

46-  
22j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

FORMULACION DE LIPOSOMAS UTILIZANDO  
COMO NUCLEO GRISEOFULVINA

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO**  
**P R E S E N T A N :**  
**REYNOSO                    AVALOS                    CARMEN**  
**ROJAS                        VAZQUEZ                    GRACIELA**

U N A M  
P E S  
Z A R A G O Z A



NO SE PUEDE USAR  
EN NINGUNA CIRCUNSTANCIA

ASESORES: O.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES  
O.F.B. RAMON SOTO VAZQUEZ

MEXICO, D. F.

FEBRERO 1997

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

### **A DIOS**

**GRACIAS, POR ESTAR SIEMPRE CONMIGO EN CADA MOMENTO DE MI VIDA Y POR TODAS LA COSAS BELLAS Y TRISTES QUE HE PASADO, POR QUEELLAS ME PERMITÉN SUPERARME CADA DIA QUE PASA.**

### **A MIS PADRES**

**POR EL GRAN AMOR, COMPRESION Y APOYO QUE ME BRINDAN INCONDICIONALMENTE, SOBRE TODO POR EL GRAN ESFUERZO QUE HAN REALIZADO PARA DARME ESTA PREPARACION, PARA QUE YO LOGRASE ESTA META, LO CUAL REPRESENTA LA MAS VALIOSA HERENCIA QUE PUDIERA RECIBIR EN MI VIDA, NI CON TODOS LOS CONOCIMIENTOS PODRE REMPLAZAR.**

### **A MIS HERMANOS**

**BERTHA, JAVIER, LUCIA, SUSANA Y SANDRA, PORQUE ME HAN PERMITIDO SER PARTE DE USTEDES Y POR TODO EL CARIÑO QUE ME HAN DADO .**

**A MI ESPOSO JESUS**

**CON TODO MI AMOR Y RESPETO GRACIAS POR  
COMPARTIR CONMIGO TUS CONOCIMIENTOS,GRACIAS  
POR TU COMPRESIÓN Y EL APOYO QUE ME BRINDAS  
CADA DIA.**

**TE AMO**

**A MI HIJA NANCY**

**GRACIAS A ELLA HE ENCINTRADO UNO DE LOS  
MEJORES LOGROS, QUE ES EL SER MADRE.**

**A CHELA**

**POR SU AMISTAD, APOYO Y PASIENCIA QUE HA  
BRINDADO DURANTE ESTE TIEMPO**

**GRACIAS**

**CARMEN REYNOSO AVALOS**

**GRACIAS A DIOS**

**QUE ME DIO LA OPORTUNIDAD DE REALIZAR UNA CARRERA PROFESIONAL PARA ORGULLO DE MIS PADRES, EN BENEFICIO MIO Y DE LA SOCIEDAD A LA CUAL PERTENEZCO Y QUIERO SERVIR CON HONESTIDAD Y CALIDAD.**

**A MI MADRE**

**COMO TESTIMONIO Y AGRADECIMIENTO PORQUE SUPO LLEVARME POR BUEN CAMINO A BASE DE SACRIFICIOS Y DESVELOS Y ME BRINDO SU SPOYO MORAL QUE SIEMPRE NECESITÉ, CON EL CUAL HE LOGRADO TERMINAR MI CARRERA PROFESIONAL QUE ES PARA MI LA MEJOR DE LAS HERENCIAS.**

**A MI HERMANO**

**POR SU COMPRESION E IMPULSO QUE SIEMPRE ME BRINDO.**

**A ROBERTO**

**POR SU GRAN CARIÑO QUE ME BRINDA DIA CON DIA Y POR QUE SIEMPRE SIGA ADELANTE.**

**GRACIELA ROJAS VAZQUEZ**

**A CARMEN**

**POR SU VALIOSA AMISTAD Y APOYO QUE ME HA  
DADO SIEMPRE.**

**A IDALIA FLORES**

**POR HABERME APOYADO DURANTE LA FORMACION  
DE MI CARRERA Y POR SU COMPRESION Y CARIÑO  
GRACIAS.**

**GRACIELA ROJAS VAZQUEZ**

**CON GRAN AFECTO Y ADMIRACION, EXPRESAMOS  
NUESTRO ESPECIAL AGRADECIMIENTO A LA Q.F.B.  
PATRICIA PARRA CERVANTES Y RAMON SOTO  
VAZQUEZ POR COMPARTIR CON NOSOTROS SU  
TIEMPO Y EXPERIENCIA, ADEMAS DE HABER  
DIRIGIDO ESTE TRABAJO.**

**AGRADEZCO LA COLABORACION Y VALIOSA AYUDA  
DE LA SEÑORA LUZ MARIA POR SU AMABLE  
DISPOSICION PARA LA REALIZACION DE ESTA TESIS**

**A VICTOR E ISA**

**POR SU AYUDA EN LA REALIZACION DE ESTE  
TRABAJO.**

**AL JURADO Q.F.B. ENRIQUETA CASTREJON RODRIGUEZ  
Q.F.B. PATRICIA PARRA CERVANTES  
Q.F.B. IDALIA L. FLORES GOMEZ  
Q.F.B. RAMON SOTO VAZQUEZ  
Q.F.B. ANTONIO HERNANDEZ CARDOSO**

**LES AGRADESEMOS TODAS SUS CORRECCIONES Y  
SUGERENCIAS PARA CONSEGUIR QUE ESTE TRABAJO  
ALCANZARA UNA CALIDAD SATISFACTORIA**

**GRACIELA Y CARMEN**

## INDICE

<b>INTRODUCCION</b>	<b>1</b>
<b>1. MARCO TEORICO</b>	<b>3</b>
<b>1.1 GRISEOFULVINA</b>	<b>4</b>
<b>1.1.1 PROPIEDADES FISICOQUIMICAS</b>	<b>4</b>
<b>1.1.2 FARMACOCINETICA</b>	<b>6</b>
<b>1.2 LIPOSOMAS</b>	<b>7</b>
<b>1.2.1 DEFINICION DE LIPOSOMAS</b>	<b>7</b>
<b>1.2.2 MATERIAS PRIMAS PARA LA PREPARACION DE LIPOSOMAS</b>	<b>8</b>
<b>1.3 METODOS DE PREPARACION</b>	<b>11</b>
<b>1.3.1 VESICULAS MULTILAMINARES</b>	<b>13</b>
<b>1.3.2 FORMACION DE VUL POR ELIMINACION DE DETERGENTE</b>	<b>13</b>
<b>1.3.3 METODO DE EVAPORACION EN FASE REVERSA</b>	<b>14</b>
<b>1.3.4 METODOS DIVERSOS</b>	<b>16</b>
<b>1.4 CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS</b>	<b>17</b>
<b>1.4.1 EFICIENCIA DE ENCAPSULACION Y VOLUMEN INTERNO</b>	<b>17</b>
<b>1.4.2 FACTORES QUE AFECTAN EL ENCAPSULAMIENTO DEL FARMACO</b>	<b>18</b>
<b>1.4.3 LAMINALIDAD</b>	<b>19</b>
<b>1.4.4 TAMAÑO</b>	<b>19</b>
<b>1.4.5 APLICACIÓN DE LA TEORIA DE DOBLE CAPA PARA LIPOSOMAS</b>	<b>21</b>
<b>1.5 ESTABILIDAD DE LIPOSOMAS</b>	<b>22</b>
<b>1.5.1 ESTABILIDAD QUIMICA</b>	<b>22</b>
<b>1.5.2 ESTABILIDAD EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL</b>	<b>26</b>
<b>1.5.3 ESTABILIDAD DE LIPOSOMAS EN FLUIDOS BIOLOGICOS</b>	<b>26</b>
<b>1.5.4 ESTABILIDAD FISICA</b>	<b>27</b>



<b>1.5.5 FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD FISICA</b>	<b>27</b>
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>29</b>
<b>3.OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>4. HIPOTESIS</b>	<b>31</b>
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL</b>	<b>32</b>
<b>5.1 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO</b>	<b>32</b>
<b>5.2 METODOLOGIA</b>	<b>35</b>
<b>6. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
<b>7. DISCUSION DE RESULTADOS</b>	<b>53</b>
<b>8. CONCLUSIONES</b>	<b>56</b>
<b>9. SUGERENCIAS</b>	<b>57</b>
<b>10. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>58</b>

## INTRODUCCION

En la actualidad, el índice de morbilidad y mortalidad humana ha descendido notablemente debido al desarrollo de más y mejores medicamentos, encontrándose entre los más importantes las formas farmacéuticas con sistemas acarreadores de fármacos, los cuales son encargados de transportar el principio activo hasta el área u órgano deseado; por lo cual atraviesan una serie de barreras anatómicas y biológicas; muchas han sido las aproximaciones experimentales destinadas a obtener este modelo y algunas de ellas han resistido las pruebas aportadas por la experimentación. El uso de liposomas como acarreadores está un poco limitado; sin embargo, se han utilizado a nivel experimental para evaluar distintos fármacos.

Los liposomas, son dispersiones coloidales de moléculas acomodadas en capas biomoleculares en forma esférica, que contienen medio acuoso en forma de compartimentos. Estas formulaciones son de considerable interés en los estudios de interacción membrana-fármaco, como un sistema de liberación de fármacos. Recientemente, se ha puesto atención en la aplicación potencial de los liposomas para estabilizar fármacos dentro de una bicapa de fosfolípidos, mediante un equilibrio de partición con el fin de que el ambiente hidrocarbonado de la bicapa ofrezca protección contra la hidrólisis catalítica de una forma similar a los sistemas micelares, también son utilizados en fármacos con baja absorción intestinal, facilitando el transporte de moléculas que no pueden atravesar la membrana en su estado libre.

Es importante considerar lo mencionado; ya que para este proyecto se seleccionó la griseofulvina, por ser un fármaco que posee propiedades de baja solubilidad y mínima absorción intestinal, además de ser un agente de amplia acción antimicótica; por lo que se estableció una formulación de un sistema acarreador (liposomas), pretendiendo aumentar la absorción de éste.

Se realizó el estudio de caracterización de liposomas, se evaluaron los siguientes parámetros: tamaño, forma y porcentaje de fármaco encapsulado, así como su estabilidad física, la cual se vio afectada por la composición y su naturaleza química. De ésta, se establecieron los factores para su estabilización, que están relacionados con el centro reactivo de las moléculas del soluto en la membrana-bicapa de fosfolípidos y la fracción del fármaco total distribuido en los liposomas.

## 1. MARCO TEORICO

Papaodopulus y Gordiori fueron los primeros en desarrollar liposomas, sus trabajos datan desde 1970 y han realizado numerosas publicaciones en torno a este tema , además de sus múltiples investigaciones. (8) Desde 1977 se tienen datos de Zborowzki, quien investigó junto con otros, las interacciones entre los liposomas y las lipoproteínas en plasma así como su estabilidad frente a éstas moléculas (6); posteriormente D'silva y Nortari en 1982 observaron la hidrólisis de ancitabina a critrabina y su protección con sistemas fosfolípidos (7); en esas mismas épocas Gabizón y otros, demostraron que la actividad de ciertos fármacos podía ser regulada por la modificación de la composición y tamaño de los liposomas (3). Fue en 1983 cuando Torrens utilizó a los liposomas para incrementar el tiempo de vida media en una enzima (superóxido-dismutasa) en pulmón y con ello se involucró a los liposomas con los sistemas de liberación de fármacos (6). también en este año Alim a Fatah y L.M.Loew analizaron las reacciones producidas en las membranas biológicas por vesículas lipídicas estudiando principalmente la hidrólisis de los ésteres (5).

Bakker y Wonderverg en 1985 comenzaron a estudiar el empleo de liposomas para proteger fármacos contra enzimas presentes en el organismo , ellos demostraron que la encapsulación liposomal de la ampicilina aumenta su estabilidad y su biodisponibilidad en el organismo (6); en ese mismo año Agarwal observó que algunas modificaciones en las estructuras fosfolípidas de los liposomas previó la lisis de los mismos en sangre y aumenta su estabilidad (8). Al siguiente año 1986 Stuhnel-Skalec y Smeeters (1982) estudiaron los cambios de estabilidad de fármacos en liposomas dentro de la sangre al modificar su composición (2); en 1987 Barsa y Lauterlain estudiaron más a fondo las modificaciones en la vida media al formular Fármacos en liposomas bajo un pretratamiento por temperatura (7). A partir de aquí han existido numerosos estudios, sobre la estabilidad que pueden aportar los liposomas a un cierto fármaco.

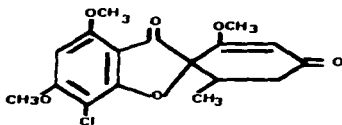
**FALTA PAGINA**

No.

41

**e) FORMULA QUIMICA.**

C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>ClO<sub>6</sub>



PM. 352.77 g/mol (17)

**FIGURA No.1 Estructura de la griseofulvina**

**f) SOLUBILIDAD.**

La griseofulvina es soluble a 25°C en:

Acetona 30g/l, Tetracloruro de carbono 2g/l, Diclouroetano 80g/l, Dimetilacetamida 40g/l, Dioxano 30g/l, Éter etílico 0.7g/l, Heptano 0.3g/l, Metanol, Aceite mineral 0.1g/l, Propilenglicol 2g/l, Span 80, 0.2g/l, Tween 80, 7g/l. Prácticamente insoluble en agua y éter de petróleo. (15,17y 18)

**g) ESTRUCTURA CRISTALINA.**

Se presenta en cristales generalmente de 5nm como máxima dimensión, el tamaño de éstos cristales afecta la absorción de griseofulvina cuando es administrado oralmente. (15)

#### ***h) MECANISMO DE ACCION.***

El mecanismo de acción no ha sido establecido, pero es probable que la griseofulvina interfiera en la función microtubular, o en la síntesis y polimerización del ácido nucleico. Pero se ha atribuido la actividad antimicótica de la griseofulvina a la inhibición de la síntesis de la pared celular de las hifas, efectos sobre la síntesis de ácidos nucleicos e inhibición de la mitosis. La griseofulvina altera los microtúbulos del huso mitótico y los microtúbulos citoplásmaticos. La destrucción de éstos puede alterar el proceso de los constituyentes para la síntesis de una nueva pared celular, atacando los puntos de crecimiento de las hifas. La griseofulvina es activa sólo contra las células en desarrollo.

#### **1.1.2 FARMACOCINETICA**

##### ***a) ABSORCION, DISTRIBUCION Y EXCRECION.***

La administración oral de 500 mg de griseofulvina alcanza una concentración plasmática de aproximadamente de 1ug/ml en 4 horas. Estos valores pueden variar por su baja solubilidad, la absorción puede ser incrementada con una alimentación rica en grasas después de haber ingerido el fármaco. La velocidad de disolución y disgregación es limitada por la biodisponibilidad de la griseofulvina dependiendo si es micronizada o ultramicronizada. Aunque la biodisponibilidad de las preparaciones que utilizan polvo ultramicrocristalino aumenta el 50% más que la preparaciones convencionales con griseofulvina micronizada. Las micropartículas de griseofulvina en dosis de 1g diario alcanzan, valores sanguíneos de 0.5 a 1.5 ug/ml. La vida media del fármaco en plasma es de un día y aproximadamente el 50 por ciento de la dosis oral puede ser detectada en orina durante 5 días en forma de metabolitos. El primer metabolito es 6-metilgriseofulvina en el tracto gastrointestinal.

El fármaco absorbido tiene afinidad por la piel enferma y se deposita ahí, unido a la queratina. Así vuelve resistente al tejido y el nuevo crecimiento del pelo o de las uñas queda libre de infección. A medida que las estructuras queratinizadas se desprenden tienden a ser remplazadas por las normales sin infección. Poca griseofulvina se encuentra en los tejidos y líquidos corporales. La mayor parte de éste fármaco es excretado en las heces y en la orina. (8)

#### **b) USOS CLINICOS.**

El uso tópico de la griseofulvina tiene poco efecto, en las preparaciones micronizadas de griseofulvina, se administra por vía oral en cantidad de 0.5 a 1g diario. Una preparación ultramicronizada se da a los adultos en dosis de 0.3 a 0.6 g por esta vía. El tratamiento se debe continuar de tres a seis semanas si únicamente el cabello o la piel están afectados, pero por tres o seis meses más si las uñas también lo están. La griseofulvina está indicada en las dermatofitosis graves que afectan la piel, el pelo o las uñas, particularmente si son causadas por Trichophyton rubrum. En infecciones fúngicas en piel la griseofulvina empieza a combatir al hongo entre 4 a 8 hora después de una dosis oral de 500 mg. (8,25)

#### **c) TOXICIDAD.**

Es teratogénico y carcinógeno, a dosis mayores de dos gramos por día, además de que puede ocasionar, dolor de cabeza, confusión mental, fatiga, síncope, vértigo y en ocasiones se ha observado hepatotoxicidad.

## **1.2 LIPOSOMAS.**

### **1.2.1 DEFINICION**

Se define a los liposomas, como una suspensión de fosfolípidos dispersos en agua, formando vesículas multilaminares que tienen una estructura de bicapa lipídica parecida a una cebolla; después de un proceso de sonicación (agitación



mediante vibraciones ultrasónicas), estas estructuras se reordenan formando liposomas-vesículas autoselladas. (21)

Los liposomas, han sido creados como un sistema acarreador de fármacos con los siguientes propósitos:

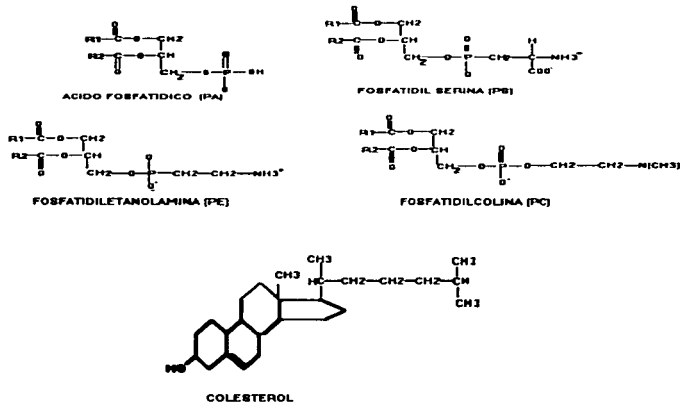
1. Para solubilizar fármacos lipofílicos (rápida disolución en torrente sanguíneo).
2. Como acarreadores de agentes inmunológicos y agentes antimicóticos.
3. Se ha encontrado que algunos fármacos encapsulados en liposomas, presentan propiedades farmacocinéticas diferentes a los fármacos libres: por ejemplo, la posibilidad del tratamiento de cáncer por el uso de liposomas, es una de las primeras sugerencias. El transporte liposomal de agentes citotóxicos a tejidos malignos evita las reacciones indeseables provocadas por tales fármacos a tejidos normales, para la inhibición de crecimiento de células tumorales. (2, 3).
4. Se tendrá un mayor desarrollo en la industria cosmética.

Los liposomas administrados, por vía intravenosa, subcutánea o intramuscular, protegen al fármaco de una degradación, una vez encapsulado, proporciona un control en la liberación del mismo, por un período prolongado. Esta característica puede reducir la eficacia del fármaco cuando se controla la velocidad de liberación en torrente sanguíneo.

## **1.2.2 MATERIAS PRIMAS PARA LA PREPARACION DE LIPOSOMAS**

Las moléculas que forman a los liposomas, son aquellas que tienen una región hidrófila y otra hidrófoba, algunos ejemplos se observan en la figura No.2 ( fosfoglicéridos y esfingolpidos). La porción hidrófila denominada cabeza polar, está formada por residuos de grupos polares con o sin carga eléctrica neta, cuya característica común es que pueden establecer interacción con las moléculas de agua de la misma naturaleza del disolvente (interacciones polares y puentes de hidrógeno). La porción hidrófoba denominada cola está formada por las

cadenas hidrocarbonadas apolares de los ácidos grasos; como el caso de los esfingolípidos. La presencia de porciones apolares hace a dichos compuestos prácticamente insolubles en agua, ya que la introducción de las colas hidrófobas en el medio acuoso es energéticamente desfavorable, las moléculas de agua en contacto con ellas, no pueden satisfacer plenamente su potencial de interacción polar y de los enlaces de hidrógeno, viéndose forzadas a adoptar una estructura ordenada a modo de caja.



**FIGURA No. 2** Materias primas utilizadas en la preparación de liposomas

**Entre las materias primas más comunes tenemos:**

**a) FOSFOLIPIDOS.**

El glicerol es una de las grasas de uso más común en la preparación de liposomas, además de que representa aproximadamente el 50 por ciento en peso de los lípidos presentes en las membranas biológicas. La estructura química general de éste se ejemplifica con el ácido fosfátidico, en la posición 3 del hidróxido en la molécula del glicerol siendo esterificada por la acción del ácido fosfórico, ( por lo que recibe el nombre de glicerolfosfolípido) .

El glicerol fosfatídico más abundante en plantas y animales es la Fosfatidilcolina (PC), también llamada lecitina y fosfatidiletanolamina, estos dos fosfátidos constituyen el mayor componente en las membranas biológicas, también se utiliza la fosfatidilserina y el fosfatidilinositol , los cuales presentan una esterificación en el grupo hidroxilo del aminoácido l-serina y en el alcohol inositol.

En la tabla No. 1 se muestra la composición de ácidos grasos de las dos fosfatidilcolinas más comunes, mostrando en la composición de los ácidos grasos el número de carbonos que constituyen la cadena alifática, así como el número de insaturaciones que presentan.

COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS	PC HUEVO	PC SOYA
16:0 PALMITICO	32.0	12.0
16:1 PALMITOLEICO	1.5	0.2
18:0 ESTEARICO	16.0	2.3
18:1 OLEICO	26.0	10.0
18:2 LINOLEICO	13.0	68.0
18:3 LINOLENICO	0.3	5.0
20:4 ARAQUIDONICO	4.8	0.1
22:6 DODOSAPENTAEENOICO	4.0	0.1

**TABLA No. 1 Composición de los ácidos grasos de las dos fosfatidilcolinas más comunes.**

## **b) ESTEROIDES.**

El colesterol y sus derivados, son incluidos frecuentemente como componentes de las membranas liposomales. El colesterol es abundante en los tejidos animales y es el primero en localizarse en las membranas celulares, además de incrementar la fluidez y la microviscosidad en la bicapa, reduciendo la permeabilidad para moléculas solubles en agua y la estabilización de las membranas con la presencia de fluidos biológicos, como el plasma.

Los liposomas, muestran una rápida interacción con proteínas plasmáticas como albúmina, transferrina y macroglobulinas; cuando son preparados con colesterol, reducen substancialmente la aparición de estas interacciones.

## **c) FOSFOLIPIDOS SINTETICOS.**

Generalmente se usan fosfolípidos saturados que son: dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC), dipalmitoilfosfatidiletanolamina (DPPE), dipalmitoilfosfatidilserina (DSPS), ácido dipalmitoilfosfatídico (DPPA) y dipalmitoilfosfatidilglicerol (DPPG). Además de que se pueden utilizar diversos fosfolípidos insaturados para la preparación de liposomas, estos incluyen dioleoilfosfatidilcolina (DOPC) y dioleoilfosfatidilglicerol (DOPG).

## **1.3 METODOS DE PREPARACION**

A partir de los estudios realizados por Gabizón y Mayer (16) se inició una revolución en la fabricación de liposomas, buscando nuevas formas de fabricarlos y modificarlos según las condiciones requeridas, para ello se conocen actualmente nuevas tecnologías de fabricación como las que se muestran a continuación:

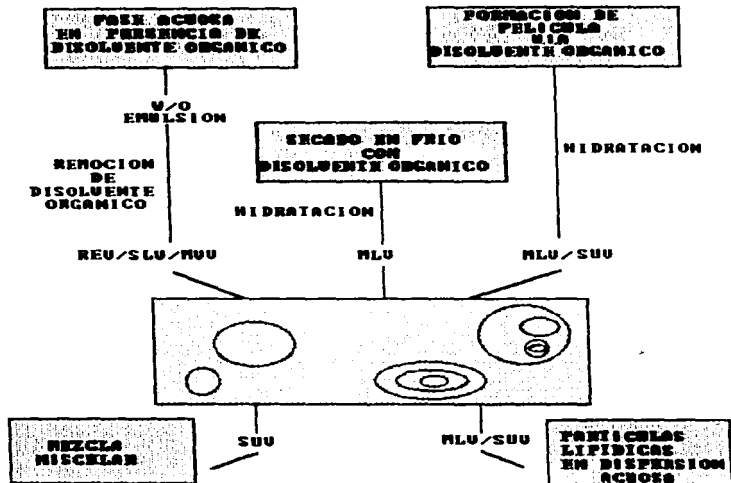


FIGURA. No. 3 Metodos de preparacion de liposomas

REV: Evaporación en fase reversa, SLV: Pequeñas vesículas largas. MLV: Vesículas multilaminares largas. MVV: Vesículas vesiculares multilaminares. SUV: Pequeñas vesículas unilaminares.

### **1.3.1 VESÍCULAS MULTILAMINARES ( VML)**

#### **a) EFECTO DE LA CARGA DEL LÍPIDO.**

La presencia de lípidos de carga negativa como, fosfatidil senna (PS), ácido fosfatídico (PA), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilglicerol (PG), o de carga positiva como los detergentes y la estearilamina, tienden a incrementar la distancia interlaminal de las capas sucesivas de las estructuras VML, también incrementa el volumen atrapado del fármaco. Es relevante la fuerza iónica de soluciones amortiguadoras o no electrolíticas como la sacarosa, hacen que las fuerzas electrostáticas repulsivas, eleven el efecto de estas condiciones.

Generalmente, se utiliza del 10-20 por ciento de especies cargadas para producir vesículas multilaminares; la presencia de lípidos con carga, reduce la probabilidad de la formación de aglomerados en VML.

#### **b) HIDRATACION EN PRESENCIA DE DISOLVENTE.**

Las vesículas multilaminares con elevada eficiencia de atrapamiento de fármacos pueden ser producidas, por hidratación del lípido en presencia de disolventes orgánicos, este método fue realizado por Papahadjopoulos, que consiste en un sistema de dos fases de volúmenes iguales de éter de petróleo y de la fase lipídica, emulsificados con vigorosa agitación y eliminación de éter a través del paso del gas nitrógeno dentro de la mezcla. Como el éter es removido por el gas acarreador, las VML se encuentran en la fase acuosa.(12)

### **1.3.2 FORMACION DE VESÍCULAS UNILAMINARES (VUL)**

#### **a) ELIMINACION DE DETERGENTE.**

Un método esencialmente diferente para la producción de liposomas es a través de la eliminación de detergente, que consiste en una dispersión acuosa formada por fosfolípido/detergente. Debido a que el detergente es removido, los

fosfolípidos se invierten en micelas y finalmente sufren coalescencia para cerrar la bicapa vesicular.

#### **b) DIALISIS.**

Kagawa y Racker, fueron los únicos en introducir la diálisis para la preparación de vesículas. A pesar de que estos autores, fueron los primeros interesados en reconstruir membranas biológicas solubilizadas con detergente; estos métodos se aplicaron para la formación de liposomas. Comúnmente se utilizan detergentes sintéticos, tales como el octilglucósido incluyendo a las sales biliares que exhiben una alta concentración micelar, esto facilita la eliminación del disolvente. El tratamiento de fosfatidilcolina de huevo, con una proporción molar de 2:1 de cloruro de sodio seguido de la diálisis, resulta en pocas horas la formación de vesículas unilaminares con diámetro de 100nm. (12)

#### **c) CROMATOGRAFIA EN COLUMNA.**

Consiste en la formación de vesículas de capa simple con fosfolípidos, durante la eliminación del detergente por cromatografía en columna; éste método fue reportado por Enoch y Strittmatter, el cual involucra la formación de una película de lípidos seguida de sonicación, el cual consiste en una mezcla de detergente/fosfolípido en proporción 2:1, seguida de la eliminación del detergente a través de la columna Sephadex G.25; el cambio se da tan rápido que sólo se aprecian las vesículas formadas de aproximadamente 100nm, las cuales están listas para separarse por sonicación.

### **1.3.3 METODO DE EVAPORACION EN FASE REVERSA**

Las vesículas unilaminares VUL, también pueden ser preparadas por la formación de una emulsión agua en aceite y una solución amortiguadora con exceso de fase orgánica seguida de la eliminación de ésta bajo presión reducida, ( a este método se le conoce como evaporación en fase reversa REV) ver fig. No 4. Las dos fases son emulsificadas por sonicación o por otros mecanismos que también pueden ser usados. La eliminación del disolvente orgánico bajo vacío

causa coalescencia, ( gotitas de agua cubiertas de fosfolípidos), eventualmente se forma un gel viscoso, las trazas finales del disolvente se eliminan al rompimiento del gel dando una suspensión uniforme de vesículas unilaminares. Debido a la composición de algunos lípidos la transición de la emulsión a la suspensión de LUV es tan rápido que no se aprecia la fase intermedia del gel.

En éste método los pioneros fueron Szoka y Papahadjopoulos (12), el cual fue usado extensivamente para aplicaciones que requieren una alta eficiencia de encapsulación para fármacos solubles en agua. La eficiencia de atrapamiento que se alcanza con este método es de aproximadamente 65%.

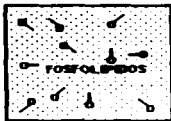
Los fosfolípidos son primero disueltos en el disolvente orgánico como, dietiléter, isopropiléter o una mezcla de dos disolventes como son isopropiléter-cloroformo. La emulsificación, es más fácil cuando se realiza con densidades iguales tanto de la fase orgánica como de la fase acuosa. Por esta razón, el éter (densidad = 0.7) es a menudo mezclado con un disolvente de alta densidad, como el triclorotrifluoroetano ( densidad = 1.4 ) para producir un sistema de disolventes con densidad aproximada a la del agua. La fase acuosa contiene el fármaco que va a encapsular, esta solución es directamente adicionada a la mezcla fosfolípida.

La proporción de la fase acuosa y la fase orgánica es usualmente 1:3 para éter y 1:6 para la mezcla de isopropiléter/cloroformo; las dos fases son emulsificadas por sonicación por poco tiempo y la fase orgánica es eliminada lentamente bajo vacío producido por aspersion de agua a través de un rotavapor a 20-30°C.

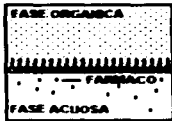
La principal desventaja de este método, es la exposición del material que va a ser encapsulado en contacto con los disolventes orgánicos, el mecanismo de agitación, y las condiciones que pueden conducir a la desnaturalización de algunas proteínas o rompimiento de ADN.



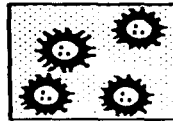
**LÍPIDO EN SOLVENTE**



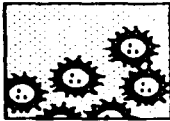
**SISTEMA DE DOS FASES**



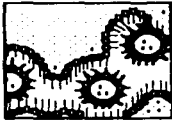
**EMULSION W/O**



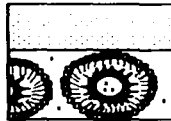
**SOLVENTE REMOVIDO**



**FORMACION DE GEL**



**LIPOSOMAS REV**



**FIGURA No.4 Formación de liposomas por EVR.**

#### **1.3.4 METODOS DIVERSOS.**

##### **INCREMENTO EN SOLUCIONES NO ELECTROLITICAS.**

Revés y Dowben, reportaron un método para producir liposomas de capas simples, hidratando lentamente a los fosfolípidos con agua destilada y una solución no electrolítica; seguido de la hidratación hay una destilación del agua o de la solución no electrolítica como puede ser sacarosa. El rendimiento de vesículas de capa simple es bueno en condiciones exactas, pero tiene desventaja sobre la técnica, debido a que es muy sensible, por el tipo de mecanismo que se utiliza durante la agitación para la formación de las vesículas.

## 1.4 CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS

Los liposomas se caracterizan en términos de su tamaño, número de bicapas lipídicas, volumen encapsulado y eficiencia de encapsulación circundantes al compartimiento central acuoso. Las vesículas de categoría principal son las vesículas multilaminares, vesículas pequeñas unilaminares y vesículas largas unilaminares. La caracterización se realiza a través de diferentes métodos como se muestra en la tabla No. II

PARAMETROS	TECNICAS
TAMÑO	MICROSCOPIA ELECTRONICA DISPERSION DE LUZ MICROSCOPIA ELECTRONICA CON UV COLORANTE NEGATIVO
NUMERO DE CAPAS	NMR ESPECTROSCOPIA MICROSCOPIA ELECTRONICA
EFICIENCIA DE ENCAPSULACION	COCIENTE DE PARTICION SEPARACION FISICA DE LA SOLUCION.
VOLUMEN ENCAPSULADO	FLUORESCENCIA C 14 Y LISIS DE LIPOSOMA

TABLA No. II CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS.

### 1.4.1 EFICIENCIA DE ENCAPSULACION Y VOLUMEN INTERNO

Estos dos parámetros, describen el atrapamiento de fármacos solubles en agua en el compartimiento acuoso de los liposomas.

El volumen interno es expresado como la cantidad de volumen encapsulado por unidad de lípido ( $\mu\text{l}/\mu\text{mol}$  o  $\mu\text{l}/\text{mg}$ ). Esto es determinado por el atrapamiento de agua marcada con 6-carboxifluoroceína, C14, H3-glucosa o sacarosa seguida

de la lisis del liposoma con un detergente. La eficiencia de encapsulación se define como el porcentaje de fármaco atrapado por mg de lípido. La eficiencia de encapsulación y el volumen interno depende del contenido liposomal, la concentración de lípido, el método de preparación y el fármaco usado. Algunos valores típicos se observan en la tabla No.III de acuerdo al tipo de liposoma que se presenta.

TIPO DE LIPOSOMA	VOLUMEN INTERNO ( $\mu\text{L}/\text{mg}$ )	EFICIENCIA DE ATRAPAMIENTO ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ )
SUV	0.5	1.0
MLV	4.0	5.0-15
REV	10.0	36.0-65

**TABLA No. III Valores de eficiencia de encapsulación**

La incorporación de la carga del fármaco dentro de la bicapa, incrementa el volumen en el compartimento acuoso, por la separación adyacente a la bicapa. Esto debe ser directo para fármacos hidrofóbicos. La eficiencia de atrapamiento aproximada al 100 por ciento depende del tipo de liposoma y composición. (26)

#### **1.4.2 FACTORES QUE AFECTAN EL ENCAPSULAMIENTO DEL FARMACO**

La localización del fármaco dentro del liposoma, está basada en el coeficiente de partición entre los compartimentos acuosos y la bicapa lipídica, la máxima cantidad que puede ser atrapada dentro de un liposoma depende de la solubilidad del fármaco en cada fase. La eficiencia de encapsulación depende de la concentración utilizada y de los límites de saturación dentro del compartimento acuoso (para fármacos polares) o en la bicapa lipídica (para fármacos no polares). (26)

El método de preparación puede afectar la localización del fármaco y la eficiencia de atrapamiento, así como la incorporación del fármaco que va a depender del coeficiente de partición, es decir la solubilidad en ambas fases acuosa y lipídica; los liposomas son preparados mezclando el fármaco con el disolvente, dividido en cantidades iguales en la fase acuosa y la fase lipídica, la cantidad de fármaco encapsulado dependerá del coeficiente de partición. También la velocidad de partición está en función de la difusibilidad en cada fase. El coeficiente de partición es usualmente determinado con disolventes orgánicos/agua ejemplo etanol/agua.

Estos pueden ser determinados, por el método de Bakouch y Gerlier que se basa en la separación física de la fase acuosa y la bicapa lipídica, por ultracentrifugación después de una destrucción mecánica de los liposomas, seguido del análisis del fármaco en cada fase por métodos ultrasónicos a bajas temperaturas.

#### **1.4.3 LAMINARIDAD**

El número de bicapas presentes en un liposoma, puede ser determinado por medio de una fractura en frío, a través de microscopía electrónica y resonancia magnética nuclear (RMN), siendo una de las técnicas más reciente, después de la adición de agentes impermeables que sufren ensanchamiento como el Manganeso  $Mn^{+2}$ , que interacciona con la bicapa externa. Por lo tanto un 50% de reducción en RMN es una señal de la preparación de liposomas unitaminares y 25% de reductores en la intensidad de origen RMN es señal de dos bicapas en el liposoma. (20).

#### **1.4.4 TAMAÑO DE LIPOSOMA**

Es un parámetro importante con respecto a las propiedades físicas y biológicas de liposomas y fármacos atrapados. Los métodos más usados en la determinación de éste parámetro son:

**a) *Dispersión luminosa.***

Hay una variedad de técnicas disponibles para la determinación del tamaño de liposomas por dispersión de luz. Sin embargo este es el método más popular. El nuevo equipo está basado en la dispersión de luz por medio de rayos láser. Si la fase liposomal es analizada por dispersión de luz se necesita modificar el método, se requiere preparaciones heterogéneas para poder hacer una estimación precisa de la distribución del tamaño. En este método se puede contar con algoritmos para determinar el tamaño y distribución de la partícula, aunque los resultados sean engañosos. Además de que en este método no se puede distinguir entre una partícula larga y una masa floculada de partículas pequeñas. Es importante eliminar partículas micronizadas presentes en el primer análisis.

Se dificulta la interpretación de los datos de tamaño de partícula y se puede demostrar con una muestra comprimida de un 97% de vesículas unilaminares con radio de 15nm y 3% de vesículas multilaminares con un radio tres veces más grande.

**b) *Microscopía luminosa.***

Este método, puede ser usado para examinar el grosor y la distribución del tamaño de vesículas en la preparación de VML. La inclusión de un ensayo de fluorescencia en la bicapa permite la observación de liposomas bajo una microscopía fluorescente, siendo éste un método muy conveniente para obtener y estimar un tamaño de distribución mínimo.(15,26)

**c) *Microscopía electrónica.***

Este método utiliza un colorante negativo, como molibdato o fosfotungsteno, para analizar la distribución de tamaño de partículas por abajo de 5  $\mu$ , también es usado para validar el método de dispersión luminosa que actualmente se emplea para asegurar la calidad y precisar la evaluación estadística en un 5% en base al tamaño, se debe realizar con un mínimo de 400 partículas y no confiar en una sola muestra para el conteo.(15)

#### **d) Microscopía electrónica con ruptura en frío.**

Este método es especialmente utilizado para observar la estructura morfológica de liposomas, se realiza la fractura pasando por el plano de la vesícula que es momentáneamente congelado, posteriormente se aplican métodos matemáticos para poder ser analizados correctamente. (15)

### **1.4.5 APLICACIÓN DE LA TEORÍA DE DOBLE CAPA PARA LIPOSOMAS**

Los liposomas pueden realizarse por varias rutas, dando vesículas iguales, como partículas coloidales suspendidas en agua o soluciones electrolíticas. Cuando la carga de la partícula es débil, también las fuerzas repulsivas electrostáticas son débiles, lo cual incrementa la oportunidad de cerrar la vesícula, algunas partículas neutras que tienden a aglomerarse y sedimentarse, forman una suspensión floculada. Simultáneamente dos poblaciones de liposomas, son orientadas hacia las cargas eléctricas opuestas, para aumentar la velocidad de aglomeración que está en función de las fuerzas de atracción electrostática.

Las partículas orientadas hacia la red de cargas negativas, puede inducir a la formación de aglomerados en presencia de cationes di o trivalentes. Por ejemplo el calcio en el rango de 1-2 nm induce a los liposomas que contienen más del 50% de aglomerados de fosfatidilserina (PS), este fenómeno causa un efecto dramático sobre la estabilidad física de liposomas y principalmente de la fusión de liposomas, con incremento en el tamaño. Afortunadamente, la tendencia de los liposomas a fusionarse puede ser controlada por la infusión de cantidades pequeñas de lípidos dentro de la formulación, cargados negativamente como la fosfatidilserina, positivamente como el fosfatidilglicerol y anfólitos como la estearilamina; durante el almacenamiento, puede haber aglomeración con crecimiento del tamaño de partícula, lo cual es indeseable en muchos productos. (26)

## **1.5 ESTABILIDAD DE LIPOSOMAS**

La estabilidad de cualquier producto farmacéutico, se define por su capacidad de permanecer dentro de los límites de diseño por un periodo predeterminado (tiempo de almacenamiento del producto). El primer paso preestablecido para diseñar cualquier tipo de prueba de estabilidad, es necesario especificar los límites de los parámetros definidos en términos de estabilidad química, física y microbiana.

Estos métodos deben ser especificados para evaluar cada uno de los parámetros indicados. Se debe tratar a los fármacos para liposomas de la misma manera que las tradicionales formas farmacéuticas, con respecto a los protocolos claramente definidos y establecidos para su caracterización, manufactura, eficacia y pruebas de estabilidad.

Las observaciones generales referentes a la estabilidad de liposomas incluyen.

1. Son muy pocos los estudios publicados a cerca de la estabilidad de liposomas.
2. No hay reportes publicados de los protocolos para pruebas de estabilidad.
3. No hay reportes publicados de los protocolos para pruebas de estabilidad acelerada.
4. VML y EVR parecen ser más estables que pequeñas vesículas unilaminares SVU, con respecto a la estabilidad de almacenaje.
5. El uso de fosfolípidos saturados y la incorporación de colesterol dentro de la bicapa generalmente promueve la estabilidad.
6. Los liposomas almacenados a 4° C, a cierto tiempo, parecen ser mas estables que los liposomas almacenados a temperatura ambiente.(26)

### **1.5.1 ESTABILIDAD QUIMICA**

Químicamente los fosfolípidos son susceptibles a hidrólisis. Adicionalmente, los fosfolípidos contienen ácidos grasos insaturados que pueden sufrir reacciones de oxidación. Muchos de los datos sobre la estabilidad de liposomas que aparece en la literatura pueden considerar el tipo de fosfolípido que se va a usar y la

cantidad de productos oxidados e hidrolizados. Estas reacciones pueden causar cambios dramáticos en las propiedades de permeabilidad de liposomas.(26,23)

#### **a) PEROXIDACION DE LIPIDOS.**

La mayoría de los fosfolípidos usados para las dispersiones liposomales contienen cadenas acíclicas insaturadas como parte de la estructura molecular.

Estas cadenas son vulnerables a degradación oxidativa. La reacción de oxidación puede ocurrir durante la preparación, el almacenaje y el uso actual. El deterioro oxidativo de lípidos es un proceso complejo que implica la generación de radicales libres y la formación de peróxidos cíclicos e hidroperóxidos. Muchos de los procesos usados para determinar la peroxidación de lípidos no son específicos. Otra determinación está basada sobre la desaparición de ácidos grasos insaturados y la aparición de enlaces conjugados. La técnica posterior es usada para la determinación de la oxidación acompañada del incremento en el espectro de absorción UV dentro del rango 230-260nm. Si se usan fosfolípidos insaturados para la preparación de liposomas y no se tiene especial cuidado en su uso para minimizar la oxidación, la reacción puede ocurrir rápidamente. La oxidación de los fosfolípidos podrá ser minimizada por los siguientes pasos. (26)

1. El uso mínimo de fosfolípidos insaturados.
2. El uso de argón y nitrógeno y minimizar la exposición al oxígeno.
3. El uso de contenedores resistentes a la luz.
4. Remover los metales pesados (EDTA).
5. Uso de antioxidantes tales como el alfa-tocoferol.



## **b) HIDROLISIS DE LIPIDOS.**

Las vesículas que se forman espontáneamente en medio acuoso, han sido estudiados como un sistema acarreador de fármacos; los liposomas que se forman en dispersión acuosa son difícilmente de formar por su inestabilidad química y física durante su almacenamiento. De los estudios realizados sobre las formulaciones farmacéuticas para liposomas, los fosfolípidos comienzan a ser un importante tema de estudio.

Debido a que los fosfolípidos saturados e insaturados que forman a los liposomas se pueden hidrolizar, para formar a liso-fosfatidilcolina(LPC) y ácidos grasos. Muchos de los trabajos eligen la formación de liso-PC como una medida estándar para la estabilidad química de fosfolípidos, una vez presente la liso-PC en la bicapa lipídica pueden sufrir grandes cambios en la permeabilidad de los liposomas. Por lo tanto es importante la formación de liso-PC y la observación durante el almacenaje. La reacción de hidrólisis de los fosfolípidos en los liposomas son esquematizados en la figura No. 5. (26,16)



### **1.5.2 ESTABILIDAD LIPOSOMAL EN EL TRACTO GASTROINTESTINAL**

Se han dado a conocer aproximadamente 50 publicaciones acerca de fármacos de administración oral encapsulados en liposomas, estas formulaciones han sido rechazadas debido a que existe una baja estabilidad de los liposomas en el tracto gastrointestinal. Rowland y Woodley mostraron que las formulaciones usadas son bastante inestables por pH, influencia de bilis y enzimas fosfolipasas. Igualmente los liposomas de distearilfosfatidilcolina/colesterol son demasiado inestables en el tracto gastrointestinal, por tal motivo los fármacos encapsulados liposomalmente y fármacos libres presentan la misma farmacocinética cuando son administrados en ratas por vía oral . (26)

### **1.5.3 ESTABILIDAD DE LIPOSOMAS EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

Las formulaciones liposomales ha derivado una gran responsabilidad al formulador sobre la biodisponibilidad y la cantidad de fármaco libre que llega al sitio de acción en un periodo de tiempo determinado. Generalmente es exacto el sitio de acción o el sitio receptor, sin embargo, no es conocido el mecanismo a nivel molecular para reproducir y lograr los niveles sanguíneos del fármaco.

Con las formas de dosificación tradicional no-parenteral, se conoce que sólo el fármaco libre es absorbido. Así el único método disponible para controlar la farmacocinética del fármaco en sangre está en función del tiempo.

Factores que afectan la farmacocinética de liposomas por administración parenteral:

- a. Concentración del fármaco libre en sangre
- b. Concentración del fármaco encapsulado en sangre
- c. Velocidad de liberación del fármaco del liposoma en la sangre

#### **1.5.4 ESTABILIDAD FISICA**

Los estudios de estabilidad química y física son de gran importancia para determinar la vida de anaquel en productos con liposomas. Se ha encontrado que los liposomas presentan cambios en sus características por medio de dos procesos que afectan la estabilidad física:

1. Existe una disminución de la retención del fármaco dentro del liposoma.
2. Los liposomas pueden ser aglomerados y/o fusionados en largas cadenas de partículas.

Estos procesos influyen en el cambio de la disposición del fármaco en vivo y por consiguiente en el índice terapéutico y en la eficiencia de encapsulación.(8,13)

Por tal motivo se sugiere una serie de pasos para obtener una óptima estabilidad:

1. Para almacenar dispersiones acuosas de liposomas, la composición lipídica de la bicapa y el disolvente acuoso puede ser ajustado o inducido a una estabilidad óptima.
2. La dispersión liposomal puede ser en forma seca ( liofilizada).
3. Realizar un proliposoma, eliminando la carga, permitiendo que la preparación de la dispersión sea in situ.
4. Estabilidad de almacenamiento de la dispersión liposomal.

#### **1.5.5 FACTORES QUE AFECTAN LA ESTABILIDAD FISICA**

##### **1) TAMAÑO.**

El tamaño de los liposomas varía cuando se utiliza fosfatidilcolina, debido al efecto inductor de carga que presenta cambio en el potencial Z de los liposomas. Se ha comprobado que cuando son formulados con fosfolípidos que inducen carga negativa (PG), se obtiene exitosamente la estabilidad de liposomas.

## **2) SEPARACION DE FASE.**

La separación de fase ocurre cuando la composición de la bicapa cambia por las reacciones de degradación química ó cuando la bicapa es sometida a diferentes ciclos de temperaturas. Una buena selección de los componentes de la bicapa pueden evitarse éste tipo de problemas.

Los componentes se deben seleccionarse de acuerdo a las siguientes características:

- a) No debe existir interacción entre los componentes de la bicapa.
- b) No se debe afectar la permeabilidad de los componentes encapsulados (rigidez de la bicapa y baja permeabilidad)
- c) Que no sean tóxicos
- d) Biodisponibilidad de los componentes puros
- e) Costo

Con la finalidad obtener liposomas de una buena estabilidad física y facilmente se puedan reproducir a cualquier escala.

## **3) FILTRACION DEL MATERIAL ENCAPSULADO.**

La permeabilidad de la bicapa depende principalmente de las propiedades fisicoquímicas del fármaco y la temperatura, existiendo dos categorías de fármacos de acuerdo a su solubilidad.

- Fármacos hidrofílicos que interactúan en la bicapa
- Fármacos lipofílicos

Un ejemplo de fármaco hidrosoluble, es la carboxifluoroceina debido a que no interacciona con la bicapa sobre la cinética de la segunda categoría del fármaco liposoluble, debido a que este tipo de fármaco tiende a dificultar la eficiencia de atrapamiento por meses, teniendo baja afinidad por la bicapa. (13, 8)

## **2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La griseofulvina, fármaco empleado en el tratamiento de la unimicosis, tiña pedis, tiña capitis, se ha preferido sobre otros antimicóticos por su alta eficiencia terapéutica; sin embargo, presenta los siguientes problemas: poca solubilidad en agua, baja biodisponibilidad y elevada nefrotoxicidad cuando es ingerida por periodos de tratamientos largos, en dosis elevadas.

Algunos de los problemas mencionados anteriormente han sido resueltos desde varios puntos de vista, fundamentalmente de tipo tecnológico. Para incrementar su absorción fue micronizada y ultramicronizada, para favorecer aun más la eficiencia terapéutica se recomienda a los pacientes ingerirla con una dieta rica en grasas. En este proyecto se pretende utilizar nuevamente la tecnología para desarrollar una nueva forma farmacéutica que solucione alguno de los problemas mencionados anteriormente; siendo ésta una forma innovadora que consiste en una formulación a base de liposomas, los cuales debido a su composición lipídica favorecen la biodisponibilidad del fármaco en el organismo, lo cual se respalda con lo mencionado en la literatura en donde se ha visto incrementada la biodisponibilidad cuando es dispersada o englobada en polímeros (12,3).

Resaltando el hecho de que en este trabajo se manejarán las variables que permitan obtener liposomas como acarreadores de griseofulvina, además de que al realizar los estudios de confrontación permitan obtener una formulación estable y biodisponible que genere un paquete tecnológico fácilmente asimilable y transferible a otras formulaciones que puedan ser administradas por diferentes vías.

### **3. OBJETIVOS**

#### **GENERAL:**

**Desarrollar una formulación de liposomas con griseofulvina por el método de evaporación en fase reversa EVR, evaluando los factores que la afectan.**

#### **ESPECIFICOS:**

- 1. Caracterizar a las materias primas y principio activo.**
- 2. Proponer una formulación de liposomas.**
- 3. Establecer una formulación de liposomas con griseofulvina.**
- 4. Determinar los factores que afectan la formulación de liposomas.**
- 5. Determinar la eficiencia de encapsulación de griseofulvina en los liposomas.**
- 6.- Evaluar la estabilidad física de los liposomas con griseofulvina.**

#### **4. HIPOTESIS**

Considerando las propiedades fisicoquímicas de la griseofulvina, así como su baja absorción gastrointestinal, se desarrollará una formulación estable de liposomas teniendo como núcleo a éste fármaco, obteniéndose por el método de evaporación en fase reversa, controlando los factores que pueden afectar este proceso, tales como: La concentración de las materias primas, temperatura de fabricación, almacenamiento, velocidad de agitación y pH; lo cual permitirá la obtención de dicha formulación, misma que se evaluará considerando la eficiencia de encapsulación.



## **5. PARTE EXPERIMENTAL**

### **5.1 MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO**

#### **MATERIAL DE LABORATORIO.**

Probetas de 50, 100 ml Pyrex o Kimax  
Vasos de Precipitados de 50, 100 ml Pyrex  
Matraces volumétricos de 10, 25, 50, 100 ml Pyrex  
Pipetas volumétricas de 1, 2, 5 y 10 ml Pyrex  
Matraz redondo 24/40 de 50 ml Pyrex  
Refrigerante 24/40 Pyrex  
Termómetro Taylor de -20°C a 150°C  
Tubos de ensayo 13 X100 Pyrex  
Tubos capilares  
Cromatofolios Al de silicagel 60 F254 20x20  
espesor de capa 0,22mm Merck

#### **REACTIVOS**

Hidroximetilmetilamina. Marca Sigma  
Cloruro de sodio. Marca JT Baker  
Acido clorhídrico. Marca JT Baker  
Hidróxido de sodio. Marca JT Baker  
Benceno. Marca JT Baker  
Acetato de etilo. Marca JT Baker  
Cloroformo . Marca JT Baker  
Metanol. Marca JT Baker  
Nitrógeno gas, grado reactivo, Marca AGA  
Agua destilada para uso farmacéutico  
Griseofulvina, grado farmacéutico. Glaxo de México  
Colesterol, grado farmacéutico. Marca Sigma  
Lecitina de soya, grado industrial

## **EQUIPO**

**Baño de ultrasonido Marca Cole-Parmer**

**Vortex Marca Thermolyne, Modelo 37600**

**Balanza analítica standard, Marca Ohaus, Modelo As 120**

**Microscopio óptico, Marca Rossbach Kyowa, Modelo 771106**

**Espectrofotómetro lambda 2 UV/ VIS Marca Perkin Elmer**

**Refrigerador , Marca Mabe**

**Homogenizador Biospec Products, Modelo. 985-370**

**Calorímetro Diferencial de Barrido, Modelo DSC 7, Marca Perkin Elmer**

**Controlador de análisis térmico, Modelo TAC 7/DX, Marca Perkin Elmer**

**KITS de aluminio No. 0219-0041, Marca Perkin Elmer**

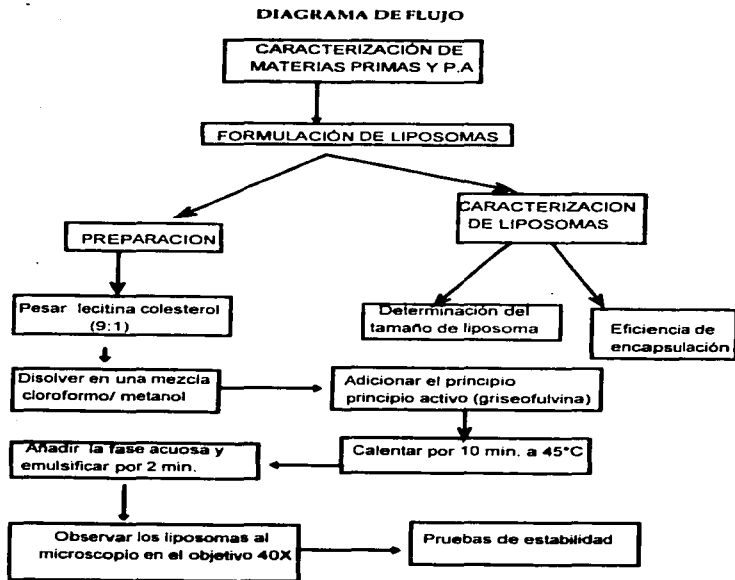


FIGURA No. 6 DIAGRAMA DE FLUJO

## **5.2 METODOLOGIA**

### **CARACTERIZACION DE MATERIAS PRIMAS.**

El estudio de caracterización de materias primas fue realizado en base a lo establecido en la Farmacopea Mexicana de los Estados Unidos Mexicanos.

### **SUSPENSION LIPOSOMAL.**

Se pesó fosfatidilcolina de soya (Lecitina) y colesterol en una proporción (9:1), se disolvió en una mezcla cloroformo/metanol ( 2:1 ), se adicionaron 0.2gr de griseofulvina, se evaporó el disolvente en un baño María a 45°C durante 10 min. Posteriormente se adicionaron 6ml de fase acuosa, emulsificando la mezcla por 2 minutos, obteniendo una suspensión liposomal.

### **FASE ACUOSA.**

#### **SOLUCION REGULADORA pH 7.5**

Disolver 7.27g de tris ( hidroximetilmetilamina) y 4.97g de cloruro de sodio en 950ml de agua, se añadió HCl 2M hasta obtener pH 7.5, aforar a 1000ml .

### **CARACTERIZACION DE LIPOSOMAS.**

#### **FORMACION DE LIPOSOMAS.**

La suspensión liposomal se observó a las 24hrs posteriores a su preparación siendo identificadas la formación, tipo y tamaño de liposomas a través de un microscopio óptico.

### **EFICIENCIA DE ENCAPSULACION.**

La eficiencia de encapsulación se determinó mediante un método cromatográfico en capa fina, seguido de la cuantificación de griseofulvina encapsulada por espectrofotometría U. V.

### **PREPARACION DE LA CAMARA DE ELUCION.**

En un vaso de precipitado de 50ml se preparó 20 ml del sistema benceno/acetato de etilo (2:1), se adicionó al sistema de separación que contó con un filtro poroso, tapando perfectamente la cámara de elución y se esperó a que se saturara la cámara y estuviera lista para su uso.

### **PREPARACION DE LA MUESTRA PARA CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.**

Se aplicó a la cromatoplaaca 25 $\mu$ l de la suspensión liposomal con una micropipeta dejando secar y desarrollar el cromatograma hasta que el frente de disolvente avanzó 17 cm arriba del punto de aplicación. Se retiró la placa dejando secar a temperatura ambiente. Examinando el cromatograma bajo una lámpara de luz ultravioleta. La mancha obtenida en el cromatograma correspondió a la griseofulvina.

### **PREPARACION DE LA MUESTRA PARA ESPECTROFOTOMETRÍA.**

La mancha correspondiente a la griseofulvina en el cromatograma se raspó y se filtró en un embudo, realizando una serie de lavados con cloroformo frío, esta solución fue transferida a un matraz volumétrico de 25 ml para posteriormente ser leído en espectrofotómetro a 291 nm determinando así la cantidad de griseofulvina libre en la suspensión liposomal y por diferencia conocer la griseofulvina encapsulada.

## ESTUDIO DE ESTABILIDAD FÍSICA PARA LA FORMULACION DE LIPOSOMAS.

Se prepararon tres lotes con diferente concentración de lecitina y tres lotes con diferente concentración de griseofulvina para determinar cuál es la formulación más estable. Ambas se sometieron a diferentes temperatura (-10°C y 4°C) durante tres semanas, observando al microscopio la cantidad de liposomas presentes en cada semana.

Los resultados del estudio de estabilidad se analizarán con base al diseño Jerárquicos-Factorial, en donde el modelo estadístico lineal para este diseño es:

$$Y_{ijkl} = \mu + \tau_i + \beta_j + \gamma_{k(j)} + (\tau\beta)_{ij} + (\tau\gamma)_{ik(j)} + \epsilon_{ijkl}$$

Donde:

$\tau_i$  es el efecto de la  $i$ -ésima concentración.

$\beta_j$  es el efecto de la  $j$ -ésima temperatura.

$\gamma_{k(j)}$  es el efecto del  $k$ -ésimo tiempo dentro de  $j$ -ésima temperatura.

$(\tau\beta)_{ij}$  es la interacción de la concentración por temperatura.

$(\tau\gamma)_{ik(j)}$  es la interacción concentración tiempo dentro de la interacción temperatura.

$\epsilon_{ijkl}$  es el término usual del error.

## 6. RESULTADOS

### FORMULACION

Formulación para una suspensión liposomal.

COLESTEROL  
LECITINA  
GRISEOFULVINA  
SOL. AMORTIGUADORA pH 7.5  
CLOROFORMO  
METANOL

<u>Conc.1</u>	=	<u>Conc.2</u>	Standar	Problema
Abs1		Abs2	Conc.1 = 0.0242g	Conc.2 = 0.01467g
			Abs 1 = 0.3925	Abs. 2 = 0.2380

$$\text{Conc.2} = \frac{(0.0242) \times (0.238)}{0.3925} = 0.01467 \text{ g/ml}$$

Se obtuvo una suspensión liposomal de aproximadamente 10ml en los cuales se encontró una concentración de griseofulvina libre equivalente a 0.01467g/ml obteniendo el 60.62% de griseofulvina libre y un 39.38% en la eficiencia de encapsulación.

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{[\text{ ] griseofulvina en los liposomas}}{[\text{ ] griseofulvina teórica}} \times 100$$

$$\% \text{ Eficiencia} = \frac{0.00953}{0.0242} \times 100 = 39.38\%$$

**TABLA No. IV ANALISIS DE MATERIA PRIMA LECITINA**

<b>ANALISIS</b>	<b>LIMITES</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>DESCRIPCION</b>	Consistencia plástica a fluida variando de color amarillo claro a café.	Pasa la prueba
<b>SOLUBILIDAD</b>	Parcialmente soluble en agua, en ácidos grasos. Insoluble en aceites fijos. Parcialmente soluble en alcohol. Insoluble en acetona	Pasa la prueba
<b>DENSIDAD</b>	Densidad relativa 1.0305g/ml	1.0426g/ml
<b>INDICE DE ACIDEZ</b>	No mas de 36	7.6
<b>INDICE DE YODO</b>	No mas de 95	45
<b>INDICE DE SAPONIFICACION</b>	No mas de 196	204
<b>AGUA</b>	No mas del 1.5%	No se realizó
<b>ARSENICO</b>	No mas de 3ppm	Pasa la prueba
<b>MATERIA INSOLUBLE EN ETER DE PETROLEO</b>	No mas del 0.3%	0.1241%
<b>MATERIA INSOLUBLE EN ACETONA</b>	No mas de 0.1%	0.084%



**TABLA No.V ANALISIS DE MATERIA PRIMA COLESTEROL**

<b>ANALISIS</b>	<b>LIMITE</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>DESCRIPCION SOLUBILIDAD</b>	Polvo blanco 500mg en 50ml de alcohol caliente, no presenta residuos de turbidez	Pasa la prueba Pasa la prueba
<b>ENSAYOS DE IDENTIDAD</b>	10mg de la muestra en 1ml de cloroformo, aparece una coloración azul rojizo al adicionar gotas de ácido sulfúrico, aparece un color verde fluorescente	Pasa la prueba
<b>RANGO DE FUSION ACIDEZ</b>	147°C- 150°C No mas de 0.3 ml de ácido sulfúrico	146°C-148°C 0.2 ml de ácido sulfúrico
<b>RESIDUO DE IGNICION ROTACION ESPECIFICA</b>	No mas de 0.1 %  -34° a -38°	0.0869%  No se realizó
<b>HUMEDAD</b>	No mas de 0,3%	0.53%

**TABLA No. VI ANALISIS DE MATERIA PRIMA GRISEOFULVINA**

<b>ANALISIS</b>	<b>LIMITES</b>	<b>RESULTADOS</b>
<b>DESCRIPCION</b>	Polvo blanco o amarillo	Pasa la prueba
<b>SOLUBILIDAD</b>	Soluble 1, 1, 2, 2-tetracloroetano, cloroformo. Ligeramente soluble en alcohol y metanol. Poco soluble en agua.	Pasa la prueba
<b>ENSAYOS DE IDENTIDAD</b>	5mg de la muestra en 1ml de ácido sulfúrico. 5mg de dicromato de potasio aparece un color rojo vino.	Pasa la prueba
<b>TEMPERATURA DE FUSION</b>	217°C - 224°C	216°C - 220°C
<b>ROTACION OPTICA</b>	+340° y 364° en dimetilformamida	No se realizo
<b>ACIDEZ</b>	250mg de la muestra en 20ml de alcohol titular con NaOH. 0.02 ml volumen no mayor a 1ml.	0.7 ml de NaOH
<b>CLARIDAD Y COLOR DE LA SOLUCION</b>	Solución 7.5% de la muestra en dimetilformamida es clara.	Pasa la prueba
<b>PERDIDA POR SECADO</b>	No mas del 1%	0.54%
<b>RESIDUO DE IGNICION</b>	No mas de 0.2%	13%
<b>TAMAÑO DE PARTICULA</b>	No mas de 30 cristales en diez campos mayores de 5u.	Pasa la prueba
<b>CRISTALINIDAD</b>	Deben presentar birrefringencia.	Presentan birrefringencia
<b>VALORACION</b>	No menos del 95% y no mas del 105%.	100.1%

## FORMULACION

**TABLA No.VII PROPORCIONES UTILIZADAS DE COLESTEROL Y LECITINA  
PARA EL ESTUDIO DE FORMULACION DE LIPOSOMAS**

COLESTEROL	LECITINA	PRESENCIA DE LIPOSOMAS
1	1	-
0.3	1	-
1	2	-
0.2	0.6	+
0.2	0.7	++
0.2	0.8	++
0.1	0.9	+++
0.1	1.20	++

- AUSENCIA DE LIPOSOMAS + POCA PRESENCIA DE LIPOSOMAS ++ PRESENCIA DE LIPOSOMAS +++ ABUNDANTE  
PRESENCIA DE LIPOSOMAS

NOTA. LA OBSERVACION SE REALIZO EN EL MICROSCOPIO CON EL OBJETIVO 40X

**TABLA No. VIII PROPORCIONES UTILIZADAS DE GRISEOFULVINA PARA  
EL ESTUDIO DE FORMULACION DE LIPOSOMAS**

LECITINA /COLESTEROL	GRISEOFULVINA	PRESENCIA DE LIPOSOMAS
9:1	100mg	-
9:1	50mg	-
9:1	30mg	+
9:1	25mg	++
9:1	20mg	+++

- AUSENCIA DE LIPOSOMAS + POCA PRESENCIA DE LIPOSOMAS ++ PRESENCIA DE LIPOSOMAS +++ABUNDANTE  
PRESENCIA DE LIPOSOMAS

NOTA. LA OBSERVACION SE REALIZO AL MICROSCOPIO CON EL OBJETIVO 40X

## RESULTADOS DEL ANALISIS DE ESTABILIDAD PARA LIPOSOMAS

**TABLA No.IX NUMERO DE LIPOSOMAS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD VARIANDO LA CONCENTRACION DE GRISEOFULVINA**

CONCENTRACION	TEMPERATURA 4°C			TEMPERATURA -10°C			
	TIEMPO (SEM) 1	2	3	1	2	3	
0.01	80	50	10		50	20	0
	80	10	8		50	50	20
0.02	80	70	0		60	15	0
	80	30	10		50	10	10
0.03	80	37	20		80	60	30
	25	20	10		10	0	0

**TABLA No. X NUMERO DE LIPOSOMAS DEL ESTUDIO DE ESTABILIDAD VARIANDO LA CONCENTRACION DE LECITINA**

CONCENTRACION	TEMPERATURA 4°C			TEMPERATURA -10°C			
	TIEMPO (SEM) 1	2	3	1	2	3	
0.70	80	40	15		50	22	25
	50	0	0		20	15	10
0.90	35	15	10		15	15	15
	50	40	30		25	20	12
1.20	70	56	26		50	20	10
	10	0	0		20	13	13

**TABLA No. XI ANALISIS DE VARIANZA VARIANDO LA CONCENTRACION DE LECITINA .**

FUENTE	SC	GL	CM	Fcalculada	F teorica
CONCENTRACION	99.5	2	49.75	0.345	3.55
TEMPERATURA	684.7	1	684.70	0.570	4.41
TIEMPO DENTRO DE TEM.	4805.06	4	1201.40	3.160	2.66
CONC. TEM.	84.38	2	42.20	0.293	3.55
CONC. TEM. TIEMPO	1152.61	8	144.07	0.379	2.46
ERRORES	6826.49	18	379.24		
TOTAL	13652.75	35			

Ho1. No existe diferencia significativa entre concentraciones

Ho2. No existe diferencia significativa entre temperaturas

Ho3. No existe diferencia significativa entre concentración, temperatura y tiempo de almacenamiento

Ho4. No existe diferencia significativa entre temperatura y tiempo de almacenamiento

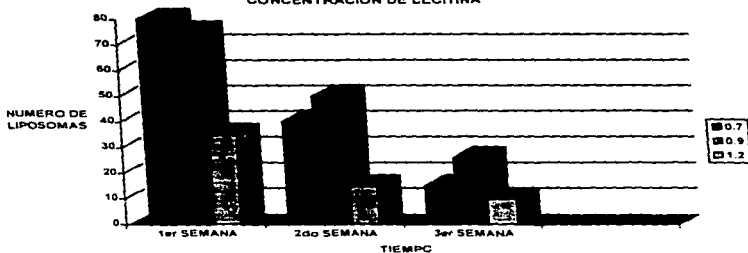
Nota. Las hipótesis son similares para la tabla XI y XII, con un valor de significancia del 5%

**TABLA No.XII ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIACION DE CONCENTRACION DE GRISEOFULVINA**

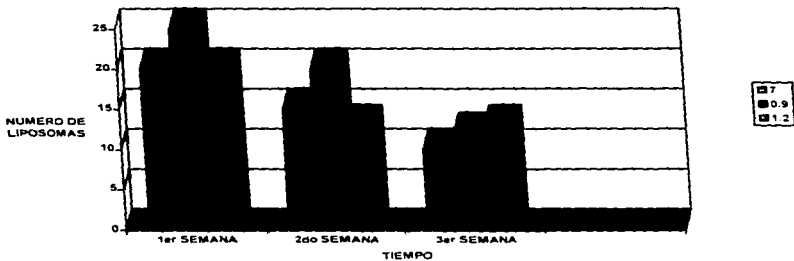
FUENTE	SC	GL	CM	Fcalculada	Fteorica
CONCENTRACION	135.72	2	67.86	-0.037	3.55
TEMPERATURA	930.25	1	930.25	0.216	4.41
TIEMPO DENTRO DE TEM	17207.80	4	4301.95	5.286	2.66
CONC X TEM	560.16	2	280.08	0.052	3.55
CONC X TIEMPO	42623.81	8	5327.97	-2.908	2.46
ERROR	32974.11	18	1831.89		
TOTAL	28483.63	35	813.82		

En la tabla No.XI y XII se observa que no existe diferencia significativa entre las diferentes concentraciones, temperatura y concentración-tiempo de almacenamiento, pero sí se aprecia diferencia significativa de la tiempo dentro de la temperatura.

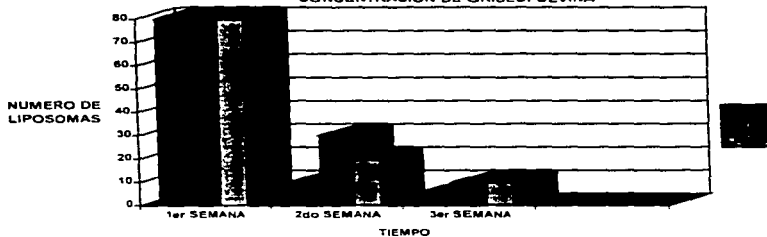
GRAFICA No.1 ESTABILIDAD FISICA DE LIPOSOMAS A 4°C VARIANDO LA CONCENTRACION DE LECITINA



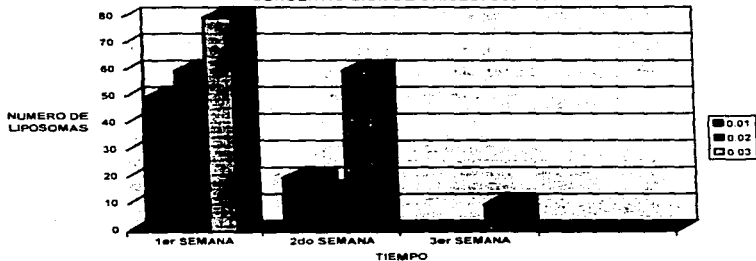
GRAFICA No.2 ESTABILIDAD FISICA DE LIPOSOMAS A -10°C VARIANDO LA CONCENTRACION DE LECITINA



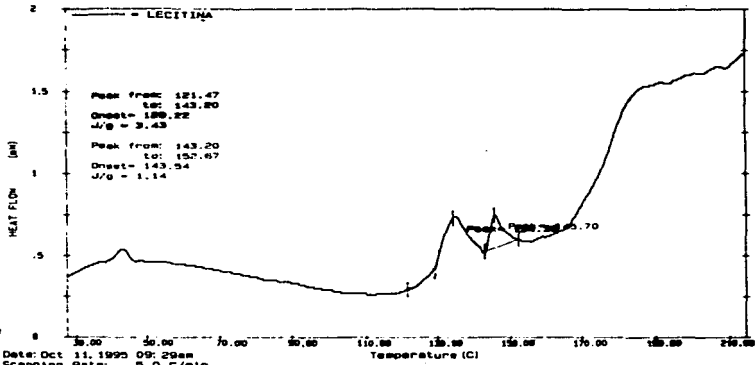
GRAFICA No.3 ESTABILIDAD FISICA DE LIPOSOMAS A 4°C VARIANDO LA CONCENTRACION DE GRISEOFULVINA



GRAFICA No.4 ESTABILIDAD FISICA DE LIPOSOMAS A -10°C VARIANDO LA CONCENTRACION DE GRISEOFULVINA



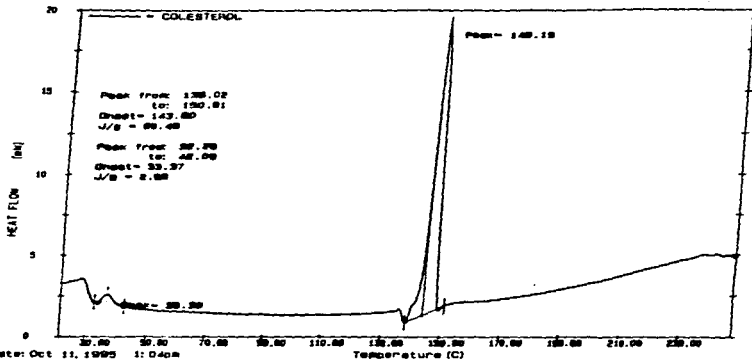




Date: Oct 11, 1995 09:29am  
 Scanning Rate: 5.0 C/min  
 Sample wt: 8.700 mg, Path: \PEN  
 File: LEC11095.D

PE PC SERIES DSC7

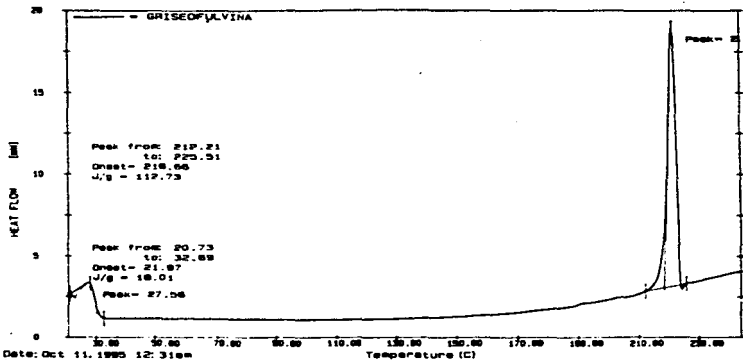
TERMOGRAMA No. 1 MUESTRA DE LECITINA



Date: Oct 11, 1999 1:04pm  
 Scanning Rate: 10.0 C/min  
 Sample wt: 3.200 mg Path: \PE\  
 File: C011085.Dm Y 81V

PE PC SERIES DSC7

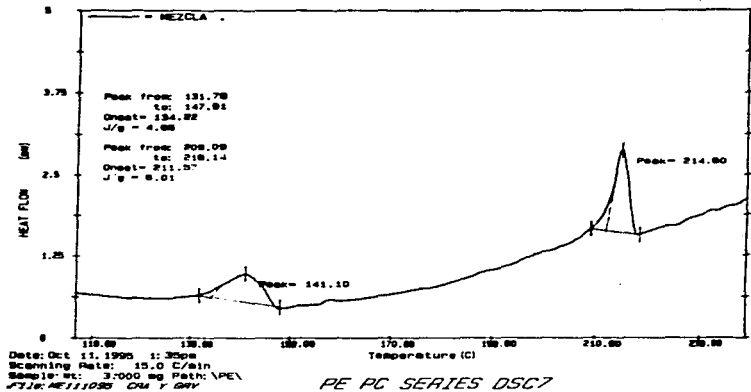
TERMOGRAMA No.2 MUESTRA DE COLESTEROL



Date: Oct 11, 1999 12:31m  
 Scanning Rate: 15.0 C/min  
 Sample wt: 1.000 mg Path: APE\  
 File: 0911095.DM Y.DM

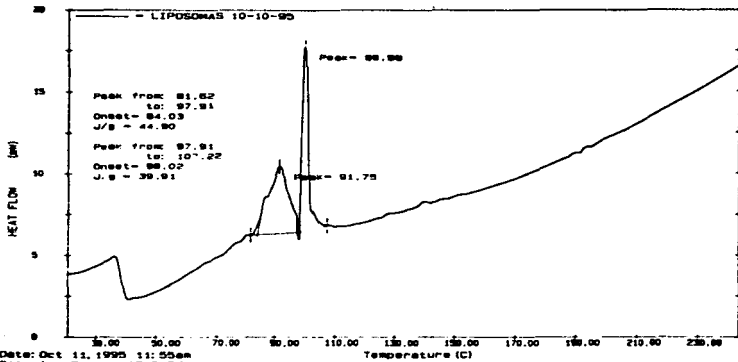
PE PC SERIES DSC7

TERMOGRAMA No.3 MUESTRA DE GRISOFULVINA



PE PC SERIES DSC7

TERMOGRAMA No. 4 MEZCLA DE MATERIAS PRIMAS



Date: Oct 11, 1995 11:55am

Scanning Rate: 10.0 C/min

Sample Wt: 2.900 mg Path: \PE\

File: L111098 CARMEN R. A. Y. GRACIE

PE PC SERIES DSC7

TERMOGRAMA No. 6 MUESTRA DE LIPOSOMAS

## 7. DISCUSION DE RESULTADOS

En las tablas 4, 5 y 6, se presentan los resultados del análisis de materias primas, cumpliendo con los requisitos establecidos por la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

En base a la bibliografía consultada, se propuso una formulación para liposomas conteniendo como agente de formulación lecitina y colesterol, sin embargo las referencias no indican las concentraciones propias para la obtención de los mismos, por lo cual se estableció un diseño experimental para encontrar la relación de ambos aditivos que resulta más apropiada (ver tabla VII).

Se encontró que una concentración de lecitina/colesterol en una proporción 9:1, funciona apropiadamente para la formación de liposomas, ya que está presenta un mayor número de éstos, se observo que al disminuir la concentración de lecitina no hay formación de liposomas, mientras que al aumentarla se presenta tensión molecular alta dando lugar al rompimiento de los liposomas; cabe mencionar que los parámetros: velocidad de agitación, temperatura de calentamiento, pH y volumen de la fase acuosa y orgánica se mantuvieron constantes. Debemos recordar que los planteamientos teóricos estipulan que la lecitina actúa como molécula antipática formando la capa micelar que conforman a los liposomas.

Una vez establecida la formulación de liposomas se prosiguió a realizarla con griseofulvina, utilizando diferentes concentraciones de ésta, tratando de encontrar la óptima concentración, aunque el estudio bibliográfico indica que se tendrá mejor comportamiento si se utilizan concentraciones menores de 0.020g/10ml, pero no puede ser posible su preparación con concentraciones más bajas debido a que no hay formación de liposomas, por lo que se debe trabajar con concentraciones de 0.020g/10ml, además de que no son aceptables para la dosificación (ver tabla VIII). Con la anterior formulación se realizó la caracterización de los liposomas evaluando: eficiencia de encapsulación, tamaño de liposoma y tipo de bicapa, encontrando el tamaño que varía de 5 a 20 $\mu$ , con una eficiencia de encapsulación del 40%, con vesículas pequeñas unilaminares

A demás se observo que debido al calor emitido por el foco del microscopio se presenta un proceso que afecta la estabilidad física de los liposomas, manifestándose aglomeración y fusión de los mismos y rompimiento de los liposomas, dando lugar a la formación de cristales de lecitina y griseofulvina, lo cual demuestra el efecto perjudicial de la temperatura en la estabilidad de los liposomas..

Por otra parte, la termogravimetría nos ayuda a determinar cualitativamente especies químicas, por lo que se realizó un estudio de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para comprobar la presencia de liposomas. Los resultados observados en los termogramas No. 1, 2, 3 y 4 de las materias primas y mezcla de las materias primas, presentan máximos de respuesta en el rango de 130°C- 150°C la lecitina y colesterol; 210°C- 230°C para griseofulvina. A diferencia del termograma de la mezcla de materias primas y la suspensión liposomal, termogramas 4 y 5 los máximos de respuesta tienen un rango diferente en las temperaturas. Existiendo una diferencia de 100°C entre la mezcla de las materias primas y la suspensión liposomal, esta diferencia se debe al cambio físico o químico que ocurre en la transformación de las materias prima a liposomas al obtener una bicapa lipídica que es fusionada a 85°C, el otro máximo correspondiente a 100°C suponemos es la griseofulvina que sufrió algún cambio en sus propiedades o estructura.

El estudio de estabilidad se presenta en las gráficas 1, 2, 3 y 4. En donde la formulación 9:1 de lecitina-colesterol, tiene una tendencia más estable, en cuanto al número de liposomas a medida que transcurre el tiempo; de acuerdo a la tabla (IX y X.).

En las gráficas 3 y 4 se aprecia una variación en el número de liposomas, observando que la concentración de 0.02g de griseofulvina es más constante, en comparación a las otras concentraciones a una temperatura de 4°C.

En base a los resultados anteriores se decidió trabajar con el diseño jerárquico-factorial, el cual tiene como finalidad determinar el efecto de las variables manejadas y su interacción en el estudio de estabilidad. Los resultados de este diseño se aprecian en la (tabla XI y XII). No existiendo diferencia significativa entre las tres concentraciones de griseofulvina y lecitina, así como tampoco en la interacción concentración y temperatura de almacenamiento, pero si existe diferencia significativa entre las variables de temperatura y tiempo de almacenamiento. No se aprecia diferencia significativa en la triple interacción temperatura, concentración y tiempo.



## **8. CONCLUSIONES**

Los liposomas tienen un uso limitado en la industria farmacéutica debido, a su inestabilidad química y física (agregación, separación de fases y fusión de la bicapa). Estos problemas no solo se deben a la cantidad y tipo de liposoma, si no también a las condiciones de trabajo, almacenamiento y tipo de fármaco que se utiliza para la formación de liposomas, ya que si se encuentra una alta liposolubilidad y un peso molecular elevado esto provocara problemas en el porcentaje de eficiencia de atrapamiento por periodos prolongados.

El objetivo general que se planteó al principio de este trabajo se cumplió, en el desarrollo de una formulación para liposomas con griseofulvina por el método de evaporación en fase reversa (REV). De este estudio de formulación, se encontró que hay mayor formación de liposomas y una mejor estabilidad física en la formulación (9:1) de lecitina-colesterol con 0.020g de griseofulvina.

La eficiencia de encapsulación fue determinada por la concentración de griseofulvina fuera del liposoma (griseofulvina libre), y por diferencia cuantificar la cantidad de griseofulvina encapsulada, obteniendo una eficiencia del 40% la cual no es muy aceptable, pero está puede ser incrementada al utilizar fosfatidilcolina de huevo y tener durante la preparación de los liposomas y el almacenamiento de estos una atmósfera libre de oxígeno, controlando pH de la fase acuosa, velocidad y tipo de agitación, temperatura y tiempo de preparación.

Los liposomas presentaron una mayor estabilidad física a una temperatura de almacenamiento de 4°C.

## **9. SUGERENCIAS**

- 1. Realizar una formulación de liposomas con un fármaco hidrosoluble, para comprobar la eficiencia de encapsulamiento, ya que con un fármaco liposoluble se tienen problemas para determinar el porcentaje encapsulado.**
- 2. Se sugiere trabajar los liposomas utilizando una atmósfera de nitrógeno para comprobar si aumenta su estabilidad.**
- 3. El material de empaque utilizado para el almacenamiento sea de color ámbar impermeable al oxígeno debido a que éste interfiere en la estabilidad.**
- 4. Realizar estudios de estabilidad física en un rango de temperatura de 4°C a -10°C.**

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Alim A, et al. Inhibition of Ester Hidrolysis by a Lipid Membrane. J.Org. Chem 1983; 48:1890 -1896.
2. Alpar H O, et al. Estimation by FACS of the Delivery of Liposome Encapsulae Macromolecula Into Myeloid Cells. Inter. J. Pharma.1990; 62: 133 - 141.
3. Baber F. Distribution Studies of Liposomes Encapsulated Glutathione administred. Inter J Pharma 1990; 63: 227-235
4. Bertram G. Katzung Farmacologia basica y clinica. 4a de. México D.F: Editorial el manual moderno, 1991: 600-781.
5. Bonte F , Chevalier J M, Meybeck A. Determination of Retinoic Acid-Liposomal Association Level in a Topical Formulation. Drug Development and Industrial Pharmacy 1994; 20: 2527-2534.
6. British Pharmacopoeia 1989. Addendum, London, 1989.
7. Clarke E G C. Insolation and Identification of Drugs, in Pharmaceuticals Body Fluids and post-mortem Material, 2a ed. London: Editorial Pharmaceutical Press, 1986: 564-572.
8. Crommelin D J A. Influence of lipid Composition an Ionic Strength of The Physical Stability of liposomes. Journal of Pharmaceutical Sciences1984; 73: 1559-1563.
9. D'Silva B. Drug Stability in Liposomas Suspensions: Hidrolysis of Indomethacin Cycloctidine and P-Nitrophenyl Acetate. J. Pharma. Sciens.1982; 71: 1394-1398.
10. Florey Klaus. Analytical Profiles of Drugs Sustances. Editorial academic Press, 1988: vol. 19: 584-599.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

11. Gregoradis G.; et al. A Comparative Study of Free and Liposome Entrapped Diethylenetriaminepentaacetic Acid used in the Treatment of Mice Loaded with Codmium. *Inter. J. Pharma* 1992; 79: 213-227
12. Gregorioidis G. *Drug Liposomas as carriers*. New York: Editorial John Wiley and Sons, 1988: 599 - 607.
13. Hernández C T, Villalain J, Gómez J C. Stability of liposome on long term storage. *Pharma. Pharmacol* 1990; 42: 397-400.
14. Hsiu-Ying Y, Rey-Fen L. Hepatic Uptake and Tissue Distribution of Liposomes: Influence of Vesicle size. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 1994; 20: 557-574.
15. Perrett S, Golding M, Patrick W. A Simple Methods for the preparation of Liposomes for Pharmaceutical Applications: Characterization of the Liposomes. *J. Pharma Pharmacol* 1991; 43: 154-161.
16. Ponznansky M, Juliano R Biological. Approaches to the Controlled Delivery of Drugs: A Critical Review. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1989; 36: 227-336.
17. Remington. *Farmacía*. 17a. ed. Editorial Médica Panamericana, 1990; vol. 2: 1666-1667, 1907-1928.
18. Robinson R, Joseph L, et al. *Controlled Drug Delivery*. 2a. ed. New York: Editorial Menis W, 1989: 456 - 467.
19. Rubintein M H. *Pharmaceutical Technology*. New york: Editorial Ellis Horwod, 1989: 24 - 39.
20. Soberon A G, Martuscelli Q J, Kumate R J, Ruiz C M, Ortega L R, Lieberna L M. *Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*. 5a. ed. México, D.F. Editado por la Secretaría de Salud, 1988: 703, 737.

21. Sriram V, Rhodes C T. Encapsulation of a Water Soluble Drug in a Liposome Preparation: Removal of Free Drug by Washing. Drug Development and Industrial Pharmacy 1995; 21: 1329-1338.
22. Talsma H, Crommelin DJA. Liposomes as Drug Delivery Systems, Part 1: Preparation. Pharmaceutical Technology 1992; 35: 96-100.
23. Talsma H, Crommelin DJA. Liposomes as Drug Delivery Systems, Part III: Stabilization Pharmaceutical Technology 1993; 36: 100-105.
24. Underberg J M, Mustafa G, Crommelin J A. Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous dispersions. Journal of Pharmaceutical Sciences 1993; 82: 362-366.
25. Velazquez Lorenzo. Farmacología y su proyección a la clínica. 15 a. ed. Editorial Oteo, 1987: 843-847.
26. Weiner N, Frank M, Mohammad R. Liposome as a Drug Delivery sistem. Drug Development and Industrial Pharmacy 1989; 15: 1523-1554.
27. Wowarth R, et al. The Human Body. 2a. de. Barcelona: Editorial Rostete, 1985: 489 - 502.