

Optimización de formulaciones liposomales mediante homogeneización a alta presión

Hermida, L.⁽ⁱ⁾; Dománico, R.⁽ⁱ⁾; Sabés, M.⁽ⁱⁱ⁾; Barnadas, R.⁽ⁱⁱ⁾

⁽ⁱ⁾ INTI-Química

⁽ⁱⁱ⁾ Unidad de Biofísica – Universidad Autónoma de Barcelona – España

Introducción

Los liposomas son vesículas lipídicas que se han estudiado como sistemas de vehiculización de fármacos, sustancias biológicas y biomoduladores desde hace unos 40 años. Sus componentes son biodegradables, no tóxicos y poco antigénicos. Fundamentalmente permiten resolver problemas de solubilidad, inestabilidad y degradación de las sustancias que transportan, aumentando su biodisponibilidad [1].

Existen numerosos métodos para preparar liposomas, pero la mayoría han sido diseñados para su obtención a nivel laboratorio y resultan difíciles de escalar.

Uno de los métodos más simples y efectivos para la obtención de grandes volúmenes de liposomas es la homogeneización a alta presión. Su funcionamiento se basa en aplicar una gran cantidad de energía a la muestra que provoca la rotura y posterior reensamblaje de las macroestructuras presentes, reduciéndose así su tamaño. La muestra puede ser procesada por ciclos o por recirculación a distintas presiones y temperaturas [2]. La ventaja fundamental frente a otros métodos radica en que los modelos de homogeneizadores más pequeños tienen sus equivalentes a escalas mayores, con lo cual los resultados pueden ser transferidos directamente del laboratorio a la industria.

El objetivo del este trabajo consistió en optimizar la preparación de formulaciones liposomales modelo, mediante homogeneización a alta presión.

Metodología

Preparación de liposomas:

Se emplearon fosfolípidos grado alimenticio. La concentración de lípidos se mantuvo constante a 25 mg/ml. Se incorporó una sonda fluorescente hidrosoluble (HPTS) para la determinación del volumen de sonda incorporado por los liposomas.

Se prepararon tres modelos de liposomas con distinta composición lipídica:

- Fosfatidilcolina de soja (SPC)
- Fosfatidilcolina de soja hidrogenada (HSPC)
- HSPC – colesterol (3:2) molar (HSPC-cho).

Los liposomas fueron preparados mediante homogeneización de alta presión, empleando un equipo Microfluidizer 110S escala laboratorio (ver Fig.1), operando en el modo ciclos a temperatura ambiente (SPC) o termostalizando el equipo a 55°C (liposomas conteniendo HSPC).



Fig. 1: Microfluidizer 110S con sistema de termostatación. Unidad de Biofísica, Universidad Autónoma de Barcelona, España.

Diseño experimental

Para cada modelo se trabajó a distintas presiones y número de ciclos de homogeneización (variables x e y), determinándose los diámetros y los volúmenes incorporados para cada caso (variables z). Los parámetros "presión" y "ciclos" se variaron simultáneamente según un diseño experimental del tipo "cuadrado + estrella" (ver Fig.2), en el cual se ensayan por triplicado todos los puntos de la estrella [3].

Se eligió el volumen incorporado como variable cuantitativa por tratarse de una sustancia hidrosoluble, que se localiza preferentemente en el interior acuoso de los liposomas.

El análisis matemático de los datos permitió obtener los parámetros para cada término de la ecuación que se ajusta al modelo experimental y luego interpolar los valores de presión y/o ciclos adecuados para un diámetro o volumen incorporado determinado.

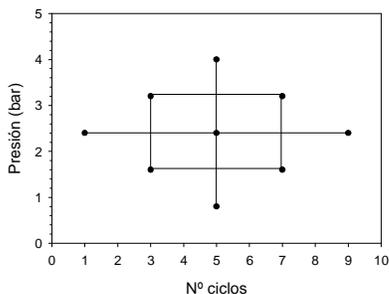


Fig. 2: Diseño "cuadrado + estrella" empleado en la optimización.

Los diámetros se determinaron mediante un analizador de partículas Microtrac UPA 150 con un rango de trabajo entre 10 y 1000 nm.

El volumen incorporado se determinó separando la sonda liposomada de la libre mediante cromatografía de exclusión molecular y determinando posteriormente el contenido de HPTS por fluorimetría y el de fosfolípidos por el método de Steward [4].

Resultados

En la *Figura 3* se muestra un ejemplo de superficie de respuesta obtenida para liposomas HSPC-chol, en la que se han determinado los diámetros obtenidos para distintas presiones y N° de ciclos.

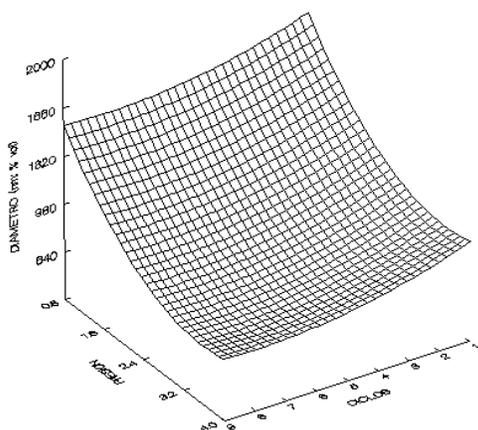


Fig. 3: Variación del diámetro (nm) en función de los ciclos de homogeneización y la presión para liposomas HSPC-chol.

De la misma manera, y para los tres modelos planteados, se obtuvieron superficies de respuesta graficando en el eje z el volumen incorporado.

El criterio de selección del procesamiento más adecuado en cada caso fue lograr el máximo volumen incorporado, con diámetros que no superaran ampliamente los 1000 nm. Liposomas de mayor diámetro no resultan adecuados en este caso por varios factores: están fuera del rango de medición de tamaños del equipo empleado, son

retenidos en un alto porcentaje por las columnas de exclusión molecular empleadas y suelen presentar problemas de agregación y/o sedimentación.

La Tabla I muestra las condiciones de preparación seleccionadas para cada tipo de liposoma y los diámetros medios y volúmenes incorporados obtenidos en cada caso.

Tabla I. Condiciones "ciclos-presión" seleccionadas para cada formulación. Diámetro medio (en nm) y volumen incorporado (litros/mol de lípido) para las condiciones elegidas.

Modelo de formulación	Ciclos - presión Elegida (C, P)	Diámetro medio (nm)	Vol. Incorp. (l/mol)
Liposomas SPC	C5 P2,4	462 ± 59	1,54 ± 0,41
Liposomas HSPC	C5 P4	859 ± 322	0,96 ± 0,17
Liposomas HSPC-chol	C5 P2,4	1066 ± 86	1,85 ± 0,46

Cabe mencionar que los liposomas conteniendo HSPC fueron procesados a una temperatura de 55°C debido a los estudios previos sobre la temperatura de transición de fase para este tipo de liposomas (52°C) realizados mediante calorimetría de barrido diferencial. En cuanto a los liposomas de HSPC-colesterol, a pesar de no presentar la transición, eliminada por la presencia del colesterol, daban lugar a productos inestables físicamente al ser procesados a temperatura ambiente.

Conclusiones

La metodología empleada ha permitido la optimización de la preparación de tres formulaciones liposomales, obteniendo la mayor información con el menor número de ensayos.

En las formulaciones estudiadas, cinco ciclos de homogeneización resultaron suficientes para obtener productos estables, con las características deseadas. En cuanto a las condiciones de presión, los liposomas de HSPC, que presentan transición de fases, requieren la mayor presión de homogeneización (4 bar).

La metodología es aplicable en forma directa a cualquier otro producto obtenido por homogeneización a alta presión, evaluando la influencia de los ciclos y la presión aplicada sobre los parámetros que sean de interés.

Referencias

- [1] Allen M. Liposomal drugs formulations. *Drugs* 56(5):747-756 (1998).
- [2] Barnadas R. y Sabés M. "Liposomes prepared by high-pressure homogenizers". *Methods in enzymology*, Vol.367:28-46 (2003).
- [3] Deming S. y Morgan S. "Experimental design: a chemometric approach". *Data handling in science and technology* Vol3 (1987).
- [4] Steward J.C.M. "Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrioxalate". *Analytical Biochemistry* 104:10-14 (1980).

Para mayor información contactarse con:
Laura Hermida - lhermida@inti.gov.ar