



Revista Cubana de Química

ISSN: 0258-5995

revcubanaquimica@cnt.uo.edu.cu

Universidad de Oriente

Cuba

Tamargo-Santos, Beatriz; Herrera-Belén, Lisandra; Bello-Alarcón, Adonis; Cuéllar, Armando; González-Rodríguez, Humberto; Sierra-González, Gustavo; Morales-González, Maraelys; Ortiz-Zamora, Lisset

OBTENCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS A PARTIR DE LA LECITINA DE SOYA (Glicine max L), PARA USOS BIOMÉDICOS

Revista Cubana de Química, vol. XXIII, núm. 3, 2011, pp. 5-14

Universidad de Oriente

Santiago de Cuba, Cuba

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=443543724001>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

OBTENCIÓN DE FOSFOLÍPIDOS A PARTIR DE LA LECITINA DE SOYA (*Glicine max L*), PARA USOS BIOMÉDICOS

Beatriz Tamargo-Santos¹, Lisandra Herrera-Belén¹, Adonis Bello-Alarcón¹, Armando Cuéllar¹,
Humberto González-Rodríguez², Gustavo Sierra-González², Maraelys Morales-González³, Lisset Ortiz-Zamora³

gsierra@finlay.edu.cu

¹Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, Cuba, ²Instituto Finlay, Centro de Investigación-Desarrollo y Producción de Vacunas y Sueros, Ciudad de la Habana, Cuba, ³Facultad de Ciencias Naturales, Universidad de Oriente, Santiago de Cuba

● Resumen

Los fosfolípidos son moléculas anfipáticas, que forman parte de las membranas celulares y cumplen importantes funciones biológicas. Se extraen de diferentes fuentes, una de las más empleadas en la industria biofarmacéutica, cosmética y alimenticia, es la planta de Soya (*Glicine max L*), a partir de la cual por diferentes métodos de extracción, se obtienen los fosfolípidos con alta pureza. Los fosfolípidos son producidos y comercializados por diferentes compañías con un alto precio en el mercado. Se emplean como medicamentos, suplementos nutricionales y en la elaboración de sistemas de liberación, de diferentes compuestos con propósitos biomédicos. El presente trabajo propone una metodología para extraer los fosfolípidos de la pasta de lecitina de soya. El método utilizado fue la extracción líquido/líquido seguido de cromatografía en columna. Por CCD, utilizando patrones comerciales y/o el factor de retardo (R_f) descritos, se identificaron los posibles fosfolípidos de la fracción enriquecida en los mismos. Los fosfolípidos totales y otros componentes de la Lecitina se identificaron y cuantificaron por métodos enzimáticos, bioquímicos y químico/físicos. La extracción de los fosfolípidos de soya fue eficiente, eliminándose contaminantes como proteínas y polisacáridos. Mediante la cromatografía en columna se separó la mezcla de los componentes lipídicos según sus polaridades, identificándose a través del R_f , en las fracciones cloroformo y acetona componentes grasos indeseados, quedando en la metanólica la mezcla de fosfolípidos de interés, conteniendo fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, estando enriquecido en fosfatidilcolina y fosfatidilserina, composición y pureza adecuada para su empleo en formulaciones farmacéuticas.

Palabras clave: fosfolípidos, lecitina de soya, cromatografía en columna, cromatografía en capa delgada.

● Abstract

The phospholipids are amphipathic molecules that are part of the cellular membranes and complete important biological functions. They are extracted of different sources; one of the most used in the biopharmaceutical, cosmetic and nutritional industries is the plant of Soya (*Glicine max L*), starting from these for different extractions methods, phospholipids are obtained with a high purity. Phospholipids are produced and commercialized by dissimilar companies with the high price in the market. They are used as medications, nutritional supplements and in elaboration of delivery systems, of diverse compounds with biomedical purposes. The present work proposes a methodology to extract the phospholipids of the Soya Lecithin paste. The used method was the liquid-liquid extraction followed by chromatography in column. By TLC with commercial standards and the retard factor (R_f) described, the possible phospholipids of the fractions were identified enriched in the same ones. The total phospholipids and other lecithin components were identified and quantified for enzymatic, biochemical and physical-chemical methods. The extractions of the Soya phospholipids were efficient, being eliminated, impurity as proteins and polysaccharides. By means of the chromatography in column were separate the mixture of the lipid component according to their polarities, being identified through the R_f in the fractions with chloroform and nail polish remover undesirable fatty components, being in the methanol the mixture of phospholipids of interest, containing phosphatidylethanolamine, phosphatidylinositol being enriched in phosphatidylcholine and phosphatidylserine; appropriate composition and purity for their use in pharmaceuticals formulation.

Keywords: phospholipids, soya lecithin, flash chromatography, thin layer chromatography.

● Introducción

Los lípidos son biomoléculas muy diversas. Con el reconocimiento del papel de los lípidos en muchas enfermedades metabólicas como la obesidad, aterosclerosis, accidentes cerebro vasculares, la hipertensión y la diabetes, se inicia un campo de investigación relativamente reciente, la lipidómica, que ha sido impulsado por los rápidos avances en las tecnologías /1/.

Los fosfolípidos, son moléculas de características anfipáticas que forman parte de las membranas celulares y cumplen importantes funciones biológicas en el crecimiento, maduración y el propio funcionamiento de las células, siendo esenciales para la salud humana.

La industria farmacéutica se interesa por los lípidos y en particular, por la lecitina de la soya, que entre otras aplicaciones, se emplea como emulsionante en diferentes formas farmacéuticas terapéuticas, cosméticas y nutraceuticas. Los granos de soya contienen importantes sustancias nutritivas: albúminas, materias grasas, hidratos de carbono, lecitina, vitamina y sales minerales. Su contenido en lípidos es de entre un 15 % a un 20 %, constituidos por ácidos grasos, mayoritariamente insaturados (oleico y linoleico). La lecitina de soya es un complejo de fosfolípidos formado por fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilinositol. Es ideal para el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares y niveles de colesterol altos o con un coeficiente HDL/ LDL desequilibrado. Los minerales altamente biodisponibles presentes en la lecitina (calcio, hierro, magnesio, fósforo, potasio, sodio, y trazas de selenio, zinc, estroncio y cobre) hacen recomendable su utilización alimenticia y complementaria en la prevención de accidentes vasculares y reducción del riesgo de formación de trombos. Estudios recientes han demostrado que la fosfatidilserina (uno de los fosfolípidos en que es rica la lecitina de soya) mejora, en cierta medida, la memoria y la capacidad cognitiva. La vitamina E que la lecitina de soya contiene, le confiere propiedades antioxidantes, que protege tanto a los ácidos grasos poli insaturados, al evitar su oxidación y la producción de radicales libres, como también a las demás células del organismo. Por estimular la división celular de los tejidos, se atribuye

a la lecitina de soya la renovación de los mismos y la regeneración de las células. Además de estos componentes la lecitina de soya es rica en proteínas y carbohidratos /2, 3/.

En la industria cosmética la lecitina se utiliza como sustancia emulsionante y antioxidante y para aumentar la estabilidad del cosmético, humidificarle y asegurar la repartición homogénea de las grasas /2/.

La elaboración de diferentes sistemas de entrega de sustancias biológicamente activas, empleando fosfolípidos y otros lípidos, ha sido descrita ampliamente en la literatura. Entre los múltiples usos, de estas moléculas, se encuentra la elaboración de liposomas y cocleatos, como vehículos de compuestos con diversas aplicaciones biomédicas; numerosos fármacos y biomoléculas que incluyen antitumorales, antimicrobianos, hormonas, inmunomoduladores, material genético, antígenos vacunales, entre otras han sido incorporados en liposomas y/o cocleatos /4, 5, 6/.

La capacidad de los liposomas para potenciar la respuesta inmune contra un antígeno encapsulado fue descubierta por Allison y Gregoriadis en 1974 /7/, y posteriormente ha sido confirmada para una amplia variedad de antígenos de bacterias, virus, protozoos, tumores y otras fuentes /8, 9, 10, 11, 12/, lo que ha permitido al igual que los cocleatos, su empleo como adyuvante en vacunas. Los cocleatos tienen la ventaja de ser empleados por vía mucosal, induciendo respuesta inmune tanto mucosal como sistémica, además de incrementar la estabilidad y disponibilidad de diversas moléculas /13, 14, 15/.

Una de las principales limitaciones en la elaboración de liposomas y cocleatos como sistemas de entrega de sustancias bioactivas y específicamente de antígenos vacunales es la disponibilidad de fosfolípidos de calidad farmacéutica, los que se producen por varias compañías, pero su precio en el mercado internacional es muy elevado. Es posible emplear la lecitina de Soya para tales fines, sin embargo para formar los cocleatos a partir de liposomas se necesita purificar la lecitina y obtener un producto con alto contenido de fosfatidilserina, ya que los fosfolípidos de Soya sin purificar no forman estas estructuras /16/. En el presente trabajo, se describe

una metodología para extraer los fosfolípidos de soya, a partir de la lecitina, se demuestra que empleando este procedimiento se separan proteínas, carbohidratos y ácidos grasos y se obtienen los fosfolípidos libres de estos contaminantes, en la fracción rica en estos compuestos se identificaron la fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, siendo la fosfatidilcolina y la fosfatidilserina, los fosfolípidos mayoritarios del extracto. La pureza y composición de la mezcla, permite elaborar liposomas y cocleatos con diversas aplicaciones biomédicas.

● Métodos experimentales

Lecitina de soya

Se obtiene como subproducto de la industria alimenticia, en el proceso de fabricación del aceite de soya comestible, con un refinamiento para alcanzar la calidad farmacéutica, fue adquirida de la firma de la India Gujarat Ambuji Exports Limited, Ahmedabad 380014 (Gujarat) India, posee certificados CERT-ID y Kosher.

Extracción líquido-líquido

La extracción de los lípidos se realizó modificando la metodología utilizada por /17/, empleando un sistema trifásico de extracción líquido/líquido. La Lecitina de Soya, se trata con una mezcla $\text{CHCl}_3/\text{MetOH}/\text{NaCl}$ (0,9 %) en proporciones (2:1:1), se agita vigorosamente a 300 rpm en un agitador magnético, durante 30 min. La separación de las fases se realiza en un embudo separador, colectándose por separado la fase hidroalcohólica y la fase clorofórmica.

Cromatografía en columna

Se utilizó una columna de vidrio de 60 cm de altura y 9,5 cm de diámetro. El llenado se realizó en seco con 180 g de sílica gel, Kieselgel 60 G, 70-120 mesh, Merck. La muestra se embebe en el mismo peso de celite (10 g/10 g), el cual se coloca sobre la sílica gel en la columna. Se empleó para la elución, un gradiente isotrópico formado por cloroformo, acetona y metanol, en cantidad de 1 L cada uno, empezando con el disolvente de baja polaridad y aumentando gradualmente la polaridad. Se colectan las tres fracciones de forma independiente, se utilizó vacío para facilitar la elución de las mismas. Posteriormente

se concentraron a sequedad de forma independiente en un roto evaporador a vacío, Buchi y temperatura del baño de $35 \pm 2^\circ\text{C}$.

Se realizan cinco corridas cromatográficas, se define como un lote la fracción metanólica de cada columna cromatográfica, después de secada en roto evaporador al vacío y dispensada en bulbos de vidrio (viales R2), almacenados a -20°C , protegidos de la luz.

Las diferentes fracciones se analizaron por cromatografía en capa delgada (CCD), según la técnica que se describe a continuación.

Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se utilizaron placas pre elaboradas de sílica gel F-G 254. La muestra se aplica en 20 μL del disolvente. Se utiliza como sistema de elución para la muestra donde predominan fosfolípidos una mezcla de cloroformo: metanol: hidróxido de amonio en proporción 65:25:4 y para las fracciones donde prevalecen otros lípidos el sistema de disolventes tolueno: cloroformo: metanol en proporción 85:15:5 /18/. Como agente cromogénico se emplea en ambos casos cámara saturada en vapores de yodo. En cada caso se calculan los R_f de las manchas que se observan. Para la muestra que contiene fosfolípidos se utilizaron como patrones de referencia L- α -Fosfatidilcolina, 3-sn-Fosfatidil-L-serine, SIGMA-ALDRICH.

Determinación de la concentración de proteínas

Para la determinación de la concentración de proteínas del extracto hidroalcohólico y el análisis electroforético de las mismas, se tratan las muestras con éter y acetona fría, para eliminar cualquier compuesto lipídico remanente. La concentración de proteínas, se determinó por el método de Lowry, usando como patrón albúmina de suero bovino /19/.

Electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras fueron incubadas a 100°C durante 5 minutos en presencia de 2b-mercapto-etanol (Merck, Germany) y separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5 % (SDS-PAGE), seguida de

una tinción con Comassie R 250 /20/. Se utilizó el patrón de peso molecular (PPM), (MW, Bio-Rad), para determinar el tamaño molecular de los componentes e identificar las proteínas predominantes en cada muestra usando un procesador de imágenes (Image Master 1D Elite Ver. 3.01 Amersham Pharmacia Biotech).

Determinación de carbohidratos

La concentración de los carbohidratos, en el extracto hidroalcohólico, fue evaluada empleando la determinación de la concentración de hexosas por el método del orcinol-sulfúrico, según la técnica descrita por Bruckner en 1955 /21/.

Determinación de las características organolépticas

Se tomó un tubo de ensayo limpio y seco y se llenó hasta las tres cuartas partes con la muestra de ensayo (extracto clorofórmico) y se observó el color y la transparencia del mismo, la presencia de partículas y la separación en capas /22/.

Determinación de la densidad relativa por picnometría

Se pesó un picnómetro seco y vacío, posteriormente se llenó con la porción de ensayo. Se mantuvo a 25 °C durante 15 min, y se ajustó el líquido al nivel empleado. Se pesó cuidadosamente el picnómetro con la porción de ensayo y se repitió la operación con el agua destilada a 25 °C. Estas operaciones se repiten al menos 5 veces. La densidad relativa de la muestra se calculó mediante la fórmula, $D_{25} = (M_1 - M) / (M_2 - M)$ donde, M_1 : peso específico del picnómetro con la muestra, M_2 : peso específico del picnómetro con agua, M : peso específico del picnómetro vacío. Los resultados se aproximan hasta la tercera cifra /22/.

Cuantificación de fosfolípidos totales

La concentración de los fosfolípidos totales fue evaluada, usando el método de mineralización desarrollado por Fiske y Subarow en 1925 /23/. La concentración de fósforo calculada se multiplica por un factor, que permitirá convertir los valores de fósforo total en fosfolípidos presentes en las muestras /24/.

Cuantificación enzimática de fosfolípidos

Se utilizó el juego de reactivos comercial SpinReact para fosfolípidos, el ensayo se realizó a tres muestras de cada uno de los 5 lotes, las que se suspendieron en 1mL de agua destilada.

Preparación de liposomas y cocleatos, empleando los fosfolípidos purificados

Los liposomas se elaboraron a partir de la mezcla de los fosfolípidos purificados por la metodología desarrollada en este trabajo y colesterol (Sigma Aldrich Co.), empleando el procedimiento de deshidratación-rehidratación descrito por Kirby y Gregoriadis en 1984 /25/. Los cocleatos se obtuvieron por adición lenta de cloruro de calcio (0,1 M) a la suspensión de liposomas preformados /26/. Ambas preparaciones de liposomas y cocleatos se almacenaron a 4 °C y protegidas de la luz.

Microscopía electrónica de transmisión y crio fractura

Las imágenes electrónicas fueron obtenidas en un microscopio de Trasmisión JEM 1010 Jeol. Las muestras fueron procesadas por crio fractura, empleando como soporte mica y una cámara de fractura y congelación (Balzers, BAF 060). Se observaron a una magnificación de 100 000x.

Microscopía electrónica de barrido

Se aplicó una gota de las muestras sobre un portaobjeto de vidrio y se secaron a temperatura ambiente durante 12 h. Posteriormente se cubrieron con una fina capa de oro-paladio y se cargaron en un microscopio LEICA 440. Las imágenes se observaron con una magnificación comprendida entre 15x hasta 290.000x y una resolución de 4,5 nm.

● Resultados y discusión

Extracción y purificación de los fosfolípidos contenidos en la Lecitina de Soya

Con la combinación de la extracción líquido-líquido y la cromatografía en columna se estableció una metodología de separación y purificación de los fosfolípidos.

La extracción líquido-líquido es una técnica sencilla, que no necesita de gran equipamiento, muy fácil de reproducir, y ha sido la más empleada para la purificación de compuestos lipídicos /27/. No obstante, a pesar de su sencillez aparente, pueden presentarse dificultades teniendo en cuenta la complejidad de la matriz de partida. Uno de los factores que influye en la separación correcta de los lípidos presentes en la muestra inicial, es la proporción de disolventes, puesto que en dependencia de la misma será el reparto de los componentes de la matriz en cada una de las fases que componen el sistema. En este caso se obtuvo una buena separación entre los componentes lipídicos y

proteicos utilizando el sistema trifásico cloroformo, metanol, cloruro de sodio 0,9 % en las proporciones 2:1:1.

Componentes analizados en la fracción hidroalcohólica

La concentración de proteínas promedio, presente en las muestras ensayadas, fue de 3,72 mg/mL, siendo el coeficiente de variación entre las diferentes determinaciones de 1,2 %. Los perfiles electroforéticos observados fueron muy similares, para todas las réplicas de la muestra, tal como muestra la figura 1.

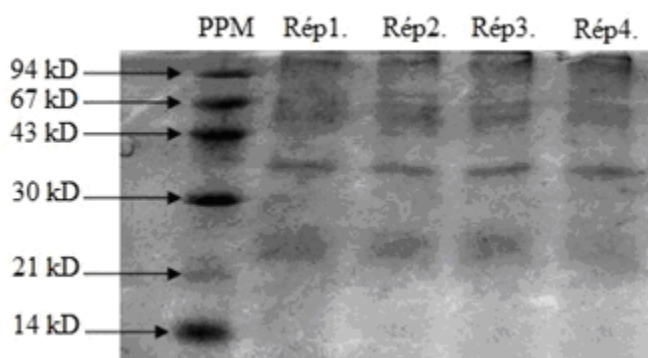


Fig. 1 Perfiles electroforéticos de las proteínas de la fracción hidroalcohólica. PPM: Patrón de Pesos Moleculares; Bandas: 1- Fosforilasa b (94 kDa), 2-Albúmina (67 kDa), 3-Ovoalbúmina (43 kDa), 4-Anhidrasa Carbónica (30 kDa), 5-Inhibidor de Tripsina (20.1 kDa) y 6- α -Lactalbúmina (14.4 kDa). Rép.1, 2, 3 y 4: Patrón electroforético correspondiente a la muestra de extracto hidroalcohólico de soya.

En el análisis densitométrico, de las réplicas, de las muestras de la fracción hidroalcohólica, se estima que la banda mayoritaria tiene un peso molecular de 40,993 kD, la cual representa el 40,25 % del total (resultados no mostrados), pudiendo ser la albúmina, una de las proteínas presentes en la lecitina de soya /2/.

Determinación de carbohidratos

Los valores obtenidos de hexosas 48.062 mg/mL, con un CV de 1,3 %, entre las réplicas, muestran que en la fracción hidroalcohólica, existe una elevada concentración de azúcares, lo cual demuestra que el proceso de purificación fue eficiente, puesto que en esta porción, se eliminó gran cantidad de carbohidratos que, en este caso, se comportan como contaminantes de los fosfolípidos.

En resumen en la fracción hidroalcohólica se pudieron cuantificar proteínas y carbohidratos, siendo 1,16 g de las primeras y 14,624 g de los segundos, de acuerdo al volumen total de esta fase, por lo que a partir de 100 g de lecitina de soya, según la metodología descrita en el presente trabajo, se obtuvieron como sustancias relacionadas un 1,16 % de proteínas y aproximadamente un 15 % de carbohidratos.

Características de la fracción clorofórmica

Luego de llevar a cabo el proceso de extracción líquido/líquido, se obtuvo un extracto de color ámbar oscuro, traslúcido y libre de partículas en suspensión. El cálculo de la densidad relativa arrojó un valor de 1,408, que equivale al peso específico de la muestra líquida. No se observaron diferencias significativas entre los pesos para cada una de las cinco réplicas analizadas (resultados no mostrados). El valor de la

densidad relativa representa el peso específico de los componentes lipídicos presentes en la fracción clorofórmica, que no sólo corresponde a los fosfolípidos, sino también a otros lípidos como ácidos grasos libres, diglicéridos y triglicéridos. Este valor es un parámetro propio de cada sustancia en determinadas condiciones, por lo que sería un indicador de la reproducibilidad de un proceso, desarrollado en las mismas condiciones en que fue calculado.

Purificación de fosfolípidos

La utilización de la cromatografía líquida en columna rápida al vacío, ofrece la ventaja de que mediante su uso se puede aumentar la velocidad de flujo del sistema de disolventes, además de que la columna se puede secar después de recoger cada fracción y se evitan las canalizaciones o grietas entre la sílica.

Se desarrollaron un total de cinco columnas cromatográficas. Cada columna se eluyó con un sistema de gradiente de diferentes polaridades obteniéndose los siguientes eluatos: E_1 : fase móvil 900mL de cloroformo, E_2 : fase móvil 900 mL de acetona y E_3 : fase móvil 900 mL de metanol. Los resultados de la purificación cromatográfica mostraron la separación de los compuestos de interés del resto de los componentes de la mezcla, los cuales eluyeron

de la columna con cloroformo y acetona, mientras que en la fracción metanólica eluyeron los fosfolípidos.

Identificación de los fosfolípidos y sustancias relacionadas

El sistema de disolventes (cloroformo/metanol/hidróxido de amonio (65:25:4)), se utilizó con la finalidad de lograr la identificación de los diferentes fosfolípidos presentes en las fases metanólicas correspondientes a los lotes resultantes de las distintas columnas cromatográficas, así como para comprobar la reproducibilidad del proceso de purificación. Luego de pocos minutos de exposición al sublimado de yodo, apareció una serie de manchas, debidas a la reacción del yodo con los grupos cromóforos presentes en los fosfolípidos. La intensidad de las manchas varía en dependencia de la concentración de fosfolípidos presentes en la muestra. El resultado obtenido del cálculo de los R_f de las diferentes manchas en cada lote, revela que los fosfolípidos presentes en la fracción metanólica pudieran ser, fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, y fosfatidiletanolamina, resultados que coinciden con lo descrito en la literatura /2, 3/.

La identificación de los fosfolípidos también permitió demostrar la reproducibilidad del proceso de purificación, puesto que se observó que los 5 lotes obtenidos, presentan similar composición, figura 2.

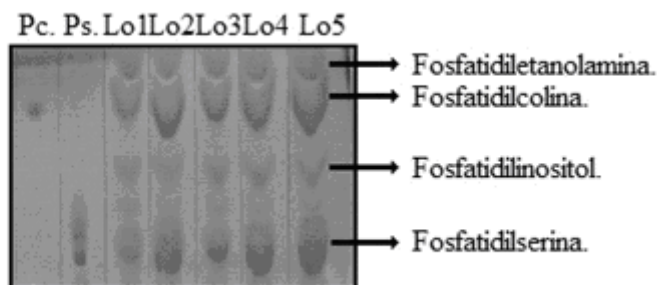


Fig. 2 Identificación de fosfolípidos de Lecitina de Soya por CCD. Cromatoplaaca obtenida empleando fase móvil cloroformo/metanol/hidróxido de amonio (65:25:4) al aplicar 20 μ L de patrones y muestras. Pc: patrón de fosfatidilcolina; Ps.: patrón de fosfatidilserina; L01: lote 01; L02: lote 02; L03: lote 03; L04: lote 04; L05: lote 05.

Los valores de R_f del patrón de fosfatidilserina (0,13) y los R_f de la mancha 1, en todos los lotes, con valor de 0,12 son similares. Los valores de R_f de la mancha 3, en cada uno de los lotes (0,67) es equivalente al R_f del patrón de fosfatidilcolina (0,68). La mancha 2 con R_f de 0,22 en los cinco lotes, tiene un valor

similar al R_f del fosfatidilinositol (0,20) y la mancha 4 con R_f de 0,8 para todos los lotes, concuerda con el R_f de fosfatidiletanolamina (0,75). Los valores de R_f de estos dos últimos fosfolípidos fueron tomados de Avanti Polar Lipids, Inc. 1998, empleando el sistema de disolventes descritos en este trabajo. Los resultados

de la identificación cromatográfica, coinciden con la literatura, donde se reporta la presencia de fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol y fosfatidiletanolamina en la lecitina de soya /2,3/.

La pequeña diferencia entre el R_f de los patrones y las muestras, correspondientes a las manchas de los lotes analizados, puede deberse a que los patrones, no provengan de la misma fuente (fosfolípidos de soya) y tengan diferencias en la composición de ácidos grasos.

La mezcla de fosfolípidos purificada que pudiera estar compuesta por fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol fundamentalmente, donde los componentes mayoritarios son los fosfolípidos colina y serina, no

solo coincide con los datos reportados en la literatura para esta matriz biológica, sino que además muestra un balance adecuado de fosfolípidos cargados positivamente (colina y etanolamina) y fosfolípidos cargados negativamente (serina e inositol), lo que la hace muy útil para la elaboración de sistemas de liberación como liposomas y cocleatos.

Identificación de sustancias relacionadas

Otros componentes lipídicos se identificaron en el eluato E_{11} , correspondiente a la fracción de cloroformo, por CCD obteniéndose la posible presencia de ácidos grasos libres y diglicéridos y triglicéridos, lo cual se comprobó al comparar los R_f calculados con los reportados por Avanti Polar Lipids, Inc. 1998 (figura 3).

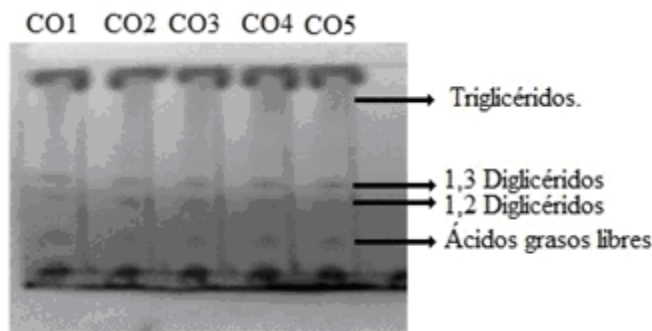


Fig. 3 Identificación de compuestos lipídicos relacionados por Cromatografía en Capa Delgada (CCD). Cromatoplaqueta obtenida empleando como fase móvil tolueno/cloroformo/metanol (85:25:4). C01: fase clorofórmica de la columna 1; C02: fase clorofórmica de la columna 2; C03: fase clorofórmica de la columna 3; C04: fase clorofórmica de la columna 4; C05: fase clorofórmica de la columna 5.

A partir de las manchas visualizadas en la figura 3, se obtiene la relación R_f reportado/ R_f calculado en cada lote analizado, para cada compuesto, siendo para los ácidos grasos libres 0,16/0,12, triglicéridos 0,96/0,9, 1,3 diglicéridos 0,32/0,42 y para los 1,2 diglicéridos 0,24/0,33. Como se observa los valores de R_f obtenidos para los compuestos lipídicos relacionados a los fosfolípidos, son similares a los reportados en la literatura, lo cual demuestra que en la fracción clorofórmica se eliminaron sustancias de origen lipídico, que constituyen impurezas para los fosfolípidos de interés.

Para comprobar la pureza de estos últimos, se desarrolló una muestra de cada uno de los lotes de fosfolípidos purificados, en una cromatoplaqueta utilizando

como fase móvil la mezcla de tolueno/cloroformo/metanol (85:25:4), para verificar la presencia de grasas contaminantes en los mismos, no observándose mancha alguna (resultados no mostrados), lo cual es otro indicativo de la pureza de la mezcla obtenida.

Cuantificación de fosfolípidos totales

La cuantificación de fosfolípidos totales mostró resultados aproximados de 1mg/mL en todos los lotes, sólo en el Lote 02 se obtuvo un valor superior. Este resultado pudo haber sido así porque los lotes provienen de procesos de purificación diferentes, o sea de diferentes columnas, y pudo haber diferencia en la cantidad de muestra aplicada, debido a que las primeras columnas se realizaron para ir estableciendo

las cantidades adecuadas, tanto de disolvente como de muestra a purificar, así como para ajustar la metodología de trabajo.

Cuantificación enzimática de fosfatidilcolina

La fosfatidilcolina presente en la mezcla de fosfolípidos se determinó mediante reacciones enzimáticas, donde la fosfatidilcolina es hidrolizada por la fosfolipasa D y la colina liberada es secuencialmente oxidada por la colina oxidasa a betaína, con la simultánea producción de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa el peróxido de hidrógeno acopla oxidativamente a la 4-aminofenazona (4-AF) y al diclorofenol formando una quinonamina coloreada. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de fosfatidilcolina presente en la muestra ensayada.

Los resultados muestran la presencia de fosfatidilcolina en los 5 lotes evaluados, y además se puede observar que los valores de concentración son similares, la concentración de este fosfolípido en las 5 muestras es similar.

La tabla 1 resume los resultados de la cuantificación de los fosfolípidos en los 5 lotes analizados, tanto por el método químico, determinación del fósforo total, como por un método enzimático comercial. Como se aprecia en la tabla el fosfolípido mayoritario en la mezcla es la fosfatidilcolina, siendo en todos los lotes más del 50 % del contenido de fosfolípidos de la mezcla purificada.

La cantidad total de fosfolípidos en los 5 lotes (referida al fósforo total), es de 139.403 mg, lo cual representa el 14 % con respecto a los 100 g de lecitina iniciales.

Microscopía electrónica de liposomas y cocleatos, elaborados con los fosfolípidos purificados

En la figura 4A se muestran las imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de los liposomas y en la figura 4B por microscopía de transmisión y criofractura de los cocleatos obtenidos empleando la mezcla de fosfolípidos purificados a partir de la lecitina de soya.

En la figura 4, se observan estructuras nanométricas en forma de liposomas (A) y cocleatos (B). Se aprecia la forma esférica de los liposomas que es característica de este tipo de estructura, con dimensiones inferiores a $1\mu\text{m}$, figura 4A. Los cocleatos, formados a partir de los liposomas, por adición de sales de calcio, se observan en la figura 4B. Se aprecia una partícula cilíndrica, alargada y continua similar a un cigarrillo, de dimensiones de $0,2\mu\text{m}$ de diámetro. Esta estructura supramolecular confirma la formación de agregados en forma de cocleatos, la cual está dada por la superposición de bicapas lipídicas que se enrollan para obtener un agregado multilaminar /28/.

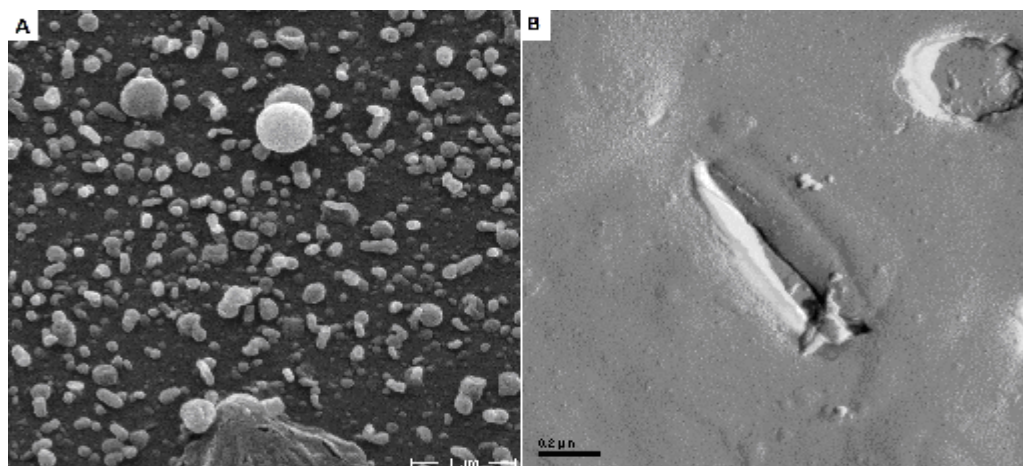


Fig. 4 Microfotografías obtenidas mediante Microscopía Electrónica. **A:** Microscopía Electrónica de Barrido, magnificación de 100.000X. **B:** Microscopía Electrónica de Transmisión y Criofractura, magnificación de 500.000X.

En resumen, la metodología propuesta en este trabajo, para la extracción y purificación de fosfolípidos a partir de la lecitina de soya, empleando un sistema trifásico en la extracción líquido/líquido, seguida de cromatografía en columna, resultó ser sencilla, rápida y reproducible, obteniendo cantidades de fosfolípidos adecuadas, en cuanto a composición y pureza.

La CCD permitió verificar la pureza de los fosfolípidos y la reproducibilidad de la metodología propuesta, además fue útil para comprobar la eliminación de otros contaminantes lipídicos. Esta técnica se utiliza por casas comerciales tales como Sigma- Aldrich para determinar la pureza de los patrones de fosfolípidos que comercializan, por lo que se considera aceptada, para el objetivo con que fue utilizada.

Los fosfolípidos que se utilizan de forma habitual en la elaboración de liposomas y coqueatos, conteniendo medicamentos como la Anfotericina B, anti inflamatorios, analgésicos, nutracéuticos, adyuvantes de vacunas y cosméticos entre otros, generalmente emplean en su composición la fosfatidilserina de cerebro bovino y/o de soya, fosfatidilcolina de soya y fosfatidilinositol/29/.

Mediante el procedimiento descrito, se obtiene una mezcla de fosfolípidos, enriquecida en fosfatidilcolina y fosfatidilserina, con los que se elaboraron liposomas y coqueatos, visualizados por microscopía electrónica, que puede emplearse en formulaciones farmacéuticas de estos sistemas de liberación, con diversas aplicaciones biomédicas.

Agradecimientos

Los autores desean agradecer al Dr.C Juan Ayala y Maite, del CBM "Severo Ochoa" de Madrid, España, por la realización de las microscopías electrónicas de las muestras.



Bibliografía

1. WATSON, A. D. Thematic review series: systems biology approaches to metabolic and cardiovascular disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. J Lipid Res 2006; 47 (10): 2101-11.
2. DE MOURA N, A. G. LIRENY, J. C. GONÇALVEZ, L. A. CUNHA PETRUS. J Food Engineering 2005; 70(4): 473-78.
3. SCHMITT, H. *Phospholipids-Making Lives Healthier*, [monografía online]. Wellness Foods Europe Lecithin & Phospholipids [mayo-junio 2009].
4. ZARIF L., T. JIN, I. SEGARRA, R. J. MANNINO. Novel Hydrogel Isolated Cochleate Formulations, Process of Preparation and Their Use for the Delivery of Pharmaceutical Agents. US patent 6,153,217.2000 Ener 22.
5. DONNELLY, J., S. W. BARNETT, D. O'HAGAN. HIV Vaccine Formulations. US patent 0,238,841 A1. 2009 Sep 24.
6. MCSWIGGEN, J. A., G. QING. RNAI Therapeutic for Respiratory Virus Infection. US patent 0,144,843 A1. 2010 Jun10.
7. ALLISON, A. C., G. GREGORIADIS. Liposome Asimmunological Adjuvant. Nature 1974; 252: 252.
8. LASIC, D. D. Novel Applications of Liposomes. Tibtech 1998; 16: 307-21.
9. KURELLA, S. M. MANOCHA, L. SABHNANI, B. THOMAS, D. N. RAO. New Age Adjuvants and Delivery Systems for Subunit Vaccines. Ind J Clin Bioch 2000 ;15: 83-100.
10. LIAN, T, R. J. HO. Trends and Developments in Liposome Drug Delivery Systems. J. Pharm Sci 2001; 90:667-80.
11. MESA, C., J. LEÓN, L. E. FERNÁNDEZ. Very Small Size PL Derives from Neisseria Meningitidis. An effective Adjuvant for Generation of CTL Response to Peptide and Protein Antigens. Vacc 2006; 24(14):2692-9.
12. PERRIE, Y., A. R. MOHAMMED, D. J. KIRBY, S. E. MCNEIL, V. W. BRAMWELL. "Vaccine Adjuvant Systems: Enhancing the Efficacy of Sub-Unit Protein Antigens". Int J Pharm 2008;364:272-80.
13. ZARIF, L. "Elongated Supramolecular Assemblies in Drug Delivery". J Cont Rel 2002; 81:7-23.
14. BRACHO, G., C. ZAYAS, L. WANG, R. COPPEL, O. PÉREZ, N. PETROVSKY. Afc01, a Meningococcal B-Derived cochleate Adjuvant, Strongly Enhances Antibody and T-Cell Immunity Against Plasmodium Falciparum Merozoite Surface Protein 4 and 5. Malaria J 2009; 8:35-45.
15. DEL CAMPO, J. *et al*. Intranasal Immunization with a Proteoliposome-Derived Cochleate Containing Recombinant gD Protein confers Protective Immunity Against Genital Herpes in Mice. Vacc 2010; 28:1193-1200.
16. ZARIF, L., f. TAN. Cochleate Made with Purified soy Phosphatidylserine. US patent 0,219,473 A1. 2003 Nov 27.
17. TRAVIESO, M. C. Obtención y caracterización de Materiales de Referencia Internos para el control de calidad del SURFACEN. [Disertación]. Facultad de Farm. y Alim: Univ. de la Hab.; 2004.
18. "Avanti Polar Lipids", Inc. Technical Support. 2011. <http://avantilipids.com>
19. LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR, R. J. RANDALL. "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent". J Biol Chem 1951; 193: 265-75, 1951.
20. LAEMMLI, N. K. *Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage*. T. 4. Nat 1970; 227:680-5.

21. BRUCKNER, J. "Estimation of Monosaccharides by the Orcinol Sulphuric Acid Reaction". J. Biochem. 1955; 60:200-5.
22. MIRANDA, M., A. CUELLAR. *Manual de prácticas de laboratorio de Farmacognosia y Productos Naturales*. 1^{ra}. Edición, La Habana, Editorial "Felix Valera", 2001.
23. BARTLET, W. C. "Phosphorus Assay in Column Chromatography". J. Biol. Chem. 1959; 234: 466-8.
24. TRAVIESO, M. C., A. B. BETANCOURT. "Evaluation of two Sources of Phospholipids to Manufacture a Reference Standard for Biochemical Assays of TLC". Revista Cubana de Química. Vol. XIII. No. 2, 2001; ISSN-058-5995, pág. 82.
25. KIRBY, C., G. GREGORIADIS. "Dehydration-Rehydration Vesicles (DRV): A New Method for High Yield Drug Entrapment in Liposomes". Biotech 1984; 2: 979-84.
26. ZARIF, L., J. R. GRAYBILL, D. PERLIN, L. NAJVAR, R. BOCANEGRA, R. J. MANNINO. Antifungal Activity of Amphotericin B Cochleates against *Candida albicans* Infection in a Mouse Model. Ant Agents Chemoth 2000; 1463-69.
27. FOLCH, J., M. LEES, G. H. STANLEY. "A Simple Method for the Isolation and Purification of Total Lipids from Animal Tissues". J. Biol. Chem. 1957; 226:497-09.
28. PAPAHAADJOPOULOS, D., G. POSTE, B. E. SCHAEFFER, W. J. VAIL. "Membrane Fusion and Molecular Segregation in Phospholipid Vesicles". Bioch Bioph Acta 1974; 352(1): 10-28.
29. TAMARGO, B., S. GOULD-FOGERITE, G. SIERRA. Estructuras cocleares, prometedores sistemas particulados, de amplio uso en biomedicina y salud. Ediciones FINLAY. En prensa 2011.