

ENCAPSULACIÓN DEL 4-HIDROXI- 3-METOXIBENZALDEHÍDO EN LIPOSOMAS MODIFICADOS CON 1-O-ALQUILGLICEROLES SINTÉTICOS: ESTUDIO DE SU REACTIVIDAD CON EL RADICAL DPPH

Lic. Leniher Castan-Chibás^I, Dra. C. Grisel del Toro-García^{II}, Dr. C. Adolfo A. Fernández-García^{III},
M. Sc. Manuel González-Pérez^{IV}, M. Sc. Emilia Ortiz-Beatón^V, Daliana Lobo-Torres^I



castan@fie.uo.edu.cu

^IFacultad de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Oriente, Cuba, ^{II}Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba, ^{III}Centro de Biofísica Médica y Facultad de Matemática-Computación, Universidad de Oriente, Cuba, ^{IV}Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Cuba, ^VFacultad de Ingeniería Eléctrica, Universidad de Oriente, Cuba

● Resumen

Se presenta un estudio de la encapsulación del 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) en liposomas del tipo vesículas multilaminares, modificadas con el 1-O-alkilglicerol sintético 1-O-decilglicerol (C10), y su reactividad con el radical libre estable difenil-p-picril hidrazi (DPPH). Los liposomas obtenidos fueron caracterizados en cuanto a su eficiencia de encapsulación, capacidad de retención del soluto encapsulado y su capacidad de captura de radicales libres. Los resultados muestran una adecuada eficiencia de encapsulación (mayor del 45 %) y una elevada retención de la vainillina inmovilizada tras siete días de almacenamiento, superior al 95 %. Estos parámetros no fueron influenciados por la composición lipídica de las vesículas. Los encapsulados del aldehído mostraron una elevada reactividad con el difenil-p-picril hidrazi, en comparación con el 1-O-decilglicerol y la vainillina sin encapsular. La reactividad mostró dependencia de la composición lipídica de los liposomas, siendo esta mayor en las vesículas que contenían el alquilglicerol, lo que sugiere que dicho compuesto aumenta la captura de radicales libres de las formulaciones. Estos resultados demuestran que es posible encapsular la vainillina en liposomas, con una buena eficiencia de encapsulación y de retención, así como con la posibilidad de aplicación de las formulaciones obtenidas en la terapia antioxidante.

Palabras clave: liposomas, vainillina, 1-o-alkilgliceroles, radicales libres, antioxidantes.

● Abstract

A study is presented of the encapsulation of 4-hydroxy-3-methoxybenzaldehyde (vanillin) in liposomes, multilamellar vesicles type, modified with the synthetic 1-O-alkylglycerol decilglycerol (C10), and the reactivity of this system with the radical diphenyl-p-picril hidrazi (DPPH). The liposomes were characterized in terms of encapsulation efficiency, holding capacity of the encapsulated solute and ability to capture free radicals. The results show an adequate encapsulation efficiency (greater than 45 %) and high retention of immobilized vanillin after 7 days of storage, in the range of 95 %. These parameters were not influenced by the lipid composition of the vesicles. The encapsulated aldehyde showed a high reactivity with diphenyl-p-picril hidrazi, compared with decilglycerol unencapsulated and vanillin. The reactivity was dependent of the lipid composition of liposomes, this being greater in vesicles containing decilglycerol and suggesting that the compound increases the capture of free radicals in the formulations. These results demonstrate the feasibility of liposome-encapsulated vanillin, with good encapsulation efficiency and retention, as well as the applicability of the formulations obtained in the antioxidant therapy.

Keywords: liposomes, vanillin, 1-O-alkylglycerols, free radicals, antioxidantes.

● Introducción

Los liposomas son vesículas lipídicas artificiales que se forman espontáneamente al suspender lípidos como la fosfatidilcolina en un medio acuoso /1/. Desde su descubrimiento en 1965, han constituido valiosos instrumentos en el estudio de las biomembranas y como sistemas de liberación controlada de fármacos y cosméticos. Así, se puede observar muchas formulaciones farmacéuticas a base de liposomas, utilizadas para tratar infecciones, neoplasias, como transportadores de antígenos y material genético /2/. Los componentes más frecuentes en estas membranas son la fosfatidilcolina y el colesterol /3/.

Las vesículas liposomales poseen la característica de ser muy versátiles, permitiendo la modificación de su estructura, incorporando otras moléculas diferentes de los fosfolípidos y el colesterol, con el objetivo de dotarlos de propiedades específicas /4/.

Algunos abordajes están dirigidos a incorporar moléculas activas farmacológicamente como componentes estructurales de las vesículas liposomales. Así, Gopinath y colaboradores /5/ esterificaron ácido ascórbico en las vesículas para dotarlas de actividad antioxidante. Se ha logrado también potenciar la actividad inmunomoduladora variando la composición de fosfolípidos insaturados y saturados /6/.

Todas estas tecnologías constituyen alternativas para mejorar las propiedades de los liposomas, y al mismo tiempo potenciar la actividad de la molécula que se quiere encapsular.

Los 1-O-alkilglicerol (1-OAG) son éteres lipídicos con diversa actividad farmacológica, que *in vivo* actúan como precursores de los plasmalógenos /7/. Debido a la dificultad de obtenerlos de fuentes naturales, en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de la Habana se desarrolló la síntesis de la serie homóloga, desde el 1-O-octilglicerol (C8) hasta el 1-O-octadecilglicerol (C18) /8/. En el caso específico del 1-O-decilglicerol (C10), han sido demostradas sus propiedades antidrepanocitarias, antitumorales y como promotor de la absorción /9/.

En la literatura científica consultada se informa sobre la obtención de formulaciones liposomales utilizando éteres lipídicos como los 1-OAG /10/. Se han empleado como componentes de estos preparados,

específicamente miembros sintéticos de la serie homóloga que comprenden desde el 1-O-tetradecilglicerol (C14) hasta el 1-O-nonadecilglicerol (C19). Sin embargo, no existen hasta la fecha reportes de formulaciones que incorporen C10 como alternativa para influir sobre las características de las vesículas y de las moléculas inmovilizadas en estas.

Este abordaje sería ventajoso, puesto que se podrían aprovechar las propiedades del éter para potenciar la actividad biológica de los solutos que sean inmovilizados en los liposomas.

Existen compuestos como el 4-hidroxi-3-metoxibenzaldehído (vainillina) que son de interés farmacéutico por su actividad farmacológica, pero en determinadas aplicaciones sus propiedades se ven afectadas al interactuar con el medio biológico. Este aldehído aromático ha sido empleado como antimutágeno, antiinflamatorio, antioxidante y antidrepanocitario /11/. A pesar de haber demostrado ser efectivo en estos estados patológicos, persisten problemas en cuanto a su absorción intestinal y oxidación en el hígado /12/.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, el éter lipídico C10 podría mejorar las propiedades de liposomas del tipo vesículas multilaminares (MLV) en cuanto a potenciación de los efectos farmacológicos, como es el caso del efecto antioxidante, a través de un sinergismo con los efectos de la vainillina. En este sentido, el aldehído constituye una molécula adecuada como modelo de soluto a encapsular.

Materiales y métodos

Para la obtención de las vesículas, se utilizó fosfatidilcolina de yema de huevo (ePC) obtenida según el método de Pangborn y col. /13/. El 1-O-decilglicerol fue obtenido por síntesis química a partir de la reacción de Williamson entre el 1,2-O-isopropilidenglicerol y el 1-clorodecano, en el Instituto de Farmacia y Alimentos de la Universidad de La Habana.

El Colesterol (Ch) utilizado es de Sigma® (USA) y los solventes orgánicos (cloroformo y metanol) fueron de la marca UNI-chem® (China). Se añadieron a la mezcla inicial de lípidos para todas las formulaciones, 20 μmol de vainillina (Panreac®, España) La composición y relaciones molares de los lípidos utilizadas para la obtención de los liposomas, se muestran en la tabla 1.

TABLA I. COMPOSICIÓN DE LAS DIFERENTES FORMULACIONES LIPOSOMALES ESTUDIADAS

Símbolo	Fosfatidilcolina umol	Colesterol umol	C10 umol	Relación molar de los componentes
ePC:Ch	20	20		1:1
ePC:Ch:C10	20	20	2	1:1:0.1
ePC:Ch0.5	20	10		1:0.5
ePC:Ch0.5:C10	20	10	2	1:0.5:0.1

Para obtener las preparaciones liposomales, se prepararon soluciones clorofórmicas conteniendo una mezcla de ePC, colesterol, vainillina y C10 en las relaciones molares correspondientes para cada formulación. Esta solución fue evaporada al vacío en un rotoevaporador (IKA®, Alemania), hasta obtenerse una fina película lipídica en las paredes del recipiente que contenía la mezcla. Esta película fue sometida a vacío por un período adicional de media hora para eliminar las trazas de solvente. A continuación se añadió al recipiente de reacción 1 mL de agua destilada y se sometió a agitación en vortex (IKA®, Alemania), obteniéndose así una suspensión de aspecto lechoso que contenía los liposomas. Estas suspensiones se mantuvieron a temperatura ambiente durante siete horas para completar el proceso de hinchamiento de las vesículas y luego se almacenaron a 4 °C. Fueron realizadas tres preparaciones por composición lipídica.

Purificación de las vesículas liposomales

La purificación de las vesículas se llevó a cabo por centrifugación. Se sometieron las diferentes formulaciones a una fuerza centrífuga de 10 000 G durante 90 min, y a 4 °C en una centrífuga refrigerada Neofuge 15 ® (China). Luego se separaron los sobrenadantes y se sometieron las preparaciones a tres lavados consecutivos con agua destilada, resuspendiendo en 1 mL, luego centrifugando y colectando los sobrenadantes. Los precipitados finales se resuspendieron en 1 mL de agua destilada y se conservaron a 4 °C.

Determinación de la eficiencia de encapsulación

Para determinar la vainillina encapsulada en los liposomas, se determinó la concentración de vainillina en los sobrenadantes. Este valor se le restó a la cantidad de vainillina añadida inicialmente y así se estimó por diferencia la magnitud de la encapsulación. El por ciento encapsulado se determinó según la fórmula:

$$\% E = \frac{CV_i - CV_{sn}}{C_{vi}} \cdot 100$$

donde %E = por ciento de encapsulación, CV_i = concentración de vainillina inicial, CV_{sn} = concentración de vainillina en el sobrenadante.

La concentración de vainillina se determinó según el método Folin Ciocalteu/14/. Debido a esta reacción, se desarrolló un color azul, el cual fue leído a 550 nm en un espectrofotómetro Rayleigh® (China).

Estudio preliminar de la retención del soluto por las vesículas liposomales

Los liposomas de diferente composición fueron almacenados a 4 °C durante siete días. Al cabo de este tiempo, las preparaciones fueron sometidas a centrifugación y posterior determinación de la concentración en los sobrenadantes, tal y como se procedió para la determinación de la eficiencia de encapsulación.

Determinación del por ciento de captura del radical difenil-p-picril-hidrazi (DPPH)

El DPPH es un radical libre estable que se emplea comúnmente en la determinación de la actividad antioxidante de diversos compuestos. El principio del método se basa en que las soluciones alcohólicas de este radical desarrollan un intenso color violeta que disminuye a medida que interactúa con otra especie capaz de capturar radicales libres /15/.

Para la determinación de la reactividad de los compuestos frente al radical DPPH, se mezclaron en un vial de 1,5 mL, 0,5 mL de solución etanólica de DPPH con 1 mL de las diferentes formulaciones.

Estas mezclas de reacción fueron preparadas por triplicado para cada formulación liposomal evaluada y se incubaron a 25 °C por 1h. Al cabo de este tiempo, las preparaciones fueron sometidas a centrifugación a 10 000 G durante 90 min y se colectaron los sobrenadantes.

Fueron evaluados los liposomas de composición ePC:Ch0,5:C10 y ePC:Ch0,5. De forma similar, con el DPPH se enfrentaron soluciones etanólicas de vainillina libre a la misma concentración promedio que se encontraba encapsulada en las formulaciones liposomales. También se evaluó la reactividad de soluciones etanólicas de C10 frente al DPPH, procediéndose de forma similar y usando una concentración del éter igual a la utilizada en las preparaciones liposomales.

A los sobrenadantes, las soluciones de C10 y de vainillina se les determinó la absorbancia a 517 nm. Como blanco de absorbancia, se utilizó una solución del propio DPPH, mientras que como control positivo soluciones ácido ascórbico.

La ecuación para determinar el por ciento de captura del radical DPPH es:

$$IpDPPH \% = (AP-AM)/AP \cdot 100$$

donde: Ip = Por ciento de captura, AM = absorbancia de la (muestra), AP = absorbancia del DPPH o blanco.

Análisis estadístico

Se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov para comprobar la normalidad de los datos. Para las diferentes réplicas de un mismo experimento, se aplicó la estadística descriptiva, obteniéndose las

medias y las desviaciones estándar en cada caso. Las comparaciones de las medias de diferentes grupos en todos los experimentos se realizaron mediante ANOVA de clasificación simple, acoplado a la prueba de Duncan cuando se detectaron diferencias. El nivel de significación utilizado fue de 0,05. Todo el procesamiento se realizó con el paquete *Statistica for Windows* versión 8.1.

● Resultados y discusión

Caracterización de los liposomas obtenidos

La figura 1 muestra la relación entre la composición lipídica de los liposomas y la eficiencia de encapsulación. Es importante señalar, que cuando se utilizó una relación molar ePC:Chol:C10 (1:1:1) las vesículas no se formaron (resultados no mostrados), indicando que C10 no permite la agregación de los restantes componentes en estructuras liposomales.

El 1-O-deciliglicerol posee en su estructura una sola cadena alquílica saturada de 10 átomos de carbono, unida por un enlace éter en la posición 1 del glicerol. Aunque posee grupos hidroxilos polares, no tiene carga eléctrica.

Todas las características descritas anteriormente hacen de C10 un compuesto con las características de un lípido formador de micelas. Estos compuestos en las bicapas lipídicas modifican el empaquetamiento de los restantes componentes, y originan zonas de curvatura que desestabilizan la membrana /16/.

A relaciones molares suficientes las moléculas de C10, debido a sus propiedades surfactantes, forman micelas que dispersan a los fosfolípidos, y no permiten su agregación en estructuras organizadas como los liposomas.

Los liposomas fueron preparados variando la relación molar y el número de componentes con respecto a la ePC. En todos los casos, se aplicaron 20 umol de vainillina a la mezcla de lípidos de partida. Se representan los valores promedios del por ciento de encapsulación \pm desviación estándar (DE) de n= 3 preparaciones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la eficiencia de encapsulación para los liposomas de diferente composición evaluados ($P > 0,05$).

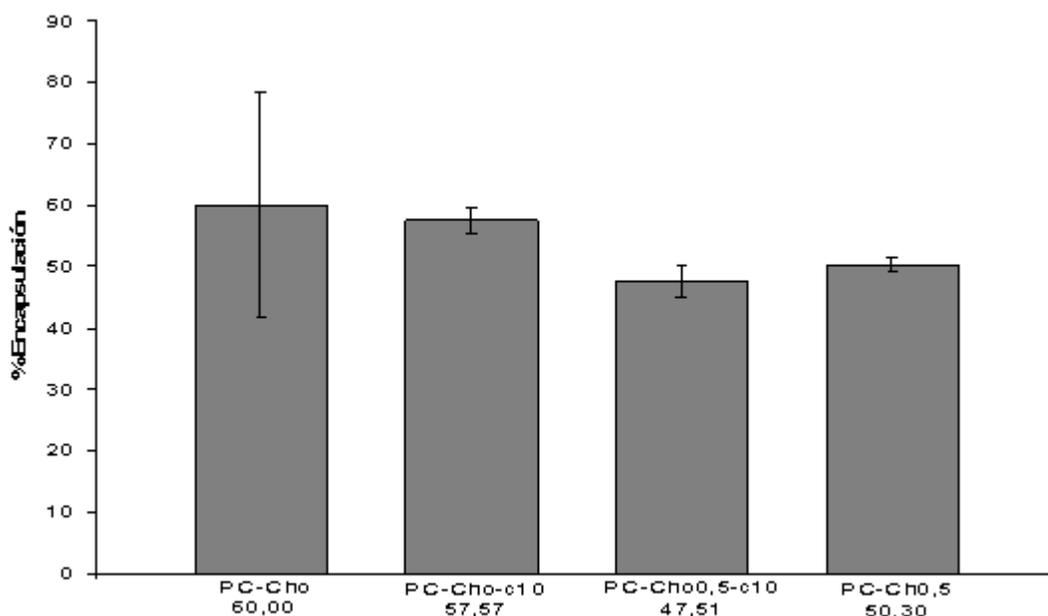


Fig. 1 Eficiencia de encapsulación de la vainillina en liposomas MLV de diferente composición.

Como puede apreciarse en el gráfico, la menor eficiencia de encapsulación observada estuvo por encima del 45 % y la mayor fue de 60 %, lo que está en concordancia con lo esperado para un soluto que se puede inmovilizar en las bicapas de las MLV /17/.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,5$) al comparar las eficiencias de encapsulación de las diferentes formulaciones liposomales ensayadas. Sin embargo, la presencia de un lípido formador de micelas como C10 pudiera afectar la eficiencia de la encapsulación de las vesículas que lo contienen por desestabilización de las membranas, como se ha explicado anteriormente.

Aunque el efecto no es significativo estadísticamente a la relación molar estudiada (0.1), el hecho de que en las formulaciones que contienen C10 se aprecie una tendencia no significativa a que disminuya la eficiencia de encapsulación, unido a que la presencia de este éter lipídico impida la formación de las vesículas cuando está a una relación uno a uno con los demás componentes, sugiere que a relaciones mayores a 0.1 el efecto sobre el nivel de encapsulación se hace mucho más pronunciado.

Este aspecto debe ser tenido en cuenta a la hora de seleccionar con que relación molar se prepararán los liposomas. Lo ideal es llegar a un compromiso entre una adecuada encapsulación, buena estabilidad y actividad biológica.

Influencia de la composición lipídica de los liposomas en la capacidad de retención de vainillina

La figura 2 muestra la capacidad para retener la vainillina de los liposomas obtenidos, conservados a una temperatura de 4 °C. La retención de vainillina se determinó centrifugando las vesículas después de siete días, con el objetivo de separar el soluto liberado; luego se determinó la concentración de vainillina en los sobrenadantes.

Los liposomas se mantuvieron almacenados siete días a 4 °C, y posteriormente fueron centrifugados para determinar en los sobrenadantes la vainillina liberada. Se representa el promedio \pm la desviación estándar de tres preparaciones. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de la retención para los liposomas de diferente composición ($P > 0,05$).

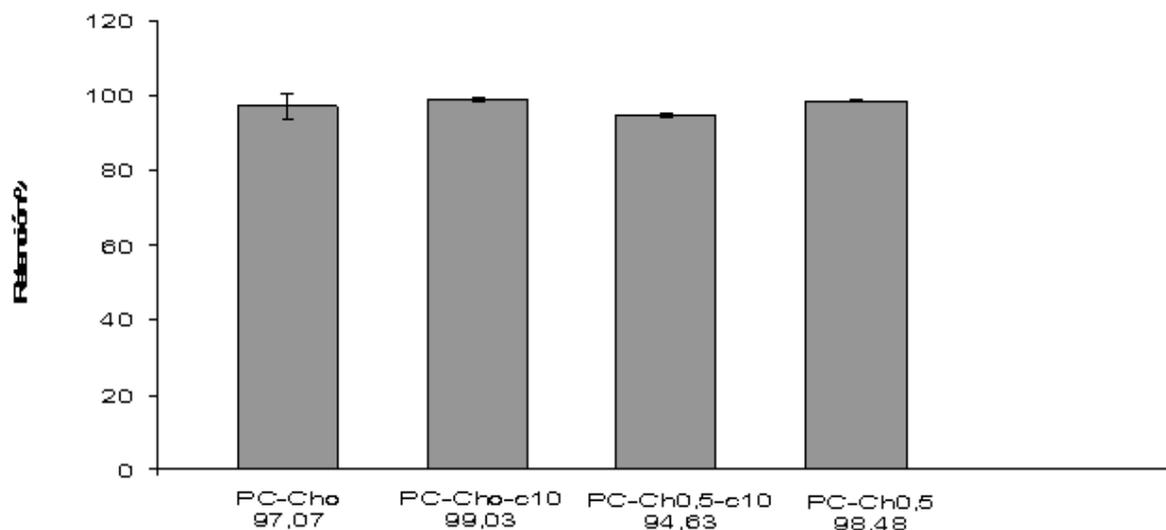


Fig. 2 Retención de vainillina en MLV de diferentes composiciones lipídicas.

La retención de vainillina por las MLV no se modificó de manera significativa ($p > 0,5$) con la composición lipídica de las vesículas; incluso, la retención fue elevada en el caso de la formulación que contiene C10, el cual desestabiliza la membrana como se mencionó anteriormente. Esto puede explicarse porque C10 se encuentra en bajas concentraciones, y eso hace que no se haga evidente su efecto desestabilizador. Además, la vainillina, con su grupo hidroxilo en posición para, puede formar puentes de hidrógeno con cualquiera de los oxígenos de las uniones éster presentes en la fosfatidilcolina. A esta interacción también contribuirían las interacciones hidrofóbicas entre el anillo aromático y el $-CH_3$ del grupo metoxi de la vainillina con las cadenas carbonadas de los ácidos grasos esterificados en los fosfolípidos. Dichas interacciones pueden favorecer la retención de la vainillina por las membranas liposomales.

En general, los liposomas mostraron una elevada capacidad de retención a los siete días de almacenados, estando en todos los casos por encima del 90 %.

Determinación de la capacidad de captura del radical DPPH por las vesículas liposomales

En las enfermedades neurodegenerativas, el cáncer y en la mayoría de los estados patológicos, se

ha reportado una contribución significativa del daño por especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (ERO)/18/. Esto implica que toda sustancia capaz de prevenir este tipo de daño posee una ventaja adicional como agente terapéutico.

En este experimento fueron evaluadas las composiciones ePC:Chol:0,5:C10, ePC:Chol0,5 y la vainillina sin encapsular a la concentración de 1,5 mg/mL. Se eligió esta concentración de vainillina por ser igual a la concentración promedio de vainillina encapsulada. También se evaluó la solución etanólica de C10 a la concentración usada en la obtención de las vesículas. El procedimiento utilizado se describió en la sección materiales y métodos.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,5$) en la captura del DPPH para los liposomas de diferente composición ensayados. Las vesículas que poseen C10 presentaron un porcentaje de captura significativamente más elevado que el resto de las composiciones evaluadas ($p < 0,05$). La composición que no contenía C10, a su vez presentó una captura significativamente mayor que la vainillina sin encapsular. Esto último es de esperar teniendo en cuenta que a la capacidad de la vainillina, que está en la membrana inmovilizada, de capturar radicales libres se suma a la de la ePC que contiene dobles enlaces capaces de reaccionar con las EROs como se ha reportado /19/.

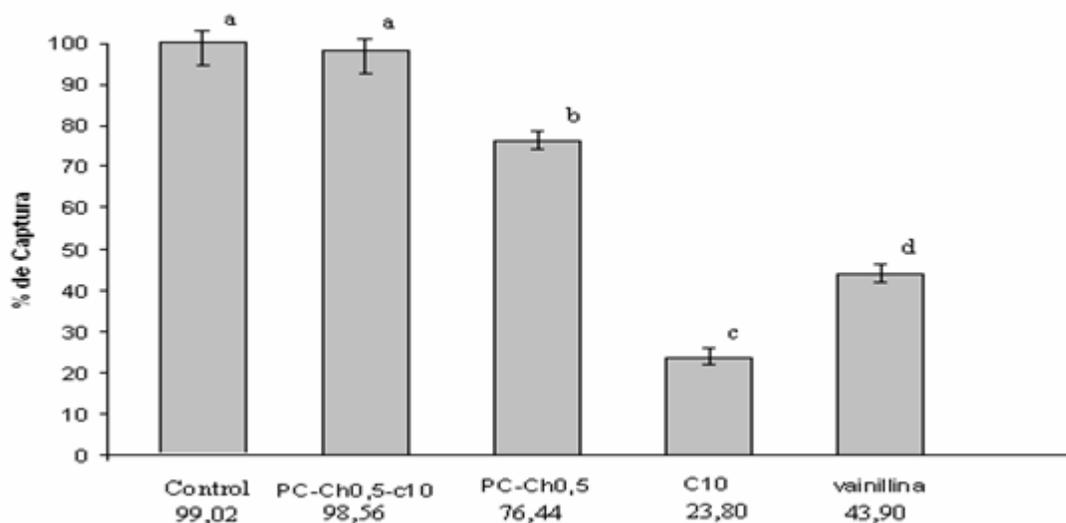


Fig. 3 Capacidad de captura de las diferentes preparaciones sobre el radical DPPH.

Se evaluaron las formulaciones liposomales ePC:Ch0.5:C10 y ePC:Ch0.5. También se evaluó la vainillina libre y C10 a la misma concentración en que fueron incorporados en los liposomas. Se observa el elevado por ciento de captura de la formulación liposomal que contiene C10. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Resulta notable el hecho de que la formulación que posee C10 sea la que presente mayor por ciento de captura aunque el éter en forma libre presenta baja reactividad. Este fenómeno pudiera estar relacionado con la capacidad de los 1-OAG de modificar las propiedades de las membranas biológicas /20/.



Conclusiones

Los resultados obtenidos demuestran que es posible encapsular vainillina en liposomas tipo MLV con buena eficiencia de encapsulación y estabilidad. La presencia de C10 a la relación molar utilizada no influye, de manera notable, en la eficiencia de encapsulación y en la retención de vainillina, siendo ésta adecuada como relación de partida para la obtención de las vesículas.

En general, los liposomas de diversa composición mostraron una elevada capacidad de reacción con el DPPH, siendo la misma significativamente mayor en las vesículas modificadas con el 1-O-decilglicerol. Los

resultados observados avalan las potencialidades de las formulaciones obtenidas en la terapia antioxidante.

Agradecimientos

Los autores agradecen al colectivo de Bioquímica del departamento de biología de la Universidad de Oriente, a la sección de Biofísica Química del centro de Biofísica Médica de la Universidad de Oriente y al departamento de Farmacología del IFAL por el apoyo a la investigación.



Bibliografía

- BANGHAM, Alec D. "Membrane models with phospholipids". *Prog Biophys Mol Biol.* 1968, 18, 29-95.
- IMMORDINO, M. L.; F. DOSIO; L. CTTEL. "Stealth Liposomes: the State of the Art". *International Journal of Nanomedicine.* 2006, 1,3, 297-315.
- KIRBY, C., J. CLARKE; G. GREGORIAIDIS. "Effect of the Cholesterol Content of Small Unilamellar Liposomes on their Stability *in vivo* and *in vitro*". *Biochem. J.* 1980, 186, 591-8.
- ULRICH, A. "Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery vehicles". *Biosci. Reps.* 2002, 22, 2, 129-50.
- GOPINATH, D.; D. RAMBHAU; S. S. APTE; B. RAMESH; D. RAVI. "Aspasome (Ascorbyl Palmitate Vesicles): a Novel Vesicular System, its Preparation and Characterization". AAPS Annual Meeting and Exposition. 2001.
- LUZARDO, María C. *et al.* "Lípidos liposomales como inmunoadyuvantes del factor de crecimiento epidérmico humano recombinante y de los alérgenos principales del ácaro *Dermatophagoides Siboney*". *Biotecnología Aplicada.* 2006, 23, 4, 331-336.

7. BRAQUET, P. "Biologically Active Ether Lipids". *Prog Biochem Pharmacol* 1988, 22, 48-57.
8. BILBAO, M.; J. LEON; H. SOTOMAYOR; Y. VALDÉS; F. MERCHÁN. "Síntesis química y caracterización del 1-O-octadecilglicerol". Sus efectos antiinflamatorios. *Memorias Joven Ciencia*. 1998, 115.
9. BILBAO, Manuel F. *et al.* "Análisis inferencial de las potencialidades de promoción de absorción de una familia de 1-O-alkilglicerol". *Revista Cubana de Farmacia*. 2009, 43, 3, 1-8.
10. GOPINATH, D.; D. RAVI; B. R. RAO; S. S. APTE; D. RAMBHAU. "1-O-Alkylglycerol Vesicles (Algosomes): their Formation and Characterization". *Int J Pharm*. 2002, 246, 187-197.
11. SHIN, Lu W. *et al.* "Vanillin Improves and Prevents Trinitrobenzene Sulfonic Acid Induced Cystitis in Mice". *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2009, 330, 2, 370-376.
12. TRAPERO, Y.; C. GONZÁLEZ; L. OLIVERA; A. CORREA. "Influencia de vehículos en la farmacocinética a dosis única de la vainillina". *Bioquímica*. 2007, 32, 1, 5-9.
13. PANGBORN, M. C. "A Simplified Purification of Lecithin". *J. Biol. Chem.* 1951, 471, 476.
14. BRITISH PHARMACOPOEIA (B.P.). *Stationary Office*. London; UK. 2007.
15. SHARMA, Om P.; Bhat K. TEJ. "DPPH Antioxidant Assay Revisited". *Food Chemistry*. 2009, 113, 4, 1202-1205.
16. MADHUSUDHAM, B.; D. RAMBHAU; S. S. APTE. "Oral Bioavailability of Flutamide from 1-O-Alkylglycerol Stabilized o/w Nanoemulsions". *Journal of Dispersion Science and Technology*. 2007, 28, 8, 1254-126.
17. EDWARDS, Katie A., Antje BAEUMNER. "Analysis of Liposomes". *Talanta*. 2006, 68, 5, 1432-1441.
18. MALDONADO, O. *et al.* Radicales libres y su papel en las enfermedades crónico-degenerativas. *Rev. Med. UV*. 2010, 10, 2, 32-39.
19. LEE, J.; E. CHOE. "Singlet Oxygen Quenching Effects of Phosphatidylcholine in Emulsion Containing Sunflower Oil". *J Food Sci*. 2008, 73, 6, 506-511.
20. MAGNUSSON, C. D., G. G. HARALDSON "Ether Lipids". *Chem Phys Lipids*. 2011, 164, 5, 315-40.