

EVALUACIÓN DE LOS TAMAÑOS DE LIPOSOMAS CON FARMACO ENCAPSULADO

M en C. Cesar Raymundo González Vargas¹,

Dra. Janna Douda¹,

** Dra. Alba Adriana Vallejo Cardona²*

** jannaduda@hotmail.com*

¹SEPI-UPIITA, INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

*²CIATEJ Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,
A.C. Av. Normalistas 800 Colinas de La Normal 44270 Guadalajara, Jalisco, México.*

Resumen

Los liposomas han sido utilizados desde hace varias décadas para el encapsulamiento de fármacos, micro y nanopartículas así como otras sustancias. Su importancia como vehículo nanométrico de fármacos es indudable, debido a su facilidad de encapsulamiento de sustancias tanto solubles como insolubles en agua [1-2]. Sin embargo, las aplicaciones médicas de los liposomas están limitadas por sus tamaños, que a su vez dependen del método de preparación. Se prepararon liposomas de fosfolípidos con y sin fármaco encapsulado (metoprolol) y se estudiaron sus tamaños antes y después del encapsulamiento del fármaco en función del método de preparación (extrusión y sonicación). Los tamaños de los liposomas se evaluaron por Dispersión de Luz Dinámica (Dynamic Light Scattering, DLS) y Microscopía Electrónica de Transmisión criogénica (Cryo-Transmission Electronic Microscopy, Cryo-TEM). Los liposomas han sido preparados por el método de rehidratación de capa fina. El encapsulamiento del fármaco se realiza durante el proceso de rehidratación. El objetivo de este trabajo fue la evaluación de los tamaños de los liposomas preparados por diferentes técnicas de homogenización y comprobación, el tamaño de los liposomas no cambia significativamente después del encapsulamiento del fármaco.

I. Introducción

Las características estructurales básicas de los liposomas derivan de las propiedades fisicoquímicas de los componentes lipídicos utilizados. En las concentraciones adecuadas, estos compuestos anfifílicos (con una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba), permiten formar las nanopartículas esféricas suspendidas en agua y con medio acuoso en su interior. Las colas hidrófobas de fosfolípidos forman una bicapa hidrofóbica, de modo que puede incluir la sustancia insoluble en agua en el interior de ésta. Por lo tanto, los liposomas sirven para encapsular en su interior o atrapar en su superficie tanto sustancias solubles como insolubles

EVALUACIÓN DE LOS TAMAÑOS DE LIPOSOMAS CON FARMACO ENCAPSULADO

en agua para diferentes aplicaciones [3]. Se pueden formar liposomas por un tipo de lípidos o bien por una mezcla de varios para mejorar su estabilidad según las aplicaciones.

Esta conformación de bicapa es la estructura básica en todas las membranas biológicas. Por otro lado, se ha demostrado que el encapsulamiento de algunos medicamentos contra el cáncer en liposomas puede reducir fuertemente la variedad de los efectos secundarios de la quimioterapia tradicional. Debido a esto, los liposomas representan un vehículo importante y eficaz para la carga de cantidades considerables de fármacos [4].

Las bicapas lipídicas de liposomas son estructuras extremadamente estables mantenidas por interacciones no covalentes entre las cabezas hidrocarbonadas y las interacciones iónicas de las cabezas cargadas con el agua [5]. La interacción hidrófoba de las cadenas hidrocarbonadas lleva a la obtención de la menor área posible de contacto del agua con las mismas, quedando así el agua excluida del interior de la bicapa. Si se disgrega, la bicapa muestra una tendencia a autoensamblarse causada por el hecho de que los grupos hidrófobos buscan el establecimiento de una estructura en la que se minimice el contacto entre el agua y las cadenas hidrocarbonadas, situación que es la más favorable desde el punto de vista termodinámico. Una bicapa lipídica se cierra sobre si misma formando un liposoma (figura 1). Dado que las interacciones individuales lípido - lípido tienen bajas energías de activación, los lípidos de una bicapa poseen una movilidad circunscrita, interrumpiendo y estableciendo interacciones con las moléculas circundantes, pero incapaces de escapar fácilmente de la bicapa lipídica [6]. La capacidad de los lípidos anfipáticos de autoensamblarse en bicapas es una característica importante, e interviene en la formación de membranas celulares.

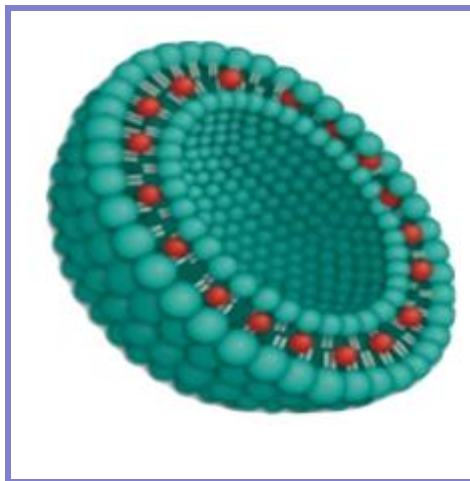


Figura 1. Representación esquemática del liposoma (corte transversal en 3D): en una bicapa lipídica se observa encapsulado el fármaco insoluble en agua (esferas

rojas). De la misma forma, el fármaco soluble en agua (como el metoprolol) se encapsula en interior de liposoma y no en la bicapa

Para el encapsulamiento de fármacos, el tamaño de los liposomas no puede ser mayor de 200nm. De manera contraria estas obstruirían la circulación sanguínea en vasos pequeños. Para preparar liposomas, existen muchas técnicas que utilizan fosfolípidos sintéticos y lípidos extraídos de membranas naturales [7]. Según el procedimiento de homogenización, pueden prepararse vesículas de diversos tamaños (de 20 nm a 1 μ m de diámetro).

II. Materiales y Métodos

Se prepararon soluciones Stocks PC (73.5mg), DPPC (74.81mg) y DSPE (69.2 mg) en 10 ml de cloroformo/metanol (9:1), 10mM. Se agregó PEG (0.249g) en 10 ml de cloroformo/metanol (9:1), 12.14 mM. Se tomó 100 μ l de PC, 100 μ l de DPPC, 100 μ l de DSPE y 50 μ l de PEG. Se evaporaron los solventes aplicando calor en un rango de temperaturas de 35 a 45°C y se dejó secar la película de bicapa lipídica al vacío toda la noche. Se hidrato la película con PBS pH 7.0 para obtener concentración 1mM de fosfolípidos y 0.2mM de PEG. Se sonicó 1 hora en ciclos de 7 s encendido y 3 s apagado. Y para la técnica de extrusión se utilizaron filtros de 100 nm, haciendo pasar la muestra 20 veces a través de estos. Para ambos casos (sonicación y extrusión) se calentó la muestra por encima de la temperatura de fusión del fosfolípido (T_m): PC (-4°C), DPPC (60°C), DSPE (65°C), PC/DPPC/DSPE (65°C). Se almacenaron las muestras a 4°C. El tamaño de los liposomas se obtuvo mediante la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS) con el equipo Zetasizer Nano Z. Así mismo la morfología de las muestras se determinó con Microscopía Electrónica de Transmisión.

III Dispersión dinámica de luz (DLS)

El tamaño de los liposomas fue analizado para las muestras representativas de PC/DPPC/DSPE preparadas con extrusión y sonicación por DLS. La figura 2 muestra los tamaños obtenidos para las muestras sonicadas y con extrusión. Se observa que los tamaños son menores para muestras preparadas por extrusión, comparado con los preparados por sonicación (tabla 1). Los liposomas presentan varias poblaciones al encapsular metoprolol (figura 3, tabla 2).

EVALUACIÓN DE LOS TAMAÑOS DE LIPOSOMAS CON FARMACO ENCAPSULADO

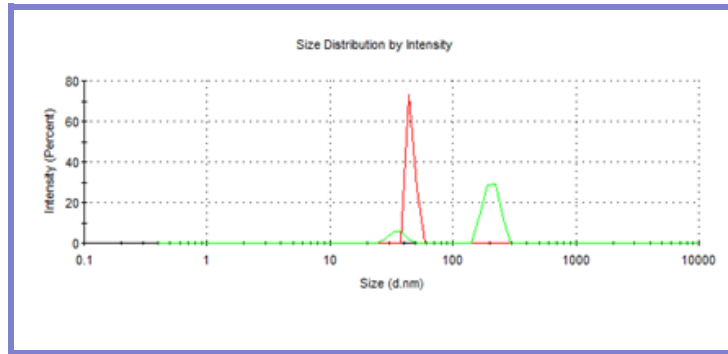


Figura 2. Tamaños de liposomas obtenidos mediante DLS. El pico rojo corresponde a liposomas preparados mediante extrusión y el verde a sonicación

Tabla 1. Tamaños promedio de liposomas sin encapsulamiento preparados por sonicación y extrusión

	Diámetro, nm	Desviación estándar
Pico 1	207	28.60
Pico 2	35	4.49

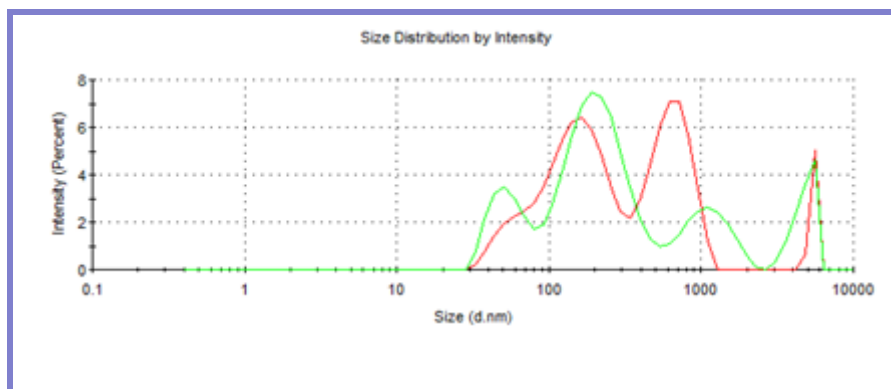


Figura 3. Tamaños de liposomas con encapsulamiento de metoprolol obtenidos mediante DLS. La señal roja corresponde a liposomas preparados mediante extrusión y la verde a los que se prepararon por sonicación

EVALUACIÓN DE LOS TAMAÑOS DE LIPOSOMAS CON FARMACO ENCAPSULADO

Tabla 2. Tamaños promedio de liposomas con encapsulamiento de metoprolol preparados por sonicación y extrusión

	Diámetro, nm	Desviación estándar
Pico 1	216	95.95
Pico 2	1101	378.20
Pico 3	53.74	13.10

IV Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM) Se analizaron las muestras con microscopía electrónica de transmisión a bajas temperaturas (cryo-TEM). De la muestra analizada se puede observar su estructura casi esférica y tamaño alrededor de 280 nm (figura 3a). A diferencia de los liposomas puros, los que contienen Metoprolol tienen una estructura esférica con los bordes irregulares (figura 3b). Es posible observar mediante esta técnica un cambio en la forma del liposoma.

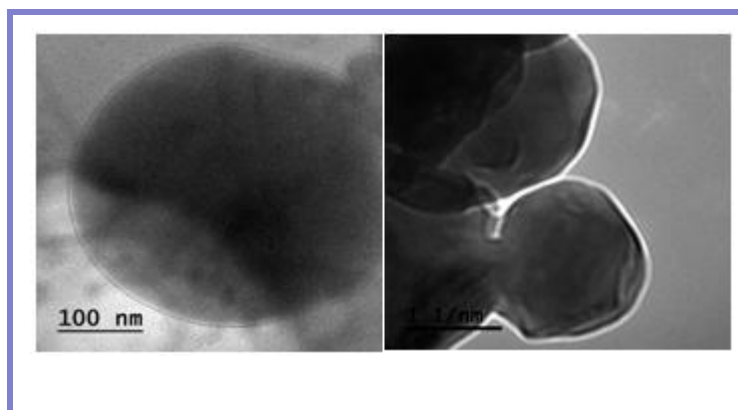


Figura 3. Imagen de cryo-TEM de liposomas sin (a) y con (b) encapsulamiento de Metoprolol

III. Conclusiones

Se encontró que los liposomas preparados mediante extrusión presentan menores tamaños que los sonicados, 35 y 207 nm, respectivamente. Los liposomas obtenidos son monodispersos en tamaño de acuerdo a los datos obtenidos mediante DLS (índice de polidispersidad, PdI=0.6). Mediante Microscopía Electrónica de Transmisión a bajas temperaturas (cryo-TEM) se encontró que los liposomas sin fármaco encapsulado presentan una estructura casi esférica, mientras

que, con el encapsulamiento del fármaco, su estructura es irregular. El encapsulamiento del fármaco cambia el tamaño de una parte de los liposomas obtenidos, lo que requiere una separación previa de la fracción de mayor tamaño para su posible aplicación clínica.

Referencias

- [1] Langer, M. R., (1998). Drug delivery and targeting. *Nature* 392, 5–10.
- [2] La Van, D. A., McGuire, T., Langer, R., (2003). Small-scale systems for in vivo drug delivery. *Nature Biotechnol.* 21, 1184–1191.
- [3] Larson, D.R., Zipfel, W.R., Williams, R.M., Clark, S.W., Bruchez, M.P., Wise, F.W., Watt, W.W., (2003). Water-Soluble Quantum Dots for Multiphoton Fluorescence Imaging in Vivo. *Science*, 300, 1434.
- [4] Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J., (2000). *Molecular Cell Biology*. 4th edition, New York: W. H. Freeman.
- [5] Alvarez, M. A., Seyler, D., Madrigal-Carballo, S., Vila, O.A., Molina, F., (2007). Influence of the electrical interface properties on the rheological behavior of sonicated soy lecithin dispersions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 309, 279-282.
- [6] Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., Deng, Y., (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Volume 10, Issue 2*, 81–98. [7] Park., J. W., (2002). Liposome-based drug delivery in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res.* 2002; 4(3): 95–99.