

# Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas



**J. Batalla Mayoral, A. Cuadros Moreno, E. San Martín-Martínez**  
*Centro de Investigación Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del Instituto Politécnico Nacional, Legaria 694. Colonia Irrigación 11500 México D. F.*

**E-mail:** sanmartinedu@hotmail.com

(Recibido el 5 de Octubre de 2014, aceptado el 14 de Diciembre de 2014)

## Resumen

Los liposomas se emplean para transportar fármacos en su interior debido a que son excelentes vehículos por su tamaño y su biocompatibilidad; sin embargo estos pueden ser inestables, y la distribución de tamaño puede ser no homogéneo. La propiedad del potencial zeta que mide el potencial de la doble capa nos puede servir para controlar la estabilidad y mantener homogénea la distribución del tamaño de los liposomas. En este estudio se ha observado que, los liposomas almacenados a 6°C son estables para potencial zeta entre  $\pm 30$ mV. Cuando el potencial disminuye se tienen agregaciones de los liposomas, lo cual aumenta su tamaño, y presentan una distribución no homogénea; como el caso de liposomas conteniendo taxol (distribución bimodal) y que han sido almacenados a -12°C durante más de 30 días.

**Palabras clave:** Liposomas, potencial zeta, estabilidad de liposomas.

## Abstract

Liposomes are used to carry drugs in their interior, they are excellent vehicles because its size and biocompatibility. However they may be unstable, and the size distribution may be inhomogeneous. The zeta potential by measuring the potential of the double layer, serves to control the stability and maintain uniform the size distribution of liposomes. In this study it was observed that the liposomes are stable stored at 6 °C, when the zeta potential was of  $\pm 30$ mV. But when the potential decrease, the aggregation of the liposomes increase its size, and have an inhomogeneous distribution; as the case of taxol-containing liposomes (bimodal distribution) and have been stored at -12 °C for more than 30 days.

**Keywords:** Liposomes, zeta potential, Stability of liposomes.

**PACS:** 01.30.Rr, 01.40.E-

**ISSN 1870-9095**

## I. INTRODUCCIÓN

El potencial zeta es una propiedad de los materiales que miden el potencial electrocinético en sistemas coloidales en la química coloidal; se denota por lo general con la letra griega *zeta*. Desde un punto de vista físico, el potencial zeta es el potencial eléctrico en la doble capa interfacial; es decir que es el punto donde se unen la capa difusa y la de Stern.

También el potencial zeta es la diferencia de potencial entre el medio de dispersión y la capa estacionaria unido a la partícula dispersada. Este valor puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial, no pueden medirse en los fluidos [1, 2, 3, 4, 5, 6].

La importancia del potencial zeta es: que su valor puede estar relacionado con la estabilidad de las dispersiones coloidales. El potencial zeta indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes, cargadas en una dispersión [7].

Para las moléculas y partículas que son lo suficientemente pequeños, un alto potencial zeta le confiere

estabilidad, es decir, la solución o dispersión se resistirá a la agregación.

Cuando el potencial es bajo, se tiene atracción entre las partículas, se supera a la repulsión y se forman flóculos, en lugar de dispersión. Por lo tanto, los coloides de alto potencial zeta se estabilizan eléctricamente, mientras que, los coloides con bajos potenciales zeta tienden a coagular o flocular [8]. También la estabilidad de las dispersiones depende del balance entre las cargas electrostáticas repulsivas en la partícula coloidal y las fuerzas de atracción de van der Waals [9].

El potencial zeta se utiliza ampliamente para la cuantificación de la magnitud de la carga eléctrica en la capa doble. Sin embargo, el potencial zeta no es igual al potencial de la superficie o potencial eléctrico Stern en la doble capa.

Estos supuestos de igualdad deben aplicarse con cautela [10 y 11]. Sin embargo, el potencial zeta es a menudo la única ruta disponible para la caracterización de las propiedades de doble capa. El potencial zeta no se debe

J. Batalla Mayoral, A. Cuadros Moreno, E. San Martín-Martínez confundir con el potencial de electrodo o potencial electroquímico.

Los liposomas son vesículas esféricas cerradas que consisten en una bicapa lipídica que pueden estar compuestos de fosfolípidos sintéticos o naturales, su tamaño varía entre 100 nm y 2.5 micras. Con base al número de capas (laminaridad) y diámetro, los liposomas se clasifican en vesículas multilaminares (MLVs, diámetro mayor a 200 nm), vesículas grandes unilaminares (LUVs, diámetro de 100-400 nm), y vesículas pequeñas unilaminares (SUVs, diámetro menor a 100 nm) [12].

Según González-Pérez [13], el tamaño de los liposomas para SUV está entre 20-50 nm, LUV 70-200 nm y otros de 0.02 micras a 3.5 micras.

En base a la carga superficial (potencial  $\zeta$ ), los liposomas se clasifican en liposomas catiónicos, neutrales y aniónicos.

Además, los liposomas pueden ser diseñados con propiedades únicas como son, largo tiempo de circulación sistémica, especificidad de la célula blanco, sensibilidad a la temperatura, sensibilidad a pH y ambiente reductivo.

Esto se logra con la selección de la composición lipídica apropiada y la modificación de la superficie de los liposomas [14]. Estas moléculas se agrupan hacia el centro de la estructura con el fin de aislarse del contacto del agua. En las membranas biológicas hay moléculas anfífilas que son fosfolípidos, su cabeza polar posee un grupo fosfato [13].

Los componentes mayoritarios de los liposomas son siempre lípidos, como la fosfatidilcolina o lecitinas, fosfatidiletanolaminas, fosfatidilserinas, etc. [13].

Los liposomas se forman espontáneamente cuando los fosfolípidos son hidratados. Pero son necesarias etapas adicionales para modificar su distribución de tamaño y lamelaridad. Se han establecido algunos métodos para la preparación de liposomas basados en la escala de preparación y otras consideraciones como la eficiencia de encapsulación del fármaco [14].

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Preparación de liposomas y nanoencapsulación de taxol

Se desarrolló el sistema de nanoencapsulación liposomal por el método de Bangham [15], el cual consistió en disolver lecitina de soya y colesterol (4:1 masa respectivamente) en una mezcla de solventes orgánicos de cloroformo y metanol (relación de 9:1 volumen respectivamente). Se agitó durante 10 minutos con un agitador magnético a 350 rpm. Se incorporó el taxol (Paclitaxel TXD01 Cytoskeleton) disuelto en etanol (0.1 mM) para obtener diferentes concentraciones de taxol en la formulación liposomal (0.5, 1, 2 y 20  $\mu\text{g/ml}$ ).

Se evaporaron los solventes orgánicos durante 2 horas, para obtener la película lipídica en un rotavapor (Yamato RE500) a una temperatura de 37°C, a 25 cm de Hg de presión y con una rotación de 50 rpm. La película lipídica

fue hidratada con una solución de agua desionizada y propilenglicol (24:1 volumen respectivamente), y se agitó suavemente a 50 rpm durante 2 horas en un baño de hielo.

Una vez formada la solución liposomal, fue sonicada (Ultrasonido Elma-D78224) durante 5 minutos a 25 °C, 25 KHz y 60% de potencia. Para homogenizar el tamaño de la formulación liposomal, se ultrafiltró varias veces con una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  de permeación (Pellicon XL device, Millipore), hasta obtener una solución transparente. De esta forma se prepararon liposomas vacíos y cargados (taxol), y se realizaron muestras liposomales por triplicado.

### B. Distribución de tamaño y potencial $\zeta$

El tamaño (diámetro hidrodinámico) y distribución de tamaño de los liposomas fue determinado por dispersión de luz dinámica (DLS) con el equipo Nano Zetasizer Malvern, modelo ZEN 3600, y la carga superficial fue determinado por el potencial  $\zeta$ , accesorio disponible en el mismo equipo.

Para observar la estabilidad de los liposomas durante el almacenamiento a temperatura ambiente, 6°C y a -12°C fue evaluado el tamaño y carga con el mismo equipo Nano Zetasizer durante 5 meses.

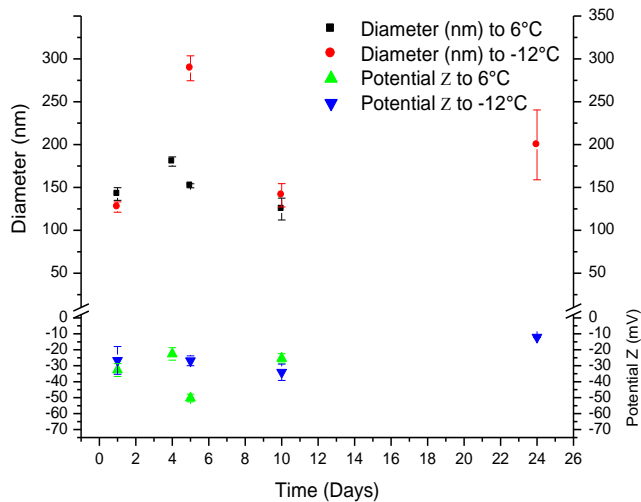
## III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### A. Estabilidad de los liposomas vacíos

La estabilidad de los liposomas cuando fueron almacenados (a temperatura ambiente, a 6°C y a -12°C), fue determinada por la variación del tamaño o diámetro hidrodinámico y por el potencial Z. Los liposomas frescos presentaron un diámetro entre 130 nm y 150 nm; después de almacenados a temperatura ambiente durante 5 días, mantienen su tamaño y carga ( $131 \pm 6.3$  nm,  $-17.5 \pm 2.6$  mV). Después de 18 días de almacenamiento, el tamaño incrementa a  $274 \pm 4.8$  nm, y disminuye su carga ( $-9.2$  mV). Este resultado puede ser consecuencia de la agregación de pequeños liposomas entre sí, o a la agregación de los liposomas menores hacia los mayores, lo cual incrementa el tamaño. Esto posiblemente se debe a la disminución de la carga superficial o del potencial Z, lo que reduce la repulsión de cargas facilitando su agregación. Los liposomas sin taxol conservados a 6°C no cambiaron significativamente su tamaño; como se observa en la Figura 1, mantuvieron un tamaño de aproximadamente 150 nm durante los 10 días de almacenamiento. Sin embargo cuando los liposomas fueron almacenados a -12°C, tenían un tamaño inicial de  $127.1 \pm 6.0$  nm y después de 5 días de almacenamiento, incrementaron su tamaño a  $289 \pm 14.5$  nm.

Mayor tiempo de almacenamiento (10 días) reduce el tamaño ( $140.9 \pm 13.6$  nm) y por 24 días incrementa a valores de  $199.7 \pm 40.7$  nm; y el potencial se reduce entre las diversas muestras almacenadas. Las fluctuaciones en cuanto al tamaño probablemente se deben a la temperatura y a la disminución del potencial Z, favoreciendo a la agregación de los liposomas.

El potencial  $\zeta$  es un parámetro usado para describir el potencial en la doble capa cercano a la superficie de las nanopartículas. El cual está influenciado por la composición de la partícula y el medio en el que se dispersa. Las nanopartículas con un potencial z fuera del rango  $\pm 30$  mV han demostrado ser estables en suspensión, debido a que la carga superficial evita la agregación de las partículas [16].



**FIGURA 1.** Estabilidad de liposomas sin contener taxol durante el almacenamiento a 6 °C y -12°C evaluados por el diámetro hidrodinámico y potencial  $\zeta$ .

### B. Estabilidad de los liposomas conteniendo taxol

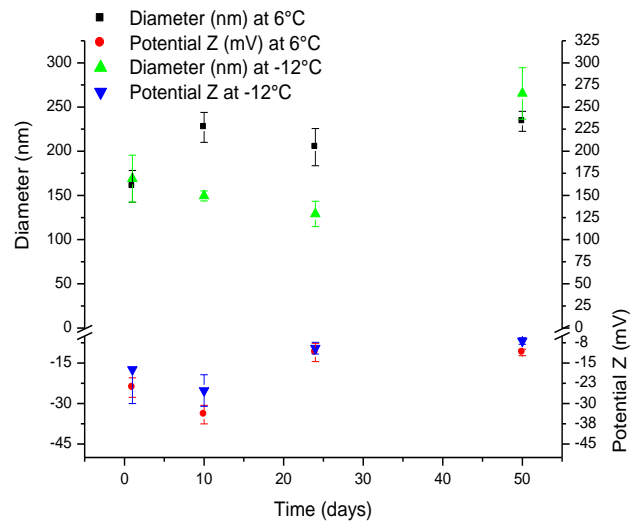
Al evaluar los liposomas conteniendo taxol (Figura 2) a diversas concentraciones y temperatura de almacenamiento 6°C y -12°C se observa que a mayor tiempo de almacenamiento se incrementa el tamaño debido a la reducción del potencial en la doble capa de los liposomas, como se indicó en el comportamiento de los liposomas vacíos. La temperatura de almacenamiento de los liposomas a -12°C afecta más que a 6°C, debido a que en la temperatura por debajo de cero se tiene una transición de fase lo que promueve la agregación entre los liposomas. Sin embargo, inicialmente se reduce su tamaño para un tiempo de almacenamiento de 25 días, y posteriormente incrementa a los 50 días. El contenido de taxol en los liposomas no presenta un efecto significativo en la estabilidad de los liposomas, dentro del intervalo de estudio (0.5, 1.0, 2.0, y 20  $\mu\text{g/ml}$ ), y a diferentes concentraciones de taxol los liposomas tienen similar comportamiento de estabilidad en cuanto al tamaño y carga superficial. Es decir, que los liposomas son más afectados por el tiempo de almacenamiento y por la temperatura, que por su contenido de taxol. Por otro lado, Videira *et al.* [17] observaron que concentraciones de taxol entre 82.5 a 125  $\mu\text{g/ml}$  no alteran la estabilidad en nanopartículas sólidas lipídicas, y cuando se incrementa la concentración a 150  $\mu\text{g/ml}$  observaron ligera inestabilidad.

### Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas

Pero a 300  $\mu\text{g/ml}$  se tiene inestabilidad, se observa la formación de cristales en la superficie de sus nanoestructuras lipídicas a las 72 h de conservación. Patel *et al* [18] no observaron diferencias significativas tanto en el diámetro hidrodinámico (180 y 200 nm), como en el potencial  $\zeta$  (23 a 32 mV) sobre liposomas cargados con tariquidar y/o taxol.

En nuestro caso los liposomas cargados con taxol incrementaron ligeramente su tamaño (160 nm).

La fuerza iónica de MA (Madecassoside, saponina triterpenoide extraída de *Centella asiática*), encapsulada en liposomas fue mayor que la de los liposomas sin MA. Lo cual puede estar relacionado con las cargas positivas-negativas del dipolo de la lecitina de soya, y con la carga positiva de la colina que se encuentra en la superficie de los liposomas, la cual gradualmente incrementa la adsorción de aniones. Las cargas negativas acumuladas tienen un balance con los cationes en la suspensión de liposomas para formar una nueva doble capa, probablemente sea la razón del cambio en el potencial  $\zeta$  de los liposomas sin MA. Los liposomas sin MA presentaron una fuerza iónica débil. El MA y el colesterol podrían generar más aniones que pueden ser atraídos por las cargas de la fosfatidilcolina a pH=7, lo cual puede obstaculizar la fluidez de la membrana formando grandes partículas contribuyendo a la buena estabilidad de la bicapa de fosfolípidos [19].



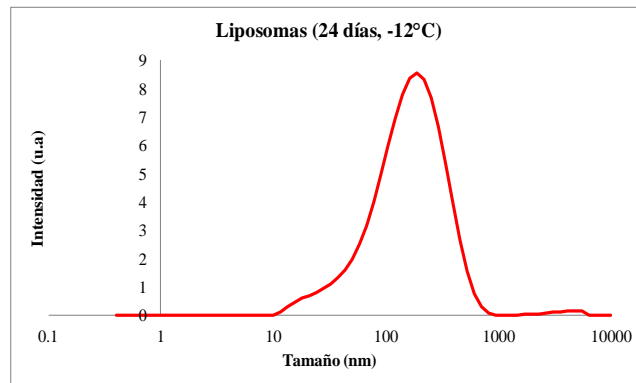
**FIGURA 2.** Estabilidad de liposomas que contienen 20 $\mu\text{g/ml}$  de taxol, durante el almacenamiento evaluados a través del diámetro hidrodinámico (a 6 °C y -12°C) y potencial  $\zeta$  (a 6°C y -12°C).

Como se puede observar en la Tabla I a medida que transcurre el tiempo de almacenamiento a 6°C hasta 50 días el tamaño incrementa ligeramente, y también incrementa su desviación estándar. Esto puede estar relacionado con los procesos de degradación de los liposomas como: peroxidación de lípidos, hidrólisis liposomal, fase de transición y agregación.

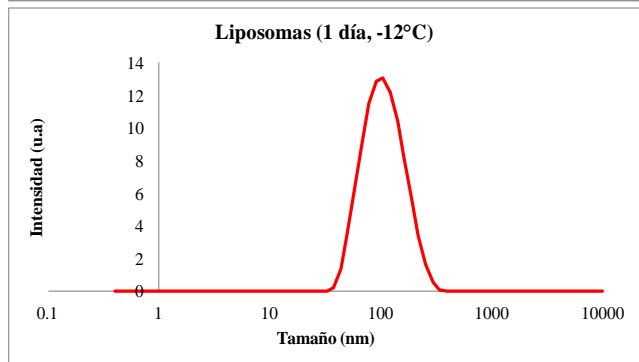
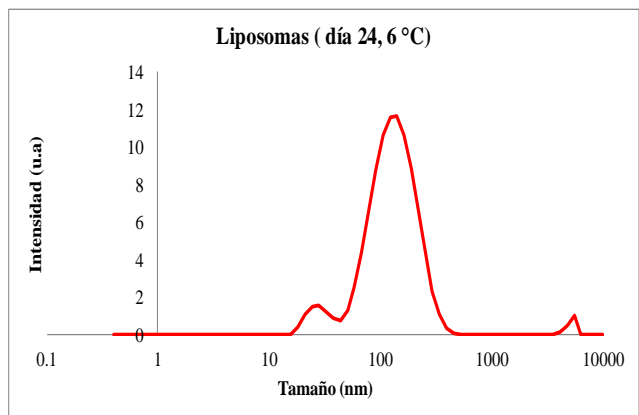
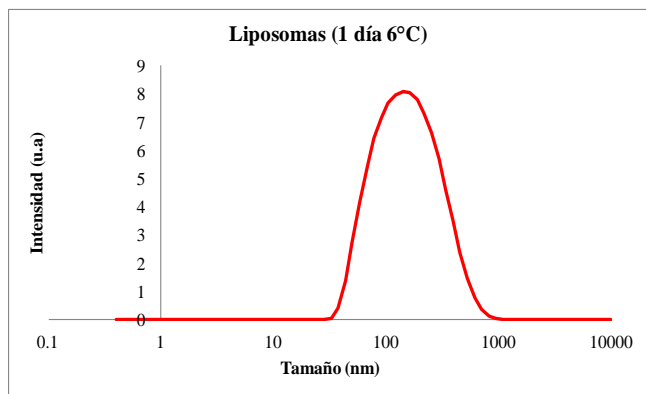
**TABLA I.** Tamaño y potencial Z para liposomas vacíos a diferentes temperaturas de almacenamiento (6°C y -12°C).

T (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial Z (mV)
6	1	142.3±7.4	-32.7±4.0
6	10	124.8±12.9	-25.4±2.9
6	24	150.6±3.0	np
6	50	175.7±27.7	-27.3±1.6
-12	1	127.1±6.0	-26.7±8.7
-12	10	140.9±13.6	-34±3.2
-12	24	199.7±40.7	-1.21±0.2
-12	50	92.21±25.8	-20.6±0.7

La distribución de tamaño para los liposomas solos mantenidos a 6°C fue monodal para 1, 10 y 24 días con potencial ζ muy semejante (-32.7 mV a -25.4 mV) como se observa en la Figura 3.



**FIGURA 3.** Distribución de tamaño de los liposomas almacenados a 6°C y -12°C.



La estabilidad de los liposomas que contenían taxol (20 µg/ml) almacenados a 6°C se presenta en la Tabla 3 y Figura 4. Se observa un incremento de 160.3 nm a 233.8 nm con respecto al tiempo de almacenamiento (50 días); además podemos observar que las desviaciones estándar son más grandes conforme incrementa el tamaño. Lo anterior nos podría indicar que la formulación liposomal se desestabiliza a través del tiempo; de igual manera su potencial ζ va disminuyendo al incrementar el tiempo hasta 50 días, de -24.1 mV hasta -11.1.

El tamaño en los liposomas que contenían taxol (20 µg/ml) almacenados a -12 °C (Tabla II, Figura 4) fue disminuyendo de 169 nm a 129.1 nm con respecto al tiempo de almacenamiento (24 días) además mostraron curvas de distribución de tamaño monodales hasta 24 días.

Lo anterior nos podría indicar que la formulación liposomal se está desestabilizando teniendo distribución bimodal en las dos temperaturas de almacenamiento como observa en la Figura 5. Pero además, Videira *et al.* [15] mencionan que cuando se desestabilizan bruscamente los liposomas-taxol, el taxol tiende a liberarse, y el tamaño de los liposomas disminuye. Estos autores reportaron que la disminución de tamaño de las nanopartículas lipídicas-taxol estuvo relacionada con la menor cantidad de taxol atrapado.

El potencial ζ va disminuyendo al incrementar el tiempo hasta 50 días, de -17.4 mV hasta -6.83.

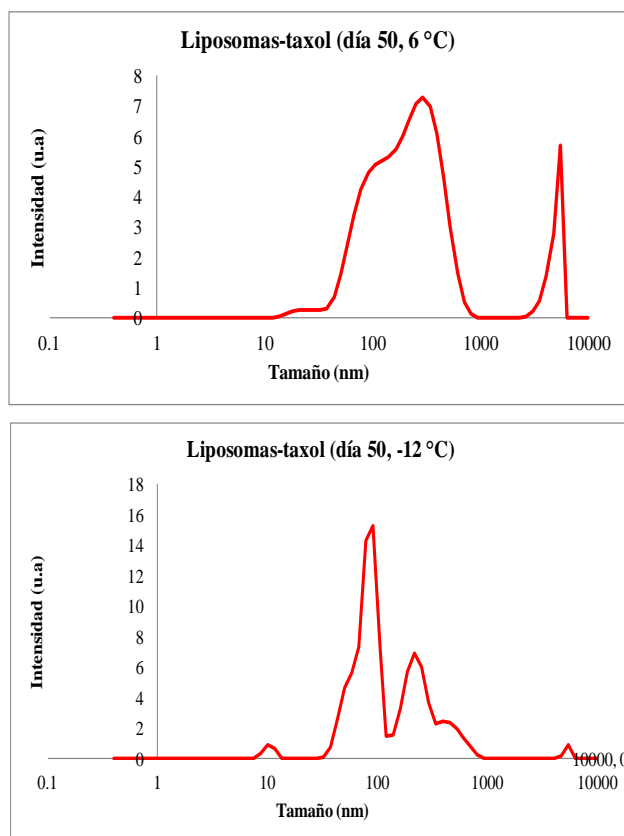
Cómo se puede observar, el potencial ζ de liposomas solos es más negativo en comparación con liposomas-taxol (20 µg/ml). Por lo tanto, son más estables los liposomas solos, y el cambio en potencial ζ de los liposomas que contenían taxol sugiere un encapsulamiento del taxol.

Además el tamaño de los liposomas que contenían taxol es ligeramente mayor en comparación con los liposomas solos.

**TABLA II.** Tamaño y potencial Z para liposomas que contienen taxol (20 µg/ml) a diferentes temperaturas de almacenamiento (6°C y -12°C).

T (°C)	Tiempo de almacenamiento (días)	Diámetro hidrodinámico (nm)	Potencial ζ (mV)
6	1	160.3±17.9	-24.1±3.6
6	10	227±37	-34.1±2.1
6	24	204.7±58.1	-11.1±3.4
6	50	233.8±15.4	-11.1±1.2
-12	1	169±26.5	-17.4±12.6
-12	10	149.5±5.6	-25.2±5.9
-12	24	129.1±14.4	-9.5±2.2
-12	50	265.5±29.2	-6.83±1.2

\* significant difference if,  $p < 0,05$ .



**FIGURA 4.** Distribución de tamaño de los liposomas con taxol almacenados a 6°C y -12°C.

#### IV. CONCLUSIONES

Los resultados nos indican que los liposomas se mantienen estables dependiendo de la temperatura de almacenamiento, es decir a 6°C son más estable que a -12°C. Cuando los liposomas contienen en su interior taxol, disminuye su estabilidad, teniendo una distribución de nanocápsulas bimodal conforme incrementa el tiempo de almacenamiento.

Este comportamiento fue caracterizado a través del

Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas potencial ζ. Es decir, conforme el potencial de la doble capa disminuye los liposomas se agregan, y presentan distribuciones bimodales; y cuando se mantiene potenciales cercanos o mayores a ± 30 mV los liposomas son estables en tamaño y carga.

#### AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a SIP-IPN y COFFA-IPN, México, y también gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la concesión de una beca.

#### REFERENCIAS

- [1] Overbeek, J. T. G., *Colloid science. Vol. 1*, (Elsevier, Amsterdam, 1952).
- [2] Gileadi, E., Kirowa-Eisner, E. and Penciner, J., *Interfacial electrochemistry: an experimental approach*, (Addison-Wesley, Reading: USA, 1975).
- [3] Hunter, R. J., *Foundations of colloid science. Vol. 2*, (Clarendon Press, Oxford, 1989).
- [4] Lyklema, J. H., *Fundamentals of interface and colloid science*, (Academic Press, London 1991).
- [5] Bard, A. J. and Faulkner, L. R., *Electrochemical methods: fundamentals and applications*, (Wiley, New York, 2001).
- [6] Kralchevsky, P. A., Danov, K. D. and Denkov, N. D., *Handbook of Surface and Colloid Chemistry*, (CRC Press, Boca Raton: USA, 2003).
- [7] Hunter, R. J., *Zeta potential*, In: *Colloid Science: Principles and Applications*, (Academic Press, UK, 1988).
- [8] Brian J., Kirby Ernest F. and Hasselbrink Jr. *Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations*, *Electrophoresis* **25**, 187–202 (2004).
- [9] Hu, H., Yu, A., Kim, E., Zhao, B., Itkis, M. E., Bekyarova, E., Lopes, M. A., Monteiro, F. J. Santos, J. D. Serro, A. P. and Saramago B., *Hydrophobicity, surface tension, and zeta potential measurements of glass reinforced hydroxyapatite composites*, (John Wiley & Sons, Inc., 1999).
- [10] Lyklema, J., *Electrokinetics after Smoluchowski*. *Colloids Surf. A* **222**, 5–14 (2003).
- [11] Werner, C., Korber, H., Zimmermann, R., Dukhin, S. and Jacobasch, H. J., *Extended electrokinetic characterization of flat solid surfaces*, *J Colloid Interface Sci.* **208**, 329-346 (1998).
- [12] Malam Y, Loizidou, M. M. and Seifalian A., *Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer*, *Trends in Pharmacological Sciences* **30**, (2009).
- [13] González Pérez, M., *Los liposomas: usos y perspectivas*, *Revista Cubana de Química* **16**, 8-33 (2004).
- [14] Thassu, D., Deleers, M. and Pathak Y. (Eds.). *Nanoparticulate drug delivery systems*, (Informa Healthcare, New York, 2007).

*J. Batalla Mayoral, A. Cuadros Moreno, E. San Martín-Martínez*

[15] Navarro, G., Cabral, P., Malanga, A. and Savio, E., *Diseño de liposomas para el transporte de diclofenaco sódico*, Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm. **37**, 212-223 (2008).

[16] Velasco-Rodríguez, V., Cornejo-Mazón, M., Flores-Flores, J. O., Gutiérrez-López, G. F. and Hernández-Sánchez, H., *Preparation and properties of alpha-lipoic acid-loaded chitosan nanoparticles*, Revista Mexicana de Ingeniería Química **11**, 155-161 (2012).

[17] Videira, M. A., Arranja, A. G. and Gouveia, L. F., *Experimental design towards an optimal lipid nanosystem: A new opportunity for paclitaxel-based therapeutics*,

European Journal of Pharmaceutical Sciences **49**, 302-310 (2013).

[18] Patel, R. N., Rathi, A., Mongayt, D. and Torchilin, V., *Reversal of multidrug resistance by co-delivery of tariquidar (XR9576) and paclitaxel using long-circulating liposomes*, Pharmaceutical Nanotechnology **416**, 296-299 (2011).

[19] Wang, H., Liu, M. and Du, S., *Optimization of madecassoside liposomes using response surface methodology and evaluation of its stability*, Pharmaceutical Nanotechnology **473**, 280-285 (2014).