

Laura Hermida ⁽¹⁾, Carlos Bregni ⁽²⁾, Manel Sabés-Xamari ⁽³⁾, Ramón Barnadas-Rodríguez ⁽³⁾

⁽¹⁾ Instituto Nacional de Tecnología Industrial, INTI-Química, Buenos Aires, Argentina. ⁽²⁾ Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. ⁽³⁾ Unitat de Biofísica, Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, España.

INTRODUCCIÓN

Desde que fueron caracterizados por primera vez, las aplicaciones de los liposomas han crecido en número y diversidad. Entre ellas, la administración por vía oral constituye en la actualidad un desafío para productos farmacéuticos, suplementos dietarios y vacunas (Brayden, 2001). Existen evidencias de que los liposomas podrían proveer de una protección eficaz *in vivo* durante el tránsito gastrointestinal. Diferentes autores han estudiado la absorción de fármacos en liposomas luego de su administración por vía oral. Sin embargo, son escasos los estudios sistemáticos sobre el comportamiento de los liposomas sometidos a condiciones que simulen las presentes a lo largo del tracto gastrointestinal.

El objetivo de este trabajo es estudiar los cambios fisicoquímicos de distintas formulaciones liposomales sometidas a un proceso de digestión *in vitro*, para poder predecir su estabilidad *in vivo* suponiendo la administración por vía oral.

RESULTADOS

CARACTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS PRE/POST DIGESTIÓN

Composición	Diámetro medio PRE (nm)	Diámetro medio POST (nm)	Vol. incorporado PRE (l/mol)	% HPTS encaps. POST (l/mol)
SPC	462 ± 59	359 ± 72	1,20 ± 0,06	86,0 ± 2,5
HSPC	859 ± 322	1022 ± 320	0,88 ± 0,02	54,2 ± 2,9
HSPC-cholesterol 3:2	1066 ± 86	713 ± 273	1,58 ± 0,04	81,0 ± 2,5

Tabla 1: se muestra la caracterización de liposomas obtenidos por homogeneización a alta presión antes (PRE) y después (POST) de la digestión *in vitro*: diámetro medio de la distribución en volumen (nm), volumen incorporado en l/mol y porcentaje de sonda encapsulada. (Los resultados se expresan como media ± std, n=3).

RMN-³¹P para liposomas SPC

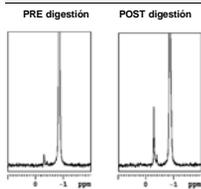


Fig.1: Determinación de PC y liso PC en liposomas SPC antes (PRE) y después (POST) de la digestión *in vitro*.

DISTRIBUCIÓN DE DIÁMETROS para liposomas HSPC-Chol

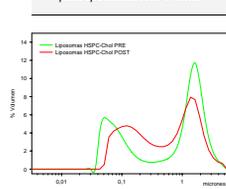


Fig.2: Distribución de diámetros para liposomas HSPC-Chol antes (PRE) y después (POST) de la digestión *in vitro*.

ESTABILIDAD QUÍMICA: Contenido de formas liso mediante RMN-³¹P

Composición	PRE digestión	POST digestión
	% liso PC (área / área total)	% liso PC (área / área total)
SPC	1,77 ± 0,32	8,14 ± 1,33
HSPC	1,58 ± 0,38	2,59 ± 0,42
HSPC-cholesterol 3:2	1,19 ± 0,44	2,31 ± 0,46

Tabla 2: se muestran los valores hallados para los porcentajes de liso PC obtenidos para liposomas antes y después de la digestión *in vitro*. El porcentaje está calculado por normalización de áreas (Los resultados se expresan como promedio ± std; n=3).

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Los fosfolípidos de soja son de Degussa. Epikuron 200 es una lecitina de soja que contiene un mínimo de 95% p/p de fosfatidilcolina. Emulsmix 950 contiene un mínimo de 95% p/p de fosfatidilcolina de soja hidrogenada. El colesterol y la sonda fluorescente HPTS (gitanina) son de SIGMA.

Preparación de liposomas y caracterización

Los liposomas se prepararon mediante homogeneización de alta presión mediante un Microfluidizer 110S (Barnadas & Sabés, 2003). Para los estudios se emplearon tres formulaciones con distinta composición lipídica: liposomas compuestos de fosfatidilcolina (SPC), liposomas compuestos de fosfatidilcolina hidrogenada (HSPC) y liposomas compuestos por una mezcla fosfatidilcolina hidrogenada - colesterol en relación molar 3:2 (HSPC-Chol). En todos los casos se empleó una concentración de lípidos totales igual a 25 mg/ml. Las suspensiones se prepararon con la sonda fluorescente HPTS a una concentración de 2 mM en buffer TRIS 10 mM NaCl 145 mM pH 7.4. La distribución de diámetros de las vesículas se determinó mediante Dynamic Light Scattering (DLS) empleando un Microtrac Ultrafine Particle Analyzer 150 spectrometer (Montgomeryville, USA). El volumen incorporado se determinó cuantificando HPTS por fluorimetría y contenido de fosfolípidos en las fracciones de liposomas obtenidas después de la separación mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) en Sephadex G-25 (Pharmacia). El porcentaje de sonda encapsulada en liposomas digeridos se calculó monitoreando la variación de la fluorescencia en el punto isotérmico de la HPTS (independiente del pH) agregando DPX, un quencher de la sonda, en el exterior acuoso de los liposomas.

Ensayos de digestión *in vitro*

Los liposomas con HPTS se purificaron mediante SEC. La digestión se realizó incubando una dilución de los liposomas en buffer a 37°C (a) 1 hora con una solución de pepsina-HCl pH 2 seguido de (b) 1 hora con una solución de pancreatina y extracto de bilis, según lo descrito anteriormente (Glahn et al, 1998).

Calibración del pH y determinación del pH interno

Se empleó la HPTS como indicador del pH interno empleando su relación con el cociente entre la fluorescencia a dos longitudes de onda (ratiometric assay), según lo descrito previamente (Prabhananda, 1996). La calibración se realizó obteniendo curvas "F454/403 vs. pH" para HPTS en solución y para liposomas incubados con gramicidina, un formador de canales en los liposomas que permite el inmediato equilibrio de pH entre el medio interno y externo. El pH interno se determinó para las tres formulaciones durante la digestión *in vitro* en presencia de DPX en el medio digestivo.

Evaluación de la estabilidad química de fosfolípidos mediante ³¹P-RMN

Los liposomas antes y después de la digestión *in vitro* se trataron según lo descrito anteriormente (Glonck, 1998). Los espectros RMN se obtuvieron en un espectrómetro Bruker ARX-400 con desacoplamiento protónico de banda ancha. Los datos de desplazamiento químico se informan usando como referencia la fosfatidilcolina que se fija a -0.84 ppm. El tiempo de adquisición por cada espectro fue de 29 minutos (512 scans).

Microscopía confocal

Se prepararon liposomas HSPC-cholesterol incorporando HPTS y se incubaron con células Caco-2 durante 1h a 37°C. Una vez lavadas, se evaluó mediante microscopía confocal la presencia de la sonda en el interior celular. Las células empleadas fueron provistas por la European Collection of Cell Cultures (ECCC) y cultivadas según Glahn et al (1995). El ensayo con liposomas se realizó entre los 12 y 15 días después de la siembra, habiéndose verificado la confluencia entre ellas.

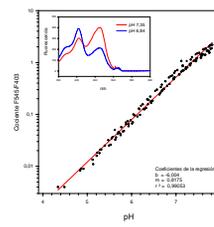


Fig.3: Calibración del pH para HPTS. Rango de medición lineal: 4,4 - 7,5. Inserto: espectros de excitación de HPTS a pH 7,35 y 6,84.

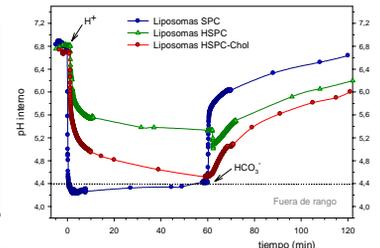


Fig.4: Determinación del pH interno para liposomas SPC, HSPC y HSPC-Chol durante la digestión *in vitro*. Las flechas indican el comienzo de la digestión estomacal (H⁺) e intestinal (HCO₃⁻). La línea de puntos indica la zona de pH a partir de la cual es válido el cálculo del pH (Los resultados se expresan como el promedio para n=3).

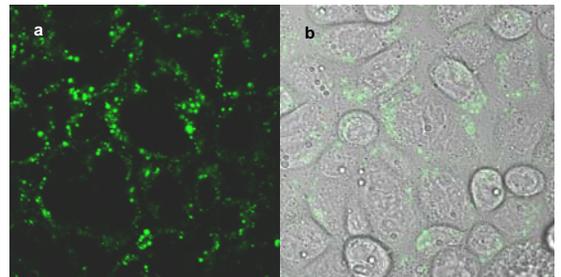


Fig.5: microscopía confocal de células Caco-2 incubadas con liposomas HSPC-Chol conteniendo HPTS, luego de 1 hora de incubación a 37°C. (a) imagen fluorescente (b) superposición de imagen fluorescente con micrografía de las monocapas.

CONCLUSIONES

- Los liposomas SPC digeridos *in vitro* muestran la menor estabilidad química (Tabla 2), sin embargo conservan un alto porcentaje de su contenido (86%, Tabla 1). Presentan la desventaja adicional de ser extremadamente permeables al cambio de pH (Fig.4), observándose un brusco descenso de pH interno (pH << 4) al inicio de la digestión estomacal.
- Los liposomas HSPC son más estables químicamente, sin embargo su contenido disminuye significativamente durante la digestión *in vitro*. Este tipo de liposoma presenta bastante impermeabilidad al cambio de pH durante la digestión *in vitro*, llegando a un pH mínimo de 5,2 al final de la etapa estomacal.
- Los liposomas HSPC-Chol presentan las características más deseables comparados con los modelos anteriores, resultando estables fisicoquímicamente. Su distribución de diámetros no varía significativamente cuando son sometidos a la digestión *in vitro* y su contenido final, evaluado mediante una sonda fluorescente hidrosoluble, es del 80%. Además, su asociación con células intestinales (Fig.5) los convierte en un buen modelo de partida para el diseño de liposomas mucoadhesivos para administración por vía oral.

Referencias

- Barnadas & Sabés (2003) Methods in Enzymology 367A:28-46.
 Brayden (2001) European Journal of Pharmaceutical Sciences 14:183-189.
 Glahn et al (1995) Journal of Nutrition 125:1833-1840 (1995).
 Glahn et al (1998) Journal of Nutrition 128:1555-1561.
 Glonck (1998) JAACS 75:569-573.
 Prabhananda & Kombrabail (1998) Biophysical Journal 71:3091-3097.