

1007

586-4



ESTUDIO DE ENCAPSULACION DE GENTAMICINA EN LIPOSOMAS

Tesina presentada por Yolanda Cajal Visa para optar al grado de licenciatura en Farmacia.

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0701739272

Dra. FRANCISCA REIG ISART, Colaboradora Científica del CSIC, Centro de Investigación y Desarrollo de Barcelona.

Dra. M^a ASUNCION ALSINA, Departamento de Farmacia, Unidad Funcional de Fisico-química, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona

CERTIFICAN:

Que el trabajo experimental y la redacción de la tesina titulada:

"ESTUDIO DE ENCAPSULACION DE GENTAMICINA EN LIPOSOMAS"

han sido realizados por YOLANDA C. CAJAL VISA bajo nuestra dirección en el Laboratorio de Péptidos del departamento de Química Orgánica Biológica del CID, CSIC, Barcelona.

Barcelona, septiembre de 1988

Dra. Francisca Reig

Dra. M^a Asunción Alsina

Esta tesina ha sido realizada en el Laboratorio de Péptidos del Departamento de Química Orgánica Biológica del Centro de Investigación y Desarrollo, CSIC, Barcelona, bajo la dirección de las Dras. Francisca Reig Isart y M^a Asunción Alsina, a las que quiero expresar mi más profundo agradecimiento.

Quiero dar las gracias a todos los miembros del equipo por su amistad y voluntad de colaboración. Gracias a Eduard Bardají, M^a Antonia Busquets, Anna Cabanes, Toni Clapés, Emili Nogués, M^a de la Sierra Osuna, Imma Pascual, Francesc Rabanal, Pilar Ruiz, Ana Ymbern, Núria Xaus y a los Drs. Pere Clapés, Jose M^a García Antón, Isabel Haro, Jose Luís Torres y Gregorio Valencia

A mis padres

ABREVIATURAS

CCF	Cromatografía en capa fina
CMC	Concentración micelar crítica
COL	Colesterol
DCP	Dicetilfosfato
DMPA	Acido dimiristoilfosfatídico
DPPA	Acido dipalmitoilfosfatídico
DRV	Liposomas obtenidos por deshidratación-rehidratación
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
LUV	Liposomas unilaminares grandes
MLV	Liposomas multilaminares
OPA	o-ftaldialdehido
OPA-ME	Reactivo de derivatización de la gentamicina
PA	Acido fosfatídico
PBS	Tampón fosfato (pH 7.4)
PG	Fosfatidilglicerol
PS	Fosfatidilserina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
rpm	Revoluciones por minuto
SA	Estearilamina
SRE	Sistema reticuloendotelial
SUV	Liposomas unilaminares pequeños
Tc	Temperatura de transición de fase
t _R	Tiempo de retención (HPLC)
TCA	Acido tricloroacético

INDICE

ABREVIATURAS

1.	<u>INTRODUCCION</u>	1
1.1.	Los liposomas: concepto y propiedades fisico-químicas.	1
1.2.	Utilidad de los liposomas	8
1.3.	Tipos de liposomas.	12
1.3.1.	Liposomas grandes	13
1.3.1.1.	Liposomas Multilaminares Grandes (MLV)	13
1.3.1.2.	Liposomas Unilaminares Grandes (LUV)	14
1.3.1.3.	Liposomas obtenidos por deshidratación-rehidratación (DRV)	18
1.3.2.	Liposomas Pequeños Unilaminares (SUV)	19
1.4.	Interacciones liposoma-célula	23
1.5.	Antibióticos aminoglicósidos	25
1.5.1.	Gentamicina	26
2.	<u>OBJETIVOS</u>	30
3.	<u>MATERIALES Y METODOS</u>	31
3.1.	<u>Materiales</u>	31
3.1.1.	Instrumentación	31
3.1.2.	Disolventes y reactivos	33
3.1.3.	Lípidos	34
3.1.4.	Soluciones preparadas	34
3.1.5.	Soportes cromatográficos	35
3.2.	<u>Métodos</u>	36
3.2.1.	Purificación de la lecitina	36

3.2.2.	Método de determinación de la gentamicina	37
3.2.2.1.	Método de derivatización de la gentamicina	38
3.2.2.2.	Técnica analítica	40
3.2.3.	Encapsulación de gentamicina en distintos tipos de liposomas	41
3.2.3.1.	Liposomas Multilaminares (MLV)	41
3.2.3.2.	Liposomas Unilaminares Pequeños (SUV)	42
3.2.3.3.	Liposomas obtenidos por deshidratación-rehidratación (DRV)	43
3.2.4.	Método de análisis de fósforo	44
3.2.5.	Método de microscopía electrónica	45
3.2.6.	Estabilidad de los liposomas DRV frente a soluciones tampón de diferente fuerza iónica	47
3.2.7.	Estabilidad de los liposomas en presencia de sangre	48
4.	<u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	49
4.1.	Purificación de la lecitina	49
4.2.	Cromatografía en capa fina	50
4.3.	Resonancia Magnética Nuclear de las lecitinas	51
4.4.	Determinación de la gentamicina por cromatografía líquida de alta eficacia	54
4.4.1.	Detección al ultravioleta	55
4.4.2.	Detección por fluorescencia	59
4.4.3.	Calibración	62
4.4.4.	Linealidad	62
4.4.5.	Concentración mínima detectable	62
4.5.	Encapsulación de gentamicina en función del tamaño de los liposomas	67
4.6.	Influencia de la temperatura en la eficacia de encapsulación de MLV	73
4.7.	Encapsulación de gentamicina en función de la composición lipídica de los liposomas	76
4.8.	Determinación de la pérdida de liposomas en la centrifugación	79

4.9.	Observación de una preparación liposómica por microscopía electrónica	81
4.10	Estabilidad de los liposomas DRV frente a soluciones tampón de PBS de diferente fuerza iónica	83
4.11	Estabilidad de liposomas durante su incubación con sangre	86
5.	<u>CONCLUSIONES</u>	90
6.	<u>BIBLIOGRAFIA</u>	93

1. INTRODUCCION

1.1. LOS LIPOSOMAS: CONCEPTO Y PROPIEDADES FISICO-QUIMICAS

Los liposomas son vesículas que contienen compartimentos acuosos concéntricos separados entre sí y del medio externo acuoso por bicapas concéntricas de lípidos anfifílicos (figura 1).

El término liposoma fue utilizado por primera vez por Bangham y Horne (1), al observar por microscopía electrónica una suspensión de fosfolípidos de origen celular aislados y purificados.

Los liposomas pueden prepararse con una gran variedad de lípidos naturales o sintéticos, o bien con mezclas de ellos; los más comunmente utilizados son los fosfolípidos y el colesterol, cuya fórmula general se muestra en la figura 2.

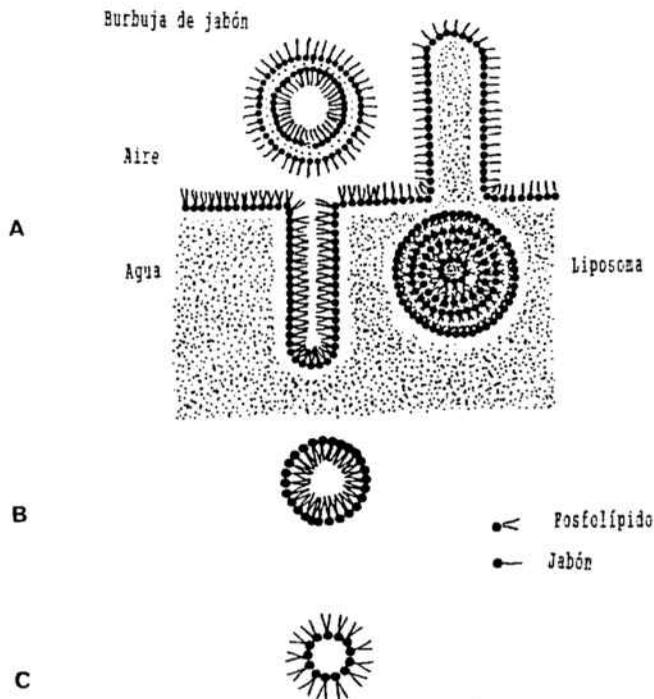


Fig. 1: Representación esquemática de moléculas anfipáticas en contacto con agua, aire e interfase aire-agua. A: Liposomas formados cuando la solución acuosa se encuentra en exceso. B: Micelas formadas cuando hay exceso de fosfolípido. C: Micelas invertidas, formadas en exceso de disolvente orgánico.

La ordenación en forma de bicapa característica de los liposomas es debida al caracter anfipático de los fosfolípidos. Sin embargo, no todos los lípidos anfifílicos son capaces de formar liposomas, sino que debe existir un equilibrio óptimo entre las partes hidrófoba e hidrófila de la molécula.

En general, los lípidos anfifílicos en contacto con el agua pueden adoptar varias ordenaciones según su estructura molecular:

- . Monocapa en la interfase agua-aire.
- . Micelas
- . Fase de cristal líquido en disposición hexagonal.
- . Fase de cristal líquido en disposición laminar (doble capa).

Sólamete los que presentan una ordenación en forma de bicapa formarán liposomas en contacto con un medio acuoso.

Cuando una concentración suficiente de fosfolípidos se mezcla con agua, las cadenas hidrófobas se asocian para excluirla, mientras que las cabezas hidrófilas se sitúan frente a ella, formándose estructuras lipídicas globulares en estado de mesofase esméctica (cristal líquido) constituidas por bicapas con las zonas hidrófilas enfrentadas. Estas estructuras admiten contenidos acuosos en su interior o entre las bicapas.

La forma y dimensiones de estas moléculas impiden la formación de micelas, siendo la forma termodinámicamente más estable la de vesículas. La fosfatidiletanolamina constituye una excepción a este comportamiento general de los fosfolípidos, ya que su ordenación más estable es la hexagonal.

La estructura de los lípidos es muy importante, pues de su cabeza polar y de la longitud, insaturaciones y ramificaciones de las cadenas apolares depende la ordenación hidratada más estable.

Los fosfolípidos naturales son en realidad mezclas de un gran número de componentes que se diferencian en las cadenas alquílicas de los ácidos grasos acilantes. Sólo en el caso de los fosfolípidos sintéticos se puede hablar de una especie pura.

Por otra parte, el estado físico de la bicapa lipídica es una característica importante de los liposomas.

Al calentar un lípido anhidro hasta llegar al punto de fusión, se producen una serie de cambios de fase termotrópicos. Estos compuestos no pasan directamente del estado cristalino (gel) al estado de líquido isotrópico, sino que a temperaturas intermedias se encuentran en un estado de cristal líquido.

La transición del estado de gel que presentan los fosfolípidos a bajas temperaturas, al de cristal líquido que presentan a temperaturas elevadas, es un proceso endotérmico que tiene lugar en un estrecho intervalo de temperaturas alrededor de una temperatura característica denominada temperatura de transición (T_c).

En la figura 3 se muestran los cambios en la estructura de la bicapa al producirse la transición de fase. En el estado de gel (sólido), las cadenas acilantes son rígidas, están en una conformación extendida (todo anti) y empaquetadas apretadamente. Sin embargo, si la temperatura del medio es superior a T_c , los liposomas se encuentran en el estado de cristal líquido (fluido), en el cual las cadenas acilantes tienen cierta libertad de movimiento, y aumenta el área de la bicapa por molécula de fosfolípido al mismo tiempo que el grosor de la bicapa disminuye.

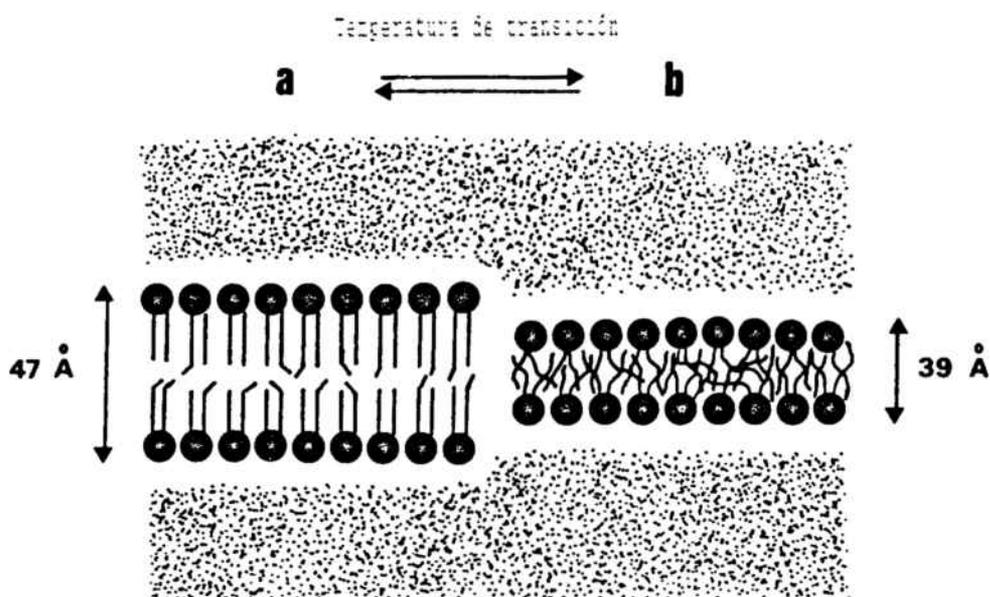


Fig. 3: Representación esquemática de los dos estados de la bicapa fosfolipídica.
a: estado de gel (sólido).
b: estado de cristal líquido (fluido)
●: cabeza polar de los fosfolípidos
 $\equiv \sim$: cadenas hidrofóbicas de ácidos grasos.

La T_c depende de la naturaleza de la cadena de los ácidos grasos y del grupo polar del fosfolípido (2). En la tabla 1 se representan los valores de T_c de los fosfolípidos más comunes.

Un fosfolípido puro compuesto de dos cadenas de ácidos grasos idénticas presenta una T_c que aumenta de 14 a 17°C por cada dos metilenos que se incorporen a sus cadenas apolares.

Los ácidos grasos insaturados así como las cadenas laterales con grupos voluminosos (como anillos de ciclopropano) producen un descenso en T_c .

	Lipid type	Abbreviation	Charge ^a	Phase transition temperature T _c (°C) ^b
	<i>One type of acylated chain: neutral lipids</i>			
Lecithins	Dioleoyl phosphatidylcholine (C18:1)	DOPC	0	-22
	Dilauryloyl phosphatidylcholine (C12:0)	DLPC	0	-1.8
	Dimyristoyl phosphatidylcholine (C14:0)	DMPC	0	23
	Dipalmitoyl phosphatidylcholine (C16:0)	DPPC	0	41
	Distearoyl phosphatidylcholine (C18:0)	DSPC	0	58
Cephalins	Diisostearoyl phosphatidylcholine	DIPC	0	—
	Dimyristoyl phosphatidylethanolamine	DMPE	0 ^c	48
	Dipalmitoyl phosphatidylethanolamine	DPPE	0 ^c	60
	Dipalmitoyl sphingomyelin	DPSPM	0	41
	Distearoyl sphingomyelin	DSSM	0	57
	<i>Mixture of acylated chains: neutral lipid</i>			
	1-Myristoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine (C14:0,16:0)	MPPC	0	27
	1-Palmitoyl-2-myristoyl phosphatidylcholine (C16:0,14:0)	PMPC	0	35
	1-Stearoyl-2-palmitoyl phosphatidylcholine (C18:0,16:0)	SPPC	0	47 ^d
	1-Palmitoyl-2-stearoyl phosphatidylcholine (C16:0,18:0)	PSPC	0	44 ^d
	Egg phosphatidylcholine	egg PC	0	-15 -7
	Beef brain sphingomyelin	BSM	0	32
	<i>Charged lipids</i>			
	<i>phospholipids conferring a negative charge on the liposomes</i>			
	Dilauryloyl phosphatidylglycerol	DLPG	-1	4
	Dimyristoyl phosphatidylglycerol	DMPG	-1	23
	Dipalmitoyl phosphatidylglycerol	DPPG	-1	41
	Distearoyl phosphatidylglycerol	DSPG	-1	55
	Dioleoyl phosphatidylglycerol	DOPG	-1	-18
	Dimyristoyl phosphatidic acid	DMPA	-1 ^e	51
	Dimyristoyl phosphatidic acid	DMPA	-2 ^f	45
	Dipalmitoyl phosphatidic acid	DPPA	-1 ^g	67
	Dipalmitoyl phosphatidic acid	DPPA	-2 ^h	58
	Dipalmitoyl phosphatidylserine	DPPS	-1	51
	Phosphatidylserine	PS	Negative ⁱ	68
	Dicetylphosphate	DCP	-1	—
	Phosphatidyl inositol	PI	-1	—
	<i>Phospholipids conferring a positive charge on the liposomes</i>			
	Stearylamine	SA	+1	—

Tabla 1: T_c de los fosfolípidos más comunes.

Los fosfolípidos que confieren al liposoma carga negativa, como por ejemplo PS, PG, DCP ó PA, tienen una considerable influencia en el valor de Tc de la mezcla lipídica. Asimismo, este valor puede modularse por adición de cationes divalentes, como por ejemplo Ca^{+2} y Mg^{+2} , que a concentraciones fisiológicas (0.1-10 mM) pueden incrementar el valor de Tc.

El pH influye también en el valor de Tc, por ejemplo la adición de iones hidrógeno aumenta 17°C la Tc del DPPG, 6°C la del DMPA y 8°C la del DPPA.

Todos estos aspectos son importantes, puesto que el estado sólido o fluido de la bicapa influye de modo determinante en la estabilidad del liposoma, propiedad que condiciona la pérdida de producto encapsulado, la vida media en sangre o tejidos y la biodistribución, aspectos todos ellos de vital importancia en el estudio del interés terapéutico de los liposomas como vehículos de principios activos.

Asimismo se ha comprobado que las insaturaciones y ramificaciones dificultan la compactación de las cadenas alquílicas, dando lugar a liposomas menos estables. Es por ello que en muchos casos se ha optado por incorporar colesterol a las formulaciones lipídicas de los liposomas, dado su carácter regulador de la fluidez. El colesterol es un componente lipídico de las membranas eucariotas; al incorporarlo a la bicapas fosfolipídicas reduce considerablemente su permeabilidad (3), ya que causa una gradual desaparición de la transición de fase (4). En cantidades superiores a 33% moles de colesterol, no se observa transición de fase. Por otra parte, el colesterol reduce la posibilidad de que determinadas proteínas (HDL) puedan penetrar en la bicapa

lipídica, lo que incrementa la estabilidad de los liposomas "in vitro" en presencia de plasma (5) así como "in vivo" tras inyección intravenosa (6). Además, si bien no se conoce exactamente como interacciona con los fosfolípidos para modular estos parámetros, si se sabe que incrementa el diámetro de los liposomas SUV alrededor de un 30% cuando se introduce a una concentración de 50% moles respecto a los fosfolípidos; sin embargo, no varía el diámetro de los liposomas si su proporción molar es del 20% (7)

El colesterol aumenta la captación hepática y esplénica de los liposomas que son rápidamente eliminados de la circulación. Según Heath y Papahadjopoulos, el colesterol es un componente esencial de la membrana liposomal para asegurar una buena distribución del fármaco (8).

La carga superficial de los liposomas influye también de manera importante en la farmacocinética de los mismos, sin que exista una unificación de criterios sobre el tema. La carga de los liposomas también tiene influencia en el porcentaje de acumulación en los distintos órganos; así, los liposomas con carga positiva son captados preferentemente por cerebro y pulmón (9).

1.2. UTILIDAD DE LOS LIPOSOMAS

Los liposomas tienen dos aplicaciones mayoritarias: como modelos de membrana para estudios bioquímicos y como sistemas de transporte de moléculas biológicamente activas.

En el primer caso, permiten estudiar fenómenos de transporte, interacciones lípido-proteína, canales iónicos, interacciones de moléculas con receptores, etc. (10, 11).

En el segundo caso, los liposomas permiten administrar gran variedad de fármacos y materiales biológicos, tanto hidrosolubles, que quedarán encapsulados en el interior acuoso del liposoma, como liposolubles, que formarán parte de la bicapa lipídica.

Los liposomas constituyen, por tanto, un interesante "drug delivery system" que podría solventar algunos problemas importantes que se presentan en terapéutica:

a) Permiten prolongar la vida media del fármaco en sangre, pues la liberación del mismo tiene lugar de manera continuada. Así se aumenta la eficacia del mismo. La vida media de los liposomas "in vivo" varía de unos minutos a varios días (12).

b) Por el hecho de acumularse en determinados lugares del organismo (por ejemplo en las membranas endoteliales), pueden ser de gran utilidad en el diagnóstico o tratamiento de enfermedades localizadas en estos lugares (13).

c) Permiten reducir la toxicidad de determinados fármacos en los tejidos, pues no se acumulan en corazón ni riñones, con lo cual podrían ser de gran utilidad en la administración de agentes cardiotóxicos (adriamicina, doxorubicina) (14) o nefrotóxicos (gentamicina, anfotericina B) (15).

d) Protegen a la sustancia encapsulada frente al ataque enzimático o a la respuesta inmunológica del organismo.

e) Pueden mimetizar la acción de ciertas células. Por ejemplo, liposomas con hemoglobina encapsulada podrían reemplazar a los eritrocitos como tratamiento en determinadas anemias (16).

f) Su afinidad por las células fagocíticas mononucleares del SRE (sistema reticuloendotelial) podría aprovecharse para tratar enfermedades de este sistema (17).

g) Los liposomas pueden unirse a anticuerpos u otros ligandos sin reducir su especificidad, lográndose así una potenciación de los efectos terapéuticos del fármaco encapsulado y permitiendo una liberación local y selectiva del fármaco (18).

h) Permiten administrar fármacos o moléculas que sólo son activas posteriormente a su penetración en la célula, o bien que atraviesan con dificultad la membrana celular (19).

i) La sustancia encapsulada no sufre ningún cambio en su estructura, con lo cual su actividad no resulta alterada (esto no se cumple con todos los transportadores macromoleculares) (20).

j) Es un campo de gran actualidad la posibilidad de ligar los liposomas a anticuerpos, hormonas, carbohidratos u otros ligandos que los conduzcan selectivamente a determinados tipos de células ("Targetting")(21, 22).

Aplicaciones de los liposomas en medicina

I. Tratamiento de deficiencias enzimáticas: al administrar el enzima encapsulado se reduce el problema de la inactivación del mismo por la respuesta inmunológica del organismo; asimismo se impide su acción sobre otros sustratos situados en lugares del organismo no necesitados de tratamiento (23).

Un ejemplo de esta aplicación es el tratamiento de la enfermedad de Gaucher en adultos, caracterizada por la deficiencia de un glucocerebrósido (la β -glucosidasa) principalmente en las células del SRE, alteración que al ser tratada con este enzima encapsulado en liposomas experimenta una mejora sustancial (24).

II. Tratamiento del cáncer (25, 26, 27): Determinados tipos de cáncer pueden tratarse con liposomas que llevan encapsulados antígenos de membrana de las células tumorales (vacunas); se ha comprobado que esto induce la formación de anticuerpos antitumorales.

Por otra parte, se han encapsulado también diversos citostáticos o antitumorales convencionales (quimioterapia), como citosina-arabinósido (ara-C), adriamicina (AM), metotrexato, actinomicina D o arabinosiladenina entre otros. Además, estos liposomas podrían ir marcados en su superficie con anticuerpos dirigidos contra antígenos de la superficie de las células tumorales, de forma que se aumentaría la selectividad del tratamiento, reduciéndose paralelamente la toxicidad de estos fármacos para las células sanas.

Un último punto a destacar dentro de la aplicación de los liposomas en la terapia del cáncer es la activación de macrófagos tumorocidas (BRM); las linfoquinas y el muramil-dipéptido (MDP) son muy eficaces en convertir los macrófagos en tumorocidas "in vitro", por lo que también se ha estudiado su incorporación en liposomas, comprobándose que en los pacientes sometidos a este tratamiento se produce un menor número de metástasis.

III. Terapia antimicrobiana: La afinidad de los liposomas por las células del SRE sugiere su utilidad en el tratamiento de enfermedades parasitarias en las que los agentes causales residen en macrófagos. Hay una serie de virus, bacterias, hongos y protozoos que se replican en el interior de los macrófagos; este tipo de infecciones intracelulares son difíciles de tratar, ya que los agentes antiparasitarios y antimicrobianos penetran poco en las células. Por ello se administran encapsulados en liposomas, con lo que se obtienen mejores resultados.

Algunos ejemplos de sustancias encapsuladas son: penicilina, dehidroestreptomina, antibióticos poliénicos (anfotericina B), gentamicina, gluconato antimónico-sódico (en el tratamiento de la leishmaniasis), así como fármacos para el tratamiento de la tripanosomiasis, malaria, brucelosis, lepra, tracoma, tífus,

psitacosis, infecciones virales (herpes), infecciones pulmonares por diferentes virus, etc (28, 29, 30).

IV. Desintoxicación de metales: Las acumulaciones de metales en el organismo se tratan con agentes quelantes, los cuales presentan el inconveniente de su reducida capacidad de penetración en el interior de las células. Por otra parte, los metales se acumulan mayoritariamente en los lisosomas. Por ello, el tratamiento de estas enfermedades con agentes quelantes incluidos en liposomas resulta muy adecuado, pues por una parte aumenta la penetración del agente quelante en las células, y por otra los liposomas presentan un tropismo por los lisosomas, con lo cual aumenta la selectividad.

Algunos quelantes estudiados son: desferrioxamina, DTPA, EDTA (31).

V. También se hallan descritas en la bibliografía otras aplicaciones terapéuticas de los liposomas, tales como: coadyuvantes en inmunología (32), aplicaciones oftalmológicas (33), administración de hormonas peptídicas (insulina) (34), etc.

1.3. TIPOS DE LIPOSOMAS

Los liposomas pueden ser preparados por diversas técnicas que condicionan su tamaño, volumen de encapsulación, número de bicapas y otras características.

Los liposomas pueden clasificarse en dos grandes grupos: liposomas grandes multilaminares o unilaminares, cuyos diámetros oscilan de 0.4 a 5 μm y de 0.2 a 2 μm respectivamente, y liposomas pequeños unilaminares, con diámetro de 0.02 a 0.08 μm . (figura 4).

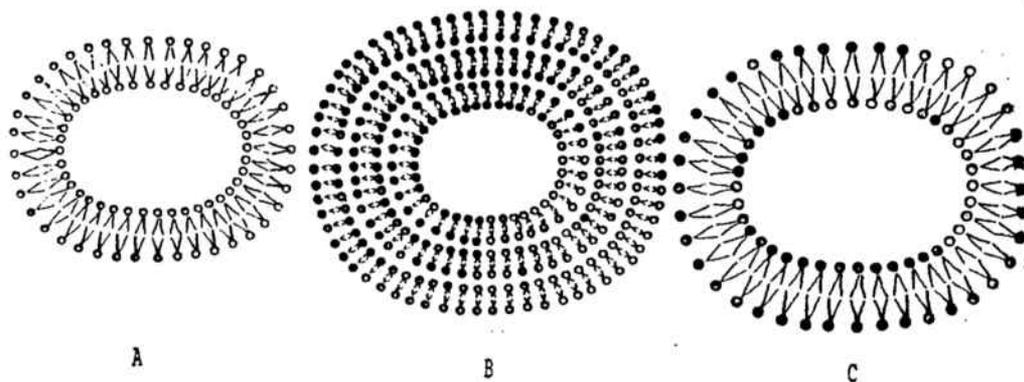


Fig. 4: Representación esquemática de varios tipos de liposomas.

A: Liposomas unilaminares pequeños (SUV)

B: Liposomas multilaminares (MLV)

C: Liposomas unilaminares grandes (LUV)

1.3.1. Liposomas Grandes

Se engloban aquí tres tipos de liposomas: MLV, LUV y DRV.

1.3.1.1. Liposomas multilaminares grandes (MLV)

Fueron descritos por primera vez por Bangham y colaboradores (35). Presentan un diámetro superior a 1000 Å, un volumen acuoso encapsulado que varía de 1 a 4 litros/mol fosfolípido y son osmóticamente sensibles.

A pesar de ser los más sencillos de preparar, los MLV presentan dos grandes inconvenientes: su heterogeneidad de tamaño y su baja capacidad de encapsulación.

Para su preparación, en primer lugar se forma una fina película de lípido seco, obtenida por evaporación del disolvente orgánico; a continuación se hidrata el lípido mediante agitación mecánica con una solución acuosa del soluto a encapsular. La temperatura debe mantenerse en todo momento por encima de la temperatura de

transición de gel a cristal líquido (T_c), que es característica de cada fosfolípido; en caso de utilizarse mezclas de fosfolípidos, la temperatura deberá ser superior a la T_c del fosfolípido que la presente más elevada.

Para obtener un máximo de encapsulación conviene hidratar durante un largo período de tiempo y agitar lentamente. La incorporación de lípidos cargados provoca un hinchamiento por repulsión electrostática entre las bicapas, con lo cual se logra aumentar la capacidad de encapsulación.

Para conseguir MLV de mayor volumen interno y mayor rendimiento de encapsulación existe otra técnica que consiste en congelar en nitrógeno líquido los MLV obtenidos tal como se ha indicado anteriormente y calentar posteriormente a 40°C en un baño de agua, repitiendo este ciclo cinco veces. Los MLV así obtenidos reciben el nombre de FATMLVs (Freeze and Thawed Multilamellar Vesicles) (36).

En cuanto a las aplicaciones de los MLV, a pesar de su baja capacidad de encapsulación se han utilizado para encapsular inhibidores de proteasas (37), polinucleótidos (38), proteínas de tamaño variable (39), fragmentos de DNA de elevado peso molecular (40), enzimas y moléculas de bajo peso molecular (41); sin embargo, su principal aplicación se sitúa en estudios de interacción lípido-lípido y lípido-proteína, como modelos de membrana.

1.3.1.2. Liposomas unilaminares grandes (LUV)

Estos liposomas presentan un diámetro superior a 1000 \AA y un volumen acuoso interno que oscila entre 8 y 17 l/mol fosfolípido. Al igual que los MLV son osmóticamente sensibles.

Son vesículas oligolaminares, es decir que constan de un número reducido de bicapas lipídicas.

Pueden obtenerse por varios procedimientos, descritos a continuación.

1.3.1.2.1. Vaporización del solvente Esta técnica consiste en inyectar los fosfolípidos disueltos en dietileter o en una mezcla de dietileter/metanol en una solución del soluto a encapsular calentada a 55-60°C o bien a 30°C a baja presión (42) (fig.5). Tras evaporar el disolvente orgánico se obtienen LUV cuyo tamaño no depende de la concentración de lípidos en el disolvente orgánico, y oscila de 1500 a 2500 Å de diámetro una vez se ha filtrado la preparación a través de filtros Millipore de 1,2 µm. Están descritas en la bibliografía modificaciones de esta técnica utilizando éter de petróleo, etilimetiléter o diclorofluorometano en lugar de dietiléter.

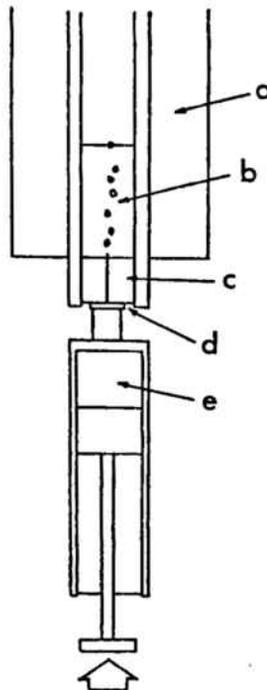


Fig. 5: Esquema del aparato utilizado en la técnica de vaporización del solvente; a: baño de agua; b: fase acuosa; c: émbolo de teflón; d: pistón; e: solución éter/líquido.

Esta técnica conlleva varios inconvenientes: la heterogeneidad del tamaño de las partículas, el bajo porcentaje de encapsulación, el uso de disolventes orgánicos y las temperaturas relativamente elevadas, lo cual puede desnaturalizar macromoléculas o inactivar sustancias disueltas. Por otra parte con este método los liposomas sin carga eléctrica tienden a agregarse (43).

Se han utilizado LUV para encapsular proteínas (44), RNA (45) y DNA (46).

1.3.1.2.2. Fusión inducida por calcio

Este procedimiento de formación de LUV, descrito por Papahadjopoulos y colaboradores en 1975 (47), se inicia a partir de SUV preformados que se mezclan con una disolución que contenga calcio, bien por diálisis o por adición directa de cloruro cálcico. Los SUV se fusionan en estructuras multilaminares cilíndricas grandes, en configuración espiral ("cochleate cylinders"), formándose un precipitado blanco floculado que puede eliminarse del recipiente de diálisis y recogerse por centrifugación. Estas estructuras cilíndricas pueden conservarse indefinidamente a 4°C o a -20°C en atmósfera de nitrógeno. Para formar los LUV el precipitado se resuspende en un volumen mínimo de la solución del producto a encapsular y se neutraliza por adición de solución de NaOH, añadiendo a continuación EDTA hasta desaparición del precipitado. Se obtiene así una solución opalescente de LUV (figura 6).

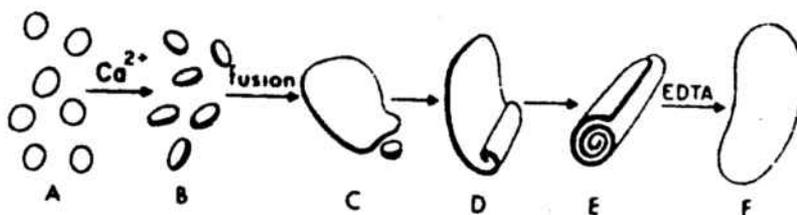


Fig. 6: Representación esquemática del efecto del Ca^{2+} sobre una población de SUV.

A: SUV en solución tampón de NaCl

B, C, D: Etapas intermedias de agregación y fusión de las vesículas adoptando configuración espiral

E: "Cochleate cylinders" (configuración espiral)

F: LUV formados tras incubación con EDTA

De esta manera se obtienen LUV de 2000 a 10000 Å de diámetro, con un volumen interno de 7 l/mol fosfolípido.

La separación del material no encapsulado de los liposomas se puede llevar a cabo por centrifugación a 48000 g durante 20 minutos, gel filtración o ultracentrifugación.

El principal inconveniente de esta técnica es que está restringida a fosfolípidos ácidos o mezclas con predominio de éstos (PA, PG, PS o cardiolípidos, puros o mezclados con colesterol).

Se han encapsulado con éxito en este tipo de liposomas proteínas (como la ferritina), picornavirus (como el poliovirus), el RNA de estos virus, RNA mensajero y DNA.

1.3.1.2.3. Evaporación en fase reversa (REV) (48)

Esta técnica de obtención de LUV consiste en disolver los fosfolípidos en disolventes orgánicos como dietiléter, diisopropiléter, mezclas como diisopropiléter/cloroformo (1:1) o fluorocarbonados de bajo punto de ebullición. La fase acuosa se añade directamente al sistema fosfolípido-disolvente orgánico. Seguidamente se sonica ligeramente la preparación para obtener una emulsión homogénea. El disolvente orgánico se evapora lentamente y a presión reducida siguiendo dos etapas: evaporación a 200-400 mm Hg hasta obtener un gel estable, y finalmente a 700 mm Hg hasta obtener una dispersión homogénea de liposomas.

Se obtienen así LUV de diámetro variable según la proporción de colesterol presente: si la proporción COL/fosfolípidos es de 1:1, se obtienen LUV de 0.17 a 0.8 μm de diámetro, mientras que si se preparan en ausencia de colesterol, el diámetro varía de 0.1 a 0.26 μm . El resultado de este proceso son poblaciones heterogéneas de vesículas oligo y unilaminares que requieren extrusión a través de filtros de policarbonato para obtener una población homogénea de LUV.

El principal inconveniente de este método es su agresividad por el uso de disolventes orgánicos y de sonicación.

Se han encapsulado en estos liposomas moléculas como ferritina, DNA del virus SV-40, 25 S RNA, etc. (49), oscilando el porcentaje de encapsulación entre un 20 y un 65 %

1.3.1.3. Liposomas obtenidos por deshidratación y rehidratación (DRV)

Descritos por Kirby y Gregoriadis (50), son liposomas oligolaminares suficientemente grandes para precipitar por centrifugación. Presentan una alta capacidad de encapsulación.

Este método consiste en sonicar una preparación de MLV, añadir la solución tamponada con el soluto a encapsular y liofilizar. Posteriormente, la preparación se rehidrata con volúmenes 10 veces menores; al ser una rehidratación gradual, el soluto está presente en casi todos los espacios interbicapa, con lo cual se logra un mayor rendimiento de encapsulación (fig. 7). Finalmente, el material no encapsulado se separa de los liposomas por centrifugación o diálisis.

El proceso de obtención es extremadamente suave, pues no requiere disolventes ni detergentes, y puesto que la sonicación tiene lugar antes de la encapsulación el producto no resulta dañado. Por todo ello es el procedimiento de elección para encapsular moléculas sensibles.

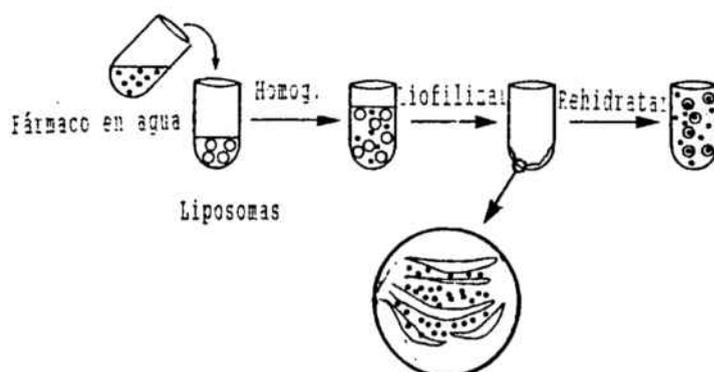


Fig. 7: Preparación de liposomas DRV.

1.3.2. Liposomas Pequeños Unilaminares (SUV)

Están constituidos por una o como máximo dos bicapas lipídicas, y poseen un diámetro de 200 a 500 Å. Estos liposomas no son osmóticamente sensibles, y presentan una reducida capacidad de encapsulación (generalmente del 0.1 al 1 %), siendo su volumen

acuoso interno de 0.2 a 1.5 l/mol fosfolípido, lo que los hace poco adecuados para la encapsulación de moléculas grandes (39).

Al tener un radio de curvatura tan pequeño, se genera una cierta tensión entre las moléculas de fosfolípido, el 70 % de las cuales están en la parte externa. Las tensiones son tan elevadas que la temperatura de transición (T_c) de un lípido puro varía en varios grados según esté hidratado formando SUV ó MLV.

Están descritas en la bibliografía varias técnicas de obtención de SUV:

1.3.2.1. Sonicación (51): Se parte de una preparación de MLV que se somete a sonicación en baño de ultrasonidos o bien mediante sonda, en atmósfera inerte (generalmente nitrógeno o argón). La sonicación con sonda genera mayor potencia y por lo tanto una rotura más rápida de los MLV, que pasan a ser estructuras con un radio mínimo; sin embargo, la preparación se contamina con partículas metálicas que se desprenden de la sonda. Por otra parte, la sonda puede ocasionar la degradación de los fosfolípidos y generar aerosoles. Todos estos problemas se evitan con el baño de ultrasonidos, pero en este caso es necesario prolongar el tiempo de sonicación para obtener vesículas de tamaño mínimo, con el consiguiente peligro de degradación de los lípidos.

La sonicación debe llevarse a cabo a temperatura superior a la T_c de los fosfolípidos, para evitar la formación de vesículas con defectos estructurales en su bicapa.

Una vez preparados, los SUV pueden separarse de los MLV por técnicas sencillas como gel filtración en Sepharosa 4B o 2B, con lo que se obtiene una población homogénea de SUV que eluyen de la columna más lentamente que los MLV (fig. 8). Sin embargo, puede

representar un inconveniente el nivel de dilución con el que se eluyen los SUV.

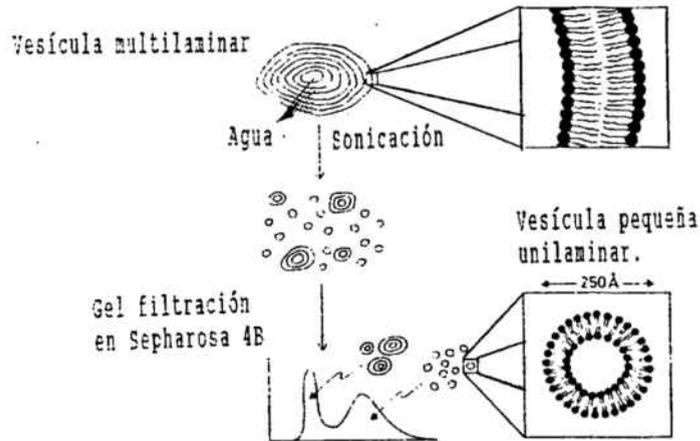


Fig. 8: Representación esquemática de la preparación de SUV por sonicación de MLV y posterior gel filtración.

La separación del material no encapsulado de los liposomas se realiza generalmente por diálisis, ya que a diferencia de los MLV y DRV, los SUV no precipitan por centrifugación. También puede utilizarse la técnica denominada "basket centrifugation" (52), que se basa en el principio de exclusión molecular en pequeñas columnas rellenas con Sephadex G-25.

1.3.2.2. Extracción del detergente: Esta técnica, empleada en un principio para reconstituir proteínas de membrana en las bicapas lipídicas (53), fue introducida por Kagawa y Racker (54).

El lípido seco o las vesículas preformadas se solubilizan en un tampón que contiene el detergente elegido para formar micelas mixtas. A continuación se elimina el detergente, con lo que las micelas coalescen, los fosfolípidos adoptan la configuración de bicapa y se forman vesículas cerradas.

Los detergentes más empleados son: colato sódico, deoxicolato y n-alkil- β -D-glucopiranosidos. Los detergentes de relativamente elevada CMC (concentración micelar crítica) pueden extraerse fácilmente, a diferencia de los de baja CMC. La extracción del detergente puede llevarse a cabo por diálisis, centrifugación (55), gel filtración (56) o diálisis rápida controlada (57).

Con una relación molar fosfolípido/detergente de (1:2) y por gel filtración, se obtienen liposomas de 30 nm de diámetro, mientras que si la relación es de (2:1) se obtienen liposomas de 1000 Å de diámetro.

1.3.2.3. Inyección de etanol: Esta técnica de preparación de SUV, descrita por Batzri y Korn (58) evita los problemas que conlleva la sonicación y el uso de detergentes, siendo un método rápido, simple y suave.

Básicamente, esta técnica consiste en disolver los lípidos en etanol e inyectar rápidamente la disolución obtenida en un medio acuoso tamponado, formándose espontáneamente las SUV.

El inconveniente principal de este método es la considerable dilución de los liposomas, lo que se traduce en un menor rendimiento de encapsulación; esto puede solventarse concentrando los liposomas por ultracentrifugación bajo presión de nitrógeno (775 atmósferas) o por filtración al vacío, obteniéndose liposomas con un volumen interno de alrededor de 0.5 l/mol fosfolípido.

Los principales inconvenientes de esta técnica son la dificultad para la eliminación del etanol por diálisis o lavado en la ultrafiltradora y la utilización de grandes volúmenes de solución acuosa, lo que exige cantidades relativamente grandes del soluto

a encapsular; sin embargo, se puede recuperar generalmente el material soluble en agua que pasa al ultrafiltrado.

Una modificación de este método permite la formación de vesículas de diámetro variable alterando la concentración lipídica en la solución etanólica, sin embargo el rendimiento de encapsulación es también muy bajo, ya que la suspensión de liposomas formada es muy diluída (59).

1.3.2.4. French press: Este método fué originariamente utilizado por Barenholz y colaboradores (60), y consiste en reducir el tamaño de una dispersión de MLV por extrusión a presión elevada (unas 1500 atmósferas, a 4°C) a través de una célula de French-pressure. Cuando se realiza esta operación una sola vez, se obtiene una población heterogénea de vesículas, de las cuales un 60% presentan un diámetro de 250 a 500 Å, y el 30% restante contiene aún MLV. Tras cuatro extrusiones sucesivas, el 94% de las vesículas presentan un diámetro comprendido entre los 315 y los 525 Å.

Por este método se obtienen SUV algo mayores que las obtenidas por sonicación.

La encapsulación de la fase acuosa es relativamente elevada cuando se emplean concentraciones elevadas de lípido.

1.4. INTERACCIONES LIPOSOMA-CELULA

Se han propuesto cuatro mecanismos de interacción entre los liposomas y las células (61), que se esquematizan en la figura 9.

1.4.1. Adsorción estable: Consiste en la asociación de las vesículas intactas a la superficie celular. Este proceso puede ser debido a fuerzas electrostáticas no específicas, hidrofóbicas o de otro tipo, o bien a componentes específicos presentes en la

vesícula y/o en la superficie celular.

1.4.2. Endocitosis: Las vesículas intactas se internan en la célula rodeadas por una vacuola; posteriormente, estas vacuolas endocíticas se fusionan con los lisosomas. La acción de las lipasas lisosomales en la membrana vesicular provoca la rotura de la vesícula y la salida del material encapsulado de la misma.

1.4.3. Fusión: Consiste en la unión de las vesículas lipídicas con la membrana plasmática, con la consiguiente liberación del contenido de las vesículas al citoplasma celular, mientras que los componentes de la membrana vesicular se asimilan en la membrana plasmática, donde permanecen o bien se internan en la célula por endocitosis e interaccionan con los lisosomas.

1.4.4. Transferencia de fosfolípidos: Tiene lugar un intercambio de moléculas lipídicas entre las vesículas y la membrana plasmática sin que se produzca contacto entre ambas.

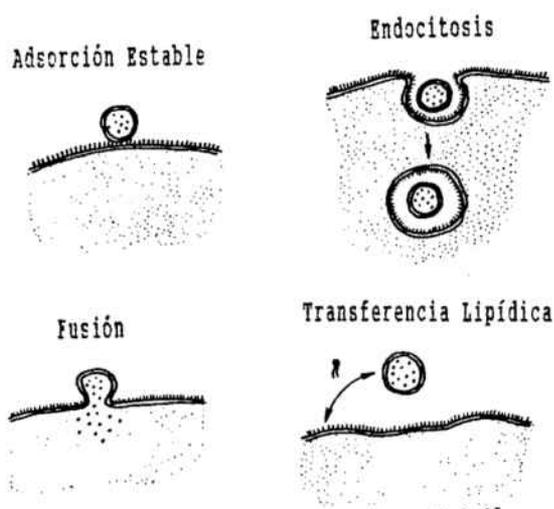


Fig. 9: Representación esquemática de los posibles mecanismos de interacción liposoma-superficie celular.

1.5. ANTIBIOTICOS AMINOGLICOSIDOS

Los aminoglicósidos son antibióticos naturales o semisintéticos con características comunes en cuanto a su estructura química. Todos ellos son sustancias básicas que son activas en medio alcalino (pH=7.8-8), y son capaces de formar sulfatos y clorhidratos.

Químicamente, se trata de poliheterósidos aminados a excepción de la espectinomicina, que es un verdadero aminociclitol. Sus principales aglicones proceden de la estreptamina, que es el derivado diamínico del inositol o ciclohexanol.

Por reducción de la función alcohólica del carbono 2 de la estreptamina se obtiene la desoxiestreptamina, que constituye la base de los antibióticos del grupo de la kanamicina (entre los que se encuentra la gentamicina).

En el esquema siguiente (tabla 2) se muestran los antibióticos aminoglicósidos más importantes clasificados de acuerdo con su estructura química:

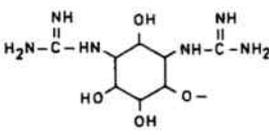
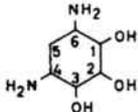
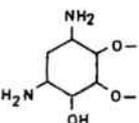
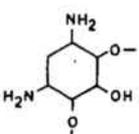
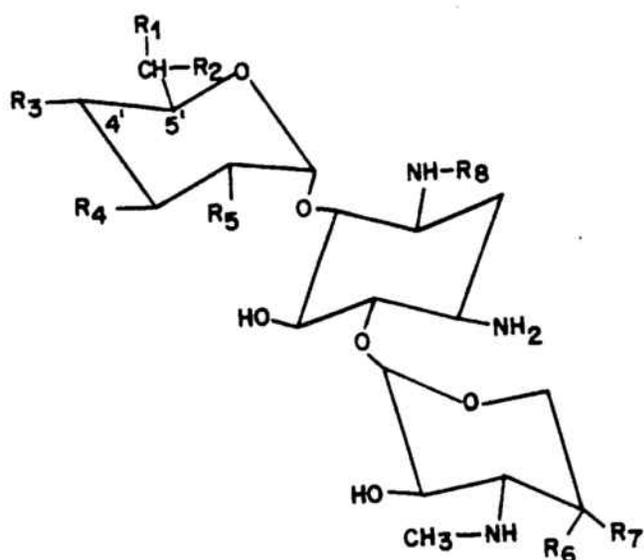
<p>1. Aminoglicósidos con estreptidina</p> <p>Spectro reducido y resistencia cruzada unilateral con los antibióticos de 2, desfavorable.</p>		<p>Estreptomina Dihidroestreptomina</p>
<p>2. Aminoglicósidos con desoxi-estreptamina</p> 	<p>Grupo de la neomicina</p> <p>Contiene ribosa en su molécula</p> 	<p>Neomicina Framicetina Paromomicina</p>
	<p>Grupo de la canamicina</p> <p>No contiene ribosa en su molécula</p> 	<p>Canamicina Gentamicina Tobramicina Sisomicina</p>
<p>3. Aminociclitoles</p>		<p>Espectinomicina</p>

Tabla 2: Antibióticos aminoglicósidos.

El mecanismo de acción se ha estudiado detalladamente para la estreptomycinina, antibiótico tipo dentro del grupo de los aminoglicósidos, ya que fué el primero que se aisló (62), a partir de una cepa de Streptomyces griseus aislada de garganta de pollo; sin embargo parece que para los demás antibióticos de este grupo el mecanismo de acción es muy parecido, cuando no idéntico. La estreptomycinina ataca los ribosomas de las células bacterianas sensibles en su subunidad 30 S (63, 64, 65) cuando está en plena operación de lectura del RNA mensajero. El lugar de ataque es una de las 15 proteínas que forman parte de dicha subunidad, concretamente la número 10. Al unirse el antibiótico a dicha proteína, se detiene la lectura del mensaje genético. No obstante, este mecanismo no explica la acción bactericida del antibiótico, ya que los ácidos nucleicos permanecen activos. Otro efecto del antibiótico es la inducción de falsas lecturas que trae consigo la producción de proteínas no funcionales por deformación del sitio aceptor de la propia subunidad 30 S, con fusión de los triplete leídos sobre el RNA mensajero, si bien este mecanismo no ha sido aún dilucidado.

1.5.1. GENTAMICINA

La gentamicina es un antibiótico aminoglicósido aislado en 1963 de cultivos de Micromonospora purpurea (66). El sulfato de gentamicina es una mezcla de tres componentes mayoritarios (67) (gentamicinas C₁, C_{1a} y C₂) y varios componentes minoritarios (gentamicinas A, A₁, B, B₁, C_{2a}, y C_{2b}), cuya estructura química se representa en la figura 10.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
A	H	OH	OH	OH	NH ₂	H	OH	H
B	H	NH ₂	H	OH	OH	OH	CH ₃	H
C _{1a}	H	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
C ₂	CH ₃	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
C ₁	CH ₃	NHCH ₃	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
C _{2a}	CH ₃	NH ₂	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H
C _{2b}	H	NHCH ₃	H	H	NH ₂	OH	CH ₃	H

Fig. 10: Estructura química de los componentes de la gentamicina.

La gentamicina es un bactericida activo frente a microorganismos gramnegativos (Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella, Serratia, Shigella, algunos Proteus y Pseudomonas aeruginosa). Dentro de los microorganismos grampositivos, el Staphylococcus aureus es particularmente sensible, además de muchas especies de Bacillus, Clostridium, Corynebacterium y otros.

La gentamicina puede desarrollar resistencias bacterianas por dos mecanismos: resistencia cromosómica (mutación) y extracromosómica (por la presencia de factores de resistencia, como plásmidos y factores R en los que se encuentran específicamente codificados los enzimas modificantes siguientes: acetiltransferasas, fosfotransferasas y nucleotidiltransferasas).

Se han observado resistencias en estafilococos, Pseudomonas aeruginosa y otros gramnegativos. La resistencia suele ser cruzada con neomicina, kanamicina y paromomicina, pero algunos microorganismos (especialmente estafilococos) pueden ser resistentes a otros aminoglicósidos y sensibles a la gentamicina.

La gentamicina se absorbe en muy baja proporción en el tracto gastrointestinal (1-5%), por lo que no se administra oralmente. Normalmente se administra por vía intramuscular, alcanzándose niveles hemáticos máximos entre 30 y 60 minutos y manteniéndose niveles eficaces durante unas 4 horas.

En cuanto a su biodistribución, este antibiótico difunde mal al líquido cefalorraquídeo, incluso cuando las meninges están inflamadas; por el contrario difunde con facilidad al resto de fluidos y tejidos, apareciendo en esputos y líquido pleural y peritoneal. Se excreta por orina, inmodificada, y no se liga a las proteínas plasmáticas.

A concentraciones plasmáticas de gentamicina superiores a 10-12 µg/ml pueden aparecer los efectos tóxicos característicos de los aminoglicósidos, consistentes en ototoxicidad, con alteraciones en el oído interno, y nefrotoxicidad, con afectación en el túbulo proximal.

Por todo ello, la gentamicina es un antibiótico de amplio espectro, cuyo campo de aplicación se vería enormemente incrementado si se lograra aumentar su absorción por vía oral reduciendo al mismo tiempo el riesgo de toxicidad que conlleva la administración de dosis elevadas.

2. OBJETIVOS

En el presente trabajo de Licenciatura se ha planteado como objetivo principal el estudio detallado de las condiciones de encapsulación de un antibiótico aminoglicósido, la gentamicina, en liposomas.

Para ello, el plan de trabajo propuesto ha consistido en:

1.- La puesta a punto por cromatografía líquida de alta eficacia del método de análisis cualitativo y cuantitativo de la gentamicina libre y encapsulada en liposomas así como en presencia de plasma.

2.- La realización de un estudio de encapsulación de la gentamicina en liposomas preparados por diferentes métodos. Puesto que el componente principal de los liposomas es la lecitina, se propuso también realizar un estudio previo de distintos tipos de este fosfolípido existentes en el mercado, con el fin de elegir el más adecuado para la obtención de liposomas.

3.- La determinación de la influencia de la composición lipídica de los liposomas en el porcentaje de encapsulación de la gentamicina. Concretamente, el estudio del efecto del colesterol y de la incorporación de fosfolípidos con carga.

4.- El estudio de la estabilidad a lo largo del tiempo de los liposomas que en los anteriores experimentos presentasen un mayor rendimiento de encapsulación de gentamicina, manteniéndolos en condiciones isoosmóticas e hipoosmóticas.

5.- La determinación de la estabilidad en sangre del mismo tipo de liposomas conteniendo gentamicina encapsulada.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. MATERIALES

3.1.1. INSTRUMENTACION

Las preparaciones fueron sonicadas con una sonda de ultrasonidos "Ultra-sonic Homogenizer Labsonic 1510" (B. Braun) de 400 wats de potencia, equipado con sonda de titanio de 9.5 mm de diámetro y 127 mm de longitud, o bien con un baño de ultrasonidos Selecta.

La agitación se realizó mediante un agitador Vibromixer Mixo-Tub. modelo 30 (Gricel).

Las diálisis de las preparaciones liposómicas se efectuaron empleando membranas para diálisis Visking, 2-18/32".

La centrifugación se llevó a cabo en tres tipos de centrífuga: Eppendorf 5414 S (no refrigerada) velocidad 15000 rpm; Beckmann modelo TJ-6 (refrigerada a 4°C) y Beckman modelo J2-21 (refrigerada a 4°C) provista de rotor JA-20.1.

Las determinaciones de pH se efectuaron en un pH-metro Crison micropH 2001, con célula Ingold.

Las medidas de conductividad del PBS se realizaron en un conductímetro Crison modelo 522 provisto de una célula Ingold R. 3796.

La osmolalidad del PBS se determinó en un aparato Knauer Vapour Pressure Osmometer Model No. 11.00.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de los distintos tipos de lecitinas ensayadas se registraron en un espectrómetro Brucker de 80 MHz.

Los análisis elementales se efectuaron en un analizador Perkin-Elmer 240, del Departamento de Química Orgánica Biológica del CID, CSIC, Barcelona.

Las fotografías de las preparaciones liposómicas fueron realizadas por el Servicio de Microscopía Electrónica de la Universidad Autónoma de Barcelona, utilizando un microscopio Hitachi modelo HU-12A.

La liofilización de las preparaciones liposómicas se llevó a cabo en una liofilizadora Telstar modelo Lioalfa, manteniendo durante el proceso una temperatura de -40°C y alcanzándose un vacío de 10^{-1} mbars.

La longitud de onda correspondiente a la máxima absorción de la gentamicina derivatizada con OPA se determinó por medio de un espectrofotómetro UV-visible Kontron modelo Uvikon 820, efectuando la lectura con lámpara de deuterio.

El agua empleada en cromatografía líquida de alta eficacia se purificó en un aparato Milli Q (Millipore) y se filtró posteriormente a través de una membrana Millipore de $0.2\ \mu\text{m}$ de diámetro de poro.

Los análisis por cromatografía líquida de alta eficacia se realizaron en un sistema Merck-Hitachi L-6200 intelligent pump provisto de inyector Rheodine 7125 y con detector de fluorescencia modelo LS-1, LC fluorescence detector (Perkin-Elmer). La longitud de onda de excitación se situó en $340\ \text{nm}$ mediante un filtro Perkin-Elmer, y la de emisión en $418\ \text{nm}$.

El registro y la integración de las señales cromatográficas se realizó por medio de un integrador cromatográfico Merck-Hitachi D-2000.

Para inyectar las muestras en el cromatógrafo se utilizó una jeringa SGE 25A-RLC de 25 µl.

Para la cromatografía en columna de exclusión molecular se utilizaron columnas de vidrio de 25 x 2.8 cm.

3.1.2. DISOLVENTES Y REACTIVOS

Para la cromatografía líquida de alta eficacia se emplearon metanol (Scharlau) y acetonitrilo (Romil Chemicals) de calidad HPLC.

El cloroformo y el metanol utilizados en la obtención de liposomas fueron de calidad analítica (Probus).

Para la preparación del PBS se utilizó cloruro sódico para análisis (Panreac), fosfato monosódico dihidrato purísimo (Panreac) y fosfato disódico dodecahidrato para análisis (Merck).

Para la preparación del tampón borato se utilizó ácido bórico (Probus) e hidróxido potásico 85% lentejas para análisis (Panreac)

Para la conservación y tratamiento de la sangre se utilizó citrato trisódico dihidrato purísimo, especial para tratar sangre (Merck), ácido tricloroacético para análisis (Merck) e hidróxido sódico calidad analítica (Panreac).

El reactivo de derivatización se preparó con o-ftaldialdehído (Scharlau), 2-mercaptoetanol (Eastman Organic Chemicals), metanol e isopropanol de calidad HPLC (Scharlau).

El ácido acético glacial 100% fue de calidad analítica (Merck)

La sal sódica del ácido 1-heptanosulfónico que se utilizó para HPLC/cromatografía de par iónico era de la marca Scharlau.

Los disolventes deuterados empleados para resonancia magnética nuclear: cloroformo, metanol, agua (Carlo Erba o Scharlau) presentaban una pureza en forma deuterada del 99.99%. Como referencia se utilizó tetrametilsilano (Carlo Erba).

En la preparación del reactivo para el análisis de fósforo se empleó molibdato amónico RS (Carlo Erba), ácido L (+) ascórbico RPE (Carlo Erba) y ácido perclórico (Panreac).

En los liposomas se encapsuló sulfato de gentamicina, B.P. 80 Estéril, potencia 638.4 U/mg., Danish powder & tableting Factory Ltd. ApS (Dinamarca).

3.1.3. LIPIDOS

Las lecitinas empleadas fueron: lecitina de huevo (Merck), Egg phosphatides powder tipe V (Asahi Chemical Industry Co. Ltd; Tokyo, Japan), lecitina de soja Vigor (Santiveri), Epikuron 200, Epikuron 200-H, Epikuron 170, Ovothin 170 (Lucas Meyer).

Se utilizó asimismo en la preparación de liposomas colesterol, tipo para bioquímica (Panreac).

Otros lípidos empleados fueron estearilamina (Sigma) y L- α -fosfatidil-L-serina, de cerebro de bovino (Sigma).

3.1.4. SOLUCIONES PREPARADAS

La solución tampón de PBS (Phosphate Buffer Saline) (pH=7.41) se preparó mezclando cloruro sódico (0.28 g), fosfato monosódico dihidrato (0.26 g) y fosfato disódico dodecahidrato (2.9 g), y

llevando a 100 ml con agua purificada por el sistema Milli Q (Millipore).

Se determinó su conductividad, que resultó ser de 15.4 mS.cm^{-1} , así como su osmolalidad, que fué de 313.35 mOsmol/kg .

La solución tampón borato se preparó ajustando una disolución de ácido bórico 0.4 M a pH 10.50 con una solución de hidróxido potásico al 45% (p/v).

La solución anticoagulante consistió en una disolución 0.5 M de citrato trisódico dihidrato en solución salina isotónica (NaCl 0.9 %).

3.1.5. SOPORTES CROMATOGRÁFICOS

La cromatografía de exclusión molecular se llevó a cabo con rellenos de Sephadex G-25 fine (Pharmacia) en el caso de la "basket centrifugation", y de alúmina (Merck) en el caso de la cromatografía en columna.

Para la cromatografía en capa fina se utilizaron placas de alúmina con indicador de fluorescencia Kieselgel 60 F₂₅₄ de 0.2 mm (Merck).

La columna utilizada en los análisis por cromatografía líquida de alta eficacia fué de fase reversa Lichrospher 100 RP-18 de $125 \times 4 \text{ mm}$, con un diámetro de partícula de $5 \mu\text{m}$ (Merck).

3.2. METODOS

3.2.1. PURIFICACION DE LA LECITINA

La purificación se realizó por cromatografía en columna, según el método descrito por Singleton en 1965 (68).

Para preparar la columna se pesaron 100 g de alúmina neutra en un vaso de precipitados de 500 ml (actividad 1) y se le añadieron 100 ml de cloroformo. Con esta mezcla se llenó una columna (25 x 2.8 cm) y se compactó eluyendo con cloroformo.

El flujo de la fase móvil a través de la columna se mantuvo alrededor de 10 ml/min.

Una vez preparada la columna, se procedió como sigue:

3.2.1.1. Introducción de la muestra: se disolvieron 5 g de lecitina impura en 10 ml de cloroformo y lentamente se introdujo esta disolución en la parte superior de la columna, cuidando de no remover la alúmina. Las paredes de la columna se lavaron con pequeñas cantidades de cloroformo dos o tres veces, con el fin de asegurar la penetración de la muestra.

3.2.1.2. Elución: la elución tuvo lugar en dos pasos: en primer lugar se eluyeron los lípidos neutros con cloroformo, recogándose cuatro fracciones de 50 ml. A continuación se cambió el sistema de elución por cloroformo/metanol (9:1), relación específica para la lecitina. Si se aumenta la proporción de metanol, se eluyen otros fosfolípidos y carotenoides.

Las fracciones obtenidas, una vez comprobada su pureza por capa fina como se detalla a continuación, se secaron primero en el rotavapor y luego se mantuvieron al vacío de bomba de aceite durante 1 hora; finalmente se pasó una corriente de nitrógeno con

el fin de eliminar el oxígeno y dejar los lípidos en atmósfera inerte, y se guardaron a -20°C .

3.2.1.3. Detección (68): Se llevó a cabo por cromatografía en capa fina en placa de alúmina, eluyendo la placa con una mezcla de cloroformo/metanol/agua (65:25:4). Para la visualización de las manchas se siguieron tres procedimientos: en primer lugar, observación de la placa en lámpara de 254 nm aprovechando que las placas utilizadas contenían indicador de fluorescencia; a continuación se expuso la placa a vapores de yodo, con lo cual los lípidos se visualizaron como manchas pardas; por último, y una vez aireada la placa, se pulverizó sobre ella ácido perclórico al 40%, y se calentó posteriormente la placa a fin de carbonizar la materia orgánica.

Este proceso se llevó a cabo con distintos tipos de lecitina, y una vez purificados los distintos lotes se realizaron espectros de RMN con el fin de determinar el grado de insaturación de los ácidos grasos que forman parte de su estructura.

3.2.2. METODO DE DETERMINACION DE LA GENTAMICINA

Para el análisis cualitativo y cuantitativo de la gentamicina se siguió la técnica de la cromatografía líquida de alta eficacia. Dada la estructura química de la gentamicina debieron someterse las muestras a un proceso de derivatización previo a su análisis por HPLC.

Para conseguir una correcta separación de los tres componentes mayoritarios de la gentamicina (C_1 , C_{1a} y C_2), tuvieron que ensayarse distintas condiciones de análisis a fin de cuantificar con el mínimo error posible la cantidad de gentamicina presente en la muestra.

3.2.2.1. Metodo de derivatización de la gentamicina

Tras una exhaustiva búsqueda bibliográfica y en función de los aparatos disponibles se optó por llevar a cabo el análisis mediante derivatización precolumna con OPA. En este método se aprovecha la capacidad del o-ftaldialdehído (OPA) de reaccionar con aminos primarias en medio alcalino y en presencia de un tiol como agente reductor, formando un compuesto fluorescente (70, 71, 72, 73) (figura 11). Este reactivo no reacciona en cambio con aminos secundarias.



Fig. 11: Reacción de derivatización con OPA en presencia de 2-mercaptoetanol.

La reacción de derivatización se llevó a cabo mezclando volúmenes iguales de muestra a analizar, isopropanol y reactivo OPA-ME, para cuya preparación se procedió como sigue: se disolvieron 50 mg de o-ftaldialdehído (OPA) en 1 ml de metanol, añadiendo a continuación 40 μl de 2-mercaptoetanol. La solución se agitó hasta decoloración y se añadieron 9 ml de tampón borato. El reactivo así preparado se guardó en frascos color ámbar y a 4°C , utilizándose como máximo durante los dos días siguientes a partir de su preparación.

El tiempo de reacción fue de 15 minutos a temperatura ambiente y agitando de vez en cuando; transcurrido este tiempo, la totalidad de la gentamicina ha reaccionado formando compuesto fluorescente.

Cuando se deseó determinar la gentamicina encapsulada en liposomas, debieron romperse los mismos previamente a la reacción de derivatización. Para ello, se añadió el isopropanol a los liposomas y se calentó el tubo durante 5 minutos a 35°C, añadiendo a continuación el reactivo OPA-ME.

El compuesto de derivatización formado no es estable, sino que la intensidad de fluorescencia varía en función de los siguientes parámetros (72, 73).

. Tiempo: la intensidad de fluorescencia de los compuestos derivados del OPA disminuye con el tiempo (figura 12)

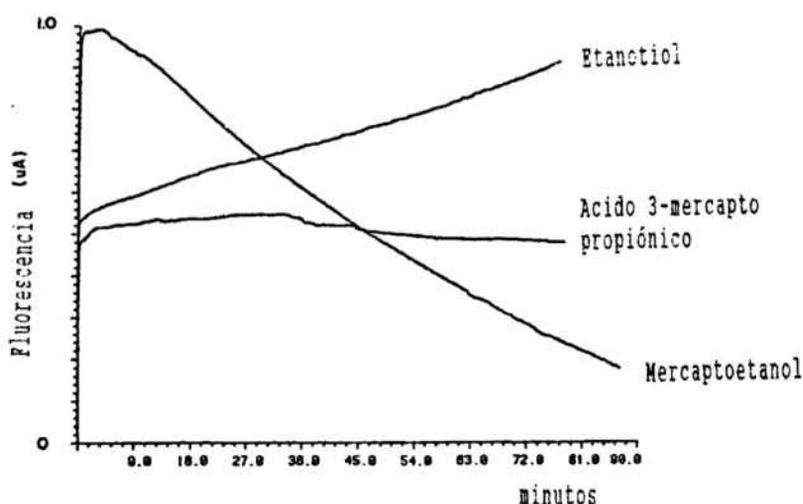


Fig. 12: Representación gráfica de la variación de la fluorescencia de derivados del OPA en función del tiempo en presencia de diferentes mercaptanos.

Por ello, una vez transcurridos los 15 minutos de derivatización, la muestra debe inyectarse inmediatamente en el cromatógrafo.

. pH: la intensidad de fluorescencia de los derivados del OPA es pH-dependiente, de modo que a mayor valor de pH corresponde mayor intensidad de fluorescencia.

. Fuerza iónica de los tampónes: influye en los tiempos de retención.

Temperatura de la columna: debe controlarse para asegurar la reproductibilidad de los cromatogramas.

Dada esta dependencia, en nuestras determinaciones se ha trabajado siempre manteniendo constantes los parámetros antes citados, a fin de obtener resultados reproducibles y comparables.

3.2.2.2. Técnica analítica

Partiendo de los datos analíticos descritos en la bibliografía para la determinación de la gentamicina por HPLC (74, 75, 76, 77, 78), se llevó a cabo un estudio previo a fin de encontrar las condiciones analíticas más adecuadas para el tipo de aparato y de columna de que se disponía en nuestro laboratorio.

De este modo se llegó a unas condiciones de elución con las que se logró separar los tres componentes mayoritarios de la gentamicina (C_1 , C_{1a} y C_2) con una buena resolución, siendo sus tiempos de retención de 2.3, 6.8 y 9.6 minutos respectivamente.

La elución se realizó por el sistema isocrático, siendo la composición de la fase móvil de un 77% de metanol y un 23% de ácido acético glacial al 10%, el cual lleva en disolución heptanosulfonato sódico en una proporción de 4.5 gramos por cada litro de mezcla total de eluyente. El flujo se fijó en 1 ml/min, alcanzándose una presión de 96 bar.

En todos los casos se inyectaron 25 μ l de muestra, siendo la capacidad máxima del inyector de 20 μ l.

La cuantificación se llevó a cabo respecto a los isómeros C_{1a} y C_2 , ya que el pico cromatográfico correspondiente al isómero C_1 queda enmascarado por el frente del eluyente y el exceso de

reactivo OPA-ME. Para ello se empleó un detector de fluorescencia, situándose la máxima intensidad de fluorescencia del compuesto de derivatización formado a una longitud de onda de excitación de 340 nm y de emisión de 418 nm. El factor de escala del fluorímetro se fijó en 0.6 y la respuesta en 3, con lo que se logró reducir el elevado ruido de fondo debido a la alta sensibilidad del método.

3.2.3. ENCAPSULACION DE GENTAMICINA EN DISTINTOS TIPOS DE LIPOSOMAS

3.2.3.1. Liposomas Multilaminares (MLV)

Se prepararon siguiendo el método descrito por Bangham (35). En primer lugar, se pesaron 25 mg de PC y 12.5 mg de COL (relación molar PC/COL 1:1), y se disolvieron con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1 v/v).

A continuación se evaporó el disolvente en un rotavapor. Finalmente se pasó corriente de nitrógeno para asegurar la total eliminación del disolvente.

La fina película de lípido seco se hidrató con 2 ml de una solución de gentamicina en PBS de 1 mg/ml, utilizándose un baño de ultrasonidos para facilitar la homogeneización.

Se dejaron transcurrir 4 horas antes de llevar a cabo la separación de la gentamicina libre de los liposomas, que se realizó por centrifugación a 14000 rpm durante 25 minutos (4°C), resuspendiendo el precipitado de liposomas ("pellet") con PBS; este proceso se repitió dos veces más. Se cuantificó por HPLC el contenido en gentamicina de los liposomas y de los tres sobrenadantes obtenidos.

3.2.3.2. Liposomas Unilaminares Pequeños (SUV)

Se prepararon por sonicación de los MLV (51) obtenidos como se indica en el apartado anterior. Se utilizó para ello una sonda de ultrasonidos a 10⁶ wats, sonicando los liposomas conteniendo gentamicina encapsulada durante tres intervalos de dos minutos cada uno, separados entre sí por un minuto de reposo durante el cual se pasó corriente de nitrógeno por la preparación. Dicha preparación permaneció en todo momento refrigerada externamente. Las partículas de titanio desprendidas por la sonda se eliminaron por centrifugación (5 minutos a 2000 rpm son suficientes).

La separación de la gentamicina encapsulada en los SUV de la gentamicina libre se realizó por dos procedimientos:

. Diálisis frente a PBS: Se introdujeron 2 ml de la preparación de liposomas en un saco de diálisis y se sumergió ésta en un volumen conocido de PBS, obteniéndose los mismos resultados si se utilizaban 2 litros de PBS sin renovarlos durante el proceso, ó 50 ml renovándolos cada 2 horas. La solución externa se mantuvo homogénea por agitación magnética.

. "Basket-centrifugation" (52): se rellenó una jeringa de plástico de 5 ml con Sephadex G-25 hinchado previamente con agua. Se compactó por centrifugación (10 minutos a 3000 rpm) y se depositó 1 ml de la preparación de SUV conteniendo gentamicina libre y encapsulada en la parte superior de la jeringa. Se centrifugó primero durante 1 minuto a 1000 rpm (200 g) para asegurar la penetración de la muestra, y a continuación durante 10 minutos a 3000 rpm (1500 g). De este modo, se logró separar la gentamicina libre de los SUV por el principio de exclusión molecular, ya que debido a su mayor tamaño los liposomas son

eluidos, mientras que en estas condiciones la gentamicina libre es retenida por el Sephadex.

3.2.3.3. Liposomas obtenidos por deshidratación y rehidratación (DRV)

Los liposomas DRV se prepararon según el método descrito por Kirby y Gregoriadis (50); para ello, en primer lugar se pesaron 25 mg de PC y 12.5 mg de COL y se disolvieron con una mezcla de cloroformo/metanol 2:1 v/v. El disolvente se evaporó en un rotavapor, con lo que se obtuvo una fina película de lípido seco; esta película lipídica se hidrató con 2 ml de agua purificada por el sistema Milli Q (Millipore), con ayuda de un baño de ultrasonidos. Esta preparación se sonicó a 100 wats con una sonda de ultrasonidos, durante tres intervalos de 2 minutos. Entre una sonicación y la siguiente, la preparación permaneció en reposo en atmósfera de nitrógeno. Las partículas de titanio desprendidas de la sonda se eliminaron por centrifugación durante 5 minutos a 2000 rpm.

A continuación se tomó 1 ml de la preparación y se le añadieron 500 µl de una solución de gentamicina en PBS de 2 mg/ml (relación en peso lípido/gentamicina 10:1), se homogeneizó la mezcla y se congeló rápidamente en un baño de nieve carbónica y metanol, liofilizándose durante unas 12 horas. Seguidamente se rehidrató, primero con 0.1 ml de agua y luego con 0.9 ml de PBS; en cada caso, los liposomas se agitaron en el vibromixer y se dejaron reposar durante 30 minutos. Finalmente se añadieron 7 ml de PBS, de forma que finalmente se obtuvo un volumen de 8 ml de DRV.

La separación del material encapsulado en DRV del no encapsulado se realizó por dos procedimientos:

. Centrifugación durante 25 minutos a 14000 rpm, refrigerando a 4°C. Los liposomas se lavaron con PBS tres veces.

. Diálisis frente a PBS: se procedió de igual forma que en el caso de los SUV.

Este procedimiento se aplicó también a la obtención de liposomas DRV de diferente composición lipídica.

3.2.4. METODO DE ANALISIS DE FOSFORO

Para comprobar que no se perdían liposomas en el proceso de la centrifugación, se cuantificaron los fosfolípidos presentes en los sobrenadantes obtenidos. Para ello se siguió el método de Barlett de análisis de fósforo (79).

En primer lugar se hizo una recta de calibrado con una solución estándar de fosfato de 3.07 $\mu\text{g P/ml}$; se pusieron en tres tubos de ensayo 1, 1.5 y 2 ml respectivamente de esta solución, y se evaporó a sequedad en un rotavapor, con baño de agua a 100 °C. Las muestras se carbonizaron añadiendo 0.5 ml de ácido perclórico, y a continuación se derivatizaron añadiendo 9.5 ml de un reactivo preparado "in situ" mezclando volúmenes iguales de dos soluciones (A y B) preparadas como se indica a continuación:
Solución A: Se preparó mezclando 1.0 g de molibdato amónico y 8 ml de ácido perclórico 70% en 60 ml de agua.

Solución B: Se disolvió 1.0 g de ácido ascórbico en 40 ml de agua.

Los tubos se taparon, se agitaron para homogeneizar la mezcla y se calentaron durante 1 hora a 50 °C. Seguidamente se leyó la absorbancia a 825 nm.

Dada la elevada sensibilidad de este método analítico, la recta de calibrado debe prepararse antes de cada análisis.

Para valorar el contenido en fosfolípidos de los sobrenadantes procedentes de la centrifugación de las preparaciones liposómicas se extrajo previamente el lípido por agitación con cloroformo de la fase acuosa liposómica y se tomó una alícuota de la fase orgánica, con la que se procedió como en el caso de la solución estándar de fosfato y se leyó la absorbancia a 825 nm (apartado 4.9). Extrapolando este valor de absorbancia en la recta de calibrado preparada anteriormente se pudo conocer la concentración en fósforo presente en el sobrenadante, y conociendo el peso molecular de la fosfatidilcolina empleada (956 g/mol) se calculó el porcentaje de pérdida de fosfolípidos.

Es muy importante que todo el material empleado en este método analítico esté lavado con mezcla crómica, a fin de evitar errores en la cuantificación por la presencia de fosfatos procedentes de los detergentes o de otros productos.

3.2.5. METODO DE MICROSCOPIA ELECTRONICA

La microscopía electrónica es una de las técnicas utilizadas para caracterizar las preparaciones liposómicas, ya que permite determinar de manera aproximada la lamelaridad (en función de la proporción de lípido expuesto al medio externo) (80), así como el tamaño de las vesículas (81).

En el campo de la microscopía electrónica existen dos métodos de observación posibles dependiendo del tipo de material en estudio: la microscopía electrónica de transmisión y la de barrido.

Para las observaciones realizadas en este trabajo se siguió el método de transmisión, que se basa en el bombardeo de la muestra por un haz de electrones, de manera que las diferentes regiones se distinguen entre sí según su capacidad de difundir los electrones.

Se siguió la técnica de tinción negativa, muy sencilla y aplicable al estudio de membranas, según indica Makowski(82), ya que su límite de resolución es de 15 Å. En primer lugar, se mezcla la suspensión que se quiere estudiar con una solución acuosa del colorante negativo. Una gota de esta mezcla se deposita sobre el soporte del microscopio, secándose después de haber pasado el tiempo necesario para la fijación de la muestra. Como colorante se utiliza generalmente la sal de un metal pesado (sal sódica o potásica del ácido fosfotúngstico, acetato de uranio, molibdato amónico, etc.), que difunde por la parte acuosa de los componentes de la muestra. En este proceso aparecen dos tipos de regiones: unas transparentes (partes hidrófobas) donde no ha llegado el colorante, y otras electrodensas (partes hidrófilas), debido a la presencia de metales pesados.

Esta técnica presenta algunos inconvenientes, como la distorsión de los liposomas (83) o errores en la observación por penetración masiva del colorante.

3.2.6. ESTABILIDAD DE LOS LIPOSOMAS DRV FRENTE A SOLUCIONES TAMPON DE DIFERENTE FUERZA IONICA

En lo que concierne a sus futuras aplicaciones terapéuticas, la estabilidad de las preparaciones liposómicas es un factor fundamental.

Se ha determinado la liberación de gentamicina a lo largo del tiempo de preparaciones de liposomas DRV compuestos por PC/COL (1:1), conteniendo 1.25 mg fosfolípido/ml y 0.064 mg gentamicina/ml, mantenidos en condiciones isoosmóticas (PBS estándar, conductividad $15.414 \text{ mS.cm}^{-1}$) o suspendidos en soluciones hipotónicas de PBS (PBS obtenidos por dilución 1:2 ó 1:4 del estándar, de conductividades 8.391 y 4.748 mS.cm^{-1} respectivamente).

A 9 ml de cada una de las tres soluciones tampón de PBS de diferente fuerza iónica se le añadió 1 ml de preparación de DRV, lavados por centrifugación, conteniendo gentamicina encapsulada y se homogeneizó la suspensión, que se mantuvo en viales color ámbar y a 4°C .

Una vez por semana se tomaron muestras de 500 μl y se centrifugaron a 15000 rpm durante 15 minutos (centrífuga Eppendorf) con el fin de precipitar los liposomas. Se tomaron 400 μl del sobrenadante y se cuantificó por HPLC la gentamicina presente, que corresponde a aquella cantidad de gentamicina encapsulada que ha sido liberada de los liposomas.

El experimento se realizó por triplicado, y cada uno de los sobrenadantes procedentes de la centrifugación fué objeto de dos derivatizaciones consecutivas y posterior cuantificación por HPLC.

3.2.7. ESTABILIDAD DE LOS LIPOSOMAS EN PRESENCIA DE SANGRE

Se determinó la estabilidad de los liposomas DRV compuestos por PC/COL (1:1) en sangre de bovino tratada con solución anticoagulante de citrato (50 µl por cada ml de sangre).

Para ello se prepararon DRV conteniendo gentamicina encapsulada, tal como se indica en el apartado 3.2.3.3, y se eliminó la gentamicina libre por centrifugación.

Se dispusieron una serie de viales Eppendorf con 1 ml de sangre en cada uno y se añadieron 400 µl de DRV conteniendo gentamicina encapsulada (0.064 mg/ml). Las muestras se homogeneizaron cuidadosamente para no provocar hemólisis y se sumergieron en un baño termostático a 37°C con el fin de reproducir la temperatura fisiológica.

A determinados intervalos de tiempo (0, 15, 30, 60, 90 y 120 minutos) se extrajeron los viales y se sometieron al tratamiento siguiente:

a) Se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos (4°C), y se tomaron 500 µl de plasma por cada vial.

b) Se precipitaron los liposomas por centrifugación a 15000 rpm durante 10 minutos (centrífuga Eppendorf).

c) Se tomaron 400 µl del sobrenadante anterior y se sometieron a un tratamiento de desproteínización con TCA (40 %), y una vez centrifugada la preparación a 15000 rpm durante 10 minutos se tomaron 350 µl del sobrenadante libre de proteínas y se neutralizaron con 25 µl de NaOH 20% (p/v).

d) Las muestras así preparadas se derivatizaron y se cuantificó el contenido en gentamicina por HPLC.

Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. PURIFICACION DE LA LECITINA

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.2.1 de Métodos, se purificaron siete tipos de lecitina, de las cuales dos (Epikuron 200-H y Egg Phosphatides type V) estaban hidrogenadas y presentaban una consistencia de polvo blanco, mientras que de las cinco restantes, cuatro (Epikuron 200, Epikuron 170, Ovothin 170 y lecitina de huevo Merck) eran de color marrón por la presencia de carotenoides, y su consistencia de pasta dificultaba su manejo, mientras que la lecitina de soja Santiveri, también coloreada, era un granulado grueso.

Se purificó 1 g. de cada una de ellas, obteniéndose los rendimientos de purificación que se indican en la tabla 3.

Lecitina	Rendimiento
Egg Phosphatides type V	79.47 %
Epikuron 200-H	77.12 %
Epikuron 200	71.48 %
Merck	59.0 %
Ovothin 170	46.76 %
Epikuron 170	31.4 %
Lecitina de soja	26.9 %

Tabla 3: Rendimientos de purificación de las lecitinas en estudio.

4.2. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA

Se controlaron por esta técnica cromatográfica los siete tipos de lecitinas en estudio antes y después de su purificación, efectuada según el proceso descrito en el apartado 3.2.1. De este modo se pretendía comprobar la eficacia del mismo.

En la capa fina obtenida a partir de las lecitinas sin purificar, se observaron varias manchas en el desarrollo cromatográfico de todas ellas. Las que presentaron mayor número de impurezas resultaron ser la de soja y la Epikuron 170, mientras que las más puras fueron la Epikuron 200 y sobre todo las dos lecitinas hidrogenadas: Epikuron 200 H y Egg Phosphatides type V.

La capa fina de las lecitinas una vez purificadas presentó una sola mancha, exceptuando el caso de la de soja y la Ovoidin 170, que presentaron varias.

Los valores de R_f de las distintas lecitinas purificadas se muestran en la tabla 4.

Lecitina	R_f
Egg phosphatide type V	0.208
Epikuron 200-H	0.216
Epikuron 200	0.250
Merck	0.246
Ovoidin 170	0.242
Epikuron 170	0.242
Lecitina de soja	0.269

Tabla 4: Elución $Cl_3CH/MeOH/H_2O$ (65/25/4)
Revelado: a) observación lámpara 254 nm;
b) vapores de yodo; c) vaporización con $HClO_4$ 40% y posterior carbonización.

Las ligeras diferencias en los valores de R_f de las lecitinas analizadas se deben a que son en realidad mezclas de compuestos con diferente composición en ácidos grasos según cual sea el origen de la lecitina o el tratamiento a que ha sido sometida, por ejemplo la hidrogenación.

4.3. RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR DE LAS LECITINAS

La presencia de insaturaciones y cadenas laterales en los ácidos grasos que forman parte de la fosfatidilcolina son un inconveniente para la estabilidad de los liposomas: las cadenas laterales hacen menos compacta la vesícula formada, mientras que los dobles enlaces presentan dos inconvenientes: son susceptibles a la oxidación por el oxígeno del aire y además pueden disponerse en conformaciones cis o trans, lo que afecta también a la compactación de la vesícula.

Por ello se determinó por RMN el promedio de insaturaciones por molécula en cada una de las lecitinas en estudio.

Este valor se halló calculando la relación existente entre las áreas integradas para los protones olefínicos respecto a la señal de los protones metílicos del resto de colina, que aparecen como singulete en $\delta \approx 3,4$.

En la figura 13 se muestra el espectro para la lecitina Epikuron 200.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5.

Lecitina	nº insat./molécula
Soja	4.235
Epikuron 200	3.85
Epikuron 170	2.115
Ovothin 170	1.5
Epikuron 200 H	1.23
Merck	0.75
Egg phosphatides type V	Indicios

Tabla 5: Número de insaturaciones por molécula de lecitina, calculado por interpretación de los espectros de RMN.

Basándonos en los estudios que se especifican en los anteriores apartados (4.1, 4.2 y 4.3), se decidió utilizar la lecitina de huevo hidrogenada de la casa comercial Asahi (Egg Phosphatides type V), ya que resultó ser la de mayor pureza de las ensayadas y a la vez la que presentaba menor proporción de insaturaciones (por RMN se detectaron indicios), con lo que se descarta el peligro de oxidación por contacto con el oxígeno del aire.

Por otra parte, su consistencia de polvo fino, de color blanco, facilitaba su manipulación.

Una última ventaja es que su purificación resultó innecesaria, pues por CCF presentó una única mancha tanto antes como después de su columnación.

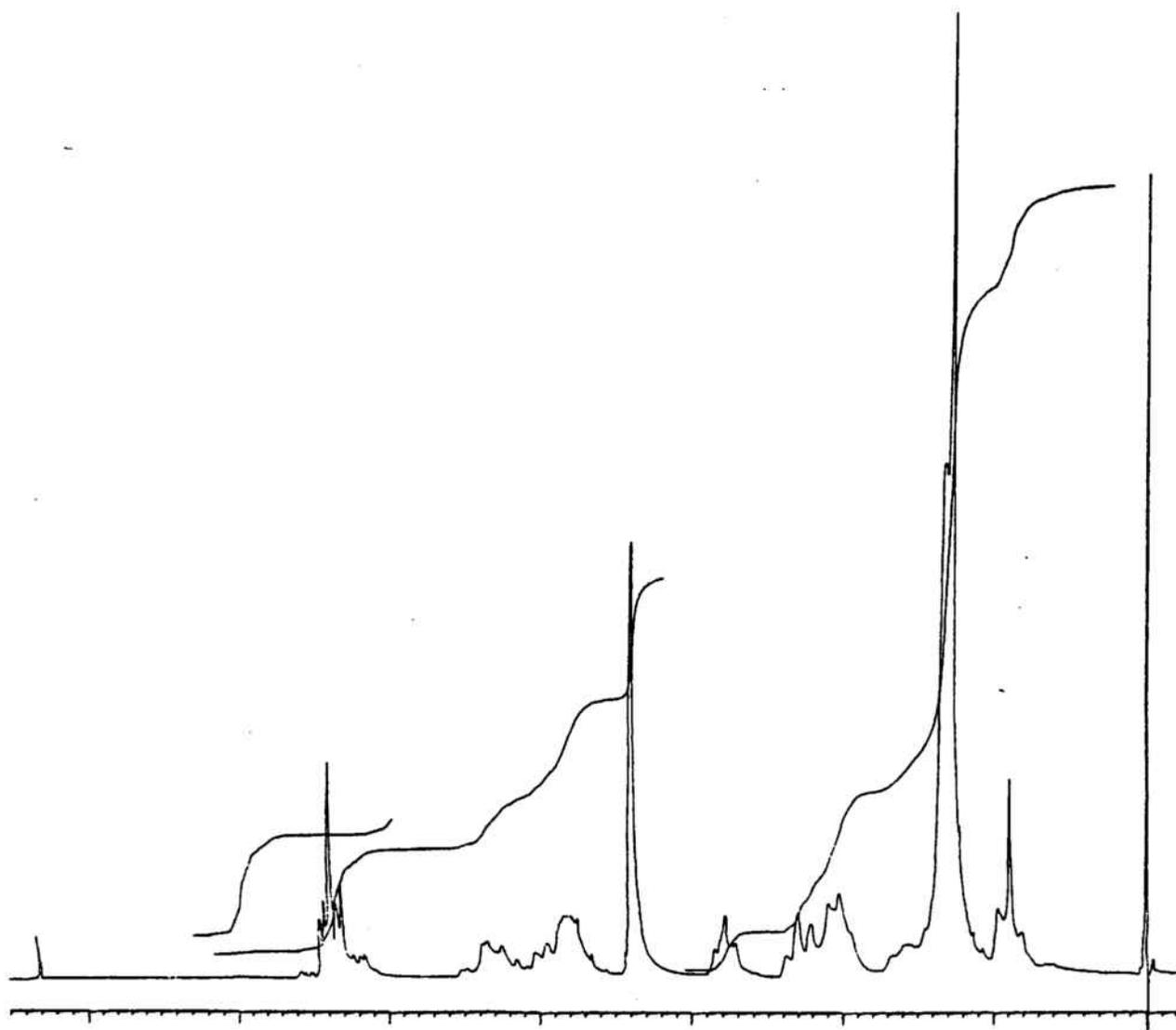


Fig. 13: Espectro de RMN de la lecitina Epikuron 200.

4.4. DETERMINACION DE LA GENTAMICINA POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA

En este trabajo se ha realizado la puesta a punto del método analítico de detección y cuantificación de la gentamicina por HPLC. Para ello se tomaron como base los diversos procedimientos descritos en la bibliografía, modificándolos hasta alcanzar las condiciones óptimas de elución en función de los medios de que se disponía en nuestro laboratorio.

La gentamicina es una mezcla de tres componentes mayoritarios (C_1 , C_{1a} y C_2) y una serie de componentes minoritarios (A, A_1 , B, B_1 , C_{2a} y C_{2b}). Los métodos de detección por HPLC hasta ahora descritos permiten la separación y cuantificación de los tres componentes mayoritarios (75, 77) o bien de estos y C_{2a} (76, 78). Por otra parte, algunos de estos métodos describen una técnica de derivatización post-columna (77), que en nuestro laboratorio resultaba impracticable, por lo que se optó por la derivatización pre-columna con detección de los componentes C_1 , C_{1a} y C_2 .

El ensayo microbiológico oficial (84) tampoco diferencia entre C_2 y C_{2a} , además de resultar menos específico y requerir mayor cantidad de tiempo.

La puesta a punto de un método analítico de detección de la gentamicina que presentase una eficaz separación de los tres componentes mayoritarios (C_1 , C_{1a} y C_2) sin alargar excesivamente el tiempo del cromatograma y que proporcionase a la vez resultados reproducibles presentó una serie de dificultades; entre ellas, la más importante es el hecho de que el compuesto de derivatización de la gentamicina sufre pérdida de intensidad de fluorescencia con el tiempo (72, 73), por lo que una vez

derivatizada la muestra no puede inyectarse dos veces en el cromatógrafo.

Los pasos que se siguieron para la puesta a punto del método de análisis cuantitativo fueron los que se indican a continuación:

4.4.1. Detección al ultravioleta

En una primera fase, se utilizó un detector de ultravioleta para la determinación del complejo de derivatización de la gentamicina, sistema de detección utilizado por Weigand (76). La detección al UV resultó ser mucho menos sensible que la detección por fluorescencia, tal como se pudo comprobar posteriormente, sin embargo es un método más sencillo, por lo que se prefirió poner a punto el método con este tipo de detector para sustituirlo por el fluorímetro en las determinaciones cuantitativas.

En primer lugar se determinó la longitud de onda de máxima absorción de la gentamicina derivatizada realizando un barrido entre 190 y 700 nm, observándose un máximo a 225 nm (fig.14).

La columna utilizada en esta primera parte del análisis fué Spherisorb ODS de 25 μm , con unas dimensiones de 15 x 0.4 cm.

En cuanto a las condiciones de elución, tras estudiar las especificadas en la literatura se optó por el método isocrático descrito por Weigand (76), siendo la composición de la fase móvil metanol/ácido acético glacial 5% (80:20) conteniendo 4.5 g/l de heptanosulfonato; el flujo se fijó en 1.4 ml/min. El volumen de muestra inyectado fué de 25 μl .

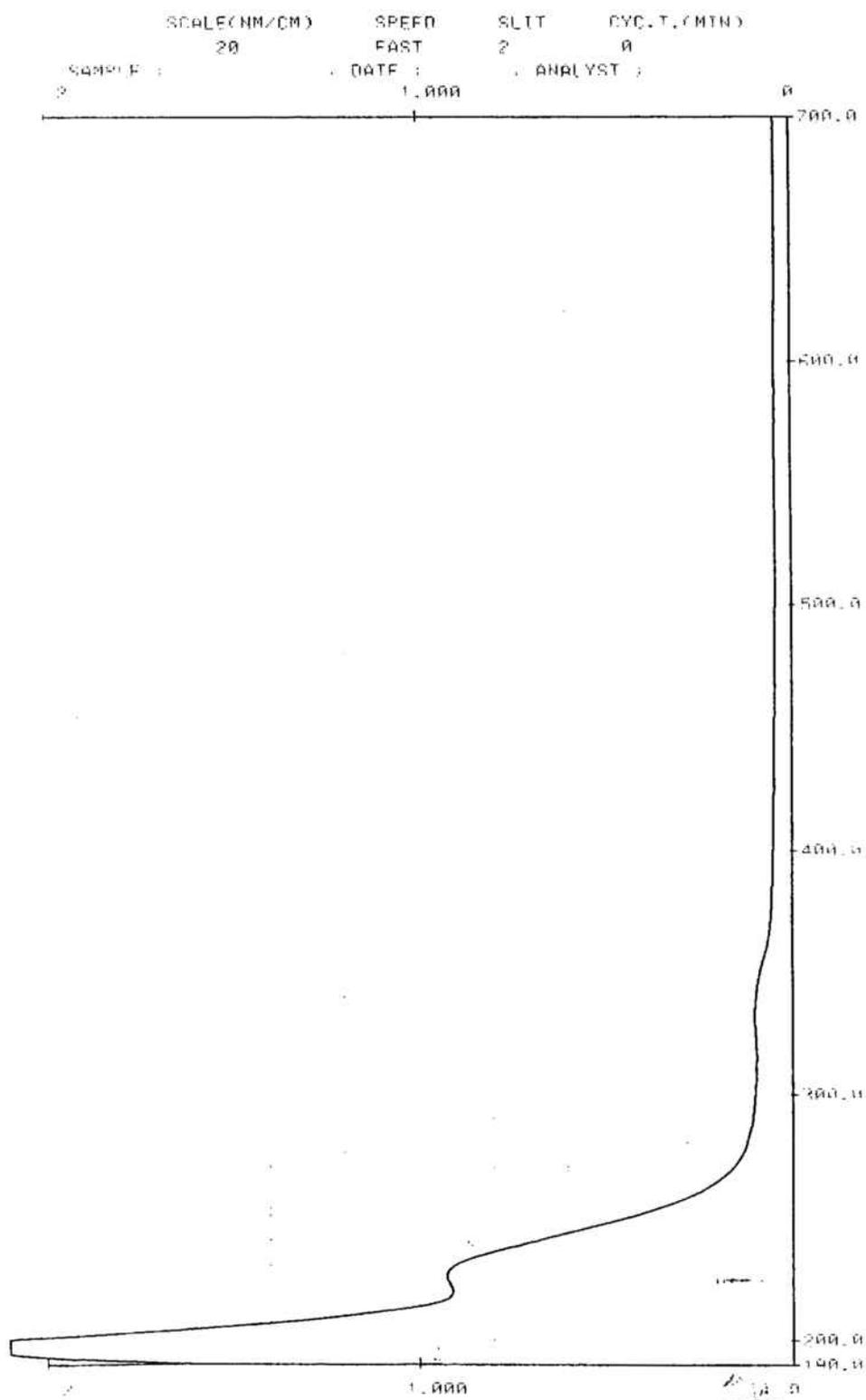


Fig. 14: Espectro de absorción al UV del compuesto de derivatización de la gentamicina

De este modo se separaron los tres componentes mayoritarios de la gentamicina: C_1 , C_{1a} y C_2 ; si bien el último de ellos aparecía con buena resolución, siendo su t_R de 10.88 minutos, los dos restantes presentaron picos cromatográficos menores solapados, probablemente debidos a los isómeros minoritarios de la gentamicina presentes en la muestra (fig. 15).

Con el fin de optimizar el cromatograma, se decidió incrementar la proporción de acético de un 5% a un 10%, manteniendo el resto de condiciones sin modificar. Esto condujo a una disminución de los t_R , tal como se observa en la fig. 16, que pasaron a ser de 2.49, 4.69 y 6.69 minutos para los componentes C_1 , C_{1a} y C_2 respectivamente, lográndose además una mejor resolución de los picos. Sin embargo, surgió un nuevo inconveniente, ya que el pico correspondiente al isómero C_2 presentaba un ligero hombro que podía ser causado por el solapamiento de dos picos correspondientes a dos componentes distintos de la gentamicina.

Para comprobar esta hipótesis se redujo el flujo a 1 ml/min manteniendo la fase móvil como en el caso anterior, con el objetivo de lograr una mejor separación de los distintos componentes al aumentar el tiempo de contacto de la muestra con la fase estacionaria. De este modo, el desdoblamiento del último pico se hizo más patente (fig. 17).

En este punto del análisis se decidió cambiar de columna para descartar la posibilidad de que la deficiente resolución de los picos fuese debida a la existencia de caminos preferentes en la misma. A partir de este momento se utilizó una columna Lichrospher 100 RP-18 de 5 μ m de diámetro de partícula y con unas dimensiones de 124 x 4 mm (Merck).

Otra modificación introducida en este momento radicó en el proceso de desgasado de la fase móvil, que se preparó filtrando los componentes y desgasándolos al vacío por separado para mezclarlos a continuación. Finalmente, y una vez preparada la mezcla, se acabó de desgasar pasando corriente de gas helio. Así se logró controlar la composición de la fase móvil, ya que el desgasado al vacío conlleva la evaporación principalmente del metanol, por ser en este caso el componente más volátil, con lo que se obtenían cromatogramas poco reproducibles.

En estas condiciones, los componentes C_1 y C_{1a} presentaron unos t_R de 3.06 y 6.12 minutos respectivamente; el C_{1a} podía integrarse y cuantificarse, pero no así el C_2 , que continuaba presentando una señal cromatográfica desdoblada (figura 18).

Con el fin de comprobar si esta última señal cromatográfica, aparecida alrededor de los 8 minutos desde el inicio del registro, era en realidad resultado del solapamiento de las señales producidas por dos componentes distintos de la gentamicina, se disminuyó la proporción de metanol en la fase móvil, que quedó constituida por metanol/ácido acético 10% (72:28) conteniendo 5 g/l de heptanosulfonato sódico; el flujo se redujo a 0.8 ml/min. De este modo los t_R aumentaron por dos razones: la disminución de la proporción del componente más apolar de la fase móvil, con lo que el producto resulta más retenido por la fase estacionaria, y por otra parte el mayor tiempo de contacto entre la muestra y las fases móvil y estacionaria producida al disminuir el flujo.

En estas condiciones analíticas se observaron con bastante buena resolución las tres señales cromatográficas correspondientes a los componentes C_1 , C_{1a} y C_2 de la gentamicina, con unos t_R

respectivos de 5.69, 16.36 y 25.72 minutos (fig. 19); las pequeñas señales cromatográficas que se observaron principalmente entre los picos C_1 y C_{1a} se debían probablemente a componentes minoritarios de la gentamicina (85), y en estas condiciones de análisis no se solaparon con los picos correspondientes a los componentes mayoritarios.

A continuación se intentó optimizar el cromatograma con el fin de disminuir el tiempo de análisis excesivamente prolongado (alrededor de 30 minutos), a fin de evitar el ensanchamiento de los picos debido a fenómenos de difusión.

Para la optimización del análisis se pasó a utilizar detector de fluorescencia.

4.4.2. Detección por fluorescencia

Se sustituyó el detector ultravioleta (225 nm) por un fluorímetro (longitudes de onda de excitación y emisión de 340 y 418 nm respectivamente), pudiendo determinarse concentraciones del orden de 10^3 veces inferiores.

Esta elevada sensibilidad de detección que se logró con el uso del fluorímetro presentó como contrapartida problemas de integración de las señales cromatográficas si se mantenía el factor de escala del fluorímetro en el valor 1 y la respuesta en 2 (condiciones basales del aparato), ya que en estas condiciones el ruido de fondo señalado por el integrador oscilaba entre 200 y 300. Como consecuencia los picos eran divididos en dos al ser integrados, o bien resultaban mal integrados por la base (fig. 20)

Para reducir el ruido de fondo, se actuó sobre dos parámetros del fluorímetro: factor de escala y respuesta. Tras ensayar distintas combinaciones de ambos parámetros, y teniendo en cuenta que una

disminución excesiva del factor de escala resultaba contraproducente ya que elevaba la concentración mínima detectable, se seleccionaron como los valores más adecuados 0.6 para el factor de escala y 3 para la respuesta, con lo cual el ruido de fondo obtenido una vez estabilizado el sistema era en todo caso de 2.

En cuanto a la sensibilidad del integrador se comprobó que valores elevados (del orden de 20), que corresponden a una menor sensibilidad en la integración, condicionan una mala integración de las señales cromatográficas, por lo que se decidió aumentar la sensibilidad de detección, que se fijó en 10.

Una vez precisadas las condiciones óptimas de resolución e integración de los picos, se intentó optimizar la técnica analítica reduciendo en lo posible los tiempos de retención, que eran alrededor de 7, 21 y 33 minutos. Con este fin se aumentó la proporción de metanol en la fase móvil, cuya composición pasó a ser la siguiente: metanol/ácido acético 10% (75:25) conteniendo 5 g/l de heptanosulfonato sódico. El flujo se mantuvo en 0.8 ml/min.

De esta manera se redujeron los t_R , que pasaron a ser 4.53, 11.89 y 17.99 minutos pero surgió un pico pequeño adosado al del componente C_{1a} de la gentamicina (t_R 10.86) que en ocasiones era integrado conjuntamente (fig. 21).

Por este motivo se incrementó la proporción de metanol hasta un 77%, con lo que los t_R quedaron alrededor de 3, 8 y 11 minutos (figura 22).

Por último, para evitar posibles variaciones en la composición de la fase móvil por evaporación de alguno de sus componentes (fundamentalmente el metanol, por ser el más volátil), se decidió

utilizar dos bombas, de forma que la mezcla final de eluyentes la realizase el cromatógrafo. También se disminuyó ligeramente la proporción de heptanosulfonato sódico, pues se comprobó que esta pequeña modificación no producía ningún efecto apreciable en el análisis.

Se concretaron unas condiciones analíticas óptimas que fueron las siguientes: la composición de la fase móvil fue de 77% metanol (bomba A) y 23% ácido acético 10% conteniendo en disolución el heptanosulfonato sódico en una proporción de 4.5 gramos por cada litro de mezcla total de eluyente (bomba B).

La fase móvil se preparó como se indica a continuación: el acético al 10% se preparó con agua Milli Q filtrada y desgasada al vacío, y se le añadió el heptanosulfonato sódico, disolviéndolo con ayuda de un baño de ultrasonidos y pasando finalmente corriente de helio; el metanol se desgasó con corriente de helio. De este modo la composición de la fase móvil era siempre la misma, pues se disminuyó el riesgo de evaporación.

El flujo en principio fue de 0.8 ml/min, pero al envejecer la columna se incrementó a 1 ml/min con el fin de mantener los t_R . Se alcanzó una presión de 96 bar.

En el integrador se trabajó con sensibilidad 10 y atenuación 8. Las longitudes de onda de lectura en el fluorímetro se fijaron en 340 nm de excitación y 418 nm de emisión. Las determinaciones se efectuaron con un factor de escala de 0.6, siendo 3 la respuesta del fluorímetro más adecuada.

El volumen de muestra inyectado fue de 25 μ l.

De este modo se obtuvieron cromatogramas en los que los tres componentes mayoritarios de la gentamicina aparecían con una

resolución satisfactoria, siendo posible el análisis cuantitativo. Los tiempos de retención quedaron alrededor de 2, 7 y 10 minutos para C_1 , C_{1a} y C_2 respectivamente, como se muestra en la figura 23.

La cuantificación se realizó siempre sobre el área del pico C_{1a} , ya que permitió obtener resultados más reproducibles y detectar concentraciones menores de producto.

4.4.3. Calibración

El cromatógrafo se calibró una vez por semana, siguiendo el método de estándar externo. Para ello se utilizó una solución de gentamicina en PBS de 3 $\mu\text{g/ml}$. Diariamente se comprobó la validez de la calibración con disoluciones patrón de 10 y 40 $\mu\text{g/ml}$ inyectadas por duplicado. El coeficiente de correlación obtenido para el componente C_{1a} fue de $r=0.99932$, y para el C_2 de $r=0.99877$.

4.4.4. Linealidad

Se realizó un estudio de linealidad en el rango de concentraciones de 0.5 a 50 $\mu\text{g/ml}$, comprobándose el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer. Se obtuvo un coeficiente de correlación de $r=0.99978$.

La ecuación de regresión, cuya representación gráfica se muestra en la figura 24, fué: $\text{Area}=4,18 \cdot 10^{-5} \text{ conc.} - 0,056 \cdot 10^{-5}$.

4.4.5. Concentración mínima detectable

Se ha podido comprobar que concentraciones de gentamicina inferiores a 0.3 $\mu\text{g/ml}$ no son cuantificables de manera fiable por este método analítico.

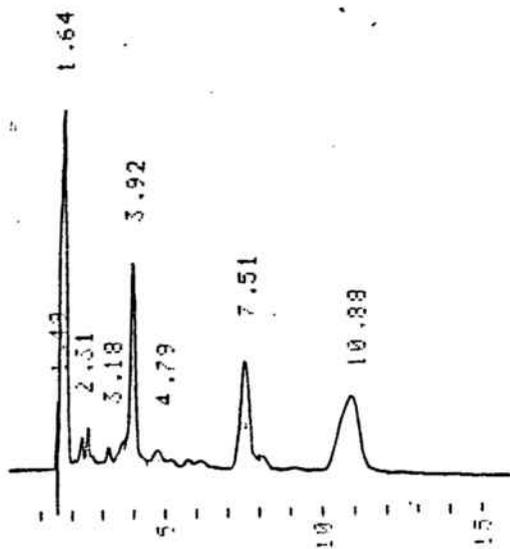


Fig. 15

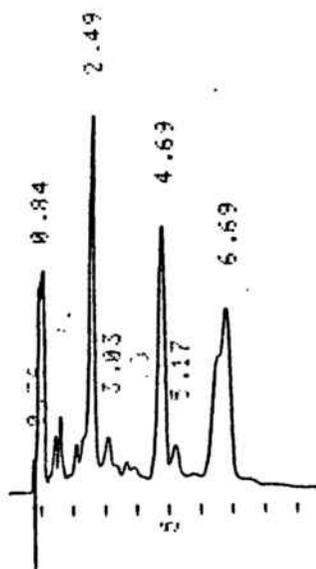


Fig. 16

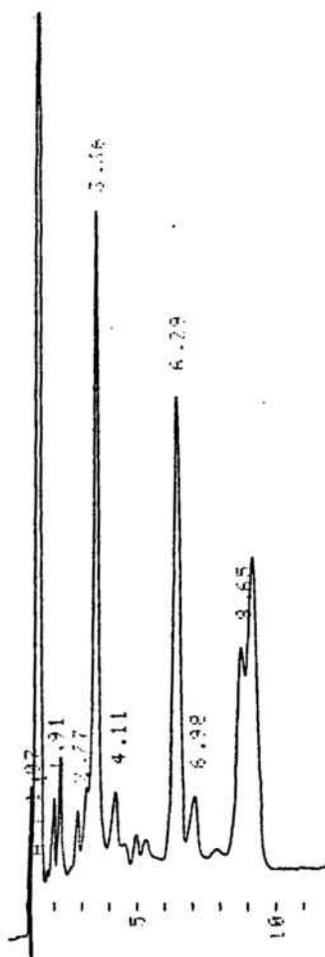


Fig. 17

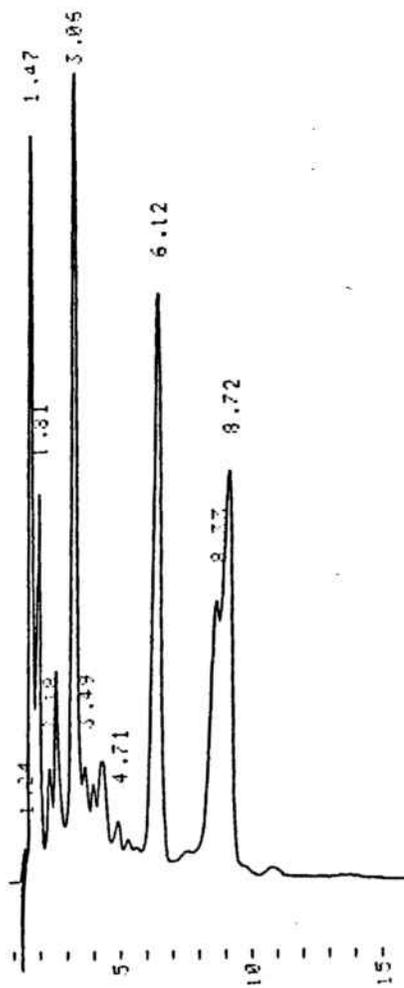


Fig. 18

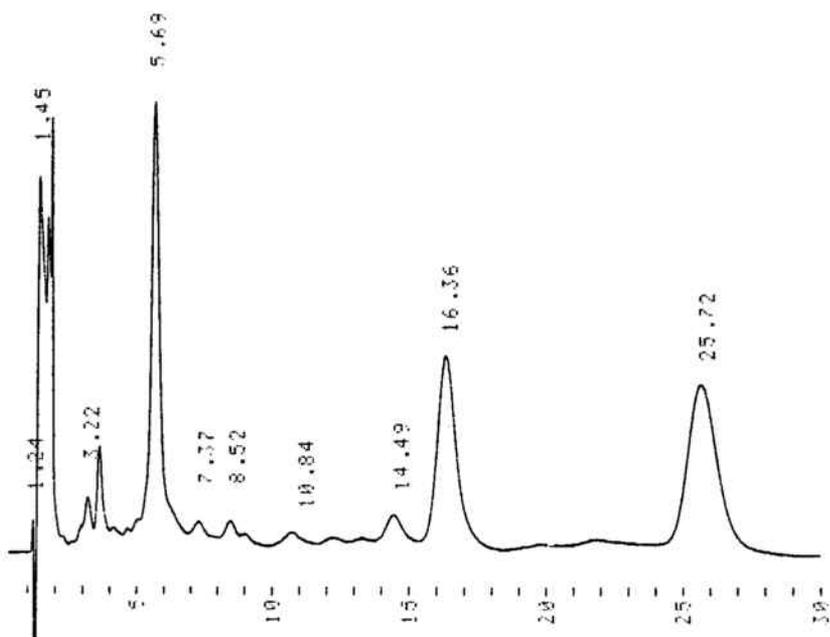


Fig. 19

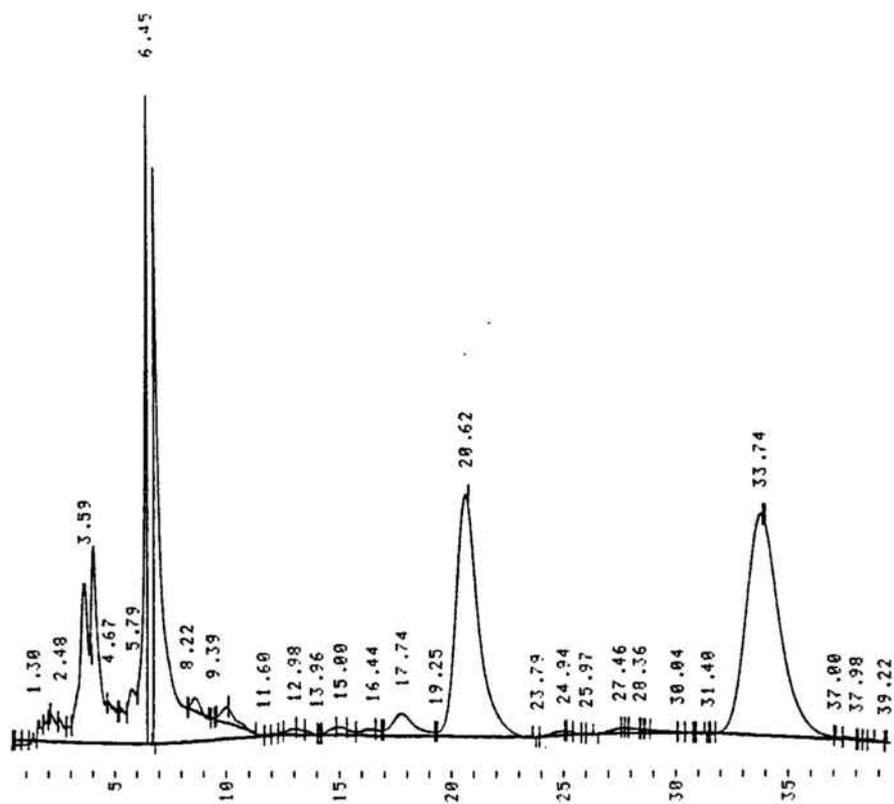


Fig. 20

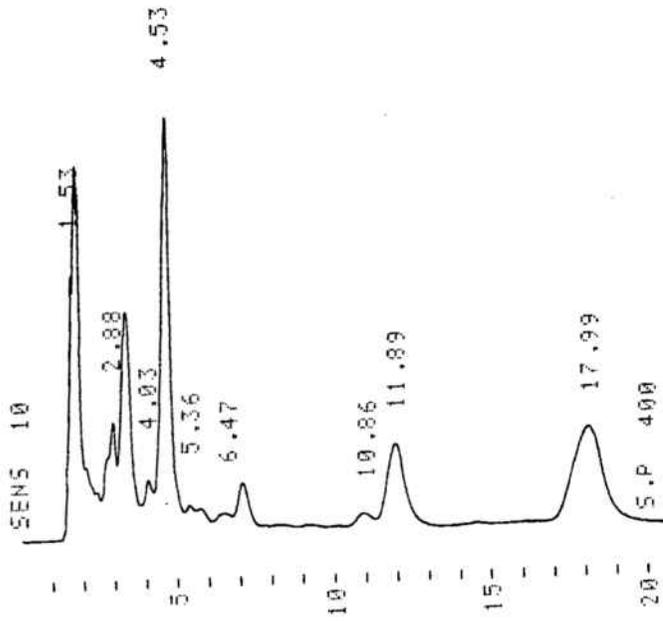


Fig. 21

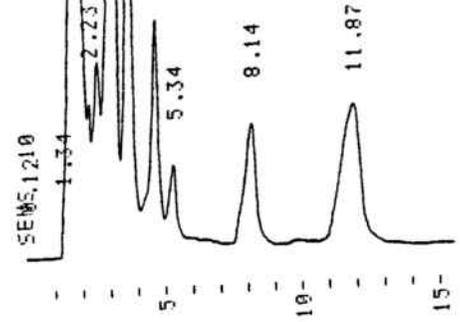


Fig. 22

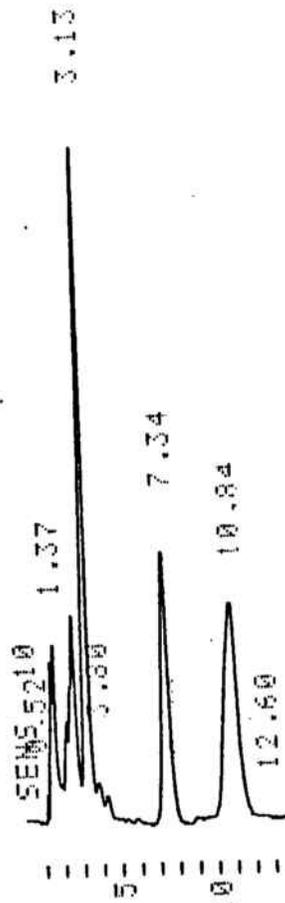


Fig. 23

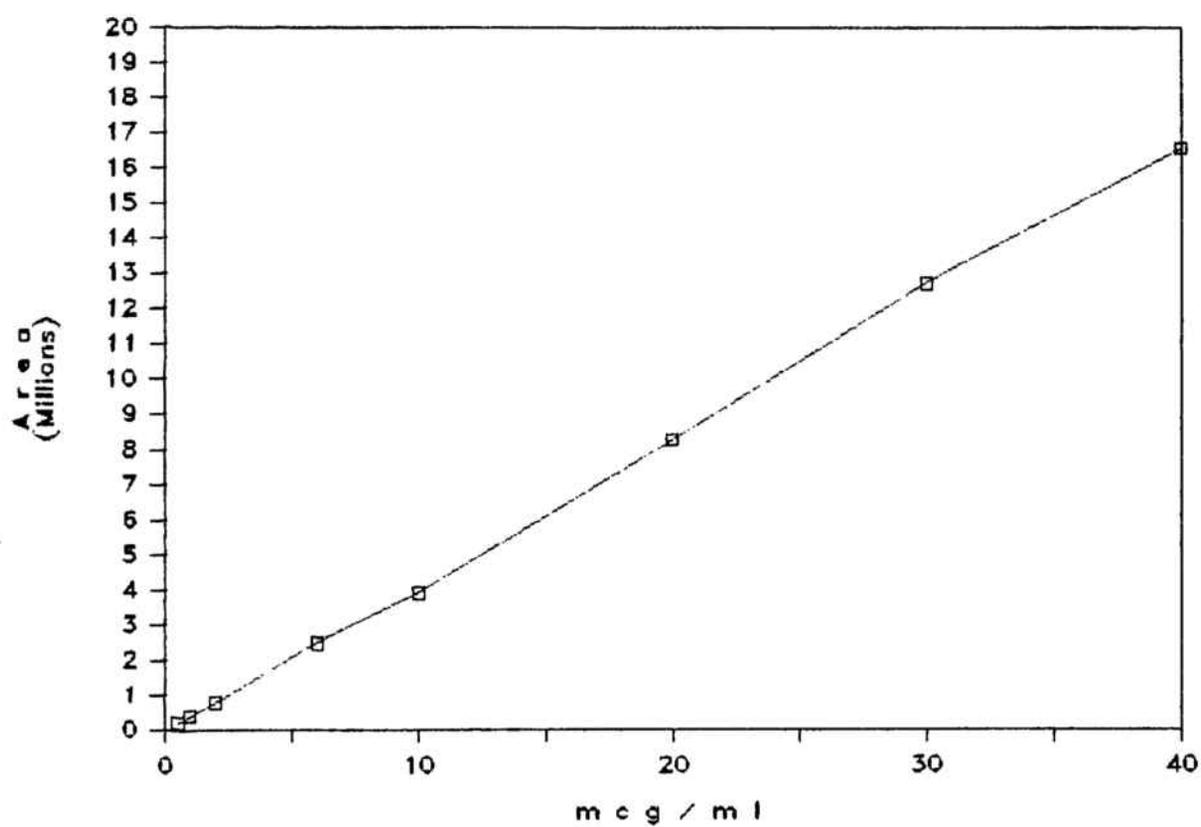


Fig. 24: Recta de regresión lineal de la gentamicina derivatizada

4.5. ENCAPSULACION DE GENTAMICINA EN FUNCION DEL TAMAÑO DE LOS LIPOSOMAS

Se estudió la capacidad de encapsulación de gentamicina en liposomas MLV, SUV y DRV preparados según se indica en el apartado 3.2.3 de Métodos.

La separación del material no encapsulado de los liposomas se realizó por varios procedimientos, según el tipo de liposomas de que se trataba.

4.5.1. DRV Se obtuvieron según se describe en el apartado 3.2.3.3, y tras la rehidratación, la preparación de DRV se dividió en dos partes iguales, en una de las cuales se separó la gentamicina libre por centrifugación y en la otra por diálisis.

Cuando se empleó el proceso de centrifugación, los tres lavados con PBS del precipitado de liposomas, centrifugando a 14000 rpm durante 25 minutos cada vez, son suficientes, ya que al cuantificar por HPLC el contenido en gentamicina del tercer sobrenadante no se obtuvieron en ningún caso valores superiores al 0.5% de la gentamicina empleada inicialmente.

Por otra parte, en el proceso de centrifugación no hay pérdida significativa de liposomas, ya que únicamente se pierde algo más del 6% del total de fosfolípidos, tal como se detalla en el apartado 4.8.

Para la separación de la gentamicina libre por diálisis se llevó a cabo un estudio previo de la cinética de diálisis de la gentamicina. Con esta finalidad, se preparó una disolución de gentamicina en PBS de 0.125 µg/ml, concentración equivalente a la de las preparaciones liposómicas antes de separar el material no encapsulado, y se introdujeron 2 ml en una membrana de diálisis.

Esta preparación se sumergió en un volumen conocido de PBS que se mantuvo homogéneo por agitación magnética.

Se estudió la diálisis frente a 50 ml. de PBS renovado cada 2 horas, y también frente a 2000 ml de PBS sin renovarlo durante todo el proceso de diálisis. En ambos casos, transcurridas 8 horas se recuperó cuidadosamente el contenido del saco de diálisis, lavando repetidamente sus paredes con PBS y enrasando a 10 ml. Tras cuantificar las muestras así obtenidas por HPLC se comprobó que se había dializado un 73% del total de gentamicina en la diálisis efectuada frente a 2000 ml de PBS y un 69% en la efectuada frente a 50 ml cambiados cada 2 horas.

A la vista de estos resultados, se dedujo que ambos tipos de diálisis resultaban de igual efectividad. Sin embargo, la diálisis de la gentamicina resultó ser un proceso excesivamente lento.

Los resultados de encapsulación obtenidos medidos para ambos métodos se esquematizan en la tabla 6.

Centrifugación:

Encapsulación %	Sobren. 1	Sobren. 2	Sobren. 3
64.37 % ± 2.54	43.50 % ± 5.97	0.97 % ± 0.67	0.19 % ± 0.14

Diálisis:

Encapsulación %: 57.41 % ± 2.06

Tabla 6: Encapsulación de gentamicina en DRV llevando a cabo la separación de la gentamicina libre por centrifugación o por diálisis.

Estos resultados permitieron constatar que los liposomas DRV presentan un alto rendimiento de encapsulación de gentamicina. Por otra parte, respecto a la técnica de separación de la gentamicina libre, se decidió utilizar la centrifugación, ya que demostró ser mucho más rápida que la diálisis además de ser muy efectiva, ya que al valorar el contenido en gentamicina del tercer sobrenadante no se obtuvieron valores significativos.

Al obtenerse un menor rendimiento de encapsulación al separar la gentamicina libre por diálisis respecto al obtenido por centrifugación, se pensó que esta molécula podría tener afinidad por las paredes de la membrana de diálisis. Para descartar esta posibilidad, una vez finalizado el proceso de diálisis y recuperado el contenido del saco, se lavó repetidamente el mismo con metanol y se cuantificó por HPLC el contenido en gentamicina de las soluciones de lavado, sin que se detectase gentamicina; por ello, el menor valor de encapsulación obtenido podría deberse a ligeras pérdidas de producto que tuvieran lugar al recuperar el contenido del interior de la membrana de diálisis o bien a la pérdida de producto encapsulado durante el tiempo de tratamiento.

4.5.2. MLV Para su preparación se siguió el proceso descrito en el apartado 3.2.3.1, y la gentamicina libre se separó de los liposomas por centrifugación (en las mismas condiciones que DRV). El precipitado de liposomas así como los tres sobrenadantes obtenidos se enrasaron a 10 ml con PBS.

Los resultados obtenidos tras cuantificación por HPLC de la gentamicina presente en los tres sobrenadantes y la encapsulada en los liposomas se esquematizan en la tabla 7.

Encapsulación %	Sobren. 1	Sobren. 2	Sobren. 3
7.248% ± 1.002	85.87% ± 4.67	3.942% ± 1.06	0.195% ± 0.14

Tabla 7: Encapsulación de gentamicina en liposomas MLV.

4.5.3. SUV Trabajando en las condiciones descritas en el apartado 3.2.3.2. se obtuvieron liposomas unilaminares pequeños. Dado que debido a su tamaño no precipitan por centrifugación en las condiciones descritas para MLV y DRV, se realizó la separación de la gentamicina libre por diálisis según el procedimiento descrito para los DRV.

De modo paralelo, se estudió también la separación por exclusión molecular según la técnica denominada "basket centrifugation", que se describe en el capítulo de Métodos (3.2.3.2).

Como no se conocía de antemano la capacidad de separación de estas columnas, se prepararon tres jeringas con Sephadex G-25 en las que se depositó respectivamente 1000 µl, 500 µl y 100 µl de una preparación de SUV. Una vez centrifugadas, las fracciones eluidas se enrasaron en todos los casos a 2 ml con PBS y se cuantificó por HPLC el contenido en gentamicina una vez rotos los liposomas para liberar el material encapsulado.

Se obtuvieron valores de encapsulación prácticamente iguales tanto si se depositaban 1000 µl como si se depositaban 500 µl, mientras que si el volumen de muestra depositado era de 100 µl, la cantidad de gentamicina en la fracción eluida resultó ser inferior al límite detectable por esta técnica analítica. Por ello, en posteriores experimentos se depositó siempre un volumen de 1000 µl de preparación liposómica.

Los resultados se resumen en la tabla 8.

	Encapsulación %
Diálisis	4.33% ± 0.47
"Basket Centrifugation"	0.884% ± 0.104

Tabla 8: Encapsulación de gentamicina en liposomas SUV.

Se puede observar que por diálisis se obtiene un porcentaje de encapsulación mucho más elevado que por "basket centrifugation". Probablemente la razón de esta diferencia sea que si bien esta última técnica de separación es adecuada para un análisis cualitativo, no resulta muy fiable en un análisis cuantitativo a menos que se realice un estudio detallado de las condiciones óptimas en cada caso; concretamente en nuestro ensayo, el que diese un valor de encapsulación tan bajo en relación con el obtenido por diálisis puede ser debido a que la centrifugación ha sido insuficiente para eluir la totalidad de los SUV de la columna. Podría pensarse solucionar este inconveniente añadiendo más fase móvil a la columna y volviendo a centrifugar, sin embargo esto conllevaría una excesiva dilución de la fracción eluida, dificultando su detección por HPLC.

En todos los casos, las preparaciones se realizaron por triplicado, y cada una de ellas se sometió al menos a dos procesos de derivatización independientes. En la figura 25 se representan gráficamente los rendimientos de encapsulación de gentamicina en liposomas DRV, MLV y SUV.

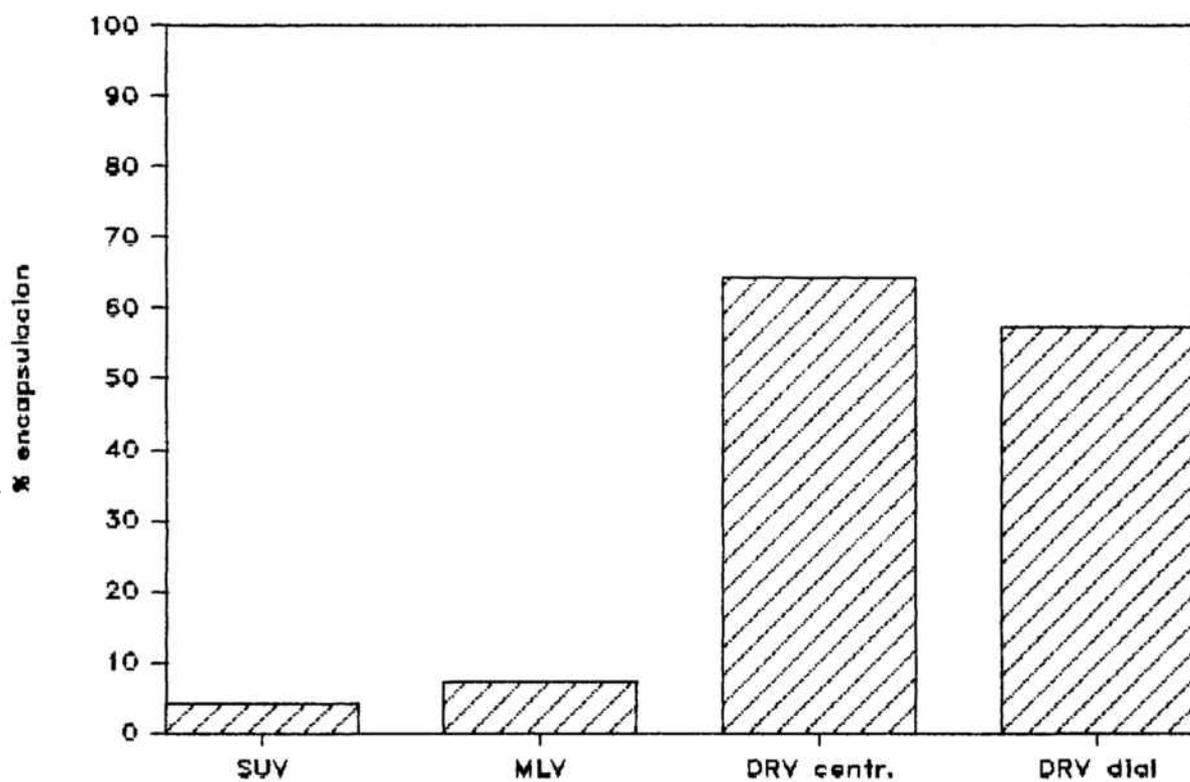


Fig. 25: Encapsulación de gentamicina en función del tamaño de los liposomas.

Se cuantificó la gentamicina encapsulada previa rotura de los liposomas, así como la gentamicina libre presente en los sobrenadantes procedentes de la centrifugación.

De la observación de los resultados expuestos en los apartados anteriores, se deduce que los liposomas que presentan un mayor rendimiento de encapsulación de gentamicina son los DRV (tal como era previsible por los datos existentes en la bibliografía, ya que estos liposomas presentan mayor volumen interno que los MLV y los SUV a la vez que tienen mayor estabilidad.

En los MLV se obtienen rendimientos de encapsulación bajos, pero superiores a los observados en SUV, por lo que se puede afirmar que estos dos tipos de liposomas no son adecuados para encapsular gentamicina.

4.6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA EFICACIA DE ENCAPSULACION DE MLV

Los distintos lotes de MLV preparados hasta ahora, cuya capacidad de encapsulación se especifica en el apartado anterior, corresponden a liposomas en que el proceso de encapsulación de la gentamicina tuvo lugar a temperatura ambiente (20°C).

Dado que la lecitina empleada estaba hidrogenada y su Tc era por tanto superior a la de la lecitina normal, podría ocurrir que los bajos rendimientos de encapsulación obtenidos se debieran, al menos en parte, a no estar trabajando por encima de la Tc. Por ello, para determinar la influencia de la temperatura en la capacidad de encapsulación en este tipo de liposomas, se prepararon MLV tal como se indica en el apartado 3.2.3.1 del capítulo de Métodos con la diferencia de que el matraz que

contenía la película de lípido seco se mantuvo en un baño a la temperatura elegida y se le añadió la disolución de gentamicina en PBS atemperada a la misma temperatura del baño.

Se estudió el porcentaje de encapsulación a 30°C y a 45°C, dejando los liposomas en reposo 4 horas antes de proceder a separar el material no encapsulado por centrifugación.

Los resultados se indican en la tabla 9, y se representan gráficamente en la figura 26.

Temperatura	Encapsulación %	Sobren. 1	Sobren. 2
30°C	2.73%±0.36	92.7%±3.2	5.0%±1.0
45°C	2.89%±0.07	95.3%±1.6	4.44%±0.82
20°C	7.25%±1.0	85.9%±4.67	3.9%±1.1

Tabla 9: Encapsulación de gentamicina en MLV según la temperatura.

Estos resultados indican que la mayor capacidad de encapsulación de gentamicina corresponde a los MLV preparados a temperatura ambiente (20°C), mientras que a temperaturas superiores la capacidad de encapsulación disminuye, no siendo por tanto la temperatura la causa del bajo porcentaje de encapsulación observado.

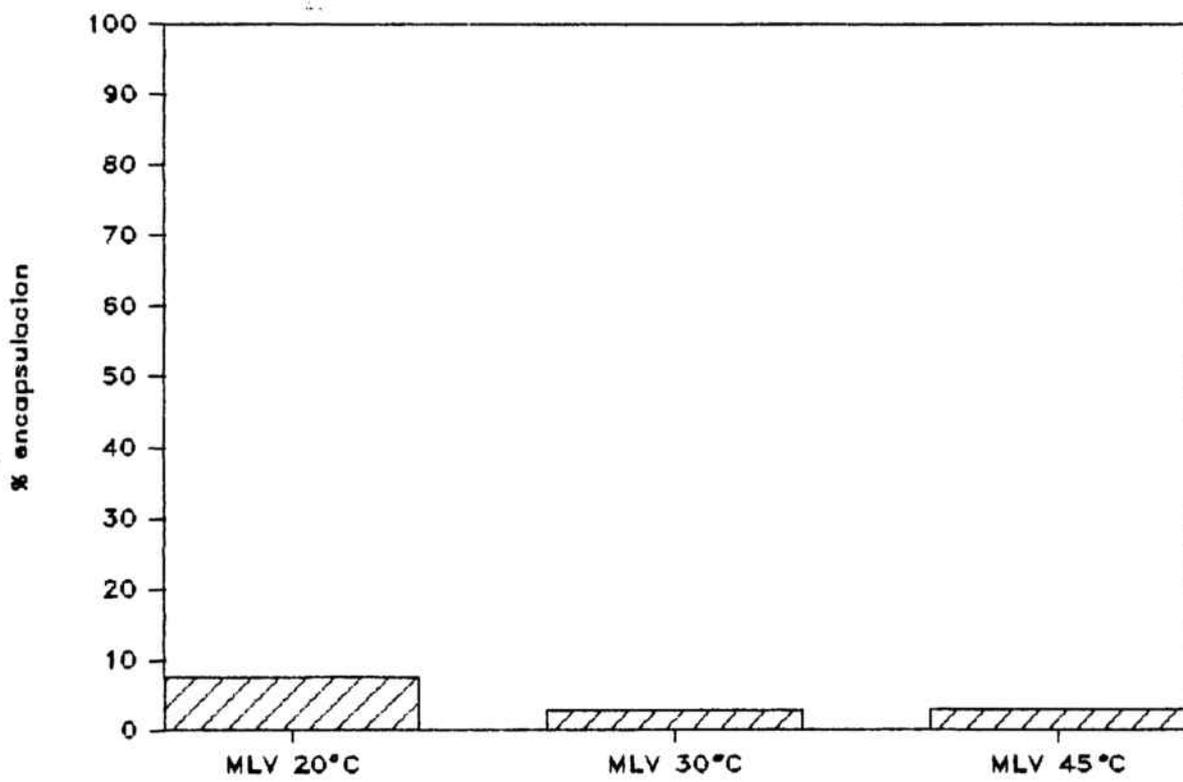


Fig. 26: Influencia de la temperatura en el rendimiento de encapsulación de gentamicina en liposomas MLV.

4.7. ENCAPSULACION DE GENTAMICINA EN FUNCION DE LA COMPOSICION LIPIDICA DE LOS LIPOSOMAS

Existen en la bibliografía sobre liposomas casos muy claros en que la composición lipídica influye extraordinariamente en el rendimiento de encapsulación y en la estabilidad de los liposomas (5, 6, 50). Es por ello que en el presente trabajo se estudió la influencia del colesterol y de fosfolípidos catiónicos o aniónicos en la capacidad de encapsulación de DRV.

Cada preparación de DRV se dividió en dos partes, en una de las cuales se separó el material no encapsulado por centrifugación y en la otra por diálisis con PBS.

Para analizar la influencia del colesterol se prepararon liposomas constituidos únicamente por fosfatidilcolina, liposomas PC/COL en relación molar (2:1) y se comparó su capacidad de encapsulación con la de los liposomas con relación PC/COL (1:1).

En cuanto a los liposomas con carga, los aniónicos se prepararon con un 10% de fosfatidilserina y los catiónicos con un 10% de estearilamina, siendo la relación molar PC/COL/PS ó SA (1:1:0.2).

Los experimentos se realizaron por triplicado, y los resultados obtenidos mediante análisis por HPLC se indican en la tabla 10.

Composición liposomas	Centrifugación	Diálisis
PC	0.531% ± 0.06	1.056% ± 0.136
PC/COL (2:1)	17.58% ± 0.89	16.79% ± 0.53
PC/COL (1:1)	64.38% ± 2.54	57.41% ± 2.06
PC/COL/PS (1:1:0.2)	47.04% ± 0.42	42.68% ± 1.36
PC/COL/SA (1:1:0.2)	62.26% ± 8.16	61.38% ± 0.58

Tabla 10 Encapsulación de gentamicina en función de la composición lipídica de los liposomas.

Estos resultados muestran de forma evidente la importancia de la composición lipídica de los liposomas en su capacidad de encapsulación.

El colesterol posee un papel estabilizador de la estructura del liposoma, reduciendo considerablemente la permeabilidad de las bicapas lipídicas que son fluidas en ausencia de colesterol (3). Esto podría explicar porqué los DRV compuestos únicamente por fosfatidilcolina presentaron un rendimiento de encapsulación prácticamente nulo, mientras que los DRV que contienen colesterol en igual proporción molar que fosfatidilcolina presentaron una elevada capacidad de encapsulación de gentamicina, muy superior a la correspondiente a los DRV con relación molar PC/COL (2:1) (figura 27). Estos resultados están en concordancia con los observados por Kirby y Gregoriadis para la encapsulación de carboxifluoresceína (91).

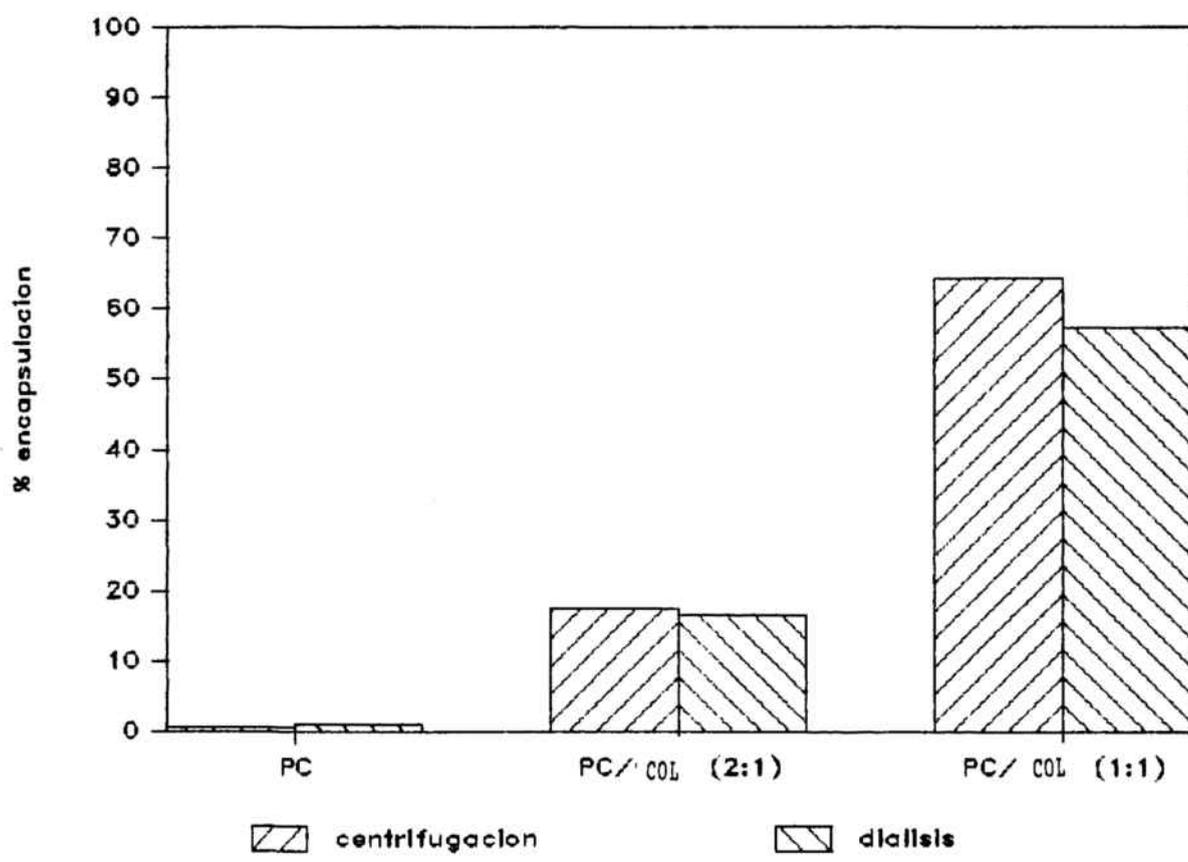


Fig. 27: Influencia del colesterol en el rendimiento de encapsulación de gentamicina en liposomas DRV.

Por otra parte, los malos resultados obtenidos con DRV compuestos exclusivamente por PC podrían ser debidos también al carácter saturado de la utilizada en estos ensayos, así como a las elevadas Tc asociadas a este tipo de fosfolípidos; no obstante, el estudio de encapsulación realizado con MLV a diferentes temperaturas (apartado 4.6) permite descartar esta idea.

Los liposomas en cuya composición lipídica intervienen fosfolípidos catiónicos, en este caso estearilamina, presentaron una elevada capacidad de encapsulación de gentamicina, próxima a la de los DRV PC/COL (1:1), mientras que los DRV con carga negativa debida a la presencia de fosfatidilserina en su composición, tienen un rendimiento de encapsulación menor; estos resultados son opuestos a los esperados teóricamente, dado el carácter catiónico de la gentamicina (figura 28).

En cualquier caso, puede afirmarse que es mucho más importante el efecto del colesterol que el de los fosfolípidos con carga en cuanto a porcentaje de encapsulación se refiere.

4.8. DETERMINACION DE LA PERDIDA DE LIPOSOMAS EN LA CENTRIFUGACION

En este trabajo se determinó si durante el proceso de la centrifugación empleado para separar la gentamicina libre de la encapsulada en liposomas, y que consistía en tres centrifugaciones de 25 minutos cada una a 15000 rpm, se perdían liposomas. Para ello, se valoró el contenido en fosfatidilcolina de los sobrenadantes procedentes de la centrifugación de una preparación de DRV (obtenidos como se detalla en el apartado 3.2.3.3) siguiendo el método de Barlett de análisis de fosfatos (79).

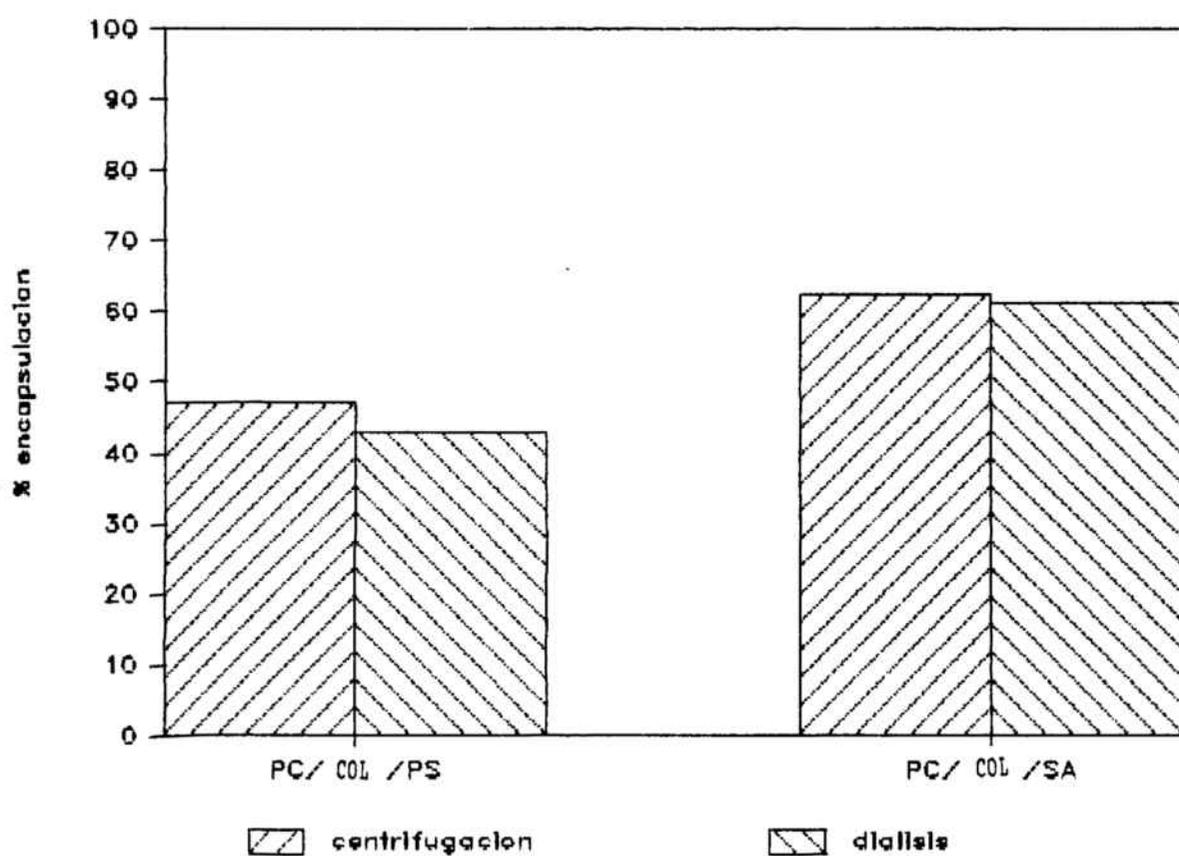


Fig. 28: Encapsulación de gentamicina en liposomas DRV con fosfolípidos aniónicos o catiónicos en su composición.

El sobrenadante procedente de la primera centrifugación de los liposomas se enrasó con PBS a 10 ml; de esta solución se extrajo el lípido agitando 1 ml de la fase acuosa liposómica con 1 ml de cloroformo y centrifugando para favorecer la separación de las dos fases. A continuación se tomó una alícuota (0.5 ml) de la fase orgánica y se evaporó a sequedad; se carbonizó con 0.5 ml de ácido perclórico y se derivatizó añadiendo 9.5 ml del reactivo de análisis de fósforo, obtenido como se indica en el apartado 3.2.4 del capítulo de Métodos. La muestra se tapó y se homogeneizó, calentándola a 50°C durante 1 hora, y seguidamente se leyó su absorbancia a 825 nm, obteniéndose un valor de 0.074.

Extrapolando este valor en la recta obtenida valorando una solución estándar de fosfato (apartado 3.2.4), se pudo calcular la concentración de fósforo presente en el sobrenadante, que fué de 25.6 µg P/ml; a partir de este dato, y sabiendo que el peso molecular de la lecitina empleada era de 956 g/mol, se dedujo que en el primer sobrenadante de la centrifugación se perdía un 6.32% de lecitina, lo que permitió afirmar que no se produce pérdida significativa de fosfolípidos en forma de liposomas durante este proceso.

4.9. OBSERVACION DE UNA PREPARACION LIPOSOMICA POR MICROSCOPIA ELECTRONICA

Se observó al microscópio electrónico una preparación de liposomas DRV obtenidos como se especifica en el apartado 3.2.3.2. conteniendo gentamicina. Se siguió el método de tinción negativa, y la muestra se observó a 62500 aumentos.

Posteriormente se calculó el tamaño de las vesículas observadas, que resultó ser de 0.15 a 0.22 µm (figura 29).

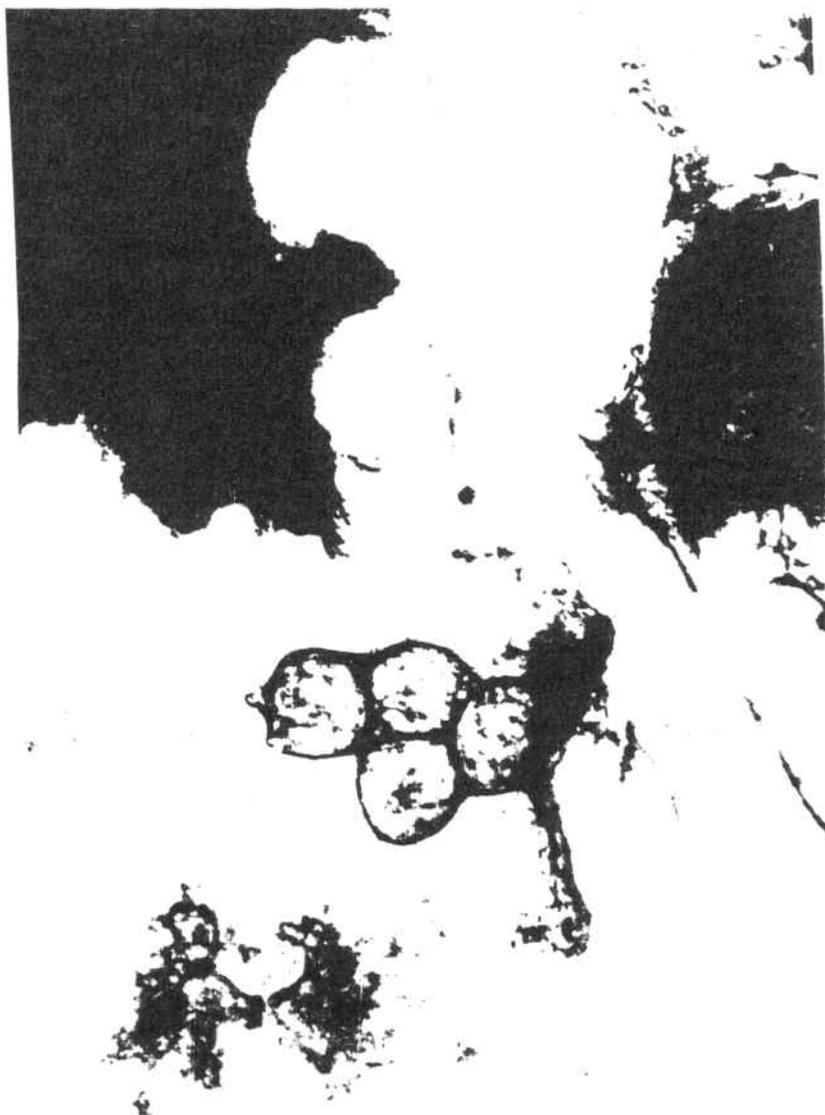


Fig. 29: Observación al microscópio electrónico de una preparación de liposomas DRV.

4.10. ESTABILIDAD DE LOS LIPOSOMAS DRV FRENTE A SOLUCIONES TAMPON DE PBS DE DIFERENTE FUERZA IONICA

El uso de los liposomas como transportadores de fármacos exige que estos sean estables a largo plazo, a fin de que puedan almacenarse en forma de dispersión acuosa. Cuando se produce la desestabilización de los liposomas, el fármaco encapsulado tiene tendencia a salir de la estructura de la bicapa, y además los liposomas pueden agregarse o fusionarse durante el almacenamiento, perdiendo en estos procesos parte de las moléculas encapsuladas. Estos procesos pueden ocasionar cambios en el perfil farmacocinético de la molécula activa, disminuyendo la reproductibilidad y efectividad del proceso terapéutico.

Uno de los métodos para poner de manifiesto la destrucción parcial o total de las bicapas que forman la estructura del liposoma es la determinación en el medio exterior de productos previamente encapsulados (50, 88). Esto permite tener un control sobre los procesos de lisis que conlleva un determinado tratamiento.

En este trabajo se determinó la estabilidad a lo largo del tiempo de suspensiones de DRV conteniendo gentamicina encapsulada, en tres disoluciones: PBS preparado como se especifica en el capítulo de Materiales, y diluciones 1:2 y 1:4 del mismo, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.2.6.

Los resultados aparecen en la tabla 11.

	% pérdida gentamicina			
	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana
PBS	21.18%±1.60	24.35%±0.80	24.92%±0.21	27.28%±1.19
PBS (1:2)	50.98%±1.62	50.15%±0.14	50.83%±0.11	49.22%±0.22
PBS (1:4)	51.98%±1.93	57.99%±0.94	55.20%±2.79	52.81%±1.29

Tabla 11: Pérdida de gentamicina encapsulada en liposomas DRV mantenidos en condiciones isoosmóticas ó hipoosmóticas.

A la vista de estos resultados, se pudo afirmar que los liposomas DRV eran muy sensibles frente a gradientes osmóticos, siendo los suspendidos en tampones hipoosmóticos más permeables a la gentamicina que los suspendidos en PBS estándar (figura 30).

Por otra parte, se observó que durante la primera semana se producía una importante pérdida de gentamicina, mientras que a lo largo de las tres semanas siguientes el proceso apenas avanzaba. Probablemente esto sea debido a que la difusión de las moléculas de gentamicina a través de las bicapas lipídicas tiende a un equilibrio cuando las concentraciones dentro y fuera de los liposomas se aproximan.

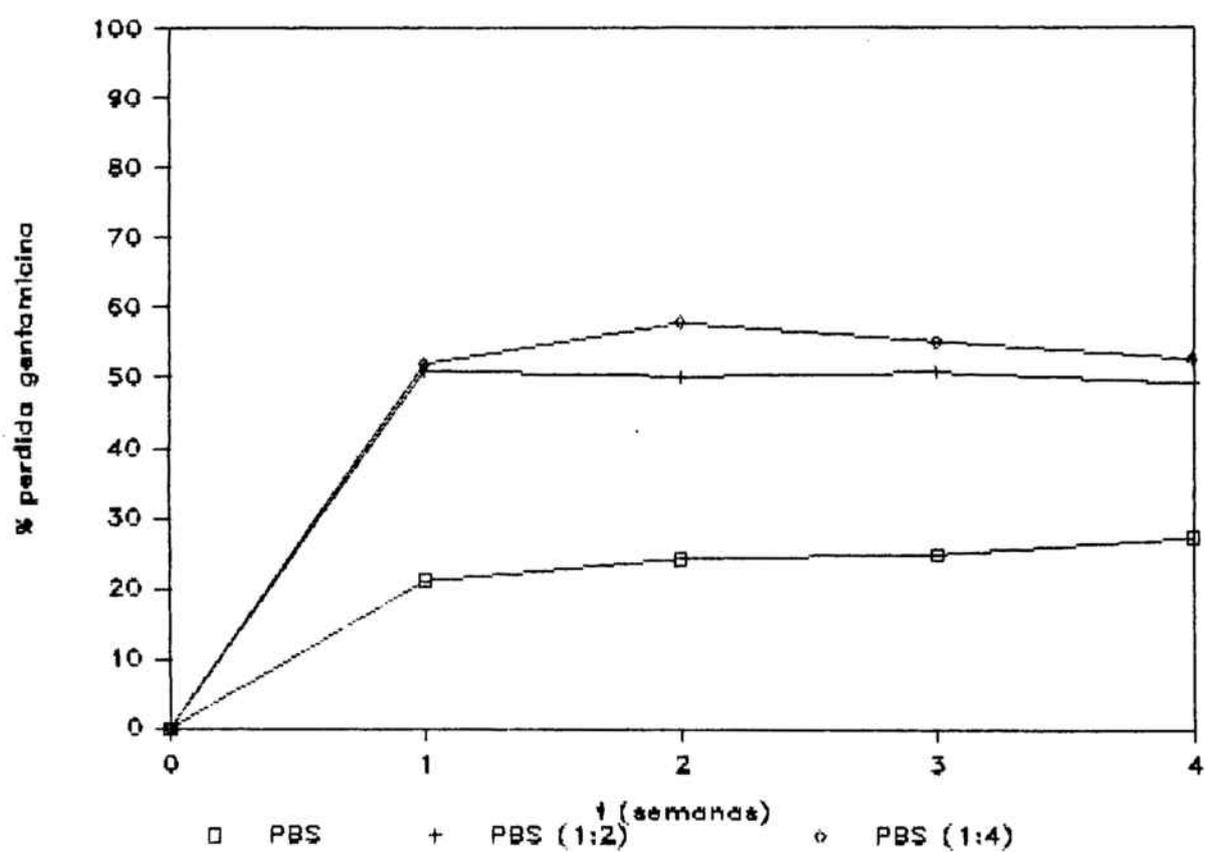


Fig. 30: Estabilidad de liposomas DRV frente a soluciones tampón de PBS de diferente fuerza iónica.

4.11. ESTABILIDAD DE LOS LIPOSOMAS DURANTE SU INCUBACION CON SANGRE

Está descrita en la bibliografía la existencia de gran número de factores que afectan la estructura y actividad de los liposomas en sangre; así, la activación del complemento puede conducir a su destrucción (89), las HDL (High-density lipoproteins) (90), la albúmina sérica, α y β -globulinas (89), anticuerpos antifosfolípido (91) producidos de modo natural por el organismo, pueden interaccionar con los liposomas afectando considerablemente su estabilidad.

La estabilidad puede mejorarse actuando en la composición lipídica de los liposomas, ya sea incrementando la proporción de colesterol hasta alcanzar un óptimo de estabilidad, introduciendo esfingomielina (forma puentes intermoleculares con otros fosfolípidos)(92) o gangliósidos.

En el presente trabajo se ha realizado un estudio preliminar de la estabilidad en presencia de sangre mantenida a 37°C de liposomas DRV conteniendo gentamicina encapsulada. Para ello se procedió como se indica en el apartado 3.2.7.

Los resultados se indican en la tabla 12.

t (minutos)	% pérdida gentamicina
0	1.379% ± 0.237
15	3.796% ± 0.317
30	4.349% ± 0.209
60	4.406% ± 0.104
90	4.989% ± 0.342
120	6.209% ± 0.856

Tabla 12: Estabilidad de liposomas DRV en sangre en función de la pérdida de gentamicina encapsulada.

Estos resultados han permitido constatar una progresiva liberación del producto encapsulado en los liposomas al incubarlos con sangre (figura 31); sin embargo, al cabo de 120 minutos de incubación únicamente se ha liberado alrededor del 6% del total encapsulado. Otros estudios descritos en la bibliografía sobre liberación de sustancias encapsuladas en liposomas muestran una menor estabilidad de los mismos, por ejemplo en el estudio realizado por Zborowski (1977) (93) con sacarosa se libera alrededor del 80% a los 120 minutos de incubación. Esto podría ser debido a muchos factores, como el método de obtención de los liposomas, su composición lipídica, así como el hecho de que en el estudio de estabilidad realizado con gentamicina, la sangre debía someterse a un tratamiento que incluye varias centrifugaciones y un tratamiento de desproteínización, con lo que podría tener lugar una pérdida sistemática de gentamicina, ya sea por precipitación con los glóbulos rojos o con las proteínas plasmáticas, mientras que en otros estudios descritos en la bibliografía las moléculas

encapsuladas van marcadas radiactivamente, con lo que su detección es directa.

Sin embargo, es posible que se produzca un intercambio entre el colesterol de los liposomas y el endógeno que forma parte de los eritrocitos, linfocitos, linfomas y fibroblastos (94), lo que mantendría los liposomas estables durante más tiempo, ya que el colesterol disminuye la permeabilidad de los liposomas y los hace más estables.

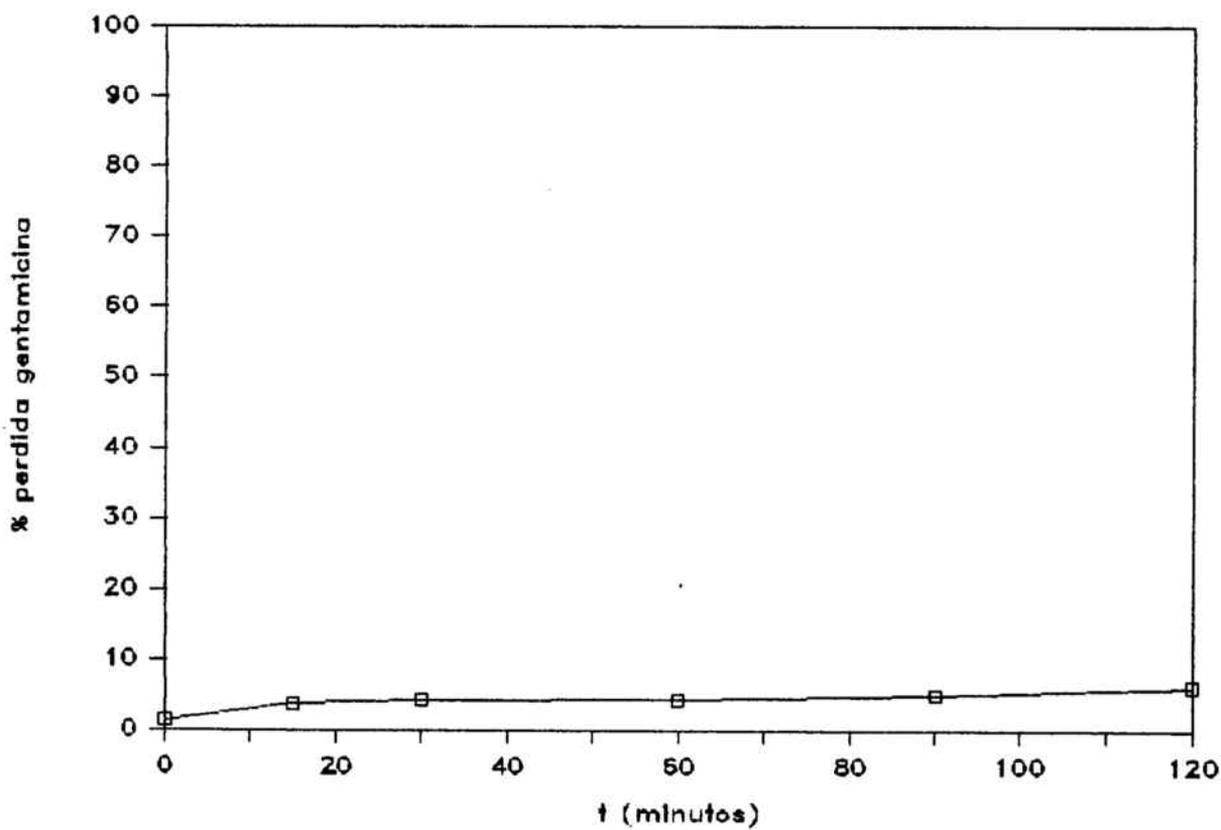


Fig. 31: Estabilidad en sangre de los liposomas DRV conteniendo gentamicina encapsulada.

5. CONCLUSIONES

1.- Por cromatografía líquida de alta eficacia se ha puesto a punto con buena resolución el análisis cuantitativo de los tres componentes mayoritarios de la gentamicina, siendo el orden de elución C_1 , C_{1a} y C_2 ; sin embargo, dado que el primero de ellos queda algo enmascarado por la base a causa del exceso de reactivo de derivatización, que aparece en la misma zona del cromatograma, la integración se ha llevado a cabo para los dos restantes. No obstante, al realizar estudios cuantitativos de encapsulación de gentamicina, se tomó el componente C_{1a} , ya que se obtenían resultados más reproducibles y presentaba un límite de detección menor.

2.- El estudio realizado con siete tipos distintos de lecitinas existentes en el mercado ha permitido establecer el siguiente orden, en función de la riqueza en fosfatidilcolina: Egg Phosphatides type V (Asahi) > Epikuron 200H > Epikuron 200 > Merck > Ovothin 170 > Epikuron 170 > Lecitina de soja; asimismo, los espectros de RMN realizados de cada una de ellas han indicado que la lecitina más saturada es al mismo tiempo la que en el estudio de pureza dio mejores resultados; por todo ello, se decidió utilizar esta lecitina en la elaboración de liposomas.

3.- Se ha llevado a cabo un estudio comparativo de la eficacia de encapsulación de gentamicina en liposomas obtenidos por diversos métodos. Los resultados indican que, a igualdad de composición lipídica, los liposomas obtenidos por deshidratación-rehidratación (DRV) son mucho más eficaces que los multilaminares grandes (MLV) y los unilaminares pequeños (SUV), siendo los porcentajes de encapsulación de alrededor de 64%, 7% y 4% respectivamente.

4.- En cuanto al método de separación de la gentamicina no encapsulada, se ha comprobado que en los casos en que se pueden centrifugar los liposomas, este método es preferible a la diálisis. En el caso de los liposomas pequeños (SUV), no sedimentables por centrifugación, la diálisis es mejor que la cromatografía de exclusión molecular (método de "basket centrifugation").

5.- Se ha comprobado que la incorporación de cantidades crecientes de colesterol en la composición lipídica de los liposomas DRV tiene un efecto positivo en la eficacia de encapsulación de gentamicina por dichos liposomas.

El orden obtenido, de mayor a menor porcentaje de encapsulación, es: PC/COL (1:1) > PC/COL (2:1) > PC.

6.- La incorporación de fosfolípidos catiónicos o aniónicos a los liposomas ha tenido un efecto contrario al esperado dado el carácter catiónico de la gentamicina, ya que los liposomas con un 10% de estearilamina en su composición presentaron un alto rendimiento de encapsulación, próximo al obtenido para los liposomas PC/COL (1:1), mientras que en los liposomas en cuya composición lipídica se incorporó un 10% de fosfatidilserina el porcentaje de encapsulación fué algo menor.

7.- Se ha comprobado que los liposomas de tipo DRV eran muy sensibles frente a gradientes osmóticos, ya que al mantenerlos en soluciones tampón de menor fuerza iónica que la empleada en su preparación liberan gentamicina en mucha mayor proporción que en condiciones isoosmóticas. Cabe señalar que tanto en condiciones isoosmóticas como hipoosmóticas, la mayor parte de la pérdida de material encapsulado se produce durante la primera semana,

alcanzándose después aparentemente un estado de equilibrio que progresa muy lentamente.

8.- Las pruebas de incubación con sangre a 37°C de DRV conteniendo gentamicina encapsulada han indicado una progresiva pérdida del material encapsulado, sin embargo, los valores tan bajos de liberación de producto que se obtuvieron podrían ser debidos a la interacción de la gentamicina con proteínas plasmáticas, que enmascararía los resultados.

6. BIBLIOGRAFIA

- (1) Bangham, A. D.; Horne, R. W.; *J. Mol. Biol.* 8, 660-668 (1964)
- (2) Chapman, D.; *Q. Rev. Biophys.*, 8, 185-235 (1975)
- (3) Papahadjopoulos, D.; Kimelberg, H. K.; *Progress in Surface Science* (S. G. Davidson ed.), Pergamon, Oxford, 141-232.
- (4) Demel, R. A.; De Kruijff, B.; *Biochim. Biophys. Acta*, 457, 109-132 (1976).
- (5) Damen, J.; Regts, J.; Scherphof, G.; *Biochim. Biophys. Acta*, 665, 538-545 (1981).
- (6) Senior, J.; Gregoriadis, G.; *Life Sci.* 30, 2123-2136 (1982).
- (7) Forge, A.; Knowles, P. F.; Marsh, D.; *J. Membr. Biol.*, 41, 249-263 (1978)
- (8) Heath, T. D.; Lopez, N. G.; Papahadjopoulos, D.; *Biochem. Biophys. Acta*, 820, 74-84 (1985)
- (9) Scherphof, G.; Roerdink, F.; Hoekstra, D.; Zborowski, J.; Wisse, E.; *Liposomes in Biological Systems*, Ed. Gregoriadis, G.; Allison A. D., 179-207 (1980).
- (10) Kaifer, A. E.; *J. Amer. Chem. Soc.*, 108, 6837-6838 (1986).
- (11) Yuasa, M.; Aiba, K.; Ogata, Y.; Nishide, H.; Tsuchida, E.; *Biochim. Biophys. Acta*, 860, 558-565 (1986)
- (12) Machy, P.; Leserman, L.; *Liposomes in cell biology and Pharmacology*, INSERM, 44-46 (1987).
- (13) Sharkey, R. M.; Primus, F. J.; Goldenberg, D. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81, 2843-2846 (1984).
- (14) Olson, F.; Mayhew, E.; Maslow, D.; Rustum, Y.; Szoka, F.; *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*, 18, 167 (1982).
- (15) Forssen, E. A.; Tokes, Z. A.; *Biochim. Biophys. Res. Commun*, 91, 1295-1301 (1979).
- (16) Gaber, B. P.; Yager, P.; Sheridan, J. P.; Chang, E. L.; *FEBS Lett.*, 153, 285-288 (1983).

- (17) Alving, C. R.; Steck, E. A.; Trends Biochem. Sci., 4, 8, N175 (1979).
- (18) Leserman, L- D.; Machy, P.; Barbet, J.; Nature, 293, 226-228 (1981).
- (19) Delos, R. J.; Straubinger, R. M.; Brunette, E. N.; Lin, J. M.; Lin, E., J.; Montgomery, A. B.; Friend, D. S.; Papahadjopoulos, D. P.; Am. Rev. Respir.; 135, 731-737 (1987)
- (20) Wu, G. Y.; Wu, C. H.; Stockert, R. J.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3078-3080 (1983)
- (21) Sumamoto y col.; Biochim. Biophys. Acta, 898, 323-330 (1987).
- (22) Takada y col.; Biochim. Biophys. Acta, 802, 237-244 (1984).
- (23) Gregoriadis, G.; Rymann, B. E.; Eur. J. Biochem., 24, 485-491 (1972).
- (24) Belchetz, P. E.; Braidman, I. P.; Crawley, J. C. W.; Gregoriadis, G.; Lancet i., 116-117 (1977).
- (25) Schroit y col.; Immunology. 49, 431-438 (1983).
- (26) Le Grue y col.; Cancer Immunology and Immunotherapy, 17, 135-141 (1984).
- (27) Warren y col.; Ann. Rev. Immunol., 4, 269-388 (1984)
- (28) Eleazar Cohen y col.; Biochim. Biophys. Acta., 857, 117-122 (1986).
- (29) Vladmirsky, M. A.; Ladygina, G. A.; Tentsova, A. I.; Biomed. Pharm., 36, 375-377 (1982).
- (30) Nanucchio, M. C.; Bellora, M. J. G.; Sordelli, D. O.; Daquino, M.; Antimicrob. Agents Chemother., 27, 137-139 (1985).
- (31) Guilmette, R. A.; Cerny, E. A.; Rahman, Y. E.; Life Sci., 22, 313-320 (1978).

- (32) Zigterman, G. J. W.; Snippe, H.; Jansze, M.; Willers, J. M. N.; *J. Immunol.* 138, 220-225 (1987).
- (33) Smolin y col., *Am. Journal of Ophthalmology*, 41, 220-224 (1981).
- (34) Dapergolas, G.; Gregoriadis, G.; *Biochem. Soc. Trans.* 5, 1383-1386 (1977).
- (35) Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C.; *J. Mol. Biol.*, 13, 238-252 (1965).
- (36) Mayer, L. D.; Hope, M. J.; Cullis, P. R.; Janoff, A. S.; *Biochim. Biophys. Acta*, 817, 193-196 (1985).
- (37) Finkelstein, M. C.; Maniscalco, J.; Weissmann, G.; *Anal. Biochem.*, 89, 400-407 (1978).
- (38) Kulpa, C. F.; Tinghitella, T. J.; *Life Sci.*, 19, 1879-1888 (1976).
- (39) Adrian, G.; Huang, L.; *Biochemistry*, 18, 5610-5614 (1979).
- (40) Hoffman, R. M.; Margolis, L. B.; Bergelson, L. D.; *FEBS Lett.*, 93, 365-368 (1978)
- (41) Gregoriadis, G. y col.; *New Engl. J. Med.*, 295, 704-710, 765-770 (1976).
- (42) Deamer, D.; Bangham, A. D.; *Biochim. Biophys. Acta*, 443, 629-634 (1976).
- (43) Szoka, F.; Papahadjopoulos, D.; *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, 9, 467-508 (1980)
- (44) Deamer, D. W. y col.; *Ann. NY Acad. Sci.*, 308, 250-258 (1978).
- (45) Ostro, M. J.; Giacomoni, D.; Dray, S.; *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 76, 836-842 (1977).
- (46) Nicolau, C. y col.; *Methodologie des Liposomes*; Leserman, L. D.; Barbet, J.; J. Eds., Paris, INSERM, 107, 49-63 (1982).
- (47) Papahadjopoulos, D.; Vail, W. J.; Jacobson, K.; Poste, G.; *Biochim. Biophys. Acta*, 394, 483-491 (1975).

- (48) Szoka, F. C.; Papahadjopoulos, D.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 4194-4198 (1978).
- (49) Fraley, R.; Subramani, S.; Berg, P.; Papahadjopoulos, D.; J. Biol. Chem., 255, 10431-10435 (1980).
- (50) Kirby, Ch.; Gregoriadis, G.; Research Paper, Biotechnology, 974-984 (1984).
- (51) Huang, C. H. y col.; Biochem., 8, 344-352 (1969)
- (52) Fry, D. W.; Courtland White, J.; Goldman, D. I.; Analytical Biochemistry, 90, 809-815 (1978).
- (53) Brunner, J.; Skrabel, P.; Hause, H.; Biochem. Biophys. Acta, 455, 322-331 (1976).
- (54) Kagawa, Y.; Racker, E.; J. Biol. Chem., 246, 5477-5487 (1971).
- (55) Warren, G. B.; Toon, P. A.; Birdsall, N. J.; Lee, A. G.; Metcalfe, J. C.; Biochem., 13, 5501-5507 (1974).
- (56) Enoch, H. G.; Strittmatter, P.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 145-149 (1979).
- (57) Milsman, M. H.; Schwendener, R. A.; Weder, H. G.; Biochim. Biophys. Acta, 512, 147-155 (1978).
- (58) Batzri, S.; Korn, E. D.; Biochim. Biophys. Acta, 298, 1015-1019 (1973).
- (59) Kremer, J. M. H.; Esker, M. W. J.; Pathmananoharan, C.; Wiersema, P. H.; Biochem. 16, 3932-3935 (1977).
- (60) Barenholz, Y.; Amselem, S.; Lichtenberg, D.; FEBS Lett. 99, 210-214 (1979).
- (61) Pagano, R. E.; Schroit, A, J.; Struck, D. K.; Liposomes: from physical structure to therapeutic applications. Research Monographs in Cell and Tissue Physiology, C. G. Knight ed.; Elsevier/North Holland; 7, 323-347 (1981).
- (62) Schatz, A.; Bugie, E.; Waksman, S. A.; Proc. Soc. Exp. Biol. (N. Y.), 55-66 (1944).

- (63) Traub, P.; Nomura, M.; J. Mol. Biol.; 40, 391 (1969).
- (64) Modolell, J.; Davis, B. D.; Proc. Nat. Acad. Sci. U.S., 67, 1148 (1970).
- (65) Wallace, B.; Tai, P. C.; Herzog, E. L.; Davis, B. D.; Proc. Nat. Acad. Sci.; 70, 1234 (1973).
- (66) Wenstein, W. J.; Luedeman, G. M.; Oden, E. M.; Wagman, C. H.; Rosselet, J. R.; Marquez, J. A.; Coniglio, C. T.; Charney, W.; Herzog, H. L.; Black, J.; J. Med. Chem., 6, 463 (1963).
- (67) Cooper, D. J.; Daniels, P. J. L.; Yudis, M. D.; Marigliano, H. M.; J. Chem. Soc. (c), 3126-3129 (1971).
- (68) Singleton, W. S.; Gray, M. S.; Brown, M. L.; White, J. L.; The Journal of the American Oil Chemists' Society, 42, 53-56 (1965).
- (69) Skipski, U. K. y col.; J. Lipid. Res., 3, 467 (1962).
- (70) Patchet, M. L.; Monk, C. R.; Daniel, R. M.; Morgan, H. W.; Journal of Chromatography, 425, 269-276 (1988).
- (71) Benson, J. R.; Hare, P. E.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, N2, 619-622 (1975).
- (72) Stuart, J. D.; Hill, D. W.; Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids, Peptides and Proteins, ed. William S. Hancock, Ph. D., CRC Press, Inc. 1, 313-321 (1984).
- (73) Pfeifer, R. F.; Hill, D. W.; Advances in Chromatography; ed.: Giddings, J. C.; Crushka, E.; Cazes, J.; Brown, P. R.; Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 22, 37-69 (1983).
- (74) Anhalt, J. P.; Sancilio, F. D.; Mc Corkle, T.; Journal of Chromatography, 153, 489-493 (1978)
- (75) D'Souza, J.; Ogilvie, R. I.; Journal of Chromatography, 232, 212-218 (1982).
- (76) Weigand, R.; Coombes, R. J.; Journal of Chromatography, 281, 381-385 (1983).

- (77) Tamai, G.; Imai, H.; Yoshida, H.; *Chromatographia*, 21, N9, 519-522 (1986).
- (78) Albracht, J. H.; De Wit, M. S.; *Journal of Chromatography*, 389, 306-311 (1987)
- (79) Barlett, G. R.; *J. Biol. Chem.*; 234, 466-468 (1959).
- (80) Zasadzin, J. A. N.; *Biophys. J.*, 49, 1119-1130 (1986).
- (81) Guiot, P.; Baudhuin, P.; *Liposome Technology*, Gregoriadis, G. CRC Press, Vol. I, 163-177 (1984).
- (82) Makowski, L.; Jade, L.; *Biomembrane Structure and Function; Topics in Molecular and Structural Biology*, Chapman D., ed.; 4, 43-166 (1983).
- (83) Miyamoto, V. K.; Stoeckenius, W.; *J. Membr. Biol.*, 4, 252 (1971).
- (84) Code of Federal Regulations, title 21, part 444, 20a (1981).
- (85) Kubo, H.; Kinoshita, T.; *Journal of Chromatography*, 227, 244-248 (1982).
- (86) Thompson, R. B.; Gaber, B. P.; *Anal. Lett.*, 18, 1847-1863 (1985).
- (87) Scherphof, G.; Damen, J.; Hoekstra, D.; *Liposomes: from Physical structure to Therapeutic Applications; Research Monographs in Cell and Tissue Physiology*; Knight, C. G. ed.; Elsevier/North Holland, 7, 299-322 (1981).
- (88) Guo, L. S.; Hamilton, R. L.; Goerke, J.; Weinstein, J. N.; Havel, R. J.; *J. Lipid Res.*, 21, 993-1003 (1980).
- (89) Alving, C. R. y col.; *Biochem. Soc. Trans*, 12, 342-344 (1984).
- (90) Deshmukh, D. S.; Bear, W. D.; Wisniewski, H. M.; Bockerhoff, H.; *Biochim. Biophys. Res Commun*, 82, 328-334 (1978)
- (91) Kirby, Ch. J.; Gregoriadis, G.; *Liposome Technology*, Gregoriadis, G. ed, CRC Press; 1, 19-27 (1984).

- (92) Allen, T. M. y col.; Biochim. Biophys. Acta, 640, 385-397 (1981).
- (93) Zborowski, J.; Roerdink, F.; Scherphof, G.; Biochim. Biophys. Acta, 497, 183-191 (1977).
- (94) Bruckdofer, K. R.; Demel, J.; De Gier, J.; Van Deenen, L.L.M.; Biochim. Biophys. Acta; 183, 334-345 (1969).