

# Efecto de los tensioactivos no-iónicos sobre la permeabilidad de los liposomas

por **A. de la Maza, M.T. García, J. Sánchez Leal, J.L. Parra**

Instituto de Tecnología Química y Textil. CSIC. Jordi Girona, 18-26, 08034 Barcelona, España  
e **I. Ribosa**

Asociación de Investigación de Detergentes (A.I.D.). Barcelona, España

**RESUMEN:** En el presente trabajo se estudian las variaciones en la permeabilidad de poblaciones de liposomas tipo SUV (small unilamellar vesicles), promovidas por tensioactivos no iónicos de la familia de los octil-fenoles oxietilenados; el intervalo en el número de moles de óxido de etileno considerado, está comprendido entre 9,5 y 20. Los estudios de los cambios de permeabilidad promovidos por los tensioactivos, se realizaron valorando la difusión de 5-(6)-Carboxifluoresceína encapsulada en las vesículas. Se estableció así un orden de eficacia permeabilizante de los octil-fenoles frente a las vesículas fosfolipídicas y se postula un mecanismo de la interacción tensioactivo/liposoma que genera estas variaciones en la permeabilidad de las membranas estudiadas.

**PALABRAS CLAVE:** Liposomas, tensioactivos no iónicos, cambios en la permeabilidad, difusión de la carboxifluoresceína.

**ABSTRACT:** PERMEABILITY CHANGES IN THE PHOSPHOLIPID BILAYERS CAUSED BY NONIONIC SURFACTANTS. The abilities of different ethoxylated octyl phenol non-ionic surfactants (number of ethylene oxide units between 9,5 and 20) to modify the permeability of small unilamellar vesicle (SUV) population of liposomes have been investigated. For this purpose, the release of the fluorescent agent 5-(6)-Carboxifluorescein from the interior of liposome vesicles induced by the presence of these non ionic surfactants was studied; a mechanism of the surfactant/liposome interaction which would promote permeability changes is proposed.

**KEY WORDS:** Liposomes, non ionic surfactants, permeability changes, carboxyfluorescein release.  
COPYRIGHT 1992 by Academic Press, Inc.  
COPYRIGHT de la traducción 1992 ITQT. CSIC.

## 1. INTRODUCCION

El estudio de la interacción entre tensioactivos y liposomas presenta un gran interés y ha sido motivo de diversos estudios en la última década (1,2). Dichas investigaciones se han centrado básicamente en dos vertientes. Por un lado, se han desarrollado estudios acerca de las propiedades físico-químicas de los sistemas lípido-tensioactivo, especialmente dirigidas al desarrollo de nuevos métodos de preparación de liposomas, tanto a escala de laboratorio (3,4), como a nivel industrial (5-7). Por otro lado, estas interacciones lípido-tensioactivo se han valorado desde la perspectiva de la solubilización o cambios en la permeabilidad promovidos en las membranas biológicas por dichos agentes tensioactivos (8-12). En este aspecto, estos trabajos engloban tanto el estudio de la acción de los tensioactivos sobre las bicapas fosfolipídicas, como la posibilidad de profundizar en el conocimiento de procesos biológicos de gran relevancia en el intercambio celular.

Dentro de las diversas familias de tensioactivos no

iónicos, una de las de mayor interés es la de los alquilfenoles oxietilenados, ya que en este tipo de tensioactivos puede variarse fácilmente el balance HLB, modificando el número de moles de óxido de etileno de su resto hidrófilo; esta razón, unida a otras de tipo económico y ecológico, pueden explicar el incremento en su utilización en países industrializados (13).

La aplicación de los octil-fenoles al campo de la biología, especialmente del octil-fenol con 10 moles de óxido de etileno (Triton X-100) ha sido de interés relevante, existiendo en la bibliografía numerosas publicaciones concernientes a la interacción de dicho tensioactivo con proteínas (14-16), así como con estructuras fosfolipídicas (16-22)

Al estudiar las interacciones entre tensioactivos y liposomas, a concentraciones de tensioactivo inferiores a las que promueve la solubilización de las membranas lipídicas, el tensioactivo incorporado a la bicapa provoca alteraciones importantes en las propiedades físico-químicas del sistema (11,12), pudiéndose producir cambios en la permeabilidad de dichas membranas. A estas concentraciones de tensioactivo, se admite, generalmente, que se

establece un equilibrio en la distribución del tensioactivo entre la bicapa lipídica y el medio acuoso, siendo este equilibrio el que gobierna la incorporación del tensioactivo a la bicapa.

Para un sistema que contenga una concentración total de fosfolípido PL(mM) y una concentración total de tensioactivo  $S_T$ (mM), correspondiendo  $S_W$  a la concentración de tensioactivo en el medio acuoso y  $S_B$  la concentración de tensioactivo en la bicapa lipídica, se puede definir un coeficiente de partición como (1)

$$K = \frac{S_B/PL}{S_W}$$

Definiendo  $R_{eff}$  como la relación efectiva de tensioactivo respecto a fosfolípido, es decir:

$$R_{eff} = \frac{S_B}{PL}$$

resulta que:

$$K = \frac{R_{eff}}{S_W}$$

En el presente trabajo, se ha investigado la capacidad de los tensioactivos no-iónicos de la familia de los octil fenoles, con un número de moles de óxido de etileno en su molécula comprendido entre 9,5 y 20, para modificar la permeabilidad de poblaciones de liposomas SUV (small unilamellar vesicles). El hecho de centrar el estudio entre 9,5 y 20 moles de OE es debido a que por debajo de 8,5 moles de OE el tensioactivo no es soluble en el medio de trabajo y, por encima de 20 moles de OE, la falta de estabilidad del sistema tensioactivo/liposoma impide estudiar de forma reproducible, los cambios en la permeabilidad promovidos por el tensioactivo.

El estudio se ha realizado valorando los cambios en la permeabilidad de un liposoma en el que se ha encapsulado el agente fluorescente 5 (6) Carboxifluoresceína y que son promovidos por la presencia de tensioactivos en el medio. Al representar en ordenadas la concentración de tensioactivo que promueve el 50% de permeabilidad de los liposomas, frente a la concentración de fosfolípido de dichos liposomas en abcisa, se observa una relación lineal que puede ser descrita por la siguiente ecuación:

$$S_T = S_W + R_{eff} = (PL)$$

Los valores experimentales del coeficiente de bipartición K anteriormente comentado, pueden determinarse a través de los valores de la pendiente ( $R_{eff}$ ) y de la ordenada en el origen ( $S_W$ ). Los valores de K, así obtenidos, pueden ayudar a establecer un criterio en la evaluación de la actividad de cada uno de los tensioactivos frente a las vesículas fosfolípicas.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1. Productos

*Fosfatidilcolina (PC)*. El producto de partida fue lecitina de huevo (Merck). Este producto se purificó según el método descrito por Singleton (23). La pureza se comprobó por cromatografía de capa fina y se determinó la composición en ácidos grasos por cromatografía de gases.

*Acido fosfatídico (Ac. P)* Obtenido de lecitina de huevo (Sigma) siendo su riqueza superior al 98%.

*Octil-fenoles*; con 9,5 moles de óxido de etileno (OP-9,5 OE), 12,5 moles de óxido de etileno (OP-12,5 OE), 15,0 moles de óxido de etileno (OP-15,0 OE) y 20,0 moles de óxido de etileno (OP-20,0 OE) de pureza 99% y fueron suministrados por la firma Tenneco S.A.

*Tampón pipes*. Solución acuosa 20 mM en ácido piperazín 1,4 bis (2-etano sulfónico) y 110 mM en  $Na_2SO_4$  cuyo pH se ajustó a 7,20 mediante adición de NaOH.

*5-(6) Carboxifluoresceína (CF)*. El material de partida (Eastman Kodak) fue purificado según el método cromatográfico descrito por Ralston (24). La concentración final de CF se ajustó a 100 mM con solución de tampón pipes.

### 2.2. Métodos

#### *Medidas de tensión superficial.*

Las determinaciones de tensión superficial se efectuaron según el método del anillo (25) utilizando un tensiómetro automático Lauda. Los valores aparentes de tensión superficial se corrigieron según los factores de Harkins-Jordan.

#### *Determinación de Fósforo*

La concentración exacta de fosfolípido se determinó utilizando el método de fósforo descrito por Allen (26).

#### *Preparación de Liposomas*

Las poblaciones de SUV (small unilamellar vesicles) se prepararon por sinicación a partir de poblaciones LUV (large unilamellar vesicles), previamente obtenidas por el método de evaporación en fase reversa (27,28), basado en el inicialmente descrito por Szoka y Papahadjopoulos y que se expone a continuación, de forma abreviada.

Se evaporó una mezcla clorofórmica que contenía fosfatidilcolina y ácido fosfatídico en una relación molar 9:1. La inclusión de ácido fosfatídico en la formulación se basó en que la tendencia de los liposomas a agregarse o fusionarse puede ser controlada por la adición de pequeñas cantidades de fosfolípidos ácidos o básicos. Los fosfolípidos se disolvieron en éter, el cual se mezcló en proporción 3:1 (v/v) con solución de tampón Pipes conteniendo una concentración 10 mM de CF. La

sonicación con sonda de ultrasonidos en condiciones suaves, condujo a la formación de una emulsión del tipo W/O. Al evaporar el éter bajo presión reducida, se formó un gel viscoso. La eliminación de las últimas trazas de fase orgánica transformaron el gel en una suspensión de liposomas.

Los liposomas SUV se prepararon por sonicación energética a partir de los LUV previamente preparados, utilizando un sonicador de sonda Braun modelo Labsonic 1510, durante 15 minutos, a una temperatura de 40°C y a una potencia de 100 W. Finalizada la sonicación, se separó el material no encapsulado de las vesículas liposómicas, pasando la población de liposomas a través de una columna cromatográfica rellena de resina Sephadex G-50 medium (Pharmacia). La columna se eluyó con tampón Pipes y, finalmente, la población de liposomas se enrasó a un volumen determinado, del que posteriormente se analizó el contenido en fosfolípido. El rango de concentraciones de fosfolípido utilizado fue de 0,1 mM a 1,0 mM.

#### Medidas de la permeabilidad de los liposomas

Las medidas de fluorescencia de la CF difundida desde el interior de las vesículas fosfolípicas, se realizó utilizando un espectrofluorímetro Shimadzu RF-540 equipado con compartimiento de célula fotoeléctrica termostático. Fijando la longitud de onda de excitación de la CF a 495 nm, se obtuvo un máximo de emisión de fluorescencia a una longitud de onda de 515,4 nm.

Las muestras de suspensión de liposomas previamente preparadas, se sometieron en cubeta de cuarzo, a la acción de soluciones tamponadas conteniendo diferentes concentraciones de tensioactivo. Todos los ensayos se realizaron a 25°C. La cantidad total de CF encapsulada en los liposomas se determinó por destrucción completa de los mismos añadiendo 60 µl de una solución acuosa de Triton X-100 al 10% (v/v) a 2 ml de suspensión de liposomas (30).

Se calculó la cantidad de CF difundida aplicando la siguiente ecuación

$$\% \text{ CF difundida} = \frac{I_t - I_o}{I_w - I_o} \times 100$$

donde  $I_o$  corresponde al valor de la intensidad de fluorescencia inicial, antes de adicionar tensioactivo al liposoma,  $I_t$  corresponde al valor de la intensidad de fluorescencia medida a los 15 minutos después de haber añadido el tensioactivo y  $I_w$  es la intensidad de fluorescencia después de destruido el liposoma con Triton X-100.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSION

#### 3.1. Determinación de la composición en ácidos grasos de la PC

El fosfolípido que se utilizó para la formación de liposomas fue PC de huevo, cuya temperatura de transición  $T_m$  es -11°C (9), lo que permite trabajar a temperatura

ambiente. La composición en ácidos grasos, determinada por cromatografía de gases, de la PC utilizada fue la siguiente:

ácido palmítico	(16:0)	37,7%
ácido esteárico	(18:0)	7,0%
ácido oleico	(18:1)	36,4%
ácido linoleico	(18:2)	17,5%

#### 3.2. Volumen interno de la población de liposomas

Se define el volumen interno de una población de liposomas, como la fracción de soluto atrapado en el interior de las vesículas. En el presente trabajo, el volumen interno se expresa como el volumen de CF encapsulado en las vesículas, referido a la concentración total de fosfolípido (31).

En la tabla I se indica el volumen interno (expresado en ml de CF encapsulado por mmol de PC) de suspensiones de liposomas, para concentraciones de fosfolípido comprendidas entre 0,1 y 1,0 mM. Puede observarse que el volumen interno es, en todos los casos, inferior a 0,5 ml/mmol de lípido, lo que confirma que estos liposomas son del tipo SUV (32).

#### 3.3. Determinación de la concentración micelar crítica (cmc)

En el estudio de los cambios de permeabilidad de liposomas que pueden causar los tensioactivos, es importante conocer la concentración micelar crítica (cmc) de estos tensioactivos en el medio de trabajo. En la Tabla II se representan los valores de la cmc de cada uno de los tensioactivos utilizados, tanto en medio acuoso como en el medio tamponado de trabajo a partir de los valores de tensión superficial.

Puede observarse que no existe gran variación entre los valores de cmc obtenidos para cada tensioactivo en medio acuoso y los obtenidos en el medio tamponado, a pesar de la elevada fuerza iónica del medio; en cualquier caso, los valores de cmc en el medio tamponado son ligeramente inferiores.

TABLA I

CONCENTRACION DE FOSFOLIPIDO

	0.165 mM	0.330 mM	0.495 mM	0.660 mM	0.825 mM	0.990 mM
Volumen interno	0,40	0,39	0,38	0,39	0,37	0,38

TABLA II

Tensioactivo	Concentración micelar crítica (mMolar)	
	Agua 25°C	Tampón Pipes 25°C
OP- 9,5 OE	0,20	0,08
OP-12,5 OE	0,18	0,06
OP-15,0 OE	0,23	0,14
OP-20,0 OE	0,25	0,17

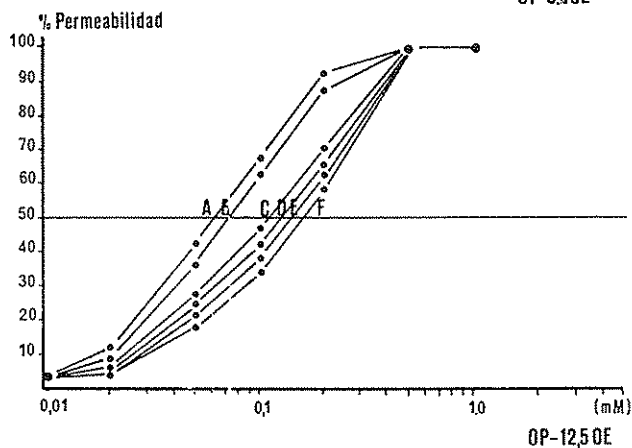
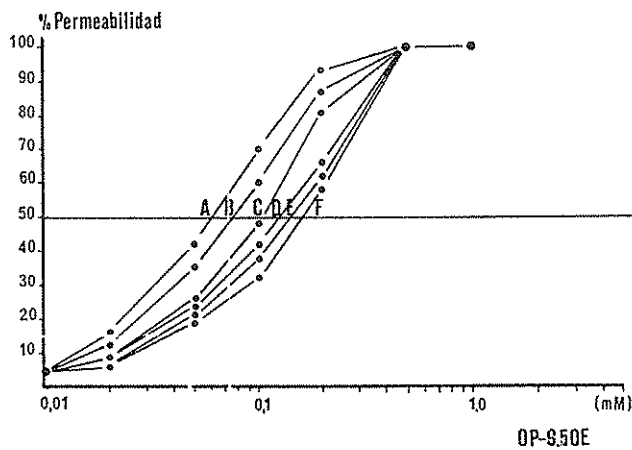


Fig. 1: Permeabilidad promovida por OP-9,5 OE y OP-12,5 OE sobre diferentes poblaciones de liposomas. A: 0,165 mM; B: 0,330 mM; C: 0,495 mM; D: 0,660 mM; E: 0,825 mM y F: 0,990 mM.

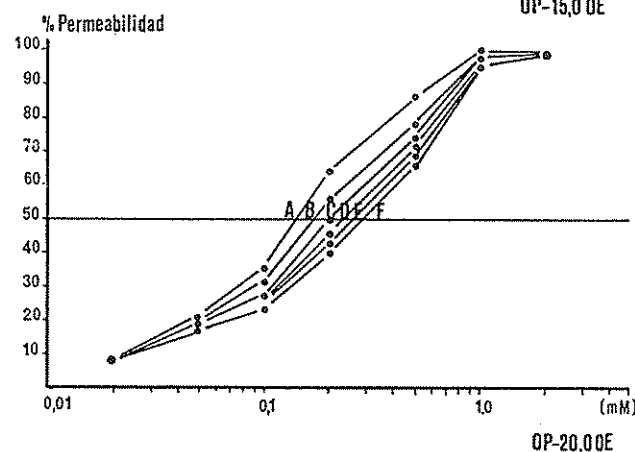
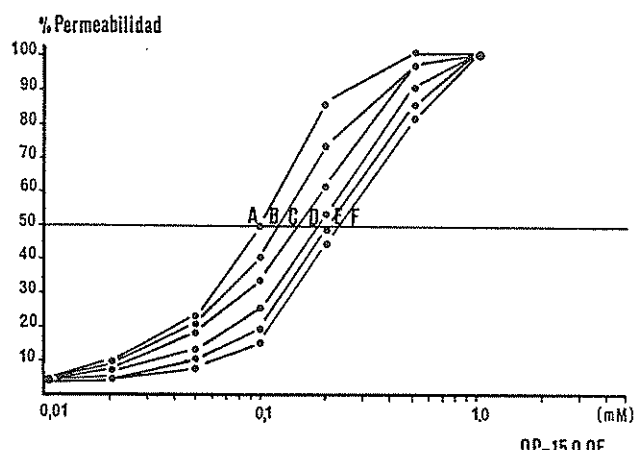


Fig. 1: Permeabilidad promovida por OP-15,0 OE y OP-20,0 OE sobre diferentes poblaciones de liposomas. A: 0,165 mM; B: 0,330 mM; C: 0,495 mM; D: 0,660 mM; E: 0,825 mM y F: 0,990 mM.

### 3.4. Estudios de Permeabilidad

Para conocer el coeficiente de partición de los tensioactivos entre el medio acuoso y la bicapa lipídica, se han realizado sistemáticas investigaciones de la permeabilidad de poblaciones de liposomas SUV, estudiando los cambios producidos por dichos tensioactivos en la permeabilidad de los liposomas, para un rango de concentraciones de fosfolípido comprendido entre 0,1 y 1,0 mM. Para una determinada población de liposomas, se define la actividad del tensioactivo frente a dichos liposomas, como la concentración total de tensioactivo necesaria para promover el 50% de permeabilidad del liposoma.

En las figuras 1 y 2 se indican los cambios de permeabilidad (%) promovidos por los tensioactivos investigados en distintas poblaciones de liposomas.

Si se considera una única y común población de liposomas para todos los tensioactivos estudiados, puede deducirse de las figuras 1 y 2, el siguiente orden de actividad de los mismos:

$$OP-12,5 OE \geq OP-9,5 OE > OP-15,0 OE > OP-20,0 OE$$

Es decir, los tensioactivos que precisan menor concentración para promover el 50% de permeabilidad en

distintas poblaciones de liposomas SUV, son el OP-12,5 OE y el OP-9,5 OE, siendo el OP-20,0 OE el que ha de estar en mayor concentración para promover esta permeabilidad del 50%. En consecuencia, la actividad de los octilfenoles frente a liposomas puede ser muy dependiente del número de moles de óxido de etileno de su resto hidrófobo, situándose el máximo de actividad en el intervalo 9,5 -12,5 moles de óxido de etileno.

Con el fin de profundizar en el conocimiento del mecanismo que rige las interacciones tensioactivo/liposoma, se ha considerado no sólo una única y común población liposómica, sino que se ha tenido en cuenta cada una de las poblaciones de liposomas estudiadas. La representación de las concentraciones de cada tensioactivo generador del 50% de permeabilidad frente a las concentraciones de fosfolípido de cada población se representa en la figura 3.

En esta figura, se aprecia una buena correlación lineal para cada una de las rectas, que, como se indicó anteriormente, corresponden a la ecuación:

$$S_T = S_W + R_{\text{eff}} PL$$

donde la relación efectiva de los tensioactivos respecto a la concentración molar de fosfolípido ( $R_{\text{eff}}$ ) y la concen-

TABLA III

Tensioactivo	$S_w$	$R_{eff}$	K
	mM	mol/mol	mM <sup>-1</sup>
OP- 9,5m OE	0,039	0,124	3,14
OP-12,5m OE	0,038	0,126	3,31
OP-15,0m OE	0,075	0,151	2,01
OP-20,0m OE	0,114	0,165	1,44

tración de tensioactivo en el medio acuoso ( $S_w$ ) son, respectivamente, las pendientes de las rectas indicadas en la figura 3 y sus ordenadas en el origen.

En la Tabla III se indican los valores obtenidos de  $S_w$  y  $R_{eff}$ , así como el valor del coeficiente de bipartición K, calculadas a partir de los datos anteriores para los tensioactivos investigados.

Puede observarse que los valores de  $S_w$ , es decir, la concentración de tensioactivo en el medio acuoso necesaria para generar el 50% de permeabilidad de las poblaciones de liposomas investigados, son menores en todos los casos a sus correspondientes valores de cmc. Así, el tensioactivo OP-9,5 OE presenta un valor de  $S_w$  que corresponde al 48,7% de su correspondiente valor de cmc, el valor  $S_w$  del tensioactivo OP-12,5 OE corresponde al 63,6% de su valor de cmc, mientras que los tensioactivos OP-15,0 OE y OP 20,0 OE, presentan valores de  $S_w$  que corresponden, respectivamente, al 55,5 % y 68,9 % de sus correspondientes valores de cmc, en el medio de trabajo empleado. Estos resultados indican que la interacción tensioactivo/liposoma para concentraciones de tensioactivo subsolubilizable, puede atribuirse a la acción de monómeros de tensioactivo sobre la bicapa fosfolipídica. Cuando la concentración de tensioactivo es superior, se observan procesos de solubilización de la bicapa fosfolipídica, jugando en este caso las micelas un papel muy importante (8,9).

Respecto a los valores de  $R_{eff}$  indicados en la Tabla III para cada tensioactivo, se observa que a medida que se incrementa el número de moles de óxido de etileno en la estructura de cada tensioactivo, el valor de  $R_{eff}$  crece, es decir, la cantidad de tensioactivo en la bicapa fosfolipídica necesaria para general el 50% de permeabilidad de los liposomas debe ser mayor. Ello indicaría un criterio inverso al de actividad.

Se indican, asimismo, en la Tabla III los valores del coeficiente de bipartición K; puede observarse que los tensioactivos que presentan un valor de K mayor (OP-12,5 OE y OP-9,5 OE) son, a su vez, los tensioactivos que presentan una mayor actividad, pudiéndose establecer una buena correlación entre los coeficientes de bipartición K y la actividad de los tensioactivos indicada anteriormente.

Representando los valores de K de cada tensioactivo en función del balance hidrófilo-lipófilo (HLB) de los mismos, se obtiene la gráfica indicada en la figura 4.

Puede observarse que el valor máximo de la curva se

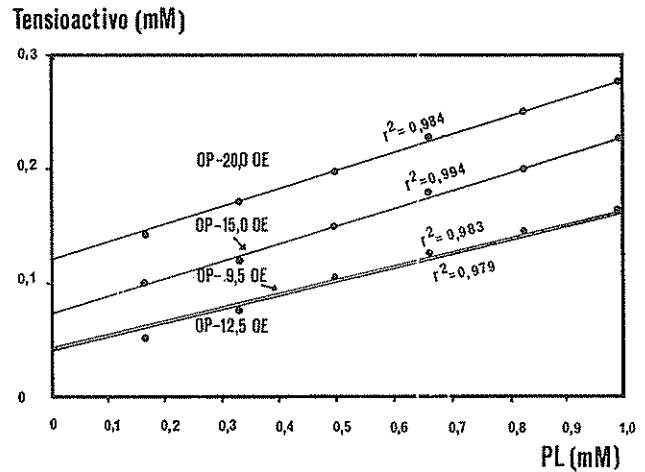


Fig. 3: Concentraciones de tensioactivo que promueven el 50 % de permeabilidad frente a concentraciones de fosfolípidos.

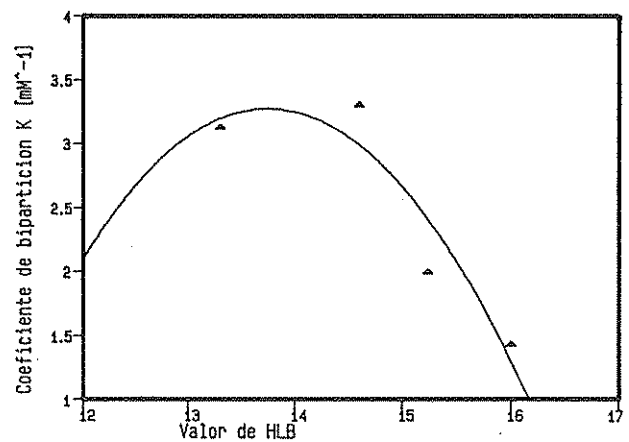


Fig. 4: Relación entre los coeficientes de bipartición K de los octil fenoles etoxilados estudiados y el valor HLB de los mismos.

obtendría para un octil fenol oxi-etileno con un blanco HLB de 13,7, el cual teóricamente corresponde a un contenido en moles de óxido de etileno de 10. Este resultado justificaría experimentalmente la utilización del Triton X-100 en gran cantidad de trabajos científicos sobre liposomas, como agente energicamente destructor de las bicapas fosfolipídicas (17-22).

#### 4. CONCLUSIONES

— Respecto a la estructura de los octil fenoles oxi-etileno investigados, se observa que la eficacia permeabilizante de dichos tensioactivos frente a poblaciones de liposomas depende del número de moles de óxido de etileno de su estructura, siendo óptima para un número comprendido entre 9,5 y 12,5 moles OE.

— La interacción tensioactivo/liposoma para concentraciones de tensioactivo subsolubilizable es atribuible a la acción de los monómeros de tensioactivo sobre las bica-

pas fosfolipídicas, ya que los valores de  $S_W$  hallados por todos los tensioactivos investigados, es inferior al valor de su cmc en el medio tamponado utilizado.

– Los valores de los coeficientes de bipartición de los tensioactivos entre el medio acuoso y la bicapa fosfolipídica, están en consonancia con el índice de actividad permeabilizante de dichos tensioactivos, obteniéndose el valor máximo de K para un número de moles de OE de 10.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Lichtenberg, D. Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* 821, 470-478 (1985).
- 2) Uena, M., Tanford, C., Reynolds, J.A. Phospholipid vesicle formation using nonionic detergents with low monomer solubility. Kinetic factors determine vesicle size and permeability. *Biochemistry* 23, 3070-3076 (1984).
- 3) Enoch, H.G., Strittmatter, P. Formation and properties of 1000-Å-diameter, single bilayer phospholipid vesicle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 145 (1979).
- 4) Mimms, L.T., Zampighi, G., Nozaki, Y., Tanford, C., Reynolds, J.A. Phospholipid vesicle formation and transmembrane protein incorporation using octyl glucoside. *Biochemistry* 20, 833 (1981).
- 5) Millsman, M.H.W., Schwendener, R.A., Weder, H.G. The preparation of large single bilayer liposomes by a fast and controlled dialysis. *Biochim. Biophys. Acta* 512, 147 (1978).
- 6) Zumbuehl, O., Weder, H.G. Liposomes of controllable size in the range of 40 to 180 nm by defined dialysis of lipid/detergent mixed micelles. *Biochim. Biophys. Acta* 640, 252 (1981).
- 7) Schwendener, R., Asanger, M., Weder, H.G. n-Alkyl-glucosides as detergents for the preparation of highly homogeneous bilayer liposomes of variable sizes (60-240 nm) applying defined rates of detergent removal by dialysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 100, 1055 (1981).
- 8) Hellenius, A., Simons, K. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 415, 29-79 (1975).
- 9) Lichtenberg, B.R., Robson, J., Dennis, E.A. Solubilization of phospholipids by detergents. *Biochim. Biophys. Acta* 737, 285-304 (1983).
- 10) Alonso, A., Saez, R., Goñi, F.M. The interaction of detergents with phospholipid vesicles. *FEBS Lett* 137, 1, 141-145 (1982).
- 11) Jackson, M.L., Schmidt, C.F., Lichtenberg, D., Litman, B.J., Albert, A.D. Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside. *Biochemistry* 21, 4576-4582 (1982).
- 12) Schubert, R., Beyer, K., Wolburg, H., Schmidt, K.M. Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate. *Biochim. Biophys. Acta* 25, 5263-5269 (1986).
- 13) Cross, J. Introduction to nonionic surfactants, nonionic surfactants chemical analysis. *Surfactant Science Series*, Ed. J. Cross, M. Dekker, New York, vol 19, 17-20 (1987).
- 14) Hellenius, A., Simons, K. The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* 247, 11, 3656-3661 (1972).
- 15) Osborne, H.B., Sardet, C., Hellenius, A. Bovine Rhodopsin: Characterization of the complex formed with Triton X-100. *Eur. J. Biochem.* 44, 383-390 (1974).
- 16) Robinson, N.C., Tanford, C. The binding of desoxycholate, Triton x-100, sodium dodecyl sulfate and phosphatidylcholine vesicles to cytochrome b5.
- 17) Allen, T.M., Romans, A.Y., Kercret, H., Segrest, J.P. Detergent removal during membrane reconstitution. *Biochim. Biophys. Acta* 601, 328 (1980).
- 18) Cheetam, P.S.J. Removal of Triton X-100 from aqueous solution using Amberlite XAD-2. *Anal. Biochem.* 92, 447 (1979).
- 19) Gregoriadis, G. *Liposome Technology*. CRC Press, vol. 1, 114-118 (1986).
- 20) Sappey Marinier, D., Letoublon, R., Delmau, J. Phosphorous NMR analysis of human white matter in mixed non-ionic detergent micelles. *J. of lipid res.* 29, 1237-1243 (1988).
- 21) Alonso, A., Saez, R., Villena, A., Goñi, F. Increase in size of sonicated phospholipid vesicles in the presence of detergents. *J. Membrane Biol.* 67, 55-62 (1982).
- 22) Ribosa, I., García, M.T., de la Maza, A., Trullas, C. Estudio del proceso de solubilización de estructuras fosfolipídicas por agentes tensioactivos. *J. Com. Deterg.* XX, (1989).
- 23) Singleton, W.S., Gray, M.S., Brown, M.L. White, J.L. Chromatographically homogeneous lecithin from egg phospholipids. *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 42, 53-56 (1965).
- 24) Ralston, E., Hjelmland, L.M., Klausner, R.D., Weinstein, J.N., Blumenthal, R. Carboxyfluorescein as a probe for liposome-cell interactions. Effect of impurities and preparation of the dye. *Biochim. Biophys. Acta* 649, 13-137 (1981).
- 25) Lunkenheimer, K., Wantke, D. Determination of the surface tension of surfactant solutions applying the method of Lecomte du Nouy (ring tensiometer). *Colloid and Polymer Sci.* 259, 354-366 (1981).
- 26) Allen, R.J.L. The estimation of Phosphorus. *Biochem. J.*, 34, 858-862 (1940).
- 27) Rigaud, J.L., Bluzat, A., Buschlen, S. Physical chemistry of transmembrane ion motions. Spach G. Ed. Elsevier Amsterdam, 457-464 (1983).
- 28) Rigaud, J.L., Bluzat, A., Buschlen, S. Incorporation of bacteriorhodopsin into large unilamellar liposomes by reverse phase evaporation. *Biophys. Res. Commun.* 111, 373-382 (1983).
- 29) Szoka, F., Papahadjopoulos, D. *Liposomes: Preparation and characterization in liposomes: From Physical structure to therapeutic applications*. Knight CG Ed. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, Chap. 3 (1981).
- 30) Sunamoto, J., Iwamoto, K., Ikeda, H., Furuse, K. Liposomal Membranes XVIII. Interaction of spermicidal agents with liposomal membranes. *Chem. Pharm. Bull* 31 (12) 4230-4235 (1983).
- 31) Bangham, A.D., Hill, M.W., Miller, N.G.A. Preparation and use of liposomes as models of biological membranes. *Methods in Membranes Biology*, vol I, Plenum Press, New York 1 (1974).
- 32) Deamer, D.W. and Oster, P.S. Liposome Preparation: Methods and Mechanism. In *Liposomes*. Ostro, M.J. Marcel Dekker New York pg. 34-35 (1983).

Recibido: Mayo, 1992  
 Aceptado: Julio, 1992