

## CARACTERIZACIÓN DE VESÍCULAS LIPOSOMALES. 2. EFECTO DE LA COMPOSICIÓN FOSFOLIPÍDICA SOBRE EL TAMAÑO DE VESÍCULA

*Olga Carolina Beltrán, Mónica Janneth Escobar, Fernando Jiménez†, Helber de Jesús Barbosa\* y Fleming Martínez\*<sup>1</sup>*

\* Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia. A. A. 14490. Santafé de Bogotá, D. C. Colombia.

<sup>1</sup>E-mail: fmartine@ciencias.ciencias.unal.edu.co

†: Q.E.P.D.

### RESUMEN

La incidencia de la composición fosfolipídica sobre el tamaño de liposomas tipo Vesículas Multilaminares Grandes (MLV), almacenadas durante 18 días bajo condiciones de temperatura de refrigeración y en atmósfera libre de oxígeno ha sido examinada empleando la técnica de microscopía óptica para la determinación de la distribución de tamaño. Las MLVs fueron preparadas por el método clásico de evaporación de solvente. Experimentalmente se encuentra que el diámetro externo promedio de MLVs cuya composición de colesterol varía entre 0 y 30% se halla entre 5 y 9  $\mu\text{m}$ .

**Palabras clave:** Liposomas - Preparación liposomal - Vesículas multilaminares grandes (MLV) - Vesícula fosfolipídica - Composición lipídica - Tamaño de vesícula - Distribución de tamaño.

### SUMMARY

#### CHARACTERIZATION OF LIPOSOME VESICLES. 2. EFFECT OF PHOSPHOLIPID COMPOSITION ON VESICLE SIZE

The effect of phospholipid composition of liposomes type Multilamellar Large Vesicles (MLV) on his size, stored for up to 18 days under conditions of refrigeration temperature in an

oxygen - free atmosphere has been examined using the optic microscopy technique for the determination of size distribution.

The MLVs were prepared by classic method of solvent evaporation. The experimental results show that MLV's average external diameter, whose cholesterol composition varies between 0 and 30%, is in the 5 - 9  $\mu\text{m}$  range.

**Key words:** Liposomes - Liposomal preparation - Multilamellar large vesicles (MLV) - Phospholipid vesicle - Lipid composition - Vesicle size - Size distribution.

### INTRODUCCIÓN

Los liposomas han sido aceptados como sistemas de transporte y entrega de sustancias con actividad terapéutica debido a su estructura organizada que permite la acomodación de fármacos en las fases acuosa o lipídica dependiendo de la solubilidad del agente terapéutico (1-4).

La caracterización fisicoquímica de vesículas liposomales se realiza principalmente mediante la evaluación de tres propiedades, las cuales son: tamaño, volumen interno y laminaridad, que determinan el comportamiento de estos sistemas heterogéneos, y cuyo conocimiento facilita la posible aplicación como medios de transporte de principios activos en el desarrollo de sistemas de entrega de fármacos (SENF) (5-8).

Continuando con la caracterización fisicoquímica de vesículas liposomales iniciada en el

Recibido para evaluación: Octubre de 1998

Aprobado para publicación: Febrero de 1999

trabajo previo (9), en este artículo se estudia el efecto de la composición fosfolipídica sobre el tamaño de vesícula en liposomas del tipo Vesículas Multilaminares Grandes (MLV), las cuales se preparan mediante el método descrito originalmente por Bangham y col. en 1.965 y referenciado por Gruner y col. (10).

## PARTE EXPERIMENTAL

### Material

Fosfatidilcolina (L-a-Lecitina) Tipo XV-E, Sigma Chemical Co. Colesterol equivalente a USP/NF aprox. 95% (GC), Sigma Chemical Co., (+)-a-Tocoferol : aprox. 95%, Sigma Chemical Co., Cloroformo para análisis, Merck. Sudán III : CI 26100, Sigma Chemical Co. Verde menta : Mezcla de CI 19140 (FD&C Amarillo No. 5) y CI 73015 (FD&C Azul No. 2) de Givaudan. Membranas de poliamida de 0.45 µm de diámetro de poro, Millipore.

### Equipos

Balanza analítica digital Mettler AE 160. Rotavapor Buchler. Agitador mecánico Burrel 75. Agitador de vórtice Maxi-Mil 16700. Microscopio óptico Leitz Diaplan.

### Preparación de liposomas

El procedimiento seguido para la preparación de las vesículas liposomales es similar al presentado en el artículo anterior (9), realizando el proceso por triplicado.

### Determinación del Tamaño de Vesícula

A la mezcla lipídica disuelta en el solvente orgánico volátil, se adicionó cerca de 1 mg de colorante Sudán III, y la hidratación de la película se realizó con solución acuosa de colorante Verde menta 0.1 mg/mL. Las muestras de liposomas se observaron al microscopio óptico en un aumento total de 1000X (100X objetivo y 10X ocular) y se tomaron 18 fotografías por cada composición a

partir de las cuales se determinó el diámetro externo de cada vesícula por medio de una medida milimétrica. El tamaño de muestra evaluada es de 200 vesículas por cada preparación liposomal. Además se efectuó la determinación del grado de coalescencia o agregación de las MLVs siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente a tiempos de 0, 10 y 18 días. Todo el procedimiento es realizado por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Distribución de Tamaño de vesículas liposomales tipo MLV

Los resultados de la distribución de tamaño de las vesículas liposomales, expresados como porcentaje de frecuencia en función de los intervalos de tamaño se presentan en las Tablas 1, 2 y 3 para los tiempos de almacenamiento: 0, 10 y 18 días respectivamente, los valores corresponden al promedio de las tres preparaciones elaboradas para cada composición y la desviación estándar en la mayoría de los puntos correspondientes a tamaños por debajo de 12 µm es inferior al 10%, si bien para tamaños superiores: mayores de 18 µm, que son muy pocos según los resultados, la desviación estándar es mas alta. Adicionalmente se presentan curvas de distribución de frecuencia para los tres tiempos estudiados a tres composiciones de colesterol: 0, 15 y 30% (Figuras 1 – 3).

Tabla 1. Distribución de Frecuencia / (%), de tamaño de liposomas tipo MLV, 0 días de almacenamiento

Intervalo/ µm	Xi/ µm	Colesterol						
		0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
0-2.	3	23.7	28.2	31.3	25.3	28.7	16.0	16.7
2-4.	5	38.0	46.5	38.5	39.4	38.1	28.4	24.0
6-8.	7	20.5	16.3	20.5	19.8	17.7	23.3	21.7
8-10.	9	10.3	5.7	6.0	11.2	9.3	14.8	17.8
10-12.	11	5.0	2.8	1.8	2.3	2.2	10.0	8.5
12-14.	13	1.8	0.5	1.2	1.5	2.7	3.0	4.2
14-16.	15	0.7	0.0	0.7	0.5	0.5	3.0	3.7
16-18.	17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	1.2	1.2
18-20.	19	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	1.7
20-22.	21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5

**Tabla 2. Distribución de Frecuencia/(%), de tamaño de liposomas tipo MLV, 10 días de almacenamiento**

Intervalo/ $\mu\text{m}$	Xi/ $\mu\text{m}$	Colesterol						
		0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
0-2.	3	21.8	23.3	17.5	14.7	25.3	15.2	11.3
2-4.	5	32.4	25.6	28.5	29.2	27.5	24.5	28.9
6-8.	7	17.7	20.5	24.5	26.2	22.3	23.8	20.4
8-10.	9	14.3	14.7	16.5	17.5	14.5	19.0	17.5
10-12.	11	6.7	4.7	6.5	6.8	5.2	9.5	9.8
12-14.	13	2.8	4.7	3.3	2.0	1.5	3.7	4.7
14-16.	15	1.8	3.0	0.7	1.5	1.7	2.5	2.8
16-18.	17	1.0	1.2	0.8	0.7	1.0	1.0	1.3
18-20.	19	1.0	0.8	1.0	0.7	0.3	0.8	1.3
20-22.	21	0.5	1.0	0.7	0.7	0.7	0.0	1.0
22-24.	23	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
24-26.	25	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5

**Tabla 3. Distribución de Frecuencia / (%), de tamaño de liposomas tipo MLV, 18 días de almacenamiento**

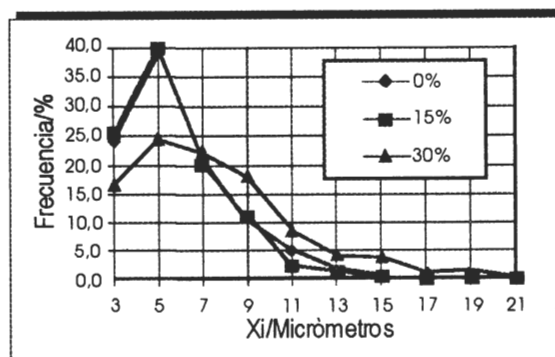
Intervalo/ $\mu\text{m}$	Xi/ $\mu\text{m}$	Colesterol						
		0%	5%	10%	15%	20%	25%	30%
0-2.	3	19.0	18.7	14.3	11.5	19.3	19.3	5.8
2-4.	5	30.8	32.5	34.4	26.3	27.0	25.1	22.2
6-8.	7	22.7	19.8	20.8	22.0	23.0	20.7	27.0
8-10.	9	16.7	15.5	13.0	21.5	14.7	13.7	17.3
10-12.	11	4.8	3.7	5.0	6.8	4.8	7.3	11.5
12-14.	13	2.8	2.0	4.2	2.8	2.8	4.5	8.2
14-16.	15	1.3	1.8	1.5	2.0	3.0	2.0	1.5
16-18.	17	0.8	1.5	1.5	1.3	1.3	2.3	3.2
18-20.	19	0.8	2.3	1.3	1.3	1.2	0.7	1.5
20-22.	21	0.3	0.7	1.0	1.3	0.7	0.8	0.3
22-24.	23	0.0	0.8	1.0	1.2	0.7	0.7	0.8
24-26.	25	0.0	0.7	1.3	1.2	0.5	0.7	0.7
26-28.	27	0.0	0.0	0.7	0.8	0.3	1.2	0.0
28-30.	29	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	1.0	0.0

Los liposomas obtenidos fueron observados a través del microscopio óptico encontrándose una completa heterogeneidad en el tamaño de éstas; en lo relacionado a su forma, las vesículas son esféricas y elipsoidales, en el segundo tipo se considera el promedio entre el eje mayor y el eje menor como representativo del área ocupada por una esfera equivalente.

En las curvas de distribución de tamaño (Figuras 1 – 3), para las composiciones correspondientes a 0, 15 y 30% de colesterol, y las otras composiciones presentadas en un trabajo anterior (11), se observa inicialmente un comportamiento ascendente, el cual alcanza un máximo y posteriormente desciende con valores de diámetro externo variando entre 2 y 22  $\mu\text{m}$ , lo cual concuerda con la información reportada en la literatura según la cual, literatura según la cual, las MLVs presentan diámetros desde cerca de 100 nm hasta varios micrómetros (4). La parte inicial no se puede observar debido a las limitaciones del método de visualización por microscopía óptica, para la determinación de tamaños inferiores a 1  $\mu\text{m}$ .

De acuerdo con los datos reportados en la Tabla 1 se observa que el mayor número de vesículas

liposomales posee un tamaño que se encuentra en el intervalo 4 - 6  $\mu\text{m}$  para todas las composiciones de colesterol, sin embargo, en aquellos liposomas que contienen una mayor proporción de colesterol (20 - 30%), se encuentran vesículas de mayor tamaño (16 - 22  $\mu\text{m}$ ) comparado con el máximo tamaño obtenido (14-16  $\mu\text{m}$ ) para liposomas con bajas proporciones de colesterol (0 - 15%) (Figura 1). La forma de los liposomas en la dispersión a 0 días es esférica.



**Figura 1. Distribución de Frecuencia/(%) de tamaño, 0 días.**

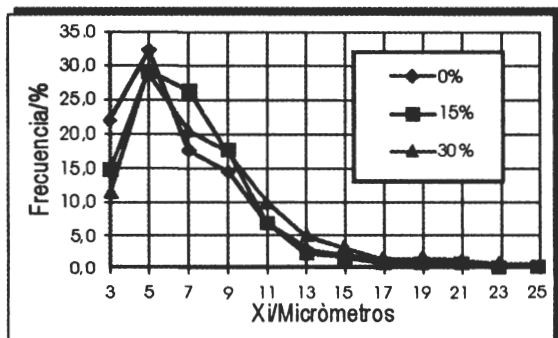


Figura 2. Distribución de Frecuencia/(%) de tamaño, 10 días

A medida que se incrementa el porcentaje de colesterol en los liposomas, aumenta el diámetro de las vesículas, tentativamente, este comportamiento puede deberse a la ubicación de colesterol en la porción interna de la bicapa fosfolípida provocando una separación entre las moléculas de fosfolípido, aumentando por consiguiente el diámetro de la vesícula, según lo planteado por Newman y Huang (12).

#### *Distribución de tamaño de vesícula en función del tiempo de almacenamiento:*

Para los liposomas que no contienen colesterol el tamaño máximo encontrado se halla en el intervalo 14 - 16  $\mu\text{m}$ ; a los 10 días se observa que algunas vesículas alcanzan un tamaño entre 20 y 22  $\mu\text{m}$  (Figura 2), manteniendo su diámetro al cabo de 18 días de almacenamiento en las condiciones establecidas (Figura 3). Es de resaltar que el mayor número de vesículas para esta composición se mantuvo dentro del intervalo 4 - 6  $\mu\text{m}$  a través del tiempo de estudio.

El tamaño máximo de los liposomas que contienen 5% de colesterol se encuentra en el intervalo 12 - 14  $\mu\text{m}$ . Después de 10 días algunas vesículas alcanzan un tamaño máximo entre 22 y 24  $\mu\text{m}$ , observándose a los 18 días vesículas de tamaño mayor (24 - 26  $\mu\text{m}$ ); el mayor número de vesículas para esta composición se mantuvo dentro el intervalo 4 - 6  $\mu\text{m}$  a través del tiempo del estudio.

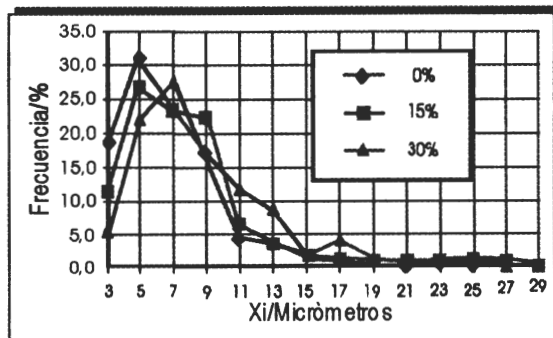


Figura 3. Distribución de Frecuencia/(%) de tamaño, 18 días

Para los liposomas que contienen 10% de colesterol la mayor proporción de liposomas poseen un tamaño entre 4 y 6  $\mu\text{m}$ , el tamaño máximo se encuentra en el intervalo 14 - 16  $\mu\text{m}$ ; al cabo de 10 días la mayor proporción de liposomas se encuentra repartida entre dos intervalos de tamaño (4 - 6  $\mu\text{m}$  y 6 - 8  $\mu\text{m}$ ), también se observa que algunas vesículas poseen un tamaño máximo de 20 - 22  $\mu\text{m}$ , encontrándose vesículas aún más grandes cuyo tamaño se encuentra en el intervalo 26 - 28  $\mu\text{m}$  a los 18 días.

En los liposomas que contienen 15% de colesterol se observa que la mayor proporción de vesículas poseen un tamaño de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , el tamaño máximo se encuentra en el intervalo 14 - 16  $\mu\text{m}$ ; a partir de los 10 días la mayor proporción de liposomas se encuentra repartida entre dos intervalos de tamaño (4 - 6  $\mu\text{m}$  y 6 - 8  $\mu\text{m}$ ), también se observa que algunas vesículas alcanzan un tamaño máximo de 20 - 22  $\mu\text{m}$ . Al cabo de los 18 días se encuentran vesículas que poseen un diámetro externo de 26 - 28  $\mu\text{m}$ .

La mayor proporción de liposomas que contienen 20% de colesterol poseen un tamaño entre 4 y 6  $\mu\text{m}$ , el tamaño máximo se encuentra en el intervalo 18 - 20  $\mu\text{m}$ ; a partir de los 10 días se observa que algunas vesículas alcanzan un tamaño máximo de 20 - 22  $\mu\text{m}$  y a los 18 días se encuentran vesículas de diámetro externo de 28 - 30  $\mu\text{m}$ .

Para los liposomas que contienen 25% de colesterol el mayor número de vesículas se encuentra en el intervalo de tamaño 4 - 6  $\mu\text{m}$ , y el

máximo tamaño encontrado es de 18 - 20  $\mu\text{m}$ , el cual se mantiene al cabo de 10 días de almacenamiento, pero la mayor proporción de vesículas se encuentra repartida en dos intervalos de tamaño (4 - 6 y 6 - 8  $\mu\text{m}$ ). A los 18 días las vesículas observadas alcanzan un tamaño de 28 - 30  $\mu\text{m}$ .

En los liposomas que contienen 30% de colesterol el tamaño máximo encontrado se halla en el intervalo 20 - 22  $\mu\text{m}$ , el mayor número de vesículas para esta composición se mantuvo dentro del intervalo 4 - 6  $\mu\text{m}$ . Después de 10 días se observa que algunas vesículas alcanzan un tamaño de 24 - 26  $\mu\text{m}$ , manteniendo su diámetro al cabo de 18 días de almacenamiento en las condiciones establecidas.

Los comportamientos descritos anteriormente pueden deberse a que las vesículas se aproximan unas a otras fusionándose, lo que se puede observar en las fotografías (Figuras 4A y 4B), ya que al

cabo de 10 días además de formas esféricas se observan también vesículas alargadas en las cuales es posible diferenciar los liposomas esféricos que se están fusionando. Después de 18 días se observan además de estas dos estructuras, aglomerados de liposomas en proceso de fusión y además vesículas esféricas grandes (Figura 4C).

Además de lo anterior, se realizó un estudio estadístico de los datos obtenidos con el fin de confirmar la influencia del porcentaje de colesterol y del tiempo de almacenamiento sobre el tamaño (diámetro externo) de las vesículas, para lo cual se aplicó el Análisis de Varianza Modelo Lineal General en donde los factores considerados previamente se comparan con los tamaños vesiculares para observar si tienen efecto significativo sobre la variabilidad de tamaño. Además se llevaron a cabo pruebas de Duncan para efectuar comparaciones múltiples, a partir de lo cual se puede observar que

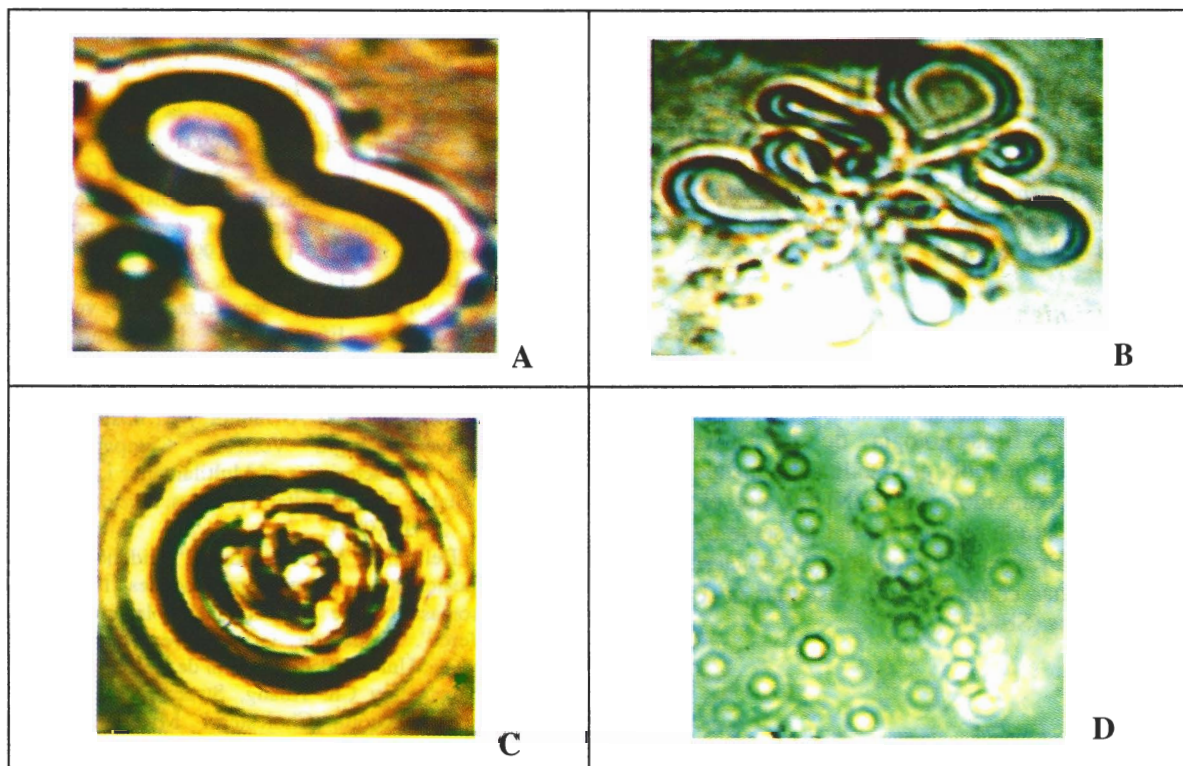


Figura 4. A. Vesículas liposomales fusionándose a 10 días, B. Agregados liposomales a 18 días, C. Vesícula liposomal grande a 18 días, D. Vesículas liposomales filtradas.

sí se presenta un efecto significativo de las variables: porcentaje de colesterol y tiempo de almacenamiento sobre el tamaño de los liposomas (11).

Por otra parte, teniendo en cuenta que el tamaño de las vesículas obtenidas se distribuyen dentro de un rango de valores bastante amplio, de 2 a 22  $\mu\text{m}$ , se lleva a cabo un tratamiento posterior con el fin de obtener una población más homogénea, por consiguiente se somete a filtración la preparación liposomal del 20% de colesterol con el objeto de observar el efecto de dicha operación sobre el tamaño de las vesículas, utilizando membranas de poliamida de diámetro de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , proceso que se realiza aplicando presión mediante una jeringa. En ambos casos las fotografías del filtrado obtenidas muestran vesículas de tamaño uniforme con diámetros de 3 y 4  $\mu\text{m}$ .

Se esperaría que el tamaño de las vesículas obtenidas fuera igual o menor a 0.45  $\mu\text{m}$ , sin embargo, se obtuvieron liposomas de tamaño mayor debido posiblemente a la flexibilidad de la bicapa fosfolipídica que permite el paso de las vesículas a través de los poros de la membrana filtrante. Es interesante anotar, que la forma de todas las vesículas observadas es completamente esférica y sólo se presenta una lámina, correspondiendo estas características posiblemente a vesículas liposomales unilaminares como se puede apreciar en la Figura 4D.

### Agradecimientos

Formalmente 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. D. Papahadjopoulos, Optimal liposomal drug action: from serendipity to targeting. En: "Liposome Technology, Interactions of Liposomes with the Biological Milieu". Vol III. 2<sup>nd</sup> ed. Edited by G. Gregoriadis. CRC Press. Boca Raton, USA. 1993. pp 2-8.
2. U. Citernesi y M. Sciacchitano, Cyclodextrines in Functional Dermocosmetics. *Cosmetics & Toiletries* 110 (3), 59-61 (1995).
3. M. Riaz, N. Weiner y F. Martin, Liposomes. En: "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, Calculating Number and Surface Area of Liposomes in Any Suspension. *J. Pharm. Sci.*, 70, 173-176 (1981)
6. D. Lichtenberg y T. Markello, Structural Characteristics of Phospholipid Multilamellar Liposomes. *J. Pharm. Sci.*, 73, 122 (1984).
7. A.N. Martin, P. Bustamante y 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.
8. B. Elorza, M.A. Elorza, M.C. Sainz y J.R. Chantres. Analysis of the Particle Size Distribution and Internal Volume of Liposomal Preparations. *J. Pharm. Sci.*, 82, 1160-1163. (1993)
9. H.J. Barbosa, O.C. Beltrán, M.J. Escobar, F. Jiménez y F. Martínez, Caracterización de vesículas liposomales.1. Efecto de la composición fosfolipídica sobre el volumen atrapado. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, 27, 31 (1998).
10. S. Gruner, R. Lenk, A. Jannof y M. Ostro, Novel Multilayered Lipid Vesicles. Comparison of Physical Characteristics of Multilamellar Liposomes and Stable Plurilamellar Vesicles. *Biochem.*, 24, 2833 - 2842 (1985).
11. O.C. Beltrán y M.J. Escobar. "Incidencia de la composición en algunas propiedades físicas de liposomas a base de lecitina, colesterol y  $\alpha$ -tocopherol". Tesis de Grado. Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. 1997.
12. A. Newman y Ch. Huang, Structural Studies on Phosphatidylcholine-Cholesterol Mixed Vesicles. *Biochem.*, 14 (15), 3363-3370 (1975).