

ALTERACIONES EN LA PERMEABILIDAD DE LIPOSOMAS UNILAMELARES CAUSADAS POR LA PRESENCIA DE SISTEMAS MIXTOS DE LOS TENSIOSACTIVOS DODECIL BETAINA Y DODECIL SULFATO SODICO¹⁾

A. de la Maza*, J.L. Parra** y F.J. Carrión***

0.1. Resumen

Se investigan las alteraciones en la permeabilidad de liposomas unilamelares promovidas por la presencia de sistemas mixtos de los tensioactivos dodecilbetaina (C_{12} -Bet)/dodecil sulfato sodico (SDS). A tal fin, se han determinado los coeficientes de partición de dichos sistemas de tensioactivos para diferentes relaciones molares del tensioactivo anfotérico al distribuirse entre la fase acuosa y la bicapa lipídica de liposomas constituídos por vesículas unilamelares de un tamaño aproximado de 100 nm. La composición lipídica de los liposomas fue fosfatidilcolina y ácido fosfatídico (relación molar 9:1). Se determinó la permeabilidad del agente fluorescente 5-(6) carboxifluoresceína encapsulado en dichas bicapas a concentraciones subsolubilizantes. Puede establecerse que cuando la fracción molar de los sistemas C_{12} -Bet/SDS es de 0.4, la concentración micelar crítica de dichos sistemas presenta un valor mínimo mientras que su coeficiente de partición es máximo. Existe una correlación directa entre la capacidad permeabilizante de los sistemas estudiados y sus coeficientes de partición.

Palabras clave: Trazador de fluoresceína, interacción de liposomas (mezclas de dodecilbetaina/dodecilsulfato sódico), coeficientes de partición, cambios de permeabilidad, liposomas unilamelare

0.2. Summary. PERMEABILITY ALTERATIONS IN UNILAMELLAR LIPOSOMES DUE TO BETAINE-TYPE ZWITTERIONIC AND ANIONIC SURFACTANT MIXED SYSTEMS.

The alterations due to betaine-type zwitterionic and anionic surfactant mixed systems in the permeability of unilamellar liposomes have been

investigated. The partition coefficient of these systems at different molar fractions, between the aqueous phase and the lipid bilayer of liposomes has been determined. These surfactant mixed systems were formed by N-dodecyl-N,N-dimethylbetaine (C_{12} -Bet) and sodium dodecyl sulphate (SDS) in the presence on 20 mM PIPES buffer and 110 mM Na_2SO_4 at pH 7.21. Unilamellar liposomes were prepared from egg phosphatidylcholine and phosphatidic acid (9:1 molar ratio) The release of the fluorescent agent 5-(6)carboxyfluorescein induced by the systems has been studied at sub-solubilizing concentrations. When the molar fraction of C_{12} -Bet/SDS is about 0.4, the critical micelle concentration values of these systems exhibit a minimum, whereas their partition coefficient between the aqueous phase and lipid bilayer of lipid bilayers shows a maximum. There is a consistent correlation between the partition coefficient and the ability of the different systems of surfactants to modify the permeability of liposomes.

Key words: Carboxyfluorescein release, interaction liposome (dodecyl betaine/sodium dodecylsulphate) mixed systems, partition coefficients, permeability changes, unilamellar liposomes.

0.3. Résumé. ALTERATIONS DE LA PERMEABILITE DE LIPOSOMES UNILAMELLAIRES CAUSEES PAR LA PRESENCE DE SYSTEMES MIXTES DES TENSIOSACTIFS DODECYL BETAINA ET DODECYL SULFATE SODIQUE.

On fait des recherches sur les altérations dans la perméabilité de liposomes unilamelaires provoquées par la présence de systèmes mixtes des tensio-actifs dodécyl bêtaïne (C_{12} -Bet)/ dodécyl sulfate sodique (SDS). Dans cet objectif, on a déterminé les coeficients de partition molaires du tensio-actif amphotérique, se répartissant entre la phase aqueuse et la bicouche lipidique de liposomes constitués par des vésicules unilamelaires d'une grandeur aproximative de 100 nm. La composition lipidique des liposomes a été phosphatidyl choline et acide phosphatidique (relation molaire 9:1). On a déterminé la perméabilité de l'agent fluorescent 5-(6) carboxyfluorescéine encapsulé dans lesdites bicouches à des concentrations subsolubilisantes. On peut établir que, lorsque la fraction molaire des systèmes C_{12} -Bet/SDS est de 0,4, la concentration

¹⁾ Trabajo publicado en el J.A.O.C.S. 70, 685-691 (1993)

* Dr. Alfonso de la Maza Ribera, Colaborador Científico del CSIC en el Centro de Investigación y Desarrollo (CID) del CSIC de Barcelona.

** Dr. José Luis Parra Juez, Profesor de Investigación del CSIC en el Centro de Investigación y Desarrollo (CID) del CSIC de Barcelona.

*** Dr. Ing. Fco. Javier Carrión Fité, Profesor Titular de Universidad en el Departamento de Ingeniería Textil y Papelera (UPC). Jefe del Laboratorio de "Tensioactivos y Detergencia" del INTEXTER y Editor de este Boletín.

micellaire critique desdits systèmes présente une valeur minimum alors que son coefficient de partition est maximum. Il existe une corrélation directe entre la capacité perméabilisante des systèmes étudiés et leurs coefficients de partition.

Mots-clés: Carboxyfluoresceína qui donne le plan, interaction liposome (dodécyl bétaïne/dodécyl sulfate sodique, systèmes mixtes, coefficients partition, perméabilité alterations, unilamellaire liposomes.

1. INTRODUCCION

Los tensioactivos anfotéricos presentan, en solución acuosa, importantes interacciones y complejas formaciones con los tensioactivos aniónicos¹⁾. Diversos autores, han propuesto el efecto reductor del nivel de irritación de tensioactivos aniónicos sobre proteínas en sus mezclas micelares con tensioactivos anfotéricos como un camino de reducción de la irritación potencial de dichos tensioactivos^{2,3)}. Así se ha reseñado una cierta reducción experimental de la irritación cutánea de tensioactivos aniónicos en presencia de distintos tensioactivos anfotéricos⁴⁾. Además, las alquilbetainas han sido utilizadas como auxiliares de tensioactivos aniónicos en distintas aplicaciones industriales, habiéndose reseñado las propiedades de dichos sistemas mixtos^{5,6)}.

Los liposomas son estructuras vesiculares constituidas generalmente por fosfolípidos cuya importancia se basa fundamentalmente en su utilización, tanto como modelos de membranas biológicas, como en sistemas de transporte, donde la encapsulación y el transporte de sustancias adquiere gran importancia^{7,8)}.

Por su naturaleza anfifílica, los tensioactivos se han utilizado para el estudio de membranas⁹⁾ aunque ciertos aspectos de su interacción con membranas lipídicas no han sido todavía suficientemente aclarados. La interacción liposoma-tensioactivo presenta dos puntos fundamentales de interés, la fusión de membranas y su reconstitución¹⁰⁻¹³⁾. En consecuencia, el estudio de las propiedades físico-químicas de los sistemas constituidos por tensioactivos y membranas fosfolipídicas se ha desarrollado extensamente, especialmente en lo concerniente a los cambios en su permeabilidad y su solubilización¹⁴⁻²²⁾.

A concentraciones subsolubilizantes, la incorporación de tensioactivos a bicapas fosfolipídicas produce cambios en la estructura de la bicapa que se traducen en cambios en la permeabilidad de la misma. El mecanismo de incorporación de los tensioactivos a dichas bicapas, así como los conceptos de coeficiente de partición (K) y de relación efectiva R_{off} han sido comentados en un trabajo anterior²³⁾.

En trabajos recientes^{24,25)} se estudiaron los coeficientes de partición entre la bicapa lipídica y el medio acuoso de liposomas unilamelares de los

tensioactivos dodecilbetaina y dodecil sulfato sodico actuando individualmente sobre dichas bicapas. En el presente trabajo se pretende extender dichas investigaciones al estudio de las interacciones de sistemas formados por mezclas de dichas tensioactivos sobre estructuras liposómicas a fin de mejorar nuestro conocimiento en lo que concierne al sinergismo existente entre estos tensioactivos y poder así establecer un criterio para evaluar la actividad de dichos sistemas frente a bicapas fosfolipídicas.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. MATERIALES

El ácido fosfatídico utilizado (PA), preparado a partir de lecitina de huevo, fue suministrado por Sigma. La fosfatidilcolina (PC), se obtuvo por purificación a partir de yema de huevo, según el método descrito por Singleton²⁶⁾, comprobándose su pureza por cromatografía en capa fina.

Se utilizó como tampón la piperacina-1,4-bis(acido 2-etanosulfónico) (tampon PIPES), suministrado por Merck SA. Dicho tampón se preparó a una concentración 20mM, ajustándose su pH a un valor de 7,20 con NaOH y suplementándose con Na_2SO_4 , 110 mM.

La dodecilbetaina fue especialmente preparada por Albright and Wilson Ltd. conteniendo una materia activa del 30 % en solución acuosa y un contenido en amina libre 0.20%. El dodecil sulfato sodico fué suministrado por Merck y posteriormente purificado por cromatografía en columna²⁷⁾.

Las membranas de policarbonato fueron suministradas por Nucleopore y el agente fluorescente 5-(6) carboxifluoresceína (CF) fue suministrado por Eastman Kodak y purificado por cromatografía en columna²⁸⁾.

2.2. METODOS

2.2.1. Preparación de liposomas

Los liposomas del tipo LUW, de un tamaño de vesícula de 100 nm. fueron preparados por extrusión a través de membranas de policarbonato a partir de liposomas LUW de mayor tamaño, obtenidos por el método de evaporación en fase reversa, según procedimiento descrito por Szoka y Papahadjopoulos²⁹⁻³²⁾.

2.2.2. Quasielastic Ligth Scattering

La determinación del tamaño de partícula y la polidispersidad de las suspensiones de liposomas se realizó por medio del Photon Correlator Spectrophotometer (Malvern Autosizer IIc). Las lecturas de tamaño de partícula se realizaron a 25°C y con un ángulo de 90°C.

2.2.3. Medida de la tensión superficial

La determinación de los valores de la tensión superficial de los tensioactivos investigados así como de sus mezclas en tampón PIPES, se realizó utilizando el tensiómetro automático Lauda 7201, por el método del anillo³³. Los valores aparentes de la tensión superficial obtenidos se corrigieron usando el factor de corrección de Harking-Jordan.

Los valores de la concentración micelar crítica (cmc), de los tensioactivos y sus mezclas en tampón PIPES se determinaron representando los valores obtenidos de tensión superficial frente a la concentración total de tensioactivo.

2.2.4. Valoración de fósforo

La valoración del fósforo total en los liposomas se determinó por el método de Allen³⁴.

2.2.5. Medida de la difusión de la 5-(6) carboxifluoresceína encapsulada en el interior de los liposomas

Los liposomas que contienen CF en su interior no presentan fluorescencia. Sin embargo, esta propiedad aparece y aumenta a medida que el agente fluorescente se difunde desde el interior de las vesículas al medio exterior debido al efecto de «quenching» que presenta dicho agente fluorescente. La medida de la fluorescencia de la CF difundida, se determinó utilizando el espectrofluorímetro Shimadzu RF-540, fijando la longitud de onda de excitación de la CF a 495 nm. y el máximo de emisión de la misma a 515.4 nm.

Los liposomas se sometieron a la acción de distintas concentraciones de tensioactivo en cubetas de cuarzo a 25°C. La cantidad total de CF encapsulada, se determinó por destrucción total de los liposomas añadiendo 60 microlitros de una solución acuosa tamponada de Triton X-100 al 10% v/v a un volumen de 2 ml de suspensión de liposomas³⁵. La cantidad de CF difundida después de cada tratamiento se calculó aplicando la siguiente ecuación:

$$\text{CF difundida} = \frac{I_t - I_o}{I_\infty - I_o} \times 100 \quad (1)$$

Donde I_o , corresponde al valor de intensidad de fluorescencia inicial antes de adicionar tensioactivo al liposoma, I_t , corresponde al valor de la intensidad de fluorescencia transcurridos 40 minutos después de haber añadido el tensioactivo, e I_∞ corresponde a la intensidad de fluorescencia medida a la misma longitud de onda que en los casos anteriores (515,4 nm.) después de destruido el liposoma por adición de Tritón X-100.

2.2.6. Coeficientes de Partición

A fin de comparar la distribución de los

diferentes sistemas mixtos de tensioactivos ensayados entre la bicapa lipídica y el medio acuoso de los liposomas se ha definido un coeficiente de partición como^{21,36}

$$K = \frac{S_B/PL}{S_w} \quad (2)$$

donde S_w y S_B son las concentraciones de tensioactivo en el medio acuoso y en la bicapa respectivamente para un sistema que contenga una concentración total de fosfolípido PL. Definiendo la relación efectiva tensioactivo/fosfolípido R_{eff} como la relación existente entre el tensioactivo existente en la bicapa (S_B) y la concentración total de fosfolípido en los liposomas resulta (PL) que:

$$K = \frac{R_{\text{eff}}}{S_w} \quad (3)$$

Al representar gráficamente las concentraciones de tensioactivo que promueven el 50% de permeabilidad de la 5-(6) carboxifluoresceína contenida en el interior de los liposomas frente a su concentración en fosfolípido (PL) se observa una relación lineal que puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$S_T = S_w + R_{\text{eff}} \times (PL) \quad (4)$$

donde S_T , S_w y R_{eff} , corresponden respectivamente a las concentraciones de tensioactivo en el medio acuoso, concentración de tensioactivo total y relación efectiva de tensioactivo incorporado a la bicapa respecto a la concentración total de fosfolípido.

3. RESULTADOS

3.1. Concentración micelar crítica (cmc)

La Figura 1 muestra la variación los valores de tensión superficial de los sistemas mixtos de tensioactivos C_{12} -Bet/SDS en función de la concentración total de fosfolípido. Puede observarse que el valor de la tensión superficial decrece para las distintas fracciones molares estudiadas al aumentar la concentración total de tensioactivo, apreciándose un mínimo en la zona correspondiente a su cmc. Este mínimo ha sido ya reseñado en la bibliografía en estudios físico-químicos de estos sistemas^{5,37}. El valor de la tensión superficial en la γ_{cmc} puede considerarse como un criterio de la actividad superficial según el cual a menor γ_{cmc} mayor actividad superficial del sistema³⁸. En los sistemas

mixtos estudiados el valor mínimo de γ_{cmc} corresponde a una fracción molar C_{12} -Bet/SDS de 0.4 para un valor de 25.4 mN m^{-1} . Se observa asimismo una disminución apreciable del valor de la

tensión superficial de los sistemas mixtos de tensioactivos estudiados en comparación con los valores correspondientes a los tensioactivos no mezclados.

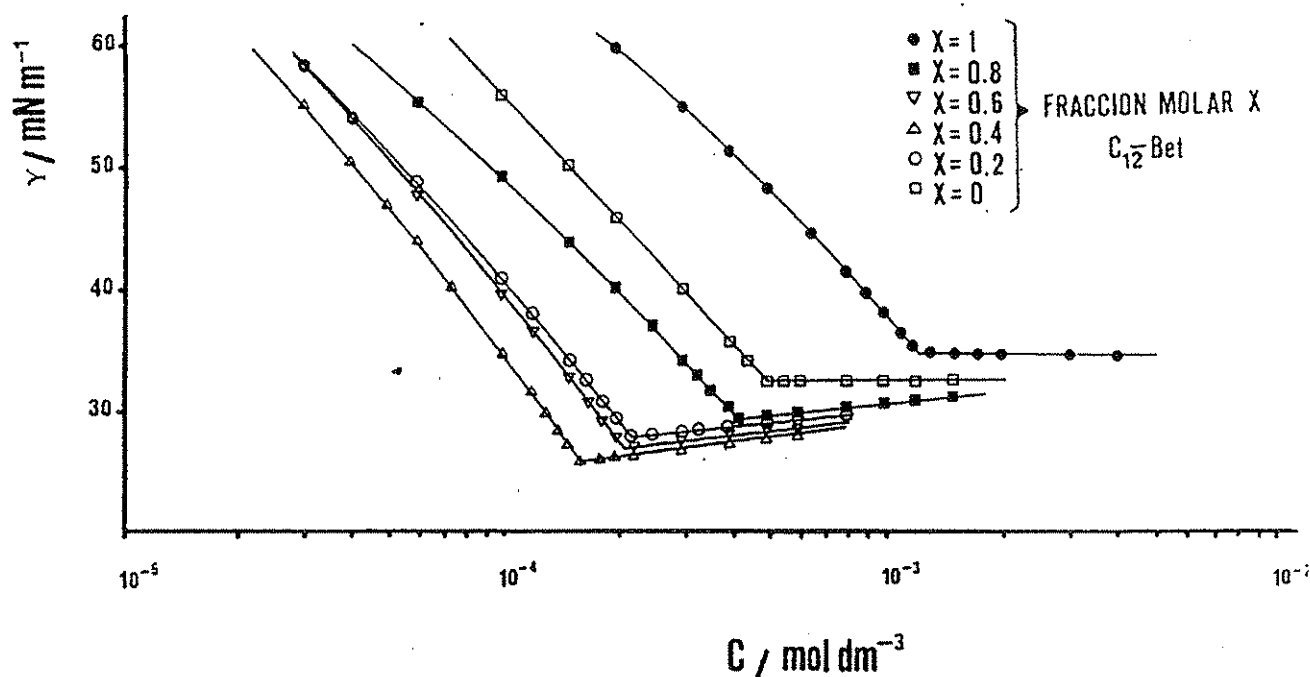


FIGURA 1 Valores de tensión superficial frente a las concentraciones totales de tensioactivo para las distintas fracciones molares X de las mezclas de tensioactivos C_{12} -Bet/SDS.

Representando los valores de las cmc obtenidos frente a las fracciones molares de las mezclas de tensioactivos se obtiene la Figura 2. Puede observarse que la cmc de los sistemas mixtos disminuye a medida que aumenta la fracción molar del componente anfotérico (X) presentando un mínimo para $X=0.4$. Dichos valores se indican en la Tabla I.

Si las micelas de los sistemas mixtos tuvieran un comportamiento ideal, sus valores de cmc deberían ajustarse a la curva correspondiente a la ecuación ³⁹⁾:

$$\frac{1}{C_{12}} = \frac{X}{C_1} + \frac{1-X}{C_2} \quad (5)$$

donde C_{12} es la cmc correspondiente al sistema micelar mixto formado por los tensioactivos 1 (C_{12} -Bet) y 2 (SDS); C_1 es la cmc del tensioactivo 1 y C_2 es la cmc del tensioactivo 2, siendo X la fracción molar del tensioactivo 1. Los valores teóricos de cada una de las fracciones molares estudiadas se indican en la Figura 2. La diferencia de valores obtenidos entre

los valores teóricos de la cmc y sus valores experimentales indican que estos sistemas binarios presentan una desviación negativa con respecto a su comportamiento ideal. Está generalmente aceptado que las cmc de sistemas mixtos formados por dos tensioactivos de carga opuesta presentan valores menores a los que corresponden a los tensioactivos

por separado, debido a asociaciones electrostáticas de dichos tensioactivos^{1,40}. El presente resultado puede también explicarse asumiendo que se produzca una asociación de ambos tensioactivos por atracciones electrostáticas entre la parte catiónica de la betaina y el SDS en las micelas mixtas.

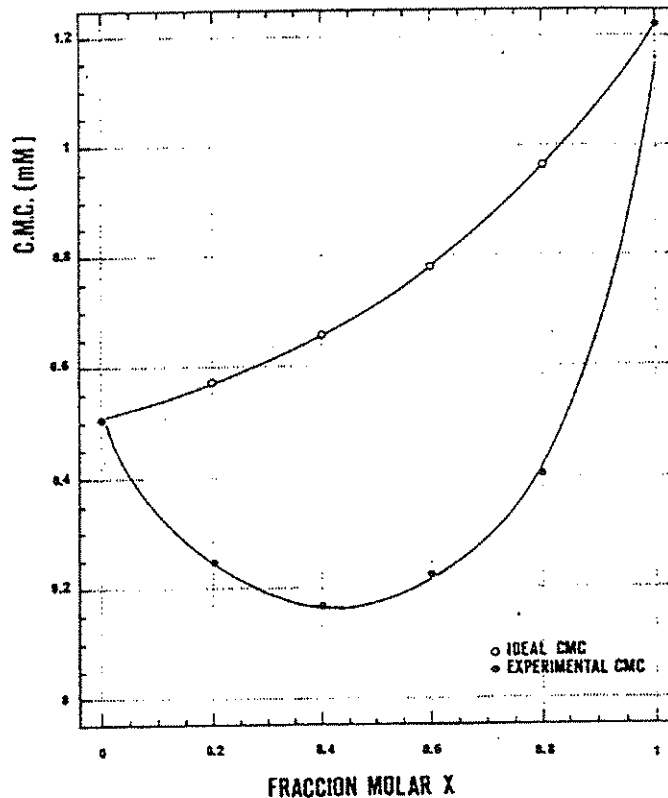


FIGURA 2 Relación entre los valores de cmc (mM) y las fracciones molares X para los sistemas mixtos formados por C₁₂-Bet/SDS

3.2. Estudios de permeabilidad

Es bien sabido, que los sistemas constituidos por fosfolípidos y tensioactivos necesitan varias horas para alcanzar el equilibrio^{41,42}. Sin embargo, la mayor parte de la interacción se produce aproximadamente en los 30 minutos posteriores a la adición del tensioactivo a las suspensiones de liposomas³⁷. A fin de determinar el tiempo necesario para obtener un valor constante de difusión de la CF contenida en el interior de las vesículas en el rango de concentración de fosfolípido estudiado (0.165mM- 0.990mM) se ha realizado un estudio cinético de la interacción de liposomas con sistemas

mixtos de los tensioactivos C₁₂-Bet/SDS. Así, liposomas conteniendo una concentración de fosfolípido 0.165 mM se trataron con dichos sistemas mixtos a diferentes relaciones molares (X) y a una concentración total de tensioactivo 0.05 mM. Los cambios en la permeabilidad de las vesículas lipídicas se estudiaron en función del tiempo. Los resultados obtenidos se representan tridimensionalmente en la Figura 3.

Puede observarse que la cinética de permeabilidad de la CF es similar para cada uno de los sistemas de tensioactivos estudiados, siendo necesarios 40 minutos para alcanzar el equilibrio.

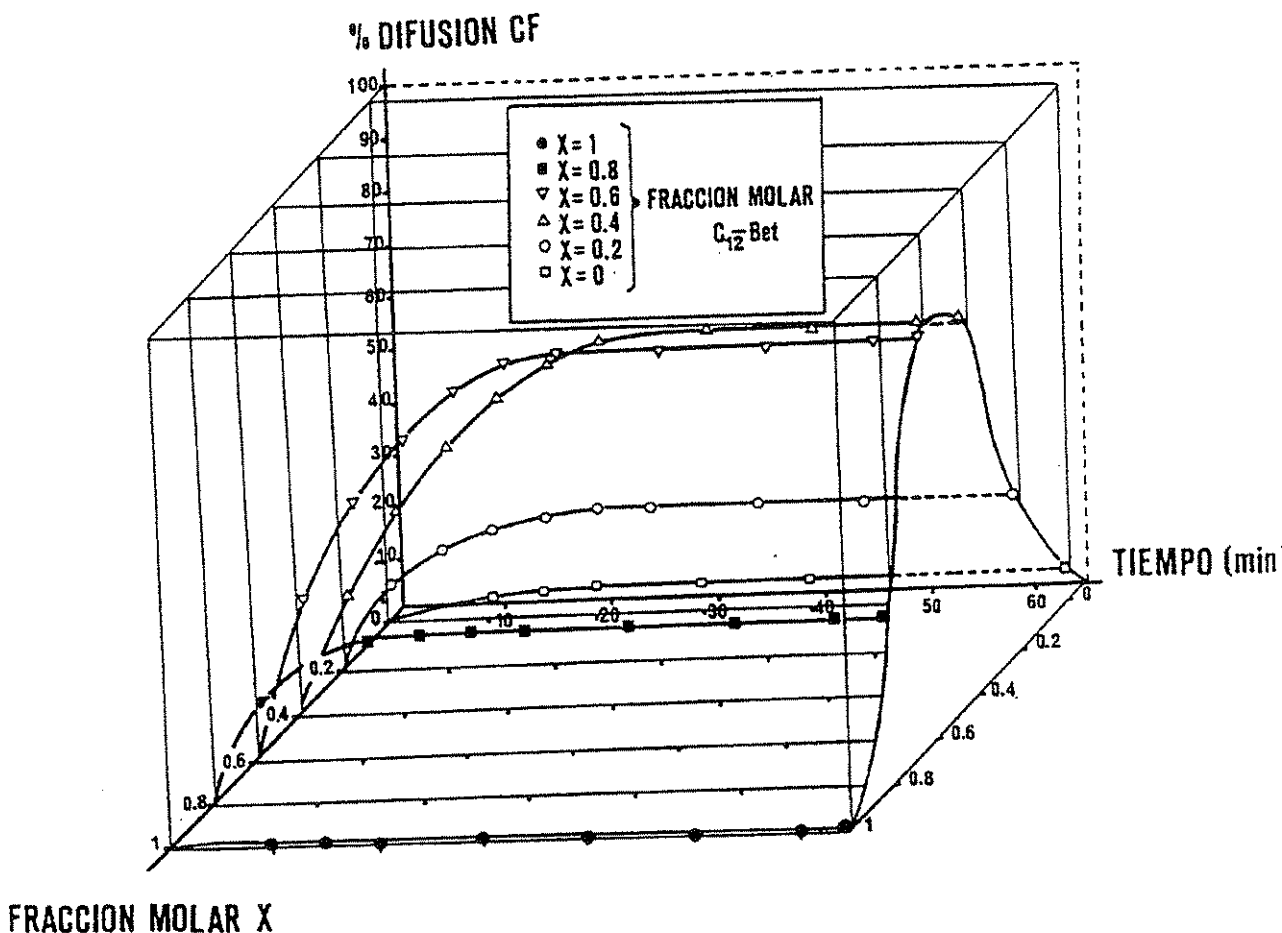


FIGURA 3. Difusión con el tiempo de la CF contenida en el interior de liposomas (conc. lipídica 0.165mM) causada por la presencia de distintas fracciones molares de los sistemas C_{12} -Bet/SDS.

Puede asimismo observarse que el incremento de CF difundida es mayor para los sistemas mixtos de tensioactivo que para los tensioactivos considerados individualmente. Así, el mayor valor de difusión se alcanza en el rango de fracciones molares comprendido entre 0.4 y 0.6, siendo los menores valores los correspondientes a las fracciones molares $X=1$ (100 % C_{12} -Bet) y $X=0$ (100% SDS). Como consecuencia de estos resultados, los cambios en la permeabilidad fueron estudiados en todos los casos 40 minutos después de la adición de los tensioactivos a los liposomas a una temperatura de 25°C. La difusión de la CF del interior de las suspensiones de liposomas en ausencia de tensioactivo fue en todos

los casos despreciable.

A fin de determinar los coeficientes de partición de los sistemas tensioactivos estudiados entre la bicapa lipídica y el medio acuoso, se realizó un estudio sistemático de los cambios de permeabilidad de los liposomas promovidos por la adición de dichos sistemas tensioactivos. Para ello se determinaron los cambios en la difusión de la CF contenida en los liposomas causada por dichos sistemas en un rango de concentraciones lipídicas comprendido entre 0.165 y 0.990mM en función de la concentración de tensioactivo, transcurridos 40 minutos de su adición. Esto resultados se indican el Figura 4.

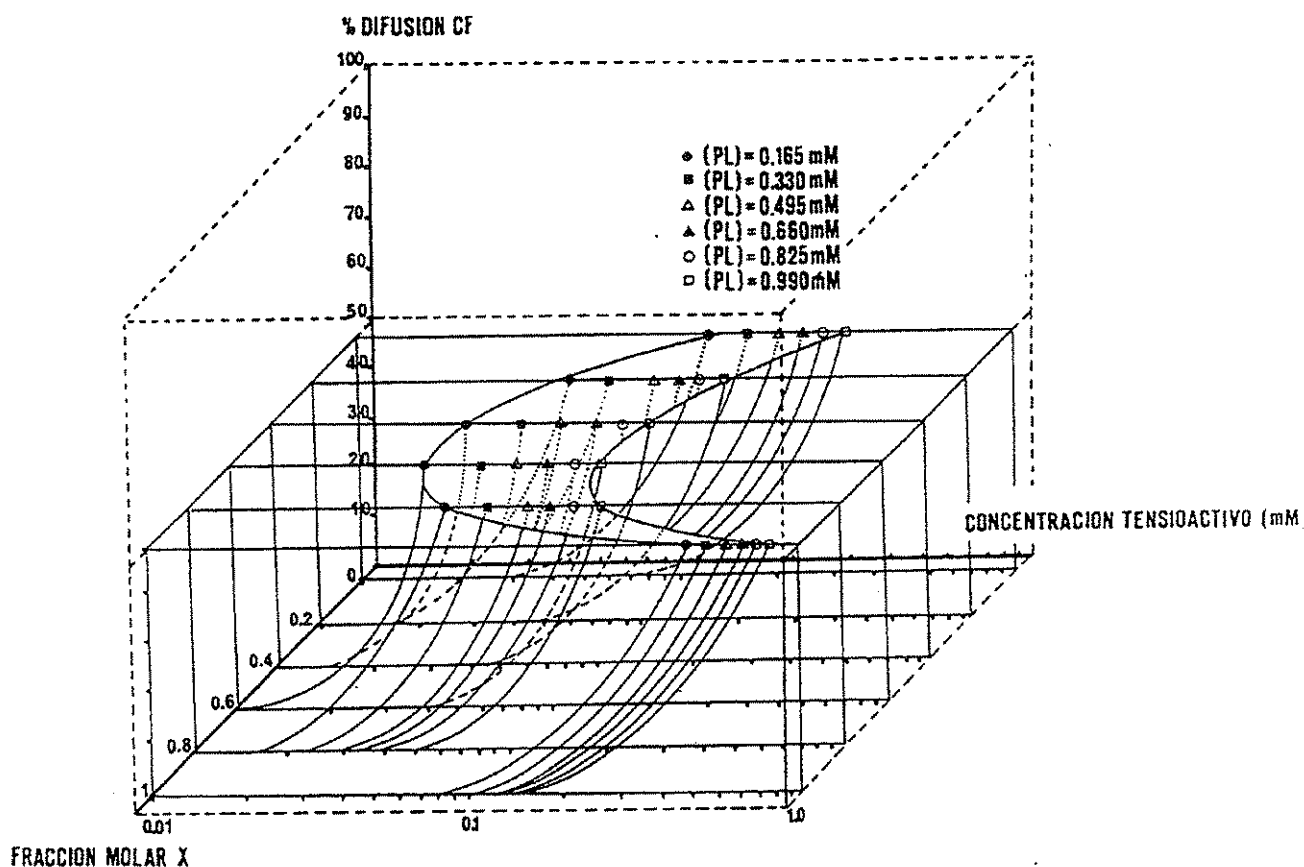


FIGURA 4. Difusión de la CF causada por diferentes fracciones molares de los sistemas mixtos de tensioactivos C1 -Bet/SDS actuando sobre liposomas unilamelares de distinta concentración lipídica ($a=0.165\text{mM}$, $b=0.330\text{mM}$, $c=0.495\text{mM}$, $d=0.660\text{mM}$, $e=0.825\text{mM}$ y $d=0.990\text{mM}$).

A partir de los datos anteriores, se obtuvieron las concentraciones de tensioactivos que promueven el 50% de difusión de la CF. Dichos valores se representan frente a la concentración de fosfolípido de los liposomas en la Figura 5. Puede observarse que en todos los casos se establece una relación lineal entre ambos parámetros. Estas gráficas corresponden a la ecuación de la recta (ecua-

ción 4) indicada en la parte experimental. La relación molar efectiva tensioactivo /fosfolípido (R_{eff}) y la concentración de tensioactivo en el medio acuoso (S_w) corresponden respectivamente a la pendiente y a la ordenada en el origen de dicha recta. Esto resultados se indican en la Tabla I.

TABLA I

FRACCION MOLAR X	CMC (mM)	AS _w (mM)	R _{off} (mol/mol)	K (mM ⁻¹)
0	0.500	0.0890	0.2530	2.84
0.2	0.220	0.0389	0.1611	4.14
0.4	0.160	0.0261	0.1189	4.55
0.6	0.210	0.0267	0.1133	4.24
0.8	0.410	0.0444	0.1356	3.05
1.0	1.250	0.4200	0.4840	1.15

Valores de cmc, S_w, R_{off} y K para las distintas fracciones molares de los sistemas mixtos de tensioactivos C₁₂-Bet/SDS.

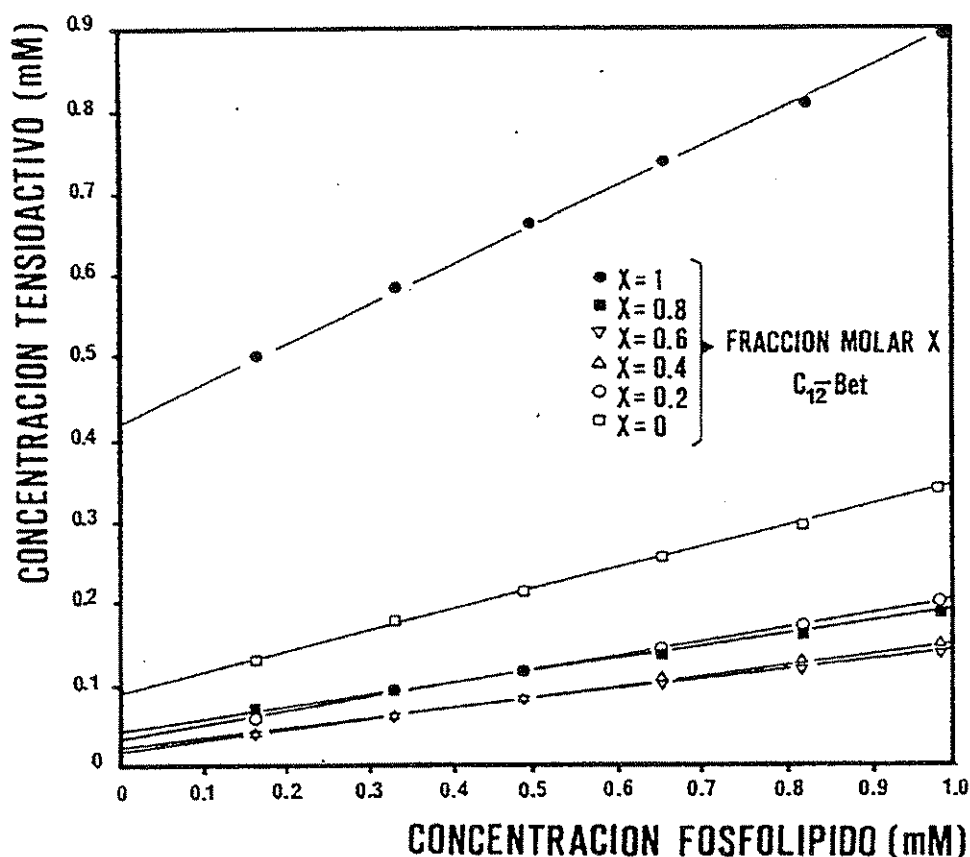


FIGURA 5. Concentraciones de tensioactivo que promueven el 50% de permeabilidad de los liposomas para diferentes fracciones molares de los tensioactivos C₁₂-Bet/SDS frente a la concentración de fosfolípido.

En dicha Tabla puede observarse que la concentración de tensioactivo en el medio acuoso (S_w) es siempre inferior a su correspondiente valor de cmc en el medio de trabajo. Este resultado sugiere que las interacciones de los sistemas mixtos de tensioactivo estudiados con liposomas viene determinada principalmente por la acción de los monómeros de tensioactivo sobre las bicapas lipídicas, inversamente a lo que ocurre en procesos

de solubilización, donde la formación de micelas juega un papel fundamental^{9,17}. Puede observarse asimismo, que tanto los valores de S_w como los de R_{off} decrecen al aumentar el valor de la fracción molar del componente anfotérico observándose un máximo para X=0.4. Al relacionar los valores de R_{off} con sus correspondientes valores de S_w se obtienen los valores de los coeficientes de partición K para cada una de las fracciones molares estudiadas. Puede

observarse que el máximo valor de K se obtiene asimismo para la fracción molar del tensioactivo anfotérico X=0.4.

Representando los valores obtenidos de K

frente a las distintas fracciones molares de tensioactivos estudiadas se obtiene la curva indicada en la Figura 6 cuya ecuación y coeficiente de regresión son los siguientes:

$$Y = 2.865 + 8.129 X - 9.776 X^2$$

$$r^2 = 0.990$$

(6)

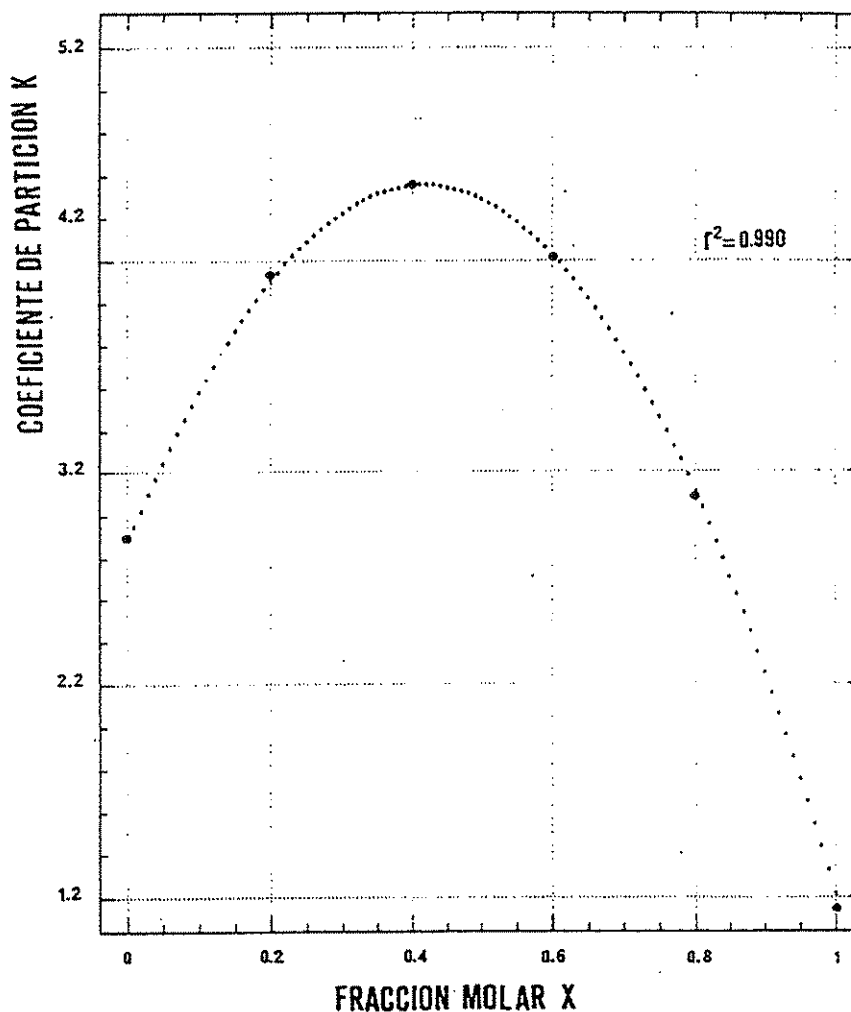


FIGURA 6. Relación entre los coeficientes de partición K y las fracciones molares de los distintos sistemas mixtos de los tensioactivos C₁₂-Bet/SDS.

Comparando las Figuras 2 y 6 puede observarse que las curvas de ambas figuras presentan tendencias contrarias, mostrando un valor mínimo de cmc y máximo de coeficientes de partición para el mismo valor de fracción molar X= 0.4. Asimismo, considerando los resultados indicados en la Figura 3 y los coeficientes de partición para cada una de las fracciones molares estudiadas puede establecerse una asociación directa entre dichos coeficientes

y la capacidad de cada sistema mixto de tensioactivos de modificar la permeabilidad de liposomas.

En conclusión, los cambios en las propiedades fisicoquímicas (cmc y su valor de tensión superficial) de los sistemas mixtos formados por los tensioactivos C₁₂-Bet/SDS determinan su capacidad en alterar la permeabilidad de vesículas fosfolípicas. Los valores de los coeficientes de par-

tición de dichos sistemas mixtos de tensioactivos entre la bicapa lipídica y la fase acuosa resultan asimismo afectados por estos cambios físico-químicos presentando un máximo para un valor de fracción molar de 0.4.

4. BIBLIOGRAFIA

1. Iwasaki, T., M. Ogawa, K. Esumi, y K. Meguro, *Langmuir*, **7**:30 (1991).
2. Cooper E.R. and B. Berner, *Surfactants in Cosmetics*, Surfactant Science Series, ed; M.M. Rieger, Marcel Dekker Inc. New York, Vol 16, Chapter 7 (1985).
3. Dominguez, J., F. Balaguer, J.L. Parra, y C.M. Pelejero, *Int J. Cosm. Sci.*, **3**:57 (1981).
4. Faucher, J.A. y E.D. Goddard, *J. Soc. Cosm. Chem.* **29**:323 (1978).
5. Abe, M., K. Kato y K. Ogino, *J. Colloid Interface Sci.*, **127**:328 (1989).
6. Janson, M. y R. Rymden, *J. Colloid Interface Sci.* **119**:185 (1987).
7. Papahadjopoulos, D., in *Liposomes and their Uses in Biology and Medicine*, edited by Ann. New York, Acad. Sci., pp.1-462, (1978).
8. Ostro, M.J., *Scientific American*, **256**:90 (1987).
9. Hellenius, A. and K. Simons, *Biochim. Biophys. Acta*, **415**:29 (1975)
10. Uena, M., C. Tanford and J.A. Reynolds, *Biochemistry*, **23**:3070 (1984).
11. Enoch, H.G. and P. Strittmatter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**:145 (1979).
12. Gerritsen, W.J., A.J. Verkleij, R.F. Zwaal and L.L. Van Deenen, *Eur. J. Biochem.* **85**:255 (1978)
13. Peterson, S.W., S. Hanna, and D.W. Deamer, *Arch. Biochem. Biophys.* **191**:224 (1978).
14. Sunamoto, J., K. Iwamoto, H. Ikeda, and K. Furuse, *Chem. Pharm. Bull.* **31**:4230 (1983).
15. Sappey Marinier, D., R. Letoublon and J. Delmau, *J. of Lipid Res.* **29**:1237 (1988).
16. Thewalt, J.L. and R.J. Cushley, *Biochim. Biophys. Acta*, **905**:329 (1987).
17. Lichtenberg, B.R., J. Robson and E.A. Dennis, *Biochim. Biophys. Acta*, **737**:285 (1983).
18. Hellenius, A., D.R. Mc Caslin, E. Fries and C. Tanford, *Methods Enzymol.* **56**:734 (1979).
19. Alonso, A., R. Saez, A. Villena and F.M. Gofí, *J. Membrane Biol.* **67**:55 (1982).
20. Alonso, A., R. Saez and F.M. Goni, *FEBS Lett.*, **137**:141 (1982).
21. Jackson, M.L., D. Schmidt, B.J. Lichtenberg, A. Litman and A.D. Albert, *Biochemistry*, **21**:4576 (1982).
22. Schubert, R., K. Beyer, H. Wolburg and K.M. Schmidt, *Biochemistry*, **25**:5263 (1986).
23. De la Maza, A., M.T. Garcia, I. Ribosa, J.L. Parra, J. Sanchez Leal, *Jorn. Com. Esp. Deterg.* **21**, 405-423 (1990).
24. De la Maza, A., J. Sanchez Leal, J.L. Parra, M.T. Garcia, y I. Ribosa *J. Amer. Oil.Chem.Soc.*, **68**, 315 (1991).
25. De la Maza, A., J.L. Parra, M.T. Garcia, I. Ribosa, y J. Sanchez Leal, *J. Colloids and Surfaces*, **61**:281 (1991).
26. Singleton, W.S., M.S. Gray, M.L. Brown, and J.L. White, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **42**:53, (1965).
27. Rosen, M.J., *J. Colloid and Interface Sci.* **79**, 587 (1981).
28. Raiston, E., L.M. Hjelmeland, R.D. Klausner J.N. Weinstein and R. Blumenthal, *Biochim. Biophys. Acta*, **649**:133 (1981).
29. Rigaud, J.L., A. Bluzat y S. Buschlen, *Physical Chemistry of Transmembrane Ion Motion*, ed.; G. Spach, Elsevier Amsterdam, pp. 457-464. (1983)
30. Paternostre, M.T., M. Roux, and J.L. Rigaud, *Biochemistry* **27**:2668 (1988).
31. Szoka, F. y D. Papahadjopoulos, *Liposomes: Preparation and Characterization*, edited by C. G. Knight, Elsevier, Amsterdam, Chapter 3. (1981)
32. Szoka, F., F. Olson, T. Heath, W. Vail, E. Mayer y D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta*, **601**:559 (1980).
33. Lunkenheimer, K. and D. Wantke, *Colloid and Polymer. Sci.* **259**:354 (1981).
34. Allen, R.J.L., *Biochem. J.* **34**:858 (1940).
35. Weinstein, J.N., E. Raiston, L.D. Leserman, R.D. Klausner, P. Dragsten, P. Henkart and R. Blumenthal, in *Liposome Technology*, edited by Gregoriadis, G. CRC. Press. Boca Raton Florida, Vol. III, pp. 183-205. (1986)
36. Lichtenberg, D., *Biochim. Biophys. Acta*, **821**:470 (1985).
37. Rosen, M.J., B.Y. Zhu, *J. Colloid Interface Sci.* **99**:427 (1984).
38. Rosen, M.J., *J. Am. Oil Chem. Soc.* **51**:461 (1974).
39. Cox, M.F., N.F. Borys y T.P. Matson, *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **62**:139 (1985).
40. Ogino, K., M. Abe, K. Kato, y R. Sakama, *J. Jpn. Oil Chem. Soc.*, **36**:129 (1987).
41. Lichtenberg, D., Y. Zilberman, P. Greenzaid y S. Zamir, *Biochemistry*, **18**, 5317 (1979).
42. Alonso, A., M.A. Urbaneja, F.G. Carmona, F.G. Canovas, J.C. Gómez-Fernández, y Gofí, F.M., *Biochim. Biophys. Acta*, **902**:237 (1987).

Trabajo recibido en 1993.09.20;
 Aceptado en 1993.10.01.