

CARACTERIZACIÓN Y SEPARACIÓN DE LIPOSOMAS POR MICROENCAPSULACIÓN

Liposomes Isolation and Characterization by Microencapsulation

María José SÁNCHEZ CARPINTERO; Amparo SÁNCHEZ NAVARRO; María José DE JESÚS VALLE

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia (Salamanca). C/ Licenciado Méndez Nieto s/n. Teléf.: 923 294536

Correo-e: mariajosedj@usal.es

RESUMEN: Los liposomas son vesículas microscópicas compuestas de bicapas lipídicas concéntricas que alternan con compartimentos acuosos. Las proteínas y los lípidos son materiales biocompatibles y biodegradables utilizados para la microencapsulación de fármacos, siendo la albúmina una de las proteínas de interés debido a su importante papel como un transportador.

El objetivo del estudio fue encapsular liposomas cargados con ciprofloxacino en Albusomas®, un novedoso vehículo farmacéutico basado en liposomas recubiertos de albúmina.

La preparación de las vesículas se llevó a cabo mediante el método de hidratación de lípidos y el método de sonicación, utilizando una mezcla de fosfatidilcolina de huevo (EPC), dietildodecilamonio (DDA) y colesterol (Ch).

Los liposomas se encapsularon con albúmina bovina por floculación inducida. El sedimento, aislado por centrifugación contiene las microesferas formadas por los liposomas recubiertos de albúmina con ciprofloxacino en el núcleo acuoso, y en las capas de revestimiento de albúmina. Se determinó la concentración de ciprofloxacino en el sobrenadante y se comprobó la ausencia de liposomas en el mismo. El vehículo propuesto (Albusomas®) demostró ser capaz de encapsular los liposomas con una alta eficacia de

encapsulación de ciprofloxacino ($86,0\pm 5,0\%$ y $93,52\pm 3,94\%$) para el método de hidratación de lípidos y el método de sonicación, respectivamente.

Palabras clave: liposomas; microencapsulación; ciprofloxacino; albúmina.

ABSTRACT: Liposomes are microscopic vesicles composed of concentric lipid bilayers entrapping aqueous compartments. Proteins and lipids are among biocompatible and biodegradable materials used for microencapsulation, being albumin an interesting protein due to its role as a drugs carrier.

The aim of the study was to encapsulate ciprofloxacin loaded liposomes into Albusomes® a novel pharmaceutical vehicle based on albumin coated liposomes.

The vesicle preparation was carried out using the lipid hydration method and sonication method using a mixture of egg phosphatidylcholine (EPC), diethyldodecylammonium (DDA) and cholesterol (Ch).

The liposomes were encapsulated with bovine serum albumin by induced flocculation. The pellet, containing the albumin coated liposomes with ciprofloxacin trapped into water vesicle core and albumin coating layers, was isolated by centrifugation. Concentration of ciprofloxacin was quantified in the supernatant and the absence of lipid vesicles was confirmed. The proposed vehicle (Albusomes®) showed to be able to encapsulate liposomes with a high drug entrapment efficacy ($86.0\pm 5.0\%$ and $93.52\pm 3.94\%$). for lipid hydration method and sonication method, respectively.

Key words: Liposomes; Microencapsulation; Ciprofloxacin; Albumin.

INTRODUCCIÓN

Los liposomas son vesículas microscópicas formadas por bicapas lipídicas concéntricas, alternando con compartimentos acuosos (Ruozi, 2005). De forma y estructura diversa, sus dimensiones oscilan entre $0.1\ \mu\text{m}$ y $10\ \mu\text{m}$. Son obtenidos generalmente por hidratación de fosfolípidos a una temperatura superior a la temperatura de transición de los mismos (Zawada, 2012). Los fosfolípidos son biocompatibles y biodegradables y pueden encapsular una gran variedad de fármacos cuando forman liposomas; estos son considerados sistemas de liberación debido a su capacidad para transportar sustancias activas hidrófilas en el compartimento acuoso e hidrófobas entre los fosfolípidos de la bicapa. Debido a su versatilidad, su aplicación terapéutica ha ido incrementándose progresivamente (Torchilin, 2014). En los últimos años, se ha producido un gran desarrollo en este campo con la aprobación de varios medicamentos liposomales que incluyen

agentes anticancerosos, como la doxorrubicina utilizada en la terapia combinada del cáncer de mama recurrente (Torchilin, 2005).

Uno de los inconvenientes de su utilización es su desaparición rápida de la sangre, así como su captura por la células del sistema reticuloendotelial, principalmente en el hígado (Torchilin, 2005). Otra limitación es su inestabilidad química, debida a los procesos de oxidación que sufren los ácidos grasos insaturados y a la hidrólisis de los enlaces éster. También la inestabilidad física que puede causar la pérdida de fármacos incorporados en las vesículas lipídicas, pudiendo influir en su comportamiento «in vivo» (focalización, captación celular...) (Clares, 2003).

Los liposomas pueden prepararse por diversos métodos que influyen en el diámetro y número de bicapas de las vesículas obtenidas. El método de fabricación se elegirá teniendo en cuenta la composición, tamaño y naturaleza del principio activo que se pretende incluir en los liposomas. El tamaño, la carga y las propiedades superficiales de los liposomas se pueden modificar con la adición de nuevos ingredientes a la mezcla de lípidos y/o por variación de los métodos de preparación (Torchilin, 2005).

Ciprofloxacino es un agente antibacteriano con unión a proteínas baja (20-30%) y, aunque presenta un gran volumen de distribución (Ferreira, 2015), su acceso intracelular podría verse favorecido al administrarlo como preparación liposomal (Hamblin, 2014).

OBJETIVOS

El objetivo del estudio fue encapsular liposomas cargados con ciprofloxacino en Albusomas®, un novedoso vehículo farmacéutico basado en liposomas recubiertos de albúmina, y determinar el contenido en principio activo de las vesículas.

MATERIAL Y MÉTODOS

L- α -Fosfatidilcolina de huevo, colesterol, dimetil dioctadecil amonio (Sigma-Aldrich Química S.A.); agua ultrapura MiliQ; etanol y triclorometano (Panreac Química S.A.); mini-extrusómetro Avanti Polar Lipids; rotavapor Heidolph; bomba de vacío Vacuubrand; baño de ultrasonidos Fisher Scientific; Canon PowerShot SD500; microscopio óptico Zeiss y Nikon; microscopio electrónico Zeiss EM 902; baño de incubación Selecta Unitronic OR; centrífuga Centrikon Kontron; cromatógrafo y detector de fluorescencia Shimadzu.

Preparación de liposomas

Método clásico de Bangham (Bangham, 1965)

Esta técnica es una de las más utilizadas y permite obtener vesículas multi-lamelares grandes formadas por varias lamelas concéntricas de fosfolípidos. El tamaño de estas estructuras depende de la energía suministrada por agitación mecánica, la fuerza iónica del medio externo, la concentración y la pureza de los fosfolípidos (Madni, 2014).

Los componentes utilizados fueron fosfatidilcolina de huevo, dimetildioc-tadecil amonio (lípido catiónico) y colesterol que son mezclados en un vaso de precipitados. Se añade a la mezcla cloroformo/etanol (12.8/6.4) para disolver los componentes. La disolución se pasa a un balón de vidrio para llevar a cabo la evaporación de los disolventes en el rotavapor a vacío, 40°C, 40 min y 60 rpm. Se eliminan los restos de disolvente con gas N₂. Seguidamente se hidratan los lípidos con una disolución acuosa de ciprofloxacino que se mantiene en baño a 60°C, 60 rpm durante 30 min junto con 1g de esfera de vidrio para favorecer la hidratación. Transcurrido este tiempo se dejan otros 30 min a temperatura ambiente para permitir la estabilización de las vesículas lipídicas.

Método de sonicación (de Jesús Valle, 2015)

Se basa en la aplicación de una energía mecánica a través de pulsos de vibraciones producidos en un baño de ultrasonidos (Gala, 2015). La presión inducida forma las vesículas y las rompe convirtiéndolas en unilamelares pequeñas con un diámetro de 5 a 100 nm.

Se utilizaron los mismos componentes que en el método clásico, pero con ausencia de disolventes orgánicos, ya que se añadió directamente a los lípidos la disolución acuosa del fármaco. Se mezcla hasta conseguir una dispersión homogénea y se mantiene en un baño de ultrasonidos precalentado a 60°C durante 10 min. Se agita y se vuelve a colocar en el baño durante durante 5 min. Transcurrido este tiempo se dejan 30 min a temperatura ambiente para permitir la estabilización de las vesículas lipídicas.

Las suspensiones de liposomas, obtenidas por uno y otro método, se centrifugaron a 4000 rpm y 10°C durante 10 minutos. Se obtiene un precipitado de restos lipídicos y un sobrenadante con los liposomas que se pasa por un filtro de 0,22 µm para obtener vesículas lipídicas de tamaño más homogéneo.

Encapsulación de liposomas

Se preparó una disolución de albúmina bovina en agua mili-Q al 1% y se procedió a la encapsulación de las vesículas mediante la adición, gota a gota, de

la disolución de la proteína sobre la suspensión de liposomas. La mezcla se lleva a un baño de incubación y se mantiene a 4°C durante 18 horas. La interacción electrostática entre la albúmina y los liposomas induce un fenómeno de floculación y la formación de microesferas de albúmina que engloban los liposomas. Las muestras floculadas se centrifugaron a 15000 rpm y 4°C durante 30 min, obteniéndose un «pellet» y un sobrenadante libre de liposomas (transparente) en el que se cuantificó la cantidad de antibiótico no encapsulado.

Determinación del contenido en fármaco de liposomas y Albusomas®

Se midieron los volúmenes de los sobrenadantes obtenidos en las centrifugaciones para calcular la cantidad de fármaco una vez determinada la concentración.

Para la cuantificación de ciprofloxacino en las muestras se utilizó una técnica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección de fluorescencia ($\lambda_{em} = 277$ y $\lambda_{exc} = 445$), fase estacionaria no polar en columna Lichrochart C₁₈ 5 cm (3 μ m) y fase móvil compuesta por ácido fórmico 0,1% (ajustado con TEA pH 3.5):metanol (80:20). Se añadió ácido tricloroacético al 10% a los sobrenadantes para precipitar la albúmina y determinar la concentración total de fármaco. Con los datos de concentración y volumen se calculó la cantidad en el sobrenadante (Qs) y por diferencia con la cantidad inicial (Qi) añadida se estimó la cantidad retenida en Los Albusomas® (Qa).

$$Q_i = Q_s + Q_a \text{ por tanto } Q_a = Q_i - Q_s$$

Lo que permite calcular la eficacia de encapsulación en los albusomas (EEa)

$$EEa (\%) = (Q_a/Q_i) \times 100$$

A su vez, la cantidad en los albusomas se reparte entre el núcleo acuoso de los liposomas (Qlip) y las capas de albúmina (Qalb) que los recubren. Asumiendo que todo el volumen acuoso captado por los albusomas está incluido en los liposomas, se realizó una estimación aproximada del contenido en principio activo de los liposomas y su correspondiente eficacia de encapsulación (EElip)

$$Q_{lip} = (V_t - V_s) \times C$$
$$EElip (\%) = (Q_{lip}/Q_i) \times 100$$

Observación microscópica de las vesículas

Todos los lotes de liposomas se observaron en un microscopio óptico que incorpora una cámara conectada al ordenador, lo que permitió la realización de varias capturas de los diferentes tipos de partículas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras la preparación de liposomas por los dos métodos estudiados se observó que con el método clásico la suspensión contiene mayor cantidad de liposomas, más heterogéneos en cuanto al tamaño y de diámetro superior al de los obtenidos por el método de sonicación; este último produce liposomas más pequeños (se requirió mayor aumento para su observación), más homogéneos, pero con mayor cantidad de trazas lipídicas no incorporadas a las vesículas (figura 1), que se eliminaron por filtración.

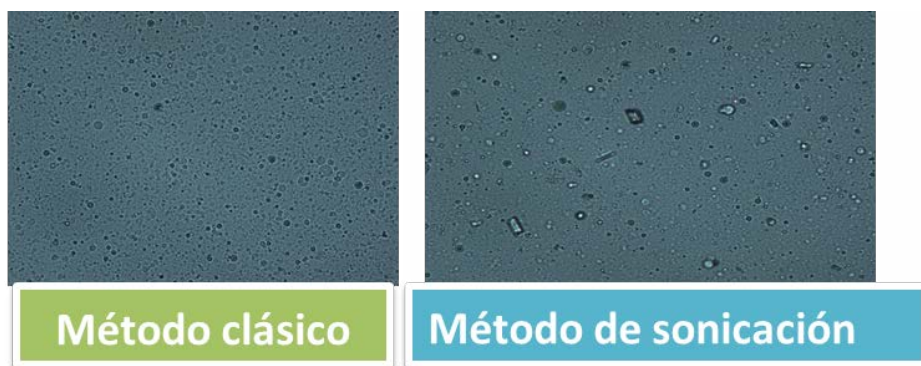


FIGURA 1: Aspecto de la suspensión de liposomas obtenidos por los dos métodos utilizados.

En estudios preliminares se intentó separar los liposomas por centrifugación, utilizando distintas velocidades, temperaturas y tiempos; en ningún caso se consiguió el aislamiento total de los mismos. Los liposomas aparecían tanto en el precipitado como en el sobrenadante (visualizados por microscopía óptica y electrónica). La mejor opción fue centrifugación a baja velocidad, 4000 rpm, durante periodos largos, aunque, incluso en estas condiciones, los liposomas más pequeños quedaban en el sobrenadante.

La adición de albúmina, siguiendo el procedimiento experimental anteriormente descrito, permitió la separación total de los liposomas; el aspecto de las mezclas, con separación de fases y aparición de un sobrenadante transparente es indicativo de la ausencia de liposomas, que se confirmó mediante la observación al microscopio. Asimismo, la observación del pellet, separado por centrifugación, reveló la formación de los denominados Albusomas®, partículas esféricas que engloban los liposomas en una red de albúmina. La figura 2 muestra las capturas tras la observación microscópica del sobrenadante y del pellet.

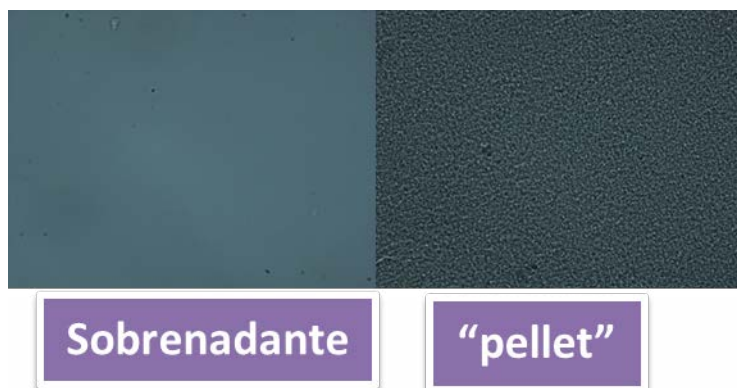


FIGURA 2. Aspecto de sobrenadante y «pellet» tras la floculación.

A partir de los resultados de la cuantificación de ciprofloxacino en los sobrenadantes y aplicando las ecuaciones anteriormente indicadas se estimaron los valores de Q_a , Q_{lip} y sus correspondientes EE_a y EE_{lip} , que resultaron ser $Q_a = 6,88 \pm 0,40$ mg; $Q_{lip} = 2,22 \pm 0,53$ mg; $EE_a = 86,00 \pm 5,04\%$ y $EE_{lip} = 27,81 \pm 6,64\%$ para el método de hidratación y $Q_a = 7,48 \pm 0,31$ mg; $Q_{lip} = 2,00 \pm 0,90$ mg; $EE_a = 93,52 \pm 3,94\%$ y $EE_{lip} = 25,00 \pm 11,13\%$ para el de sonicación (tabla 1).

TABLA 1: Valores estimados de Q_a , Q_{lip} y sus correspondientes EE_a y EE_{lip} .

MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE ALBUSOMAS®	Q_a (mg)	Q_{lip} (mg)	EE_a (%)	EE_{lip} (%)
Hidratación de lípidos	$6,88 \pm 0,40$	$2,22 \pm 0,53$	$86,00 \pm 5,04$	$27,81 \pm 6,64$
Sonicación	$7,48 \pm 0,31$	$2,00 \pm 0,90$	$93,52 \pm 3,94$	$25,00 \pm 11,13$

Se comprueba que la microencapsulación con albúmina, además de la separación de los liposomas, incrementa significativamente el contenido en principio activo de las partículas y su eficacia de encapsulación que pasa de $27,81 \pm 6,64\%$ y $25,00 \pm 11,13\%$ en los liposomas a $86,00 \pm 5,04\%$ y $93,52 \pm 3,94\%$ en los Albusomas®

CONCLUSIONES

Para la obtención de liposomas cargados con ciprofloxacino las ventajas del método de sonicación, con respecto al de hidratación, es que no utiliza disolventes orgánicos y produce liposomas más homogéneos.

El inconveniente del método de sonicación, con respecto al de hidratación, es la mayor proporción de lípidos no incorporados a las vesículas.

La microencapsulación con albúmina permite la total separación y aislamiento de los liposomas, confirmada mediante observación microscópica.

La microencapsulación con albúmina produce los denominados Albusomas® que, además de retener las vesículas, aumentan significativamente su contenido en principio activo y eficacia de encapsulación con respecto a los liposomas.

BIBLIOGRAFÍA

- BANGHAM, A. D., STANDISH, M. M. y WATKINS, J. C.: Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965; 13(1): 238-52.
- CLARES, B.: Tesis doctoral. Sistemas de Transporte y Liberación de Fármacos de Aplicación Tópica: Liposomas multilamlares portadores de Acetonido de Triamcinolona. Universidad de Granada, España 2003.
- DE JESÚS VALLE, M. J. y SÁNCHEZ NAVARRO, A.: Liposomes Prepared in Absence of Organic Solvents: Sonication Versus Lipid Film Hydration Method. *Curr Pharm Anal.* 2015; 11(2): 86-91.
- FERREIRA, M. y GAMEIRO, P.: Ciprofloxacin Metalloantibiotic: An effective antibiotic with an influx route strongly dependent on lipid interaction? *J Membr Biol.* 2015: 125-136.
- GALA, R. P., KHAN, I., ELHISSI, A. M. y ALHNAN, M. A.: A comprehensive production method of self-cryoprotected nano-liposome powders. *Int J Pharm.* 2015; 486: 153-158.
- HAMBLIN, K. A., WONG, J. P., BLANCHARD, J. D. y ATKINS, H. S.: The potential of liposome- encapsulated ciprofloxacin as a tularemia therapy. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 1-5.
- MADNI, A., SARFRAZ, M., AHMAD, M., AKHTAR, N., AHMAD, S., TAHIR, N., IJAZ, S. *et al.*: Liposomal drug delivery: A versatile platform for challenging clinical applications. *J Pharm Sci.* 2014; 17(3): 401-426.
- RUOZI, B., TOSI, G., FOMI, F., FRESTA, M. y VANDELLI, M. A.: Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur J Pharm Sci.* 2005; 25: 81-89.
- TORCHILIN, V. P.: Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2014; 13: 813-827.
- TORCHILIN, V. P.: Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 145-160.
- ZAWADA, Z. H.: Liposomes from hydrogenated soya lecithin formed in sintered glass pores. *Acta Pol Pharm.* 2012; 69(1): 107-111.