillo J. Study of Adsorption and Penetration of E2(279–298) Peptide into Langmuir Phospholipid Monolayers. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006; 110(46): 23292–23299.
43. Fidalgo Rodríguez JL. Interacciones en monocapas de colesterol con ácidos grasos saturados e insaturados (omega-3, omega-6 y omega-9). 2016.
44. Hifeda YM, Rayfield GW. Phase transitions in fatty acid monolayers containing a single double bond in the fatty acid tail. *Journal of Colloid and Interface Science* [Internet]. 1985; 104(1): 209–215.

45. Tomoaia-Cotișel M, Zsakó J, Mocanu A, Lupea M, Chifu E. Insoluble mixed monolayers: III. The ionization characteristics of some fatty acids at the air/water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*. 1987; 117(2): 464–476.
46. Pérez B, Bulsara P, Rawlings AV, Wei W, Jensen MM, Wang Z, et al. Ultralong Fatty Acyl Derivatives As Occlusive Structure Lipids for Cosmetic Applications: Synthesis and Characterization. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2016; 4(12): 7137–7146.
47. Bu W, Vaknin D. Bilayer and Trilayer Crystalline Formation by Collapsing Behenic Acid Monolayers at Gas/Aqueous Interfaces. *Langmuir*. 2008; 24(2): 441–447.
48. Phillips MM, Chapman DF. Monolayer characteristics of saturated 1,2-diacyl phosphatidylcholines (lecithins) and phosphatidylethanolamines at the air-water interface. 1968; 163(3): 301–313.
49. Teixeira ACT, Brogueira P, Fernandes AC, Gonçalves da Silva AMPS. Phase behaviour of binary mixtures involving tristearin, stearyl stearate and stearic acid: thermodynamic study and BAM observation at the air–water interface and AFM analysis of LB films. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2008; 153(2): 98–108.
50. Zdravkova AN, van. Structure and Stability of Triglyceride Monolayers on Water and Mica Surfaces. *Crystal Growth & Design*. 2007; 7(12): 2778–2787.
51. De la Fuente Feria J, Rodriguez Patiño JM. Interactions of Ethanol in Subphase with Monostearin-Distearin Mixed Monolayers. *Langmuir*. 1995; 11(6): 2163–2172.
52. Sah BK, Kundu S. Collapse of Langmuir monolayer formed by the mixture of short- and long-tailed fatty acid molecules. *Colloid and Interface Science Communications*. 2020; 36: 100261.
53. Ishikawa T, Miyuki Kuramori, Narita T, Oishi Y. Mixing Behavior of the Binary Monolayers of Fatty Acids Based on Their Cohesive Energy Differences. *Langmuir*. 2022 Sep 29;38(40):12367–72.
54. Davies JT. A surface equation of state for charged monolayers. *Journal of Colloid Science*. 1956; 11(4-5): 377–90.
55. Pocheć M, Krupka KM, Panek JJ, Orzechowski K, Jezierska A. Intermolecular Interactions and Spectroscopic Signatures of the Hydrogen-Bonded System — n-Octanol in Experimental and Theoretical Studies. *Molecules*. 2022; 27(4): 1225.
56. Fainerman VB, Vollhardt D. Penetration of Langmuir Monolayers by Soluble Amphiphilic Molecules. *Langmuir*. 1999; 15(5): 1784–90.
57. Alvares DS, Monti MR, Ruggiero Neto J, Wilke N. The antimicrobial peptide Polybia-MP1 differentiates membranes with the hopanoid, diplopterol from those with cholesterol. *BBA Advances*. 2021; 1: 100002.
58. Veurink M, Westermaier Y, Gurny R, Scapozza L. Breaking the Aggregation of the Monoclonal Antibody Bevacizumab (Avastin®) by Dexamethasone Phosphate: Insights from Molecular

Modelling and Asymmetrical Flow Field-Flow Fractionation. *Pharmaceutical Research*. 2013; 30(4): 1176–87.

59. Abdi F, Arkan E, Mansouri K, Shekarbeygi Z, Barzegari E. Interactions of Bevacizumab with chitosan biopolymer nanoparticles: Molecular modeling and spectroscopic study. *Journal of Molecular Liquids*. 2021; 339: 116655.