

EFECTO DEL DISOLVENTE Y EL pH DE LA DISOLUCIÓN TAMPÓN EN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA DE LIPOSOMAS DE FOSFATIDILCOLINA

M.L. González-Rodríguez¹, A. Cebrelli², C. Caramella², A.M. Rabasco¹

¹ Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Sevilla. C/ Prof. García González, s/n. 41012 Sevilla

² Dipartimento di Chimiche Farmaceutiche. Università di Pavia. Viale Taramelli 12, 27100 Pavia. Italia

Introducción

Los fosfolípidos (PL) que se encuentran formando parte de la formulación de liposomas en dispersiones acuosas experimentan dos tipos de reacciones de degradación, limitando así su vida media en la formulación: oxidación e hidrólisis (1).

Los fenómenos de oxidación se producen habitualmente en los PL de naturaleza insaturada, mediante la formación en cadena de radicales libres.

El proceso de hidrólisis afecta a los cuatro enlaces éster existentes en la molécula de glicerofosfolípido (especialmente los grupos acilo), donde se forman lisofosfolípidos como productos intermedios y ácidos grasos no esterificados (NEFA) y glicero compuestos como productos finales.

Estas reacciones de degradación son patentes cuando se someten las muestras a condiciones tales como soluciones concentradas de NaOH, exposición a luz UV, etc. (2).

Sin embargo, es probable que las condiciones de manipulación de los PL, así como los compuestos implicados en la elaboración de los liposomas, repercutan también de alguna forma en la formación de especies oxidadas (3).

Por ello, el objetivo del presente trabajo se centra en dilucidar la influencia de tales factores relacionados con la formulación, en el proceso de peroxidación lipídica, utilizando 1,2 diacil-sn glicero-3-fosfocolina como fosfolípido, sometido a distintas condiciones de conservación y utilización.

Materiales y Métodos

Materiales:

1,2 diacil-sn glicero-3-fosfocolina (Sigma, Barcelona, España), metanol, cloroformo y diclorometano (Panreac, Barcelona, España). Potasio di-hidrógeno fosfato y di-sodio hidrógeno fosfato (Panreac, Barcelona, España) se emplearon para preparar el tampón fosfato de Sorensen ajustado a un valor de 6.0 unidades. Ácido cítrico (Panreac, Barcelona, España) y di-sodio hidrógeno fosfato se utilizaron para preparar el tampón de McIlvane ajustado a un valor de 3.0. Tampón pH 9.3 (Panreac, Barcelona, España). Yoduro potásico, o-fenantrolina y cloruro de aluminio (Sigma, Barcelona, España).

Metodología

1. Test de peroxidación lipídica

En primer lugar, se realizó este ensayo a las muestras de fosfatidilcolina (PC) sin liposomar, cuyas condiciones de conservación y manipulación se recogen en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de almacenamiento y manipulación de las distintas muestras de PC estudiadas.

PC	Tiempo utilización	Temperatura Recepción	Temperatura conservación
PC1	5 meses	< 0 °C	< 0 °C
PC2	1 semana	25 °C	0 °C
PC3	1 día	0 °C	0 °C

Se parte de una disolución de PC en el disolvente orgánico ($8.33 \cdot 10^{-3}$ % p/v) y se somete a rotaevaporación durante 30 minutos a la temperatura de evaporación del disolvente. A

continuación, se añaden volúmenes iguales del disolvente y soluciones de IK (0.2 % p/v) y α -fenantrolina (0.02 % p/v). El cloruro de aluminio actúa como catalizador y se añade en cantidades mínimas. Tras someter la disolución resultante a 3 ciclos de vortex, se incuba en total oscuridad durante 15 minutos, valorando finalmente el contenido en hidroperóxidos de la muestra mediante espectrofotometría UV-visible (Hitachi U-2000) a 357 nm. Se empleó como sustancia de referencia cumen hidroperóxido (C₉H₁₂O₂).

2. Elaboración de los liposomas

Los liposomas se elaboraron por el método de hidratación / deshidratación del PL. Se parte de una disolución de PC en el disolvente orgánico (5 mg/mL) y se rotaevapora durante 30 minutos. A continuación se añade la solución tampón (tabla 1) y se somete a 6 ciclos de vortex. Con el fin de evaporar la totalidad del contenido acuoso de la preparación, se rotaevapora de nuevo una alícuota de la disolución anterior. Las etapas sucesivas de adición de los reactivos coinciden con lo anteriormente expuesto, a diferencia del volumen empleado de cada uno de ellos (500 μ l).

3. Morfología de las muestras de PC

Las tres muestras de PC estudiadas fueron sometidas a una caracterización morfológica mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM), con la finalidad de esclarecer que se parten de muestras diferentes de la misma sustancia.

Resultados y Discusión

Habitualmente, los fenómenos de oxidación de los PL tienen lugar cuando existen en la molécula ácidos grasos insaturados. Sin embargo, de acuerdo con otros autores (3), los PL que contienen ácidos grasos saturados pueden sufrir procesos de oxidación como consecuencia del almacenamiento incorrecto y la excesiva manipulación de las muestras.

A. Efecto del disolvente orgánico

En el presente trabajo se evaluó la peroxidación lipídica producida en tres muestras de PC almacenadas en distintas condiciones y con distinto tiempo de almacenamiento (tabla 1). Para ello, fueron sometidas al test iodométrico, obteniéndose un porcentaje de peroxidación

superior en las muestras PC1 y PC2, las cuales estuvieron sometidas a condiciones inadecuadas de manipulación y almacenamiento, respectivamente (Figura 1).

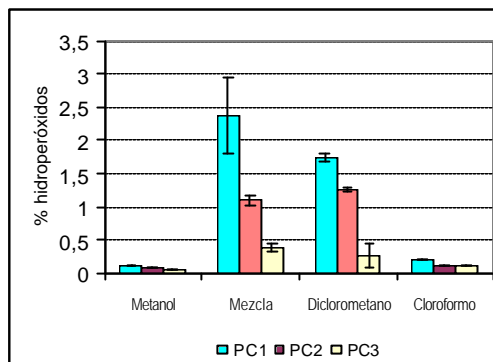


Figura 1. Porcentaje de peroxidación de PC en las distintas muestras ensayadas.

El ensayo se llevó a cabo en presencia de metanol como disolvente de la PC. Teóricamente, la formación de NEFA, que son los productos valorados finalmente, se produce cuando actúa en la reacción un grupo con características nucleofílicas. Por ello, se realizó a continuación un estudio comparativo entre disolventes orgánicos que diferían en su polaridad y nucleofilia. Se seleccionaron el cloroformo, diclorometano y mezcla 50:50 de diclorometano: metanol. Los resultados obtenidos mostraron que tanto con metanol como con cloroformo, el porcentaje de peroxidación fue inferior que cuando se utilizó diclorometano. Esto explica la influencia de la polaridad y la presencia de -OH (en caso del metanol) sobre la disminución de la peroxidación lipídica.

Esta es la razón por la que los ensayos sucesivos se llevaron a cabo con metanol como disolvente de la PC.

B. Efecto del pH

El compartimento acuoso que forma parte de las vesículas de PC está formado habitualmente por disoluciones tampón ajustadas a un determinado valor de pH.

La presencia de radicales hidroxilo en la solución puede dar lugar a un proceso de hidrólisis de la PC. Por ello, en este trabajo se evaluó el efecto

del pH en la peroxidación de las distintas muestras de PC (Figura 2). En primer lugar, y de acuerdo con Zuidam y Barenholz (4), el mantenimiento del pH en torno a 6.0 unidades es crucial para minimizar la hidrólisis de la PC, lo cual se pudo observar en la gráfica.

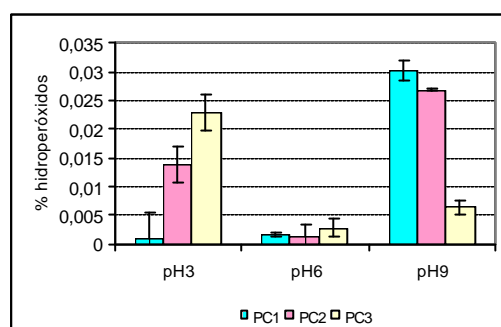


Figura 2. Porcentaje de hidroperóxidos valorados en función del pH del tampón.

Por otra parte, se apreció que en condiciones ácidas, el comportamiento era diferente en función de la muestra estudiada, de forma que la PC mantenida a una temperatura inferior a 0 °C y no expuesta al oxígeno atmosférico presentó el mayor porcentaje de hidrólisis (PC3). En cambio, ocurría el fenómeno inverso en condiciones básicas (pH 9.3), de forma que esta última PC se hidrolizaba en un bajo porcentaje, mientras que la muestra expuesta a condiciones de oxígeno atmosférico durante más tiempo presentó un elevado porcentaje de peroxidación (PC1). Realmente, la PC1 ha sufrido el fenómeno de oxidación e hidrólisis en las condiciones más drásticas del ensayo, por lo que es lógico el resultado obtenido.

Finalmente, las microfotografías de las muestras de los liposomas revelaron que el porcentaje de peroxidación analizado era directamente proporcional a los aglomerados de vesículas formados, resultado indicativo de la modificación de la bicapa de PC cuando ésta sufre proceso de oxidación.

Conclusión

La utilización de metanol como disolvente orgánico en la formación de la película de PC tras rotaevaporación y una disolución tampón de fosfatos ajustado a pH 6.0 minimiza el proceso de peroxidación lipídica de la PC. Estos resultados serán utilizados con posterioridad en la evaluación del efecto que determinados antioxidantes ejercerán sobre la PC sometida a condiciones drásticas de oxidación e hidrólisis.

Bibliografía

1. Gritt M., Crommelin D.J.A., Chem. Phys. Lipids, 64, 3 – 18, (1993)
2. Pasarassi T., Giusti A.M. et al., Free Radic. Biol. Med., 19, 511 – 516, (1995).
3. Samuni, A.M., Lipman A., et al, Che, Phys. Lipids, 105, 121 – 134, (2000).
4. Zuidam N.J., Barenholz Y., Biochim. Biophys. Acta, 1329, 211 – 222, (1997).

Autor de contacto:

*María Luisa González Rodríguez
malugoro@hotmail.com
Universidad de Sevilla
C/ Prof. García González, s/n
41012 Sevilla
Telf.: 954556618
Fax: 954556726*