

Fabricación de liposomas para el encapsulamiento de drogas de uso médico o veterinario

Marco Bayas y David Brito

Laboratorio de Biofísica, Departamento de Física

marco.bayas@epn.edu.ec

Resumen

Se ha desarrollado la metodología para preparar liposomas de tamaño nanométrico utilizando mezclas de fosfatidilcolina de soya y colesterol. Los liposomas se prepararon mediante la hidratación de una capa de lípidos en presencia de ultrasonido. Los tamaños nanométricos se obtuvieron mediante la extrusión de la solución inicial de liposomas a través de membranas con tamaño de poro igual a 100 nm. Como resultado las soluciones finales contenían liposomas con tamaños en el orden de ~ 50 nm. Las soluciones finales se caracterizaron con ayuda de un Analizador de Tamaños de Partícula basado en el método de la dispersión de luz.

Palabras claves: liposomas, dispersión dinámica de luz, penicilina.

Abstract

The methodology for the preparation of nanometric size liposomes has been developed. The liposomes were prepared using mixtures of Soy phosphatidilcholine and cholesterol. After a thin layer of the lipid mixture was obtained, this was hydrated with phosphate buffer under ultrasound. The nanometric sizes were obtained after the initial liposome solution was extruded through a membrane with 100 nm pore size. As a result, the final solution contained liposomes with sizes in the order of ~ 50 nm. The size of the liposomes in the final solution was obtained using dynamic light scattering.

Keywords: liposomes, dynamic light scattering, penicilline.

1 Introducción

El estudio de los liposomas como sistemas eficientes para el transporte de medicamentos define una de las áreas de investigación actuales. Uno de los objetivos es el desarrollo de formulaciones con mejor farmacocinética y menor toxicidad que las formulaciones tradicionales [1],[2], pues con el adecuado encapsulamiento, los fármacos

pueden llevarse a sitios específicos de los organismos y mantenerse allí por periodos de tiempo mayores, protegidos de una degradación prematura. En este contexto, las formulaciones liposomales han mostrado un gran potencial para la distribución de antígenos así como de agentes antiparasitarios [3],[4]. Particularmente, el tamaño nanométrico de estos transportadores permiten su fácil incorporación al sistema circulatorio [5].

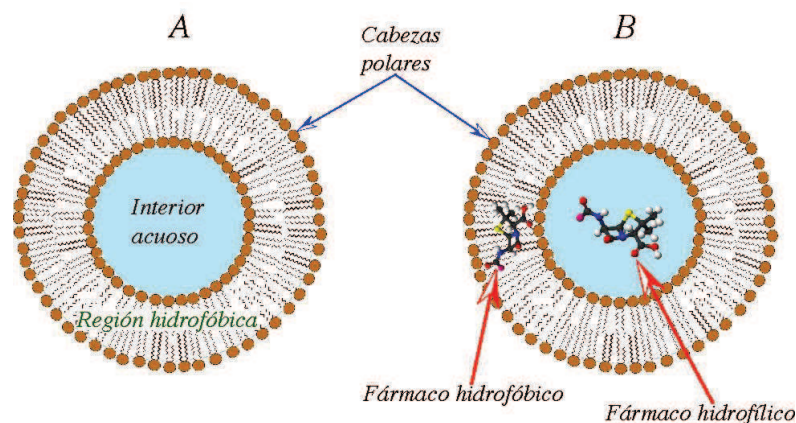


Figura 1. Liposomas como sistemas de encapsulamiento de fármacos. A). Estructura de un liposoma. B) Los fármacos en el interior acuoso del liposoma o en el interior de su membrana.

Los liposomas son estructuras esféricas constituidas por una membrana bilipídica que rodea un medio acuoso (Figura. 1A). Estas se forman en un ambiente acuoso como consecuencia de la existencia de una parte polar y otra no polar en las moléculas de los lípidos componentes; termodinámicamente, la formación de liposomas minimiza la energía y maximiza la entropía del sistema molecular total; esto se traduce en el llamado efecto hidrofóbico que resulta en el aislamiento de las partes no polares de los lípidos en el interior de las membranas mientras que las partes polares interactúan con el agua de modo que se elimina la interacción con el agua.

Las células vivas utilizan liposomas para el transporte de moléculas, como parte de su metabolismo. Liposomas artificiales pueden también utilizarse para el transporte de principios activos (ver Figura 1B); esto presenta varias ventajas debido a la biocompatibilidad de sus componentes [1]. Estos son biodegradables, puesto que los liposomas se preparan con lípidos que se presentan en el organismo. Además, prolongan la permanencia del principio activo en el organismo y mejora la eficacia en la distribución del mismo. El proyecto de investigación semilla permitió desarrollar la metodología para la preparación y caracterización, a nivel de laboratorio, de liposomas que contengan penicilina (penicilina G benzatínica).

2 Preparación

Los liposomas se prepararon utilizando Fosfatidilcolina de soya (Soy Phosphatidilcholine o PC) y colesterol; estos compuestos se compraron a la empresa Avanti Lipids

de los Estados Unidos. Las preparaciones se realizaron en el Laboratorio de Biofísica del Departamento de Física siguiendo el siguiente procedimiento:

1. Preparación de soluciones base de PC y colesterol.
2. Preparación de mezclas de PC y Colesterol.
3. Evaporación del solvente de las mezclas PC- Colesterol.
4. Hidratación del lípido seco.
5. Uso de ultrasonido para inducir la formación de liposomas en la solución acuosa.
6. Extrusión de la solución de liposomas.

Las soluciones base de PC y Colesterol se prepararon diluyéndolos en una mezcla cloroformo/metanol (2/1, v/v). Para obtener 2 ml de una dispersión de liposomas se partió de una solución que contenía una mezcla fosfatidilcolina/colesterol (2/1, mol/mol), preparada a partir de las soluciones base. Mediante la evaporación del solvente orgánico de esta solución de lípidos se obtuvo una capa homogénea de lípido seco. Luego se añadió 2 ml de solución buffer fosfato salino (PBS: 50 mM fosfato, pH:7.4, 300 mM NaCl) y se expuso la mezcla a ultrasonido para inducir la formación de liposomas; la hidratación y el uso de ultrasonido se realizó manteniendo la temperatura de la solución en 50 °C. Esta solución primaria contenía liposomas con tamaños en el orden de ~ 1 µm. Para obtener liposomas de tamaño nanométrico, la solución primaria se sometió a extrusión a través de una membrana de policarbonato con tamaño de poro de 100 nm (ver Figura 2).

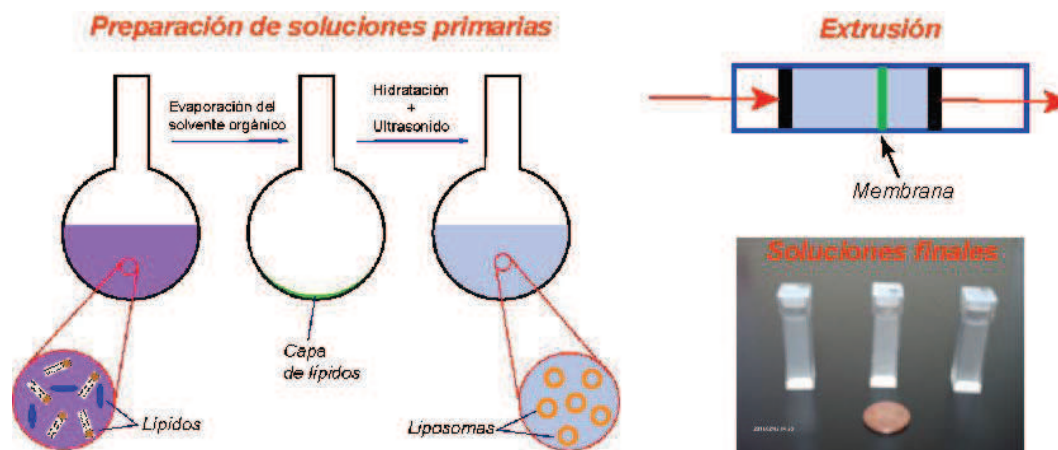


Figura 2. Preparación de soluciones de liposomas: Al final del proceso de hidratación se obtienen soluciones con liposomas de diferentes tamaños; el proceso de extrusión permite obtener soluciones de liposomas con tamaños nanométricos definidos por la membrana utilizada en el proceso.

A largo plazo, el objetivo de nuestra investigación es desarrollar la capacidad de encapsular fármacos para uso médico o veterinario. Por esta razón, como parte

del proyecto semilla se realizaron pruebas preliminares para encapsular penicilina; la penicilina G benzatínica se añadió a la mezcla inicial de lípidos y los liposomas

se prepararon de la manera descrita anteriormente. Los liposomas obtenidos en presencia de la penicilina muestran la misma estabilidad que aquellos preparados en su ausencia, esto nos hace suponer que la penicilina no altera el proceso de formación de liposomas. Desafortunadamente, al momento no disponemos de las facilidades para determinar la cantidad de penicilina encapsulada.

3 Determinación de la distribución de tamaños

Las soluciones de liposomas obtenidas luego de la extrusión se analizaron con un Analizador de Tamaño de

Partícula 90 Plus fabricado por la empresa "Brookhaven Instrument Corporation" de los Estados Unidos. Este Analizador utiliza el método de la dispersión dinámica de luz para obtener una distribución de tamaños de las partículas en una suspensión. Debido al movimiento térmico de las moléculas de la solución, las partículas en suspensión experimentan un movimiento aleatorio; lo cual hace que la intensidad de la luz dispersada experimenta fluctuaciones en el tiempo. El análisis de estas fluctuaciones permite obtener información del coeficiente de difusión de estas partículas y consecuentemente de su tamaño [6]. La Figura 3 muestra un esquema del funcionamiento del método

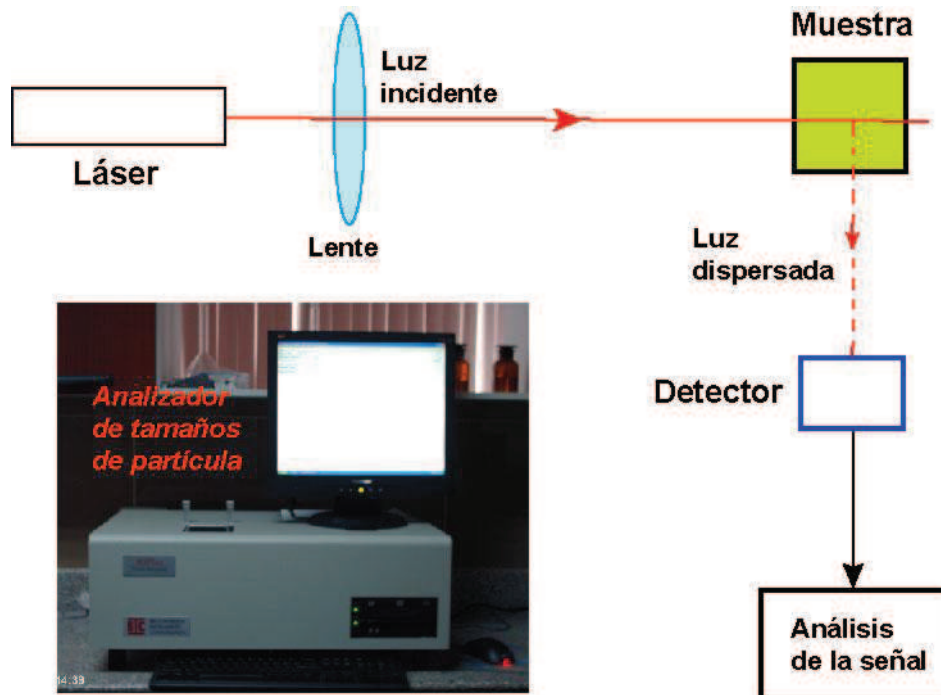


Figura 3. Analizador de tamaños de partículas basado en el método de dispersión de luz.

4 Resultados

La preparación de soluciones de liposomas con tamaño nanométrico terminó con el proceso de extrusión luego del cual se obtuvieron liposomas con diámetros menores a 100 nm. La Figura 4A muestra una distribución típica de tamaños obtenida con el método de dispersión dinámica de luz; esta muestra un máximo para un diámetro d_m . Los análisis preliminares de nuestros experimentos se han hecho considerando este parámetro. La Figura 4B muestra la dependencia de d_m , inmediatamente después de la extrusión, con la concentración de lípidos en las so-

luciones base; se puede apreciar que los tamaños obtenidos no dependen de la concentración inicial de lípidos.

Las aplicaciones farmacéuticas que se planea dar a los liposomas requieren que estos sean estables con el tiempo. Para evaluar la estabilidad de las suspensiones obtenidas se estudió la evolución temporal de d_m . La Figura 4C muestra el comportamiento típico d_m con el tiempo, mientras que la Tabla 1 muestra los promedios correspondientes, para varios experimentos. En general los tamaños de los liposomas se mantuvieron menores a 100 nm y d_m experimenta fluctuaciones de ~ 20 nm.

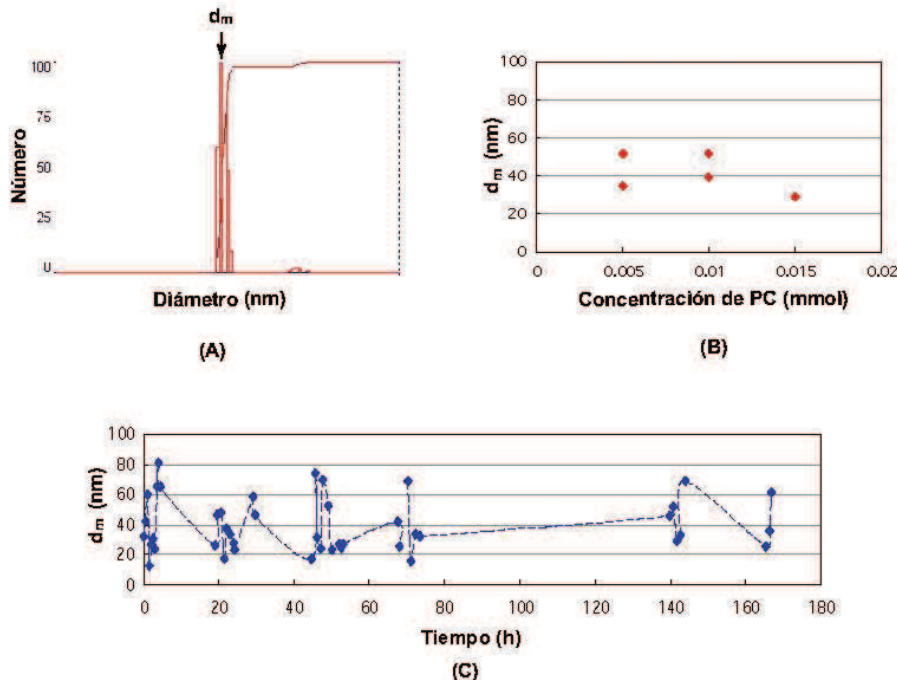


Figura 4. Principales resultados de la preparación de los liposomas.

Exp	Vol PC (mL)	Concentración PC (mmol)	d_m (nm)
1	0.17	0.005	$34,6 \pm 16,6$
2	0.34	0.01	$51,9 \pm 26,6$
3	0.34	0.01	$39,3 \pm 18,8$
4	0.51	0.015	$28,9 \pm 13,6$
5	0.17	0.005	$51,8 \pm 22,6$

Tabla 1. Valores del promedio en el tiempo del diámetro de los liposomas para cinco preparaciones diferentes.

5 Conclusiones

Los experimentos realizados muestran nuestra capacidad de preparación de soluciones de liposomas, con tamaños nanométricos, que se mantienen estables por más de cinco días. Además, la formación de liposomas, así como su estabilidad, no se alteran cuando se añade penicilina a la preparación. Esto último se utilizará en investigaciones posteriores en las que se espera desarrollar formulaciones nanométricas de penicilina para uso veterinario. Es importante enfatizar que, para llegar a disponer de este tipo de aplicación es necesario seguir un extenso proceso de investigación que empieza con la realización de experimentos *in vitro* para evaluar las propiedades antibióticas de las formulaciones nanométricas de penicilina. El éxito esta investigación futura dependerá de la disposición del equipamiento necesario para cuantificar la cantidad de penicilina encapsulada.

Reconocimientos

El Analizador de Tamaños de Partícula utilizado en la ejecución de este proyecto fue facilitado por el Dr. Victor Guerrero. La penicilina G benzatínica fue gentilmente donada de Laboratorios Cobo.

Referencias

- [1] Goodsell, D. 2004. *Bionanotechnology: lessons from nature*. Wiley-Liss, Inc.
- [2] Drulis-Kawa, Z., & Dorotkiewicz-Jach. A. 2010. *Liposomes as delivery systems for antibiotics*. Int. J. Phar. 387: 187-198.
- [3] Date, A.A., Joshi, M. D. And Patravale, V. B. 2007. *Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles*. Adv. Drug Deliv. Rev. 59: 505-521.
- [4] Peek, L.J., Middaugh, C. R. and Berkland, C. 2008. *Nanotechnology in vaccine delivery*. Adv. Drug Deliv. Rev. 60: 915-928.
- [5] Ball, P. 2005. *Synthetic biology for nanotechnology*. Nanotechnology. 16: R1-R8. 2005.
- [6] Schatzel, K. 1987. *Correlation Techniques in Dynamic Light Scattering*. Appl. Phys. B. 42: 193-213.