

## CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS LIPOSOMALES. 1. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN FOSFOLIPÍDICA SOBRE EL VOLUMEN ATRAPADO.

*Helber de Jesús Barbosa\**, *Olga Carolina Beltrán*, *Mónica Janneth Escobar*, *Fernando Jiménez y Fleming Martínez\**

\* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia. A. A. 14490. E-mail: fmartine@ciencias.ciencias.unal.edu.co

### RESUMEN

La incidencia de la composición lipídica sobre el volumen atrapado de liposomas del tipo Vesículas Multilaminares Grandes (MLV), almacenados durante 18 días bajo condiciones de refrigeración y en atmósfera libre de oxígeno ha sido examinada utilizando un nuevo método para la determinación del volumen de atrapamiento de solución acuosa de colorante Amarillo FD&C No. 5 al 5% p/v, el método incluye centrifugación y espectrofotometría. Las MLVs fueron preparadas por el método clásico de evaporación de solvente descrito originalmente por Bangham y col. en 1965. Los resultados experimentales muestran que las vesículas con composición variable de colesterol poseen un volumen de atrapamiento de 4.9 a 15.7  $\mu\text{L}/\text{mg}$  de lecitina.

**Palabras clave:** Liposomas - Preparación liposomal - Vesículas Multilaminares Grandes (MLV) - Vesícula fosfolipídica - Composición lipídica - Volumen atrapado.

### SUMMARY

#### CHARACTERIZATION OF LIPOSOME VESICLES. 1. EFFECT OF PHOSPHOLIPID COMPOSITION ON ENTRAPPED VOLUME

The effect of phospholipid composition of liposomes type Multilamellar Large Vesicles (MLV) on his entrapped volume stored for up to 18 days under conditios of refrigeration temperature in an oxygen-free atmosphere has been examined using a novel method for the determination of Entrapped Volume (of color Yellow 5 FD&C 5% w/v solution like aqueous medium) that includes centrifugation and spectrophotometry. The MLVs were prepared by classic method of solvent evaporation described first by Bangham et. al. in 1965. The experimental results shows that MLV's whose choleste-

rol composition varies between 0 and 30% have entrapped volumes from 4.9 to 15.7  $\mu\text{L}/\text{mg}$  lecithine.

**Key words:** Liposomes - Liposomal preparation - Multilamellar Large Vesicles (MLV) - Phospholipid vesicle - Lipid composition - Entrapped volume.

### INTRODUCCIÓN

Considerado el hecho de que cuando un fármaco es administrado tiene libre acceso a muchos sitios del organismo, se podría pensar que esta amplia distribución puede aumentar la posibilidad de efectos tóxicos colaterales y disminuir la efectividad de la terapia farmacológica; de esta manera, cualquier mecanismo que concentre el fármaco en el sitio blanco será enormemente benéfico. Por tal razón, en la actualidad los liposomas están siendo aceptados como agentes farmacéuticos que pueden mejorar la actividad terapéutica de una amplia variedad de compuestos; además de ser reconocidos no sólo como un poderoso modelo de membrana biológica sino también como sistemas de transporte y entrega de fármacos debido a su estructura organizada que permite la acomodación de los principios activos ya sea en la fase acuosa o en la fase lipídica dependiendo de su solubilidad (1, 2, 3, 4).

La caracterización fisicoquímica de liposomas se realiza a través de la evaluación de tres propiedades: tamaño, volumen interno y laminaridad. Siendo importante el estudio de estos parámetros ya que afectan el comportamiento de los liposomas *in vivo*, motivo por el cual en la presente investigación se hizo especial énfasis en los dos primeros aspectos de la caracterización (5, 6, 7).

### PARTE EXPERIMENTAL

#### *Materiales*

Fosfatidilcolina (L- $\alpha$ -Lecitina) Tipo XV-E, SIGMA CHEMICAL Co. Colesterol equivalente a USP/NF (aprox. 95%) GC, SIGMA CHEMICAL Co. ( $\pm$ )- $\alpha$ -Tocoferol (aprox. 95%), SIGMA CHEMICAL Co. Cloro-

Recibido para evaluación: 20 de noviembre de 1997

Aprobado para publicación 1 de diciembre de 1997

formo para análisis, MERCK. FD&C Amarillo No. 5. Sacarosa grado comercial. Cloruro de sodio grado comercial. TRITON X-100®, SIGMA CHEMICAL Co. Reactivo de Vanadatomolibdato con ácido sulfúrico, MERCK. TRIS: Hidroximetilaminometano MERCK.

### Equipos

Balanza analítica digital Mettler AE 160. Rotavapor BUCHLER. Agitador mecánico BURREL 75. Espectrofotómetro PERKIN ELMER 552. Centrífuga JOUAN 3.1. Agitador de vórtice MAXI-MIL 16700.

### Preparación de liposomas

Se estudiaron diferentes proporciones (%p/p) de los componentes lipídicos: L- $\alpha$ -lecitina  $\geq$  70%, colesterol  $\leq$  30% y ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol 0.1%, con incrementos del 5% para el colesterol. El método de preparación de los liposomas tipo MLV se basó en el método de Banghan y col (8), referenciado por Gruner y col. (9), el procedimiento seguido se describe a continuación: los componentes lipídicos (L- $\alpha$ -lecitina y colesterol) son pesados con precisión de miligramos y el ( $\pm$ )- $\alpha$ -tocoferol es suministrado a partir de una solución clorofórmica al 0.1%. Todas las muestras se elaboraron por triplicado y replicación para obtener mayor confiabilidad en los resultados.

Los elementos que forman la bicapa lipídica se mezclaron en 25 mL de cloroformo en un balón de fondo redondo de 1000 mL, una vez obtenida la solución apropiada de los componentes lipídicos, el solvente fue removido por evaporación. La película de lípidos seca obtenida, fue luego hidratada en un medio acuoso mediante agitación mecánica durante 5 minutos al nivel máximo del equipo. La relación de lípidos con respecto a la solución acuosa dispersante empleada fue siempre de 300 mg de lípido por 6 mL de solución. Por último se dejó la preparación en reposo durante 2 horas para su estabilización. A continuación, la muestra fue transferida a un frasco de vidrio que se tapó y se mantuvo refrigerado (2-8°C) hasta su utilización para efectuar la determinación correspondiente.

### Determinación del Volumen de Atrapamiento.

La etapa de hidratación de la película seca de lípidos se realizó con solución acuosa de colorante Amarillo FD&C No. 5 al 5% p/v. Cada muestra de liposomas se llevó a 100 mL con NaCl 0.9%, de allí se tomó una alícuota de 5 mL en un tubo de ensayo que posterior-

mente se sometió a centrifugación a 4000 r.p.m. por 30 minutos con el fin de separar la sustancia atrapada. Seguidamente, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en solución de Sacarosa 0.154 M (10) a 10 mL, luego se tomó una alícuota de 1 mL en un tubo de ensayo al cual se le adicionaron 3 mL de TRITON X-100® al 0.5% hasta clarificación de la solución (10, 11), y por último se efectuó una agitación con vórtice por aproximadamente 10 segundos.

Se llevó a cabo una lectura espectrofotométrica a 430 nm. Los valores de absorbancia obtenidos fueron interpolados en la curva de calibración elaborada previamente para determinar las concentraciones correspondientes con las cuales se efectúan los cálculos necesarios para obtener el volumen capturado ( $\mu$ L) por las MLVs, teniendo en cuenta la densidad de la solución acuosa usada para la hidratación.

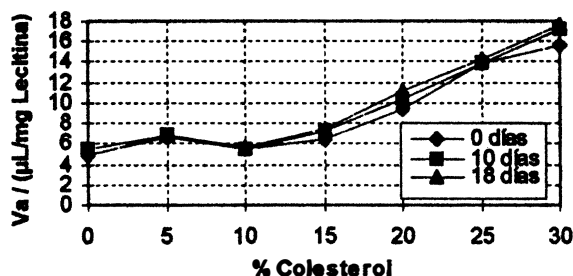
Considerando que el Volumen de Atrapamiento se expresa como  $\mu$ L/mg de lípido se realizó la determinación del contenido de fósforo presente en la lecitina como una medida indirecta de la cantidad de dicho componente que llega a formar parte de la estructura de las MLVs, empleando la técnica de formación del complejo amarillo vanadomolibdofosfato en ácido sulfúrico con lecturas espectrofotométricas a UV/máx (ácido acuoso) 384 nm.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de Volumen de Atrapamiento ( $V_a$ ) de solución acuosa de colorante Amarillo FD&C No.5 por liposomas del tipo MLV calculados para tiempo 0, 10 y 18 días se presentan en la Tabla 1 y se muestran en forma gráfica en la Figura 1.

**Tabla 1. Volumen de atrapamiento de solución acuosa de colorante Amarillo FD&C No.5 por liposomas del tipo MLV calculados para tiempo 0, 10 y 18 días.**

% Colesterol	$V_a$ / (mL/mg Lecitina)		
	0 días	10 días	18 días
0	4.9 $\pm$ 0.1	5.4 $\pm$ 0.3	5.4 $\pm$ 0.2
5	6.7 $\pm$ 0.1	6.8 $\pm$ 0.1	6.9 $\pm$ 0.2
10	5.5 $\pm$ 0.1	5.5 $\pm$ 0.1	5.6 $\pm$ 0.1
15	6.4 $\pm$ 0.1	7.2 $\pm$ 0.2	7.5 $\pm$ 0.2
20	9.3 $\pm$ 0.2	10.3 $\pm$ 0.3	11.2 $\pm$ 0.3
25	13.8 $\pm$ 0.2	13.9 $\pm$ 0.4	14.2 $\pm$ 0.3
30	15.7 $\pm$ 0.3	17.2 $\pm$ 0.5	17.6 $\pm$ 0.6



**Figura 1.** Volumen de atrapamiento de solución acuosa de colorante Amarillo FD&C No.5 por liposomas del tipo MLV calculados para tiempo 0, 10 y 18 días.

Teniendo en cuenta la curva para tiempo 0 días en la Figura 1 se observa un incremento en el volumen atrapado a medida que aumenta la proporción de colesterol en los liposomas, este comportamiento puede deberse probablemente a la naturaleza anfifílica de la molécula de colesterol, en la cual el grupo hidroxilo se orienta hacia la parte acuosa y su parte alifática se alinea paralelamente a las cadenas acíclicas en el centro de la bicapa, de manera que con la incorporación de colesterol las cabezas polares de las moléculas de fosfolípido que forman la bicapa, posiblemente se separan –debilitando la interacción dipolar entre el grupo trimetilamonio de una molécula de fosfolípido y el grupo fosfato de otra molécula de fosfolípido adyacente–, quedando un mayor espacio disponible alrededor de estos grupos polares para que un mayor número de moléculas de agua puedan unirse mediante puentes de hidrógeno, de acuerdo con los estudios realizados por Newman y Huang (10).

En el rango de composición comprendido entre 0 y 10% de colesterol se presenta un mayor volumen atrapado por las vesículas liposomales que contienen un 5% de colesterol, comparado con el obtenido para aquellas que contienen un 0 y un 10%, a partir del 15% de colesterol se presenta un aumento lineal que no sigue un modelo de primer orden ya que presenta  $r^2 = 0.9602$ . En las curvas para tiempos de 10 y 18 días, el comportamiento observado es similar al de la curva correspondiente a 0 días descrita anteriormente, sin embargo, cabe anotar que en el rango de composición comprendido entre 15% y 30% de colesterol el incremento en el volumen atrapado por los liposomas sigue un modelo lineal.

Con base en la determinación del Volumen de Atrapamiento a través del tiempo, se observa que las vesículas incorporan más solución acuosa del colorante del medio externo a medida que transcurren los días, esto puede deberse a que la bicapa fosfolipídica del liposoma –por sus propiedades de semipermeabilidad–, permite

la entrada de soluto disuelto en el medio exterior hasta alcanzar un equilibrio de concentraciones entre los ambientes interno y externo de la vesícula.

Por otro lado, se realizó un estudio estadístico de todos los datos obtenidos con el fin de confirmar la influencia del porcentaje de colesterol y el tiempo de almacenamiento sobre el volumen atrapado de solución del colorante, para ello se aplicó la metodología estadística para un diseño experimental con arreglo factorial, en donde los factores: porcentaje de colesterol y tiempo, se analizaron en función del volumen de atrapamiento. Posteriormente se realizó la prueba de Duncan, la cual permite comparar una proporción de colesterol con las demás, y una composición con respecto al tiempo, con lo que se pueden establecer los factores que pueden tener similitudes con los diferentes promedios de volumen atrapado. Todo lo anterior da como resultado que sí hay un efecto significativo sobre el volumen de atrapamiento en cada uno de los niveles de las variables investigadas, lo que se aprecia claramente en la Figura 1.

#### Agradecimientos

Agradecemos al Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia por facilitar las instalaciones y equipos requeridos, y al CINDEC por el apoyo financiero para la realización del presente trabajo a través del Proyecto “Obtención y Caracterización de Liposomas como posibles Sistemas de Entrega de Fármacos (SENF)”.

#### BIBLIOGRAFÍA

- 1 E. Martins and E. Kedor. *Arte y Ciencia Cosmética* **9**, 8-10 (1996).
- 2 U. Citernesi and M. Sciacchizano. *Cosmetics & Toiletries* **110** (11), 59-60 (1995)
- 3 M. Riaz, N. Weiner y F. Martín, en “Liposomes: Pharmaceutical Dosage Forms : Disperse Systems”. Ed. Marcel Dekker. New York. USA, (1989). v. 2, Chap. 16. pp. 569, 570, 574, 594.
- 4 G. Betageri, S. Jenkins, y D. Parson. “Liposome Drug Delivery Systems”. Ed. Technomic. USA, 1993 pp. 10-18.
- 5 C. Pidgeon y C. A. Hunt. *J. Pharm. Sci.* **70**, 173-176 (1981)
- 6 A. N. Martin, P. Bustamante, and A. H. C. Chun. “Physical Pharmacy : physical chemical principles in the pharmaceutical sciences”. 4<sup>th</sup> edition. Lea & Febiger. Philadelphia, USA. (1993) pp. 423-436.

7. B. Elorza, M. A. Elorza, M. C. Sainz, and J. R. Chantres. *J. Pharm. Sci.* **82**, 1160-1163. (1993)
8. A. D. Bangham, M. M. Standishand, and J. C. Watkins. *J. Mol. Biol.* **13**, 238 - 252 (1965).
9. S. Gruner, R. Lenk, A. Jannof and M. Ostro. *Biochem.* **24**, 2833-2842 (1985).
10. Newman and Ch. Huang. *Biochem.* **14** (15), 3363-3370 (1975).
11. Kim and G. Martin. *Biochim. Biophys.* **64**, 1-7 (1981).