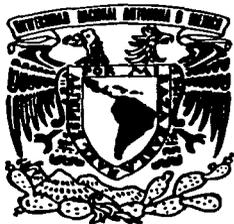


5

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA

Estudio de un sistema de liberación  
controlada de oxitetraciclina

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

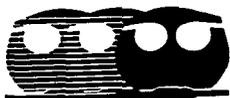
P R E S E N T A  
MARIA ANTONIETA ALVAREZ POLO



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

MEXICO, D.F.

2002



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

**Jurado asignado:**

**Presidente:** Honoría Fuentes Sixtos

**Vocal:** Juan Manuel Peguero Zambrano

**Secretario:** María Josefa Bernad Bernad

**1er. Suplente:** Liliana Aguilar Contreras

**2º. Suplente:** Juana Vázquez Ocampo

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio de Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

**ASESORA:**

**Dra. María Josefa Bernad Bernad**



---

**SUSTENTANTE:**

**María Antonieta Alvarez Polo**



---

## **AGRADECIMIENTOS**

**A la Universidad Nacional Autónoma de México porque gracias a su pluralidad y libertad de expresión me permitió el acceso a un mundo ilimitado de conocimientos reflejados en su gente.**

**A la Facultad de Química por brindarme la oportunidad de convivir y aprender de los más reconocidos de México, sus estudiantes, académicos y científicos.**

**A la Dra. María Josefa Bernad Bernad por su habilidad para permitir el desarrollo de las buenas ideas y otorgar oportunidades de gran valor. Gracias por compartir tus conocimientos, tu ánimo y sobre todo tu cariño y dedicación.**

**A mis padres por su amor y apoyo como motivo de superación y esperar siempre algo bueno de las cosas. Los quiero mucho.**

**A ti que de una u otra forma siempre haz estado ahí para darme lo mejor muchas gracias, sobre todo por compartir conmigo este momento.**

**INDICE**

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
|          | <b>Resumen</b>                                | <b>1</b>  |
| <b>1</b> | <b>Introducción</b>                           | <b>2</b>  |
| <b>2</b> | <b>Antecedentes</b>                           | <b>3</b>  |
| 2.2      | ¿Qué es la oxitetraciclina)                   | 4         |
| 2.2.1    | Ficha técnica de la oxitetraciclina           | 5         |
| 2.2.2    | Usos clínicos                                 | 6         |
| 2.2.3    | Dosis   | 7         |
| 2.3      | Sistemas de liberación                        | 7         |
| 2.3.1    | Liposomas como sistemas de liberación         | 10        |
| 2.3.1.1  | Definición de liposomas                       | 10        |
| 2.3.1.2  | Composición y clasificación                   | 12        |
| 2.3.1.3  | Metabolismo de liposomas                      | 16        |
| 2.3.1.4  | Técnicas de preparación                       | 17        |
| 2.3.1.5  | Caracterización de liposomas                  | 18        |
| 2.3.1.6  | La lecitina y su importancia en los liposomas | 19        |
| 2.3.1.7  | Ficha técnica de la lecitina de huevo         | 20        |
| 2.3.1.8  | Aplicaciones de la lecitina                   | 21        |
| 2.4      | Estudios de liberación                        | 22        |
| 2.4.1    | Celdas de difusión de Franz                   | 23        |
| <b>3</b> | <b>Objetivos</b>                              | <b>25</b> |
| <b>4</b> | <b>Parte experimental</b>                     | <b>26</b> |

---

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 4.1      | Reactivos   | 26        |
| 4.2      | Material y equipo   | 26        |
| 4.3      | Metodología   | 27        |
| 4.3.1    | Formación de liposomas  | 28        |
| 4.3.2    | Caracterización de liposomas  | 30        |
| 4.3.2.1  | Número de liposomas   | 30        |
| 4.3.2.2  | Tamaño de los liposomas y potencial zeta  | 30        |
| 4.3.2.3  | Carga de los liposomas  | 30        |
| 4.3.2.4  | Estudios de liberación controlada de liposomas con oxitetraciclina en celdas de difusión de Franz | 31        |
| <b>5</b> | <b>Resultados y discusión</b>   | <b>33</b> |
| 5.1      | Aspecto de las dispersiones   | 33        |
| 5.2      | Caracterización de liposomas  | 34        |
| 5.2.1    | Tamaño de los liposomas   | 36        |
| 5.2.2    | Número de liposomas   | 37        |
| 5.2.3    | Porcentaje de encapsulación   | 38        |
| 5.2.4    | Potencial zeta  | 39        |
| 5.2.5    | Velocidad de liberación   | 40        |
| <b>6</b> | <b>Conclusiones</b>   | <b>44</b> |
| <b>7</b> | <b>Bibliografía</b>   | <b>46</b> |

**Abreviaturas**

|                |   |
|----------------|---|
| Oxi/PC         | Oxitetraciclina/Fosfatidilcolina  |
| Oxi            | Oxitetraciclina   |
| PC             | Fosfatidilcolina  |
| SLC            | Sistema de liberación controlada  |
| I.V.           | Intravenosa   |
| $\phi$         | Potencial zeta  |
| DCM            | Diclorometano   |
| M              | Molaridad   |
| A              | Concentración de NaCl 0 M (Agua)  |
| 1B             | Concentración de NaCl 0.079 M (Buffer)  |
| 2B             | Concentración de NaCl 0.12 M (Buffer)   |
| 3B             | Concentración de NaCl 0.15 M (Buffer)   |
| 4B             | Concentración de NaCl 0.22 M (Buffer)   |
| 5B             | Concentración de NaCl 0.42 M (Buffer)   |
| 6B             | Concentración de NaCl 0.85 M (Buffer)   |
| 1:1            | Relación oxi/PC (1 mol oxi y 1 mol PC)  |
| 1:10           | Relación oxi/PC (1 mol oxi y 10 mol PC)   |
| 1:100          | Relación oxi/PC (1 mol oxi y 100 mol PC)  |
| <b>Ejemplo</b> |   |
| <b>3B1:10</b>  | Concentración de NaCl 0.15 M en Buffer, 1 mol de oxi y 10 mol de fosfatidilcolina |

**RESUMEN**

La oxitetraciclina, antibiótico de amplio espectro, de baja solubilidad en agua y de gran utilidad en medicina veterinaria se propuso como antibiótico a utilizar en el sistema de liberación controlada.

El fosfolípido empleado para la formación de los agregados lipídicos fue la fosfatidilcolina a partir de yema de huevo comúnmente conocida como lecitina de huevo. Para observar la influencia de la relación entre oxitetraciclina y fosfolípidos se propusieron relaciones 1:1, 1:10 y 1:100 así como diferentes concentraciones de cloruro de sodio para observar la influencia de la fuerza iónica. Para la formación de los liposomas se empleó la técnica de evaporación en fase reversa. Los liposomas formados fueron caracterizados por tamaño de partícula (dispersión de luz), número de liposomas (microscopía óptica), porcentaje de encapsulación (ultracentrifugación a 100000 rpm y cuantificación del sobrenadante por UV) y potencial zeta (zetámetro) para posteriormente realizar los estudios de liberación empleando celdas de difusión de Franz.

Los resultados indican que los liposomas de oxitetraciclina funcionan como sistema de liberación controlada (SLC) y que factores a considerar para su formulación posterior son relación oxitetraciclina/fosfatidilcolina y fuerza iónica; aunque no se descarta realizar estudios previos con mezclas de fosfolípidos y demás excipientes de la formulación para determinar como afectan estos a la elaboración de los liposomas y a la estabilidad.

### **1 INTRODUCCION**

La producción animal a gran escala ha favorecido el desarrollo de productos que protegen la salud de los animales. Por razones económicas y ambientales, muchas formas de producción animal suponen la concentración de un gran número de animales en un espacio reducido. En esta situación, las infecciones subclínicas pueden dañar seriamente la productividad, ya que, en un momento dado, pueden alcanzar proporciones clínicas y afectar rápidamente a todos los animales de ese ambiente cerrado. Al manejarse un gran número de animales la administración de fármacos, sobre todo cuando se hace uno por uno, es difícil y tardado además que generalmente los tratamientos son con dosis diarias.

¿Cómo reducir la frecuencia de administraciones y mantener las concentraciones terapéuticas de la oxitetraciclina en los animales? La propuesta para resolver este problema, utilizando los avances hasta ahora alcanzados por la Tecnología Farmacéutica, es la implementación de un sistema de liberación controlada, en donde la liberación de la oxitetraciclina a partir de la forma farmacéutica permitirá una prolongación del tiempo de liberación del fármaco y será controlado para seguir una cinética preestablecida.

En el presente trabajo se realizó el estudio de liposomas como sistema de liberación controlada de oxitetraciclina de donde se obtuvieron resultados con los que se puede decir que los liposomas de oxitetraciclina son una buena propuesta para la posterior formulación de oxitetraciclina en forma parenteral para su aplicación en bovinos.

## **2 ANTECEDENTES**

### **2.1 Los antibióticos en veterinaria**

Los antibióticos se empezaron a utilizar en medicina veterinaria poco después de su aplicación en medicina humana. Hoy en día la gran variedad de antibióticos existentes permite el tratamiento de enfermedades infecciosas que afectan tanto a los animales de compañía como a los destinados al consumo humano, contribuyendo así a mantener la salud de la población.

El empleo de antibióticos en animales de compañía tiene fines fundamentalmente terapéuticos y a veces profilácticos, mientras que en los animales productores de alimentos también se pueden utilizar como promotores del crecimiento añadiéndolos en el alimento en dosis subterapéuticas durante periodos de tiempo relativamente prolongados.

La práctica de incluir antibióticos en la alimentación de los animales está muy extendida desde que en 1950 Stokstad y Jukes observaron que tras la administración de pequeñas dosis de clortetraciclina aumentaba su ritmo de crecimiento<sup>1</sup>.

Los mecanismos mediante los cuales los antibióticos aceleran el crecimiento y favorecen un mayor aumento de peso en los animales que los consumen no se conocen bien. Se cree que la forma en que promueven el crecimiento se debe a la eliminación de organismos causantes de infecciones subclínicas, a la reducción de sustancias tóxicas, como el amoníaco, que retardan el crecimiento, y a la menor destrucción y competencia por nutrientes en el tracto gastrointestinal por parte de los microorganismos<sup>2</sup>. Como consecuencia existe una mayor capacidad de adaptación de los animales a los cambios de alimentación y manejo, y una disminución de enfermedades causadas por el transporte y los cambios de

ambiente, con lo cual se logran mayores ganancias de peso, con menor cantidad de alimento consumido, en periodos menores de tiempo<sup>3</sup>

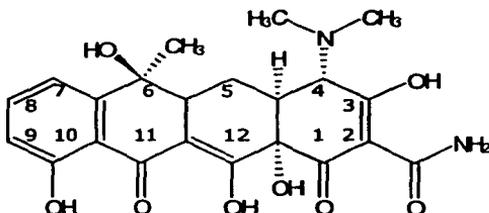
Tras la administración de antibióticos en veterinaria es necesario respetar un plazo de espera o periodo de supresión antes de utilizar la carne, leche, huevos o cualquier producto animal, para que el antibiótico haya sido eliminado totalmente y no queden residuos o que éstos se encuentren por debajo del límite máximo de residuos fijado en cada caso.

En granjas y ranchos de gran producción se manejan miles de animales, por lo que la administración de fármaco para profilaxis ó tratamiento se vuelve una tarea difícil y cansada para las personas responsables de la administración de fármaco, sobre todo si esto se tiene que hacer uno por uno de los animales (administración de tabletas, inyecciones, etc.), tal es el caso de la oxitetraciclina, antibiótico de amplio espectro utilizado para varias enfermedades en bovinos, caprinos, porcinos y aves. La oxitetraciclina se administra preferentemente vía intramuscular ya que es un fármaco sensible al contacto con el aire, a la exposición de la luz y a cambios de temperatura por lo que no se recomienda su administración en mezcla con el alimento, aunado a esto las administraciones son recomendadas por los médicos veterinarios cada 24 horas.

### **2.2 ¿Qué es la oxitetraciclina?**

La oxitetraciclina pertenece a la familia de las tetraciclinas. Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro activas contra grampositivos y gramnegativos aerobios y anaerobios, rickettsias, micoplasmas y clamidias<sup>4</sup>. La oxitetraciclina tiene como principal diferencia estructural de las demás tetraciclinas la presencia del grupo hidroxilo en la

posición 5 de la estructura base como se puede apreciar en la tabla siguiente:



| Compuesto        | Sustituyente (s)                             | Posición |
|------------------|--|----------|
| Clortetraciclina | - Cl   | 7        |
| Oxitetraciclina  | - OH, - H                                    | 5        |
| Demeclociclina   | - OH, - H, - Cl                              | 6, 7     |
| Metaciclina      | - OH, - H, = CH <sub>2</sub>                 | 5, 6     |
| Doxiciclina      | - OH, - H, - CH <sub>3</sub> , - H           | 5, 6     |
| Minociclina      | - H, - H, - N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> | 6, 7     |

### 2.2.1 Ficha Técnica de la oxitetraciclina<sup>5</sup>

|                    |   |
|--------------------|---|
| Nombre químico:.   | 4-(dimetilamino)-1,4,4 $\alpha$ ,5,5 $\alpha$ ,6,11,12 $\alpha$ -hexahidroxi-6-metil-1,11-dioxo-2-naftacencarboxamida |
| Sinónimos:         | Biostat (Pfizer), Terramicina (Pfizer)Stecsolin (Squibb), Imperacin (ICI).  |
| Peso molecular:    | 460.434 g/mol   |
| Descripción física | Polvo cristalino amarillo, poco soluble en agua. Se disuelve fácilmente en soluciones diluidas ácidas ó alcalinas     |

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Rotación óptica:</b>       | -203° a - 216°(0.250g en solución de HCl 0.1 M)  |
| <b>Método de obtención:</b>   | A partir de cultivos de streptomyces rimosus   |
| <b>Mecanismo de acción:</b>   | Inhibe la síntesis de proteínas uniéndose a la subunidad 30s de los ribosomas bacterianos.   |
| <b>Vía de administración:</b> | Inyección intramuscular (no muy recomendada por causar dolor e irritación), intravenosa lenta o subcutánea, por vía intrauterina, oral o tópica, según sea el caso y las necesidades del tratamiento.  |
| <b>Absorción:</b>             | Se produce en estómago y en intestino delgado superior. Disminuida por los alimentos. La oxitetraciclina se absorbe medianamente (60 - 80%), presenta una vida media de 6 a 12 h y su velocidad de absorción es muy lenta ya que la concentración plasmática de una solo dosis se logra en 4 horas |

**2.2.2 Usos clínicos**

La oxitetraciclina es recomendada en medicina veterinaria para los siguientes padecimientos<sup>6</sup>

| <b>Enfermedad</b> | <b>Bacteria</b>   |
|-------------------|---|
| Rinitis Astrófica | Pasteurella haemolytica<br>Pasteurella multocida<br>Bordetella bronchiseptica |
| Onfalitis         | Corynebacterium pyogenes<br>E. coli<br>Staphylococcus aureus                  |

|   |  |
|---|--|
|   | Streptococcus agalactiae<br>Streptococcus uberis |
| Metritis  | E. coli<br>Streptococcus pyogenes                |
| Pasteurellosis y enfermedades del tracto respiratorio | Pasteurella haemolytica<br>Pasteurella multocida |
| Septicemia  | Salmonella dublin<br>Streptococcus pyogenes      |
| Erisipela   | Erysipelothrix rhusiopathiae                     |

### 2.2.3 Dosis

Bovinos: 20 mg/ kg de peso vivo por vía parenteral<sup>6</sup>.

### 2.3 Sistemas de liberación

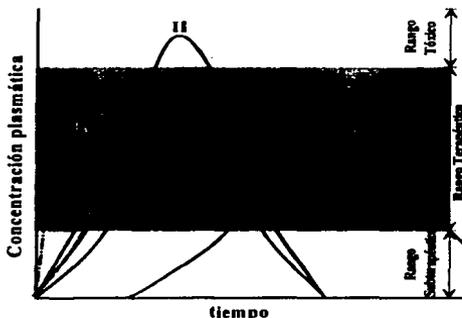
Si se exceptúa el caso concreto de la administración por infusión intravenosa continua, puede señalarse que las formas farmacéuticas convencionales de dosificación de medicamentos, presentan ciertos inconvenientes o limitaciones, para alcanzar el fin que se persigue en un sistema de liberación controlada. La liberación del principio activo, a partir de la forma de administración, se produce generalmente de una manera brusca y rápida, lo que se traduce en el organismo, en una gran fluctuación entre las concentraciones máxima y mínima que se obtienen, tanto en el plasma, como en los diferentes tejidos, lo que puede traer riesgo de toxicidad en algunos casos, o pérdida de eficacia en otros, dentro del intervalo de dosificación aplicado.

Para salvar estas dificultades se puede utilizar fármacos de vida media de eliminación más prolongada, o bien acortando la frecuencia de administración. En el primer caso, teniendo en cuenta que el estado

estacionario se alcanza cuando se igualan las velocidades de absorción y de eliminación del fármaco, se va a producir una acumulación de fármaco (ó metabolitos), con el perjuicio que ello representa para el paciente, sobre todo en situaciones de tratamientos prolongados. En el segundo caso, dada la mayor complejidad terapéutica que representa esta forma de proceder, puede comprometerse el cumplimiento de la prescripción por parte del enfermo y por tanto, la propia eficacia del tratamiento que se pretende.

Así surgieron las formas farmacéuticas de *liberación retardada* (el fármaco se libera global y masivamente, pero no de forma inmediata a su administración sino al cabo de un cierto tiempo prefijado), de *liberación prolongada* (tras la liberación inmediata de una dosis inicial de principio activo continua liberando cantidades que aseguran niveles plasmáticos terapéuticos durante al menos 6-8 horas) y formas de *liberación sostenida* (después de la cesión inicial de fármaco la liberación se prolonga durante un tiempo relativamente largo, normalmente 24horas). Hoy se prefiere el término, más general, de *formas farmacéuticas o sistemas de liberación modificada* donde se incluyen todas aquellas que en su diseño intervienen, de una u otra forma, modificaciones en el proceso tecnológico que son determinantes del lugar de liberación (formas o sistemas de liberación *diferida*, que incluyen las formas enterosolubles y las de liberación colónica) y del control de la liberación del fármaco (formas o sistemas de liberación *controlada*), la diferencia entre ellas se aprecia claramente en la figura 1. Las formas de liberación controlada permiten la prolongación del tiempo de cesión del principio activo a partir de la forma de dosificación, como sucede en la concepción clásica (prolongada o sostenida) y, además, controlan su liberación para que ésta se realice de acuerdo con una cinética preestablecida y reproducible que también involucra el lugar de acción (ubicación espacial y liberación temporal). Para el correcto

funcionamiento farmacocinético de un sistema de liberación controlada el factor limitante de la absorción del fármaco será el de su liberación a partir del dispositivo terapéutico<sup>7</sup>.



**Figura 1.** Niveles plasmáticos vs. tiempo para una forma farmacéutica convencional y diferentes sistemas de liberación de activos: I) Liberación convencional o inmediata; II) Liberación inmediata doble dosis; III) Liberación a velocidad constante (SLC ó infusión I.V. continua); IV) Liberación repetida; V) Liberación prolongada; VI) Liberación retardada o diferida.

En síntesis, puede concluirse que sistemas de liberación controlada aportan como ventaja, frente a las formas convencionales, el hecho de que permiten obtener a lo largo de todo el intervalo de dosificación del medicamento, unos niveles plasmáticos y tisulares sostenidos y terapéuticos, con menores fluctuaciones entre el máximo y el mínimo, lo que conlleva por otra parte a un mejor aprovechamiento y rendimiento del fármaco utilizado. Por ello, la cantidad de fármaco administrada, en términos absolutos, se reduce significativamente, en comparación con formas farmacéuticas convencionales, lo que representa a su vez un menor riesgo de aparición de efectos colaterales no deseables. Además, simplifican notablemente el régimen posológico, con lo que mejoran sensiblemente el cumplimiento de la prescripción por parte del paciente<sup>7,8</sup>.

### **2.3.1 Liposomas como sistemas de liberación**

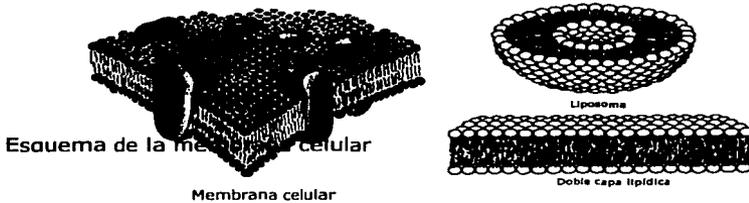
El empleo de liposomas en terapéutica ha demostrado su potencial como sistemas para la liberación de fármacos<sup>9</sup>. Dependiendo de su naturaleza (composición lipídica<sup>10,11</sup>, tamaño<sup>12,13</sup>, carga superficial<sup>14</sup>), del fármaco encapsulado<sup>15,16</sup> y de los componentes de la forma farmacéutica final, la formulación liposómica puede favorecer la acción local<sup>17</sup> o la sistémica<sup>18</sup> de fármacos de diversos grupos farmacológicos, tal es el caso de liposomas de ibuprofeno, este fármaco se administra en la epidural como tratamiento para el dolor, pero su corto tiempo de acción y lo traumático de la administración la dosificación continua es penosa para el paciente. Con liposomas de ibuprofeno se consigue en una sola administración una liberación controlada de ibuprofeno aumentando el tiempo de acción dentro del organismo<sup>17</sup>

Los liposomas presentan como ventajas para su uso farmacéutico su capacidad para contener, transportar y ceder principios activos terapéuticos, así como que sus componentes no son tóxicos, son biodegradables y pueden incorporar una gran variedad de fármacos de naturaleza hidrofílica o hidrofóbica<sup>19</sup>

#### **2.3.1.1 Definición de liposomas**

Los liposomas son vesículas (esferas huecas) formadas por bicapas lipídicas (generalmente fosfolípidos) que incluyen en su interior un pequeño volumen de disolvente en que han sido preparados. Estos se forman cuando los fosfolípidos están dispersos en un medio acuoso formando una población de vesículas con variados rangos de tamaño que van desde diez nanómetros hasta diez micras de diámetro<sup>20</sup>

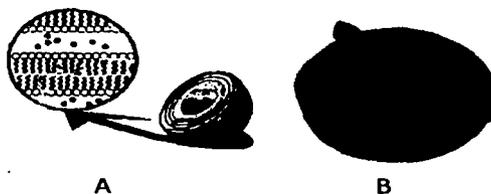
La estructura de bicapa lipídica no es exclusiva de los liposomas ya que esta conformación se encuentra en todas las membranas biológicas en donde además de incluirse la fosfolípidos encontramos proteínas y carbohidratos (Figura 2).



**Figura 2.** Representación de la membrana celular y de liposomas.

Dada la similitud entre los liposomas y las membranas celulares estos son empleados en farmacia para el transporte de fármacos, es decir, como vehículos por mimetizar a las membranas dando lugar al desarrollo de targeting<sup>21</sup> (específico para cierto tipo de células u órganos).

Cuando se incluye un fármaco en liposomas este queda atrapado en el centro del liposoma si se trata de un fármaco soluble en agua pero si es insoluble o poco soluble este se verá atrapado en la fase lipídica del liposoma (entre las cadenas alifáticas<sup>20</sup>) como se ejemplifica en la figura 3.

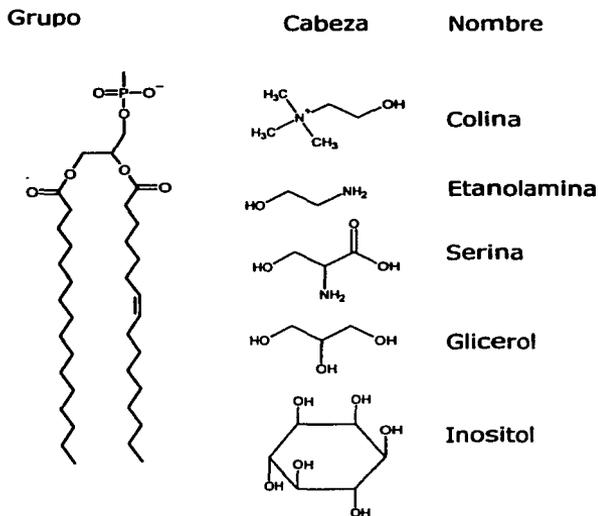


**Figura 3.** En la ilustración A) muestra un liposoma multilaminar que tiene encapsulado fármaco en las zonas hidrofílicas, en B) se muestra a un liposoma unilaminar que tiene encapsulado dos fármacos uno de los cuales es hidrosoluble y se encuentra en el interior del liposoma y otro liposoluble que se encuentra atrapado entre las cadenas alifáticas.

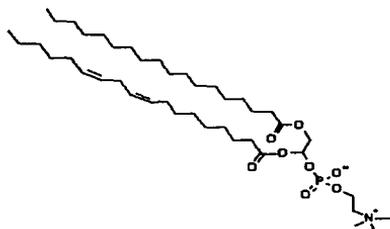
### **2.3.1.2 Composición y clasificación**

Los liposomas están formados mayoritariamente por fosfolípidos. Los fosfolípidos son una clase de moléculas que tienen una cabeza polar con un átomo de fósforo y dos cadenas (colas) no polares formadas a partir de hidrocarburos. Dada esta conformación se clasifican como moléculas anfifílicas, además por tener actividad superficial reciben en nombre de tensoactivos.

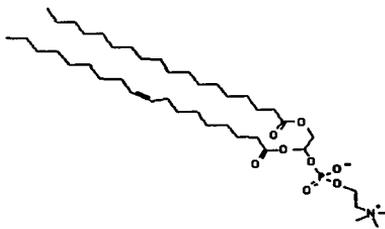
Hay muchas especies de fosfolípidos ya que se pueden combinar diferentes cabezas polares y diferentes tipos de cadenas hidrocarbonadas (Figura 4 y figura 5).



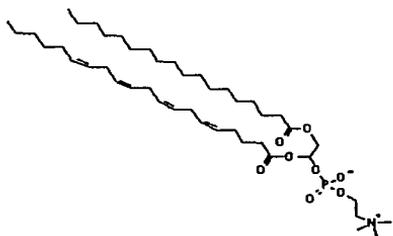
**Figura 4.** Representación del grupo fosfatidil y los diferentes grupos que funcionan como cabeza polar de la molécula, por ejemplo, fosfatidilinositol.



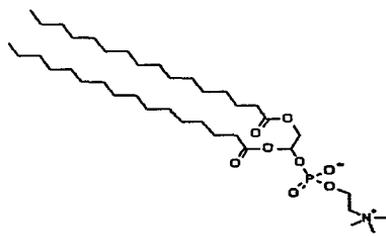
Estearoil/Linoleoil [18:0/18:2]-PC  
(SLPC) 11.22% en PC de Huevo



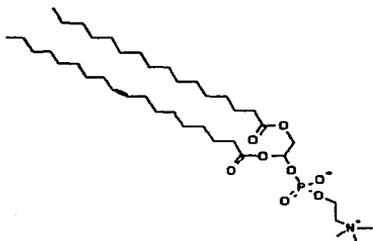
Esteraoil/Oleoil [18:0/18:1]-PC  
(SOPC)



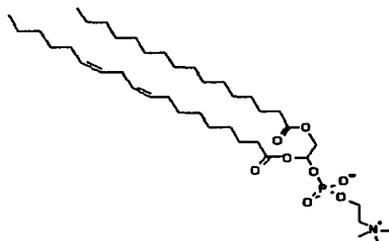
Estearoil/Araquidoil [18:0/20:4]-PC  
(SAPC)



Di-Palmitoil [16:0/16:0]-PC (DPPC)  
0.72% en PC de Huevo



Palmitoil/oleil [16:0/18:1]-PC (POPC)  
38.2% en PC de Huevo



Palmitoil/Linoleoil [16:0/18:2]-PC (PLPC)  
21.8% en PC de Huevo

**Figura 5.** Muestra algunas de las diferentes fosfatidilcolinas que tienen en común la colina como cabeza polar y difieren en las cadenas acílicas.

La formación de agregados lipídicos en agua depende de varios factores como la concentración de fosfolípidos<sup>22</sup>, temperatura<sup>23</sup>, fuerza iónica<sup>24,25</sup> y presencia de otras moléculas. Cuando un fosfolípido es adicionado progresivamente en agua se va disolviendo en el bulto y formando una película entre el agua y el aire, conforme se va adicionando más tensoactivo resulta la formación de agregados, los primeros agregados se forman cuando la concentración es igual a la concentración crítica micelar (CMC) es decir la concentración mínima necesaria para obtener una micela estable<sup>26</sup>

La formación de los liposomas no se da inmediatamente después de agregar los fosfolípidos al medio sino que dadas las características de las cadenas hidrocarbonadas se observan fases de transición conocidas como mesofases dependientes de los cambios de temperatura e hidratación de las moléculas dando lugar a formas termodinámicas más favorables<sup>27</sup>

Las fases comúnmente encontradas en sistemas agua-lípidos son:

### Fase laminar (L)

Las moléculas están ordenadas en dos dimensiones. Esta fase representa el arreglo más común de los fosfolípidos en las membranas biológicas.

### Hexagonal I (H<sub>I</sub>)

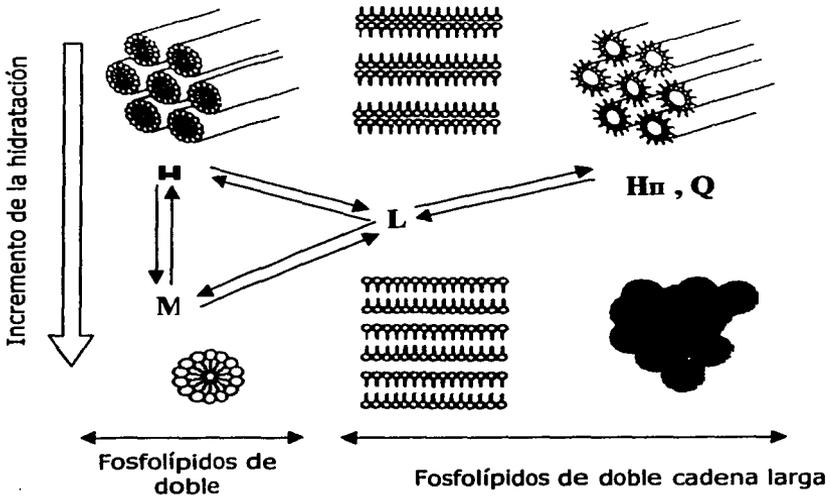
Los fosfolípidos están organizados en forma de cilindros con la cabeza polar hacia fuera (orientada al agua) Estos cilindros presentan un arreglo hexagonal.

### Hexagonal II (H<sub>II</sub>)

En este caso las cadenas alifáticas se encuentran orientadas hacia fuera (orientadas a la fase oleosa) formando cilindros, las cabezas polares están orientadas hacia el centro de la esfera formando una película continua orientada hacia el agua.

Cúbica (Q)

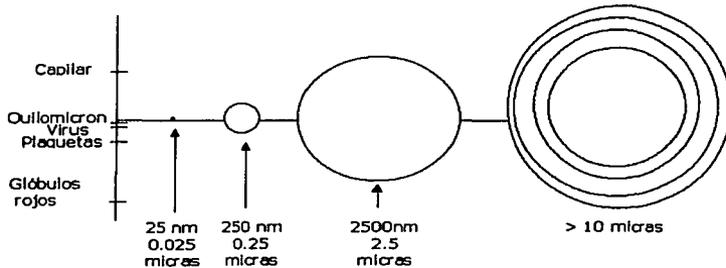
Fase discontinua constituida de micelas esféricas con las cabezas polares formando una película continua orientada hacia fuera (agua).



**Figura 6.** Representación gráfica de las fases encontradas en sistemas agua-lípidos dependientes de los cambios de hidratación.

Además del tipo de agregados los liposomas se clasifican de acuerdo a su tamaño y número de bicapas:

- MLV Vesículas grandes multicapas, > 0.5  $\mu\text{m}$
- OLV Vesículas oligocapas, 0.1-1  $\mu\text{m}$
- UV Vesículas unicapa, cualquier tamaño
- SUV Vesículas unicapa pequeñas, 20-100 nm
- MUV Vesículas unicapa de tamaño medio
- LUV Vesículas unicapa grandes, > 100 nm
- GUV Vesículas unicapa gigantes, > 1  $\mu\text{m}$
- MVV Vesículas multivesiculares, > 1  $\mu\text{m}$



**Figura 7.** Comparación entre de diferentes tamaños de liposomas y estructuras fisiológicas

### 2.3.1.3. *Metabolismo de liposomas*

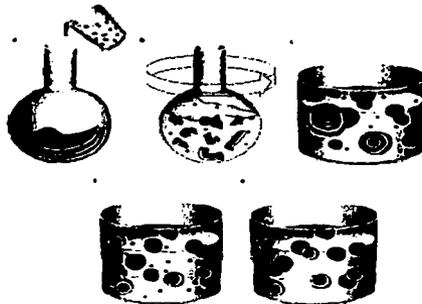
Dependiendo de su tamaño, carga eléctrica y composición, en el plasma sanguíneo los liposomas son atacados por lipoproteínas y opsoninas, y después fagocitados por monocitos y macrófagos, que los conducen a los órganos del sistema reticuloendotelial y a los sitios donde reside la infección.

Los liposomas pueden interactuar con las células de cuatro formas<sup>8</sup> que se mencionan a continuación:

- Endocitosis por células fagocitarias
- Absorción a la superficie celular
- Fusión a la membrana plasmática
- Transferencia de lípidos liposómicos a membranas celulares y viceversa.

#### 2.3.1.4 Técnicas de preparación

En el laboratorio el método más empleado para elaborar liposomas es el conocido como evaporación en fase reversa<sup>28</sup> (Figura 8) que consiste en disolver los fosfolípidos en un disolvente orgánico, después se somete a evaporación total del disolvente formando una película en la pared del recipiente, posteriormente se vierte una disolución acuosa y se agita enérgicamente. Los lípidos se agregan formando vesículas de formas y tamaños variables. Para lograr que se tengan formas y tamaños homogéneos la solución se somete a ultrasonificación garantizando tamaños pequeños y formas uniformes.



**Figura 8.** Método de evaporación en fase inversa

En la actualidad se comercializan películas lipídicas secas<sup>29</sup> de donde se obtienen liposomas al agregar a la película una solución acuosa y se agita enérgicamente.

### **2.3.1.5 Caracterización de liposomas**

En el estudio de liposomas merece la pena estudiar diferentes características que están relacionadas con la liberación del fármaco y sus propiedades de estabilidad física. Así la mayoría de los trabajos de la literatura reportan los siguientes:

- 1) Físicas: Morfología (unilaminar, multilaminar), tamaño de partícula, número de liposomas, homogeneidad de la muestra y carga en la superficie (potencial zeta que se refiere a la carga en la superficie que tienen las partículas y que permite que se desplacen dentro de un campo eléctrico. El valor debe estar por encima de  $\pm 20$  mV para que no se produzca el fenómeno de agregación<sup>30</sup>
- 2) Encapsulación: Porcentaje de fármaco encapsulado dentro del liposoma y reportado como porcentaje de encapsulación. Generalmente se cuantifica la cantidad de fármaco libre y se resta a la cantidad inicial de fármaco.
- 3) Estudios de estabilidad: Verificación del tiempo de agregación y fusión de los liposomas así como su vida media de anaquel.
- 4) Estudios de liberación del fármaco: Difusión en celdas de Franz con membranas sintéticas, animal ó humana.

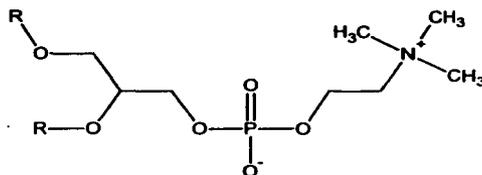
**2.3.1.6 La lecitina y su importancia en los liposomas**

De los fosfolípidos más empleados para la preparación de liposomas se encuentra la fosfatidilcolina ó comúnmente llamada Lecitina. La lecitina es una mezcla de fosfolípidos que tienen en común como cabeza polar a la colina y difieren entre ellos por las cadenas acílicas.

Los ácidos grasos y los porcentajes promedio que se encuentran en la composición de la lecitina de yema de huevo con la que se trabajó en el presente estudio se presenta en la tabla siguiente<sup>20</sup>

| Acido graso                                | Fórmula cadena | Peso molecular | Porcentaje   |
|--|----------------|----------------|--------------|
| Ac. Palmítico                              | C32H62O4       | 733            | 35.5         |
| Ac. Esteárico                              | C36H70O4       | 789            | 13.5         |
| Ac. Oleico                                 | C36H66O4       | 785            | 26.8         |
| Ac. Cis,cis-6,9-octadienoico               | C36H62O4       | 781            | 5.7          |
| Ac. γ-linoléico                            | C36H58O4       | 777            | 0.2          |
| Ac. Araquidonoico                          | C40H62O4       | 829            | 1.0          |
| Ac. All cis-5,8,11,14,17-eicosapentanoico  | C40H58O4       | 825            | 3.6          |
| Ac. All cis-7,10,13,16,19-docasapentanoico | C44H66O4       | 881            | 1.3          |
| Ac. All-4,7,10,13,16,19-docosapentanoico   | C44H62O4       | 877            | 1.26         |
| Peso molecular promedio                    |                |                | 781.66 g/mol |

2.3.1.7 Ficha Técnica de la lecitina de huevo<sup>5,29</sup>



R = cadenas acílicas

|  |   |
|--|---|
| Nombre científico  | (3-sn-fosfatidil)colina<br>1,2-diacil-sn-glicero-3-fosfocolina (IUPAC)<br>Ester diglicérido del ácido colinofosfórico |
| Número CAS   | Fosfatidilcolina (8002-43-5)  |
| Descripción física   | Granular o grasa  |
| Color  | Amarilla  |
| Punto de fusión  | 180°C con descomposición  |
| pH (al 1% en una solución 1% de NaCl)  | 5.5 - 7.5   |
| Rotación específica (al 10% en CHCl <sub>3</sub> :CH <sub>3</sub> OH:H <sub>2</sub> O 65:25:4 v/v/v) | 7°  |
| Soluble en   | Etanol, propilenglicol, tolueno, hexano, éter, cloroformo, éter de petróleo   |
| Ligeramente soluble en   | Acetona y acetato de metilo   |
| Dispersable en   | Agua  |
| Condiciones de almacenamiento  | La lecitina puede almacenarse a temperatura ambiente (max 20°C) en lugares secos bajo una atmósfera de gas inerte.    |

### **2.3.1.8 Aplicaciones de la lecitina**

#### **Administraciones parenterales**

Los liposomas previenen el daño de las membranas en el hígado producido por fármacos o sustancias hepatóxicas, como menciona Werner et al durante el tratamiento con cisplatino en cáncer, este fármaco produce hepatocidad lo cual se disminuye el daño cuando el cisplatino se encuentra encapsulado en liposomas<sup>31</sup>. Los liposomas de lecitina son utilizados en estos casos como sistemas acarreadores de fármacos<sup>32</sup>.

#### **Administraciones orales**

La alta concentración de fosfatidilcolina puede usarse como fuente de colina en el tratamiento de enfermedades con deficiencia de colina.

La lecitina protege a la mucosa gástrica de efectos agresivos de algunos medicamentos, por ejemplo la aparición de úlceras es minimizado con fosfatidilcolina durante el tratamiento de reumatismo<sup>16</sup>

#### **Administración tópica**

La lecitina ha sido empleada en el uso tópico por más de 25 años. Essaven<sup>R</sup> incluye en su formulación lecitina además de eosina y heparina usada en el tratamiento de enfermedades de las venas. Los liposomas a partir de lecitina incrementan la efectividad del econazol en el tratamiento de micosis<sup>33</sup> e incrementa la penetración de fármacos a través de la piel<sup>34</sup>

### **Aplicaciones cosméticas**

Los liposomas aumentan la humedad de la piel<sup>35</sup> y disminuyen el grosor de la piel además de proveer de una fuente de ácidos grasos esenciales.

### **Otras aplicaciones**

Los liposomas a partir de lecitina son apropiados para encapsulación de proteínas que formuladas con enzimas aceleran la fermentación durante la fabricación de queso<sup>36</sup>

También se pueden encapsular proteínas sensibles a la temperatura ya que los fosfolípidos presentan una baja temperatura de transición en medios acuosos<sup>37</sup>

Los liposomas y los fosfolípidos estabilizan a las siguientes sustancias químicas en agua: Vitaminas solubles en lípidos, Aceites y grasas, Aldehídos y cetonas insolubles en agua<sup>38</sup>, Esteroides, Antioxidantes solubles en lípidos.

## **2.4 Estudios de liberación**

Los estudios de difusión in vitro se realizan con la finalidad de evaluar y predecir el nivel de difusión de un fármaco a través de una membrana. Dichos estudios se pueden llevar a cabo utilizando celdas de difusión ya sea con una solución o suspensión del fármaco para determinar la absorción que presentan, además pueden realizarse estudios para otras formas farmacéuticas como geles, cremas, pomadas y parches para estudiar la influencia de los excipientes en la formulación así como seguir cinéticas de liberación para los sistemas de liberación modificada<sup>7</sup>.

### **2.4.1 Celdas de difusión de Franz**

Los diferentes sistemas para determinar el paso de un fármaco a través de una membrana constan de dos compartimentos, uno donador en el cual se aplica la forma farmacéutica, y uno receptor en el cual se cuantifica el fármaco. El sistema entero es homogéneo y es mantenido a una temperatura definida y velocidad de agitación constante. Entre los dos compartimentos se coloca una membrana de diferente naturaleza: animal, humana o sintética, el fármaco es determinado por cuantificación de las muestras obtenidas de la cámara receptora de donde se extrae un volumen conocido de medio y se renueva con medio nuevo con el fin de mantener el contacto entre la membrana y el medio receptor y condiciones Sink (cantidad de soluto en el medio que permite alcanzar una concentración máxima, por lo menos 10 veces por debajo del parámetro de solubilidad). La muestra es protegida de la exposición con el aire y de esta manera prevenir la evaporación y cambios en la composición de la muestra.

Entre los diferentes sistemas descritos, la celda de FRANZ (1978) ha sido empleada en la mayoría de los trabajos publicados y puede considerarse como la celda de referencia como se muestra en la figura 9.

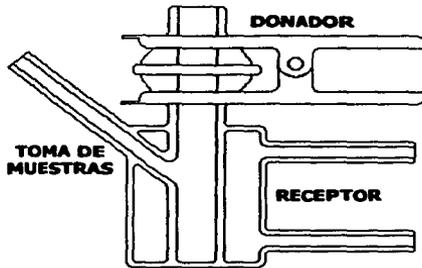


Figura 9. Celda de Difusión de Franz

Muchos parámetros pueden influir en la difusión del fármaco utilizando celdas de Franz, como por ejemplo:

- El compartimiento receptor y especialmente su temperatura y velocidad de agitación.
- El medio receptor. Este es más o menos complejo de acuerdo a la membrana utilizada, por ejemplo cuando se emplean membranas naturales el medio receptor debe de contener todo lo necesario para simular condiciones biológicas, además de poder utilizarse para mantener las condiciones de la membrana.
- El tipo y la naturaleza de la membrana empleada.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo General**

Estudiar los factores fisicoquímicos que influyen en la elaboración de liposomas como sistemas de liberación controlada de Oxitetraciclina

#### **3.2 Objetivos Particulares**

- Elaborar liposomas con oxitetraciclina utilizando el método de evaporación en fase reversa.
  
- Observar como la concentración de sales en el medio influencia en el número, tamaño, potencial zeta y carga de liposomas así como en la velocidad de liberación de la oxitetraciclina.
  
- Estudiar la influencia de la relación oxitetraciclina/fosfatidilcolina en el número, tamaño, potencial zeta, carga de liposomas y en la velocidad de liberación de la oxitetraciclina.
  
- Conocer de liberación de oxitetraciclina empleando celdas de difusión de Franz.
  
- Determinar si los liposomas de oxitetraciclina funcionan como un sistema de liberación controlada.

**4 PARTE EXPERIMENTAL**

**4.1 Reactivos**

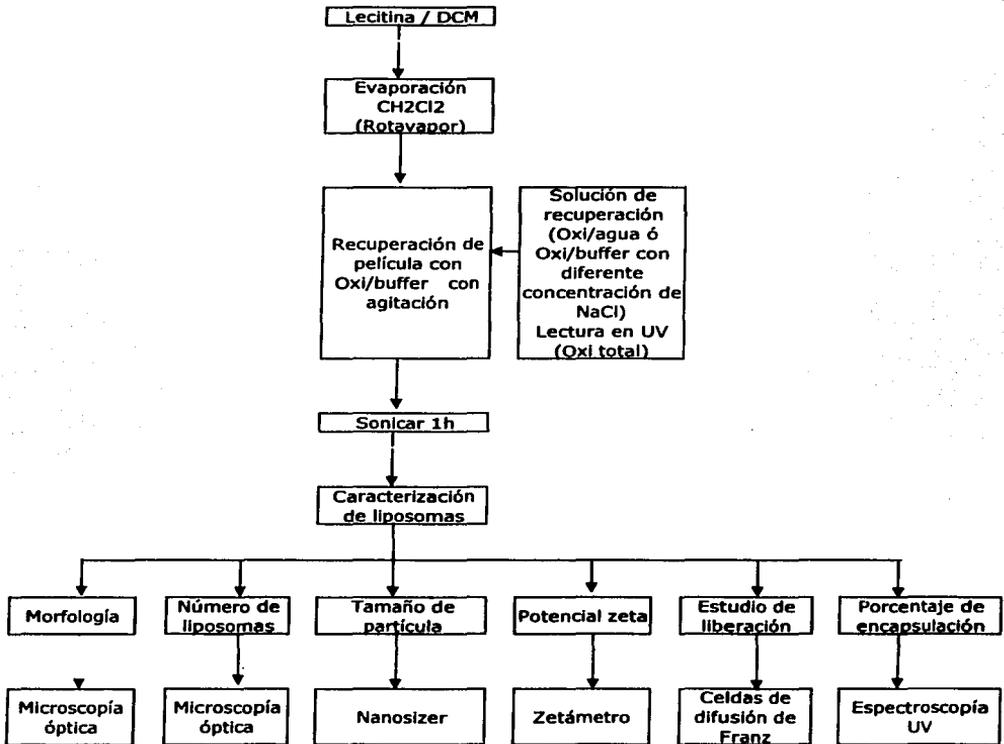
|  |   |
|--|---|
| Lecitina de huevo                                | Aldrich                                   |
| Oxitetraciclina Base BP98<br>Lote 20010811-2     | Donación Laboratorios Aranda S.A. de C.V. |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Grado analítico | Baker                                     |
| NaOH Grado analítico                             | Baker                                     |
| CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> Grado analítico  | Baker                                     |
| NaCl Grado analítico                             | Baker                                     |

**4.2 Material y equipo**

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| Rotavapor                          | Heinbold                                     |
| Nanosizer                          | Malvern Instruments                          |
| Microscopio óptico                 | Olympia                                      |
| Celdas de difusión de Franz (5 mL) | Modificada                                   |
| Espectrofotómetro UV-visible       | Ocean optics                                 |
| Sonicador                          | Cole Palmer 8890                             |
| Ultracentrífuga                    | Beckman                                      |
| Membrana celulosa                  | Spectrapore, spectrum<br>12000-14000 daltons |

### 4.3 Metodología

Para llevar a cabo este trabajo se siguió el siguiente diagrama de flujo:



### 4.3.1 Formación de liposomas

El método empleado para la preparación de los liposomas con oxitetraciclina fue el método de evaporación en fase reversa. El disolvente orgánico que se empleó para la formación de la película de lecitina es Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y la solución de recuperación es fase acuosa con o sin buffer y ajustando la concentración de sales con NaCl.

Para verificar la influencia de la cantidad de fosfolípidos en el tamaño y número de liposomas y su directa contribución en la liberación controlada de oxitetraciclina a partir de este sistema se propusieron las siguiente relaciones molares de oxitetraciclina/lecitina.

|                 | Relación molar |          |          | Disolvente               |
|-----------------|----------------|----------|----------|--------------------------|
|                 | 1:1            | 1:10     | 1:100    |                          |
| Oxitetraciclina | 3.087e-4       | 3.087e-4 | 3.087e-4 | Agua/buffer              |
| Lecitina        | 3.087e-4       | 3.087e-3 | 3.087e-2 | $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ |

Se consideró como 1 de oxitetraciclina  $3.087\text{e-}4$  M porque en estas condiciones experimentales es la cantidad máxima solubilizada del principio activo.

Para la recuperación de la capa lipídica formada en el fondo del matraz se prepararon disoluciones acuosas con diferentes concentraciones de NaCl (0, 0.079, 0.12, 0.15, 0.22, 0.42 y 0.85 M) para observar la influencia de la concentración de sales en la formación de liposomas, porcentaje de encapsulación y en la liberación de la oxitetraciclina.

Se colocó la solución de PC/DCM en un matraz de bola de 1000 mL y se evaporó el disolvente en el rotavapor a 40°C a 90 rpm hasta sequedad.

Se retiró el matraz con la película de lecitina formada en el fondo y se agregó la solución de recuperación agitando durante 10 minutos hasta el desprendimiento de la película.

La suspensión de liposomas en agua se envasó en recipientes de vidrio y se llevaron a sonicar durante 1 h a temperatura ambiente.

### **4.3.2 Caracterización de liposomas**

#### **4.3.2.1 Número de liposomas**

Se tomó una muestra representativa de la suspensión de liposomas, previa agitación, y se observó al microscopio óptico con el objetivo de 40X. Se determinó la cantidad de liposomas contando 50 campos y determinando el promedio por cada muestra.

#### **4.3.2.2 Tamaño de los liposomas y Potencial zeta**

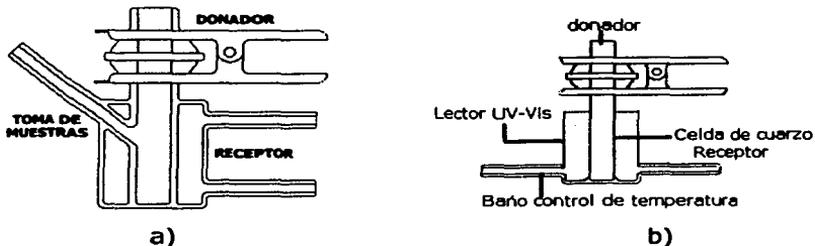
Se empleó el Zetasizer<sup>R</sup>, que muestra la distribución de tamaño de los liposomas en la muestra. En este mismo equipo en la modalidad de potencial zeta se midió la carga de superficie para cada una de las muestras.

#### **4.3.2.3 Carga de los liposomas**

Para verificar la eficiencia de encapsulación de los liposomas se tomó lectura de la solución madre de oxitetraciclina en agua y buffer, respectivamente. Las muestras obtenidas en la recuperación y formación de los liposomas se llevaron a ultracentrifugación a 100000 rpm, primero durante 1 h recuperando el sobrenadante y eliminando el exceso de lecitina y sometiendo nuevamente las muestras a ultracentrifugación (100000 rpm), durante 5 h. Todo esto manteniendo una temperatura constante de 20°C para posteriormente cuantificar la oxitetraciclina por espectrofotometría UV-VIS.

**4.3.2.4 Estudios de liberación controlada de liposomas con oxitetraciclina en celdas de difusión de Franz**

Para este estudio no se emplearon las celdas de difusión comerciales de la celda de Franz (Figura 10, inciso a) sino que se empleó una versión modificada de la celda de difusión de Franz (Figura 10, inciso b), donde la principal diferencia radica en que en la celda comercial de Franz se tiene que tomar una alícuota del medio receptor al tiempo establecido para las condiciones experimentales y recuperar con medio "nuevo" por lo que se debe considerar un factor de dilución en cada una de las medidas además de que la membrana queda por algunos instantes sin el contacto con el medio receptor. La celda de difusión de Franz modificada no requiere de tomar muestras en ningún tiempo ya que se acondicionó de manera que la cámara receptora es una celda de cuarzo que se instala directamente en el equipo de UV-VIS con temperatura controlada dando como ventajas que no se considera ningún tipo de dilución y que la membrana siempre está en contacto con el medio receptor, además de que durante periodos largos de tiempo (8 a 24 horas) el equipo se puede programar de manera que no es necesaria la presencia del operador durante ese tiempo.



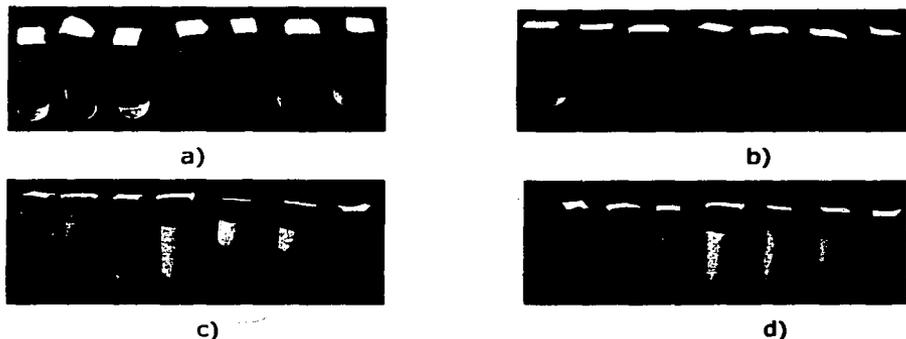
**Figura 10.** a) Celda de difusión de Franz comercial y b) celda de difusión de Franz modificada.

Se consideró como sistema receptor buffer de fosfatos 0.1 M para simular fluido biológico. Se colocó en el espacio interceldas membrana de celofán como medio de difusión. En la cámara superior se colocaron 3 mL de una dispersión de liposomas previamente homogenizado y buffer en la celda receptor manteniendo una temperatura constante de 37°C por un periodo de 24 h. Se tomaron muestras cada 10 minutos y se cuantificó la cantidad de oxitetraciclina por UV-visible.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.1 Aspecto de las dispersiones

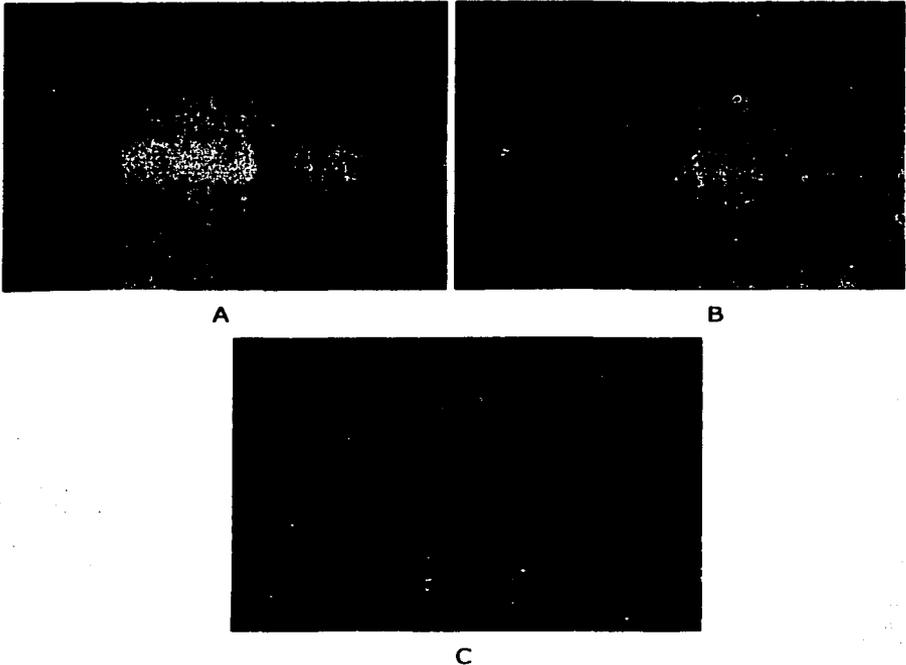
La morfología de los liposomas en general tiende a ser homogénea entre las muestras de cada serie. Para la serie de 1:1 la apariencia física de las muestras es ligeramente turbia sin separación de fases (observación diaria por 15 días) tiempo en el cual no se observaron precipitaciones o separación de fases. El aspecto de las muestras de las series 1:10 y 1:100 es de una suspensión lechosa de color amarillo pálido que a las 24 h se separa en dos fases y es fácilmente resuspendible (Figura 11)



**Figura 11.** En a) se muestra el aspecto de la serie 1:1 en donde se puede apreciar que las muestras son translúcidas y que no hay separación de fases; b) muestra la apariencia de 1:10 después de sonicar durante 1 h. A las 24 horas se apreció una separación de fases donde la fase lipídica fue menor; c) muestra la apariencia para la relación 1:100 donde se observa claramente que después de 24 horas existe la presencia de dos fases pero que es fácilmente resuspendible y de aspecto homogéneo como se aprecia en d).

En el microscopio óptico se observó en general que para las relaciones 1:1 (Figura 12) las muestras presentan un menor número de liposomas y sólo se cuantificaron los que se apreciaban a este aumento. Para el número de

liposomas más pequeños (nm) que no se aprecian por microscopía óptica se corroboró esta tendencia con la distribución de número y tamaño de los resultados obtenidos con el Zetasizer. Para las relaciones 1:10 y 1:100 (Figura 9) se observan las mismas tendencias dentro de la misma relación y la apreciación de muestras al microscopio junto con los resultados del Zetasizer indican la distribución homogénea de tamaños de los liposomas es estas relaciones.



**Figura 12** Microscopía óptica 40X de oxitetraciclina y PC.  
A)1:1, B)1:10 y C)1:100

**5.2 Caracterización de liposomas**

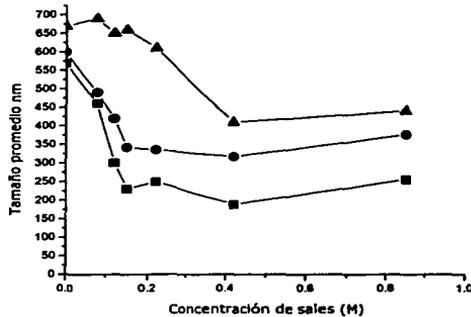
En la tabla 1 se muestran los resultados de la caracterización de los liposomas para cada uno de los sistemas, cabe mencionar que las variables independientes son la relación oxitetraciclina/fosfatidilcolina y la concentración de sales en el medio por lo que las otras cuatro variables (número, tamaño, % encapsulamiento y potencial zeta) son variables dependientes y que sus valores se obtuvieron experimentalmente lo que obviamente lleva a que todas ellas se encuentren estrechamente relacionadas.

|         | Concentración de sales (M) | Número de liposomas | Tamaño promedio (nm) | % encapsulamiento | Potencial Zeta (mV) |
|---------|----------------------------|---------------------|----------------------|-------------------|---------------------|
| A1:1    | 0                          | 10                  | 570                  | 93.72             | -41.4               |
| A1:10   | 0                          | 200                 | 600                  | 93.6              | -42.1               |
| A1:100  | 0                          | 800                 | 670                  | 93.18             | -                   |
| 1B1:1   | 0.079                      | 10                  | 460                  | 25.05             | -12.6               |
| 1B1:10  | 0.079                      | 200                 | 490                  | 36.49             | -34.4               |
| 1B1:100 | 0.079                      | 850                 | 690                  | 29.77             | -69.6               |
| 2B1:1   | 0.12                       | 20                  | 300                  | 20.73             | -8.1                |
| 2B1:10  | 0.12                       | 270                 | 419                  | 24.08             | -30.4               |
| 2B1:100 | 0.12                       | 1500                | 650                  | 23.01             | -62                 |
| 3B1:1   | 0.15                       | 25                  | 230                  | 17.77             | -5.8                |
| 3B1:10  | 0.15                       | 300                 | 342                  | 12.11             | -30.9               |
| 3B1:100 | 0.15                       | 1800                | 660                  | 25.05             | -56.1               |
| 4B1:1   | 0.22                       | 30                  | 249                  | 15.08             | -1.9                |
| 4B1:10  | 0.22                       | 400                 | 335                  | 13.00             | -25.5               |
| 4B1:100 | 0.22                       | 2000                | 610                  | 18.02             | -51.6               |
| 5B1:1   | 0.42                       | 40                  | 189                  | 23.09             | -1.9                |
| 5B1:10  | 0.42                       | 400                 | 317                  | 28.64             | -21.6               |
| 5B1:100 | 0.42                       | 2500                | 410                  | 26.01             | -45.6               |
| 6B1:1   | 0.85                       | 60                  | 255                  | 8.03              | 5.3                 |
| 6B1:10  | 0.85                       | 500                 | 376                  | 5.01              | -13.7               |
| 6B1:100 | 0.85                       | 2500                | 440                  | 10.00             | -45.1               |

**Tabla 1.** Resultados de caracterización de liposomas

### 5.2.1 Tamaño de liposomas

La tendencia para este rubro es que conforme aumenta la relación oxitetraciclina/fosfatidilcolina aumenta el tamaño promedio de los liposomas, es decir, para la relación 1:1 se observan valores de menor magnitud respectó a la relación 1:10 y estos a su vez son menores que 1:100, como se puede apreciar en la figura 13.



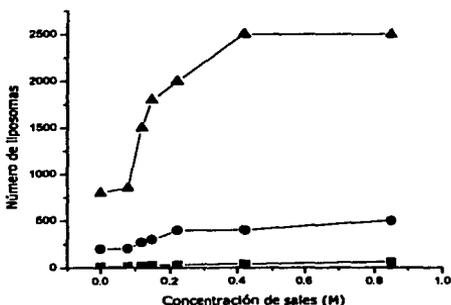
**Figura 13.** Tamaño de los liposomas respecto a la concentración de sales en el medio: ■ ) relación 1:1, ● ) relación 1:10, ▲ ) relación 1:100

Esto se debe a la cantidad de moléculas de fosfatidilcolina y a sus características anfifílicas. Las partes hidrófobas (colas hidrocarbonadas) necesitan exponer la menor superficie de contacto con el agua, lo que se logra cuando una mayor cantidad de fosfolípidos se agregan para formar liposomas de mayor tamaño evitando así que gran cantidad de moléculas en la parte hidrófoba tenga el menor contacto con el agua. Con respecto a la presencia de iones en el medio se observa para una misma relación (1:1, 1:10 y/o 1:100) que conforme aumenta la concentración de sales el tamaño de los liposomas disminuye, lo que se explica si consideramos que al aumentar la cantidad de iones en el medio la estructura del agua se

rompe, favoreciendo el desorden molecular de esta facilitando la formación de agregados de menor tamaño porque en estas condiciones las moléculas de fosfatidilcolina presentan menor repulsión hacia las moléculas del agua, además a mayor tamaño de liposomas menor superficie de contacto.

**5.2.2 Número de liposomas**

Sirviendo el análisis anterior como antecedente para este apartado se observa que al aumentar la concentración de sales en el medio y aumentar el área de contacto de la fosfatidilcolina con el agua la cantidad de fosfolípidos, que sigue siendo la misma dentro de una misma relación, compensa la formación de liposomas de menor tamaño con una mayor cantidad como se aprecia en la figura 14.



**Figura 14.** Número de los liposomas respecto a la concentración de sales en el medio: ■) relación 1:1, ● ) relación 1:10,▲ ) relación 1:100

En esta figura se aprecia que la relación 1:100 es la relación que tiene mayor número de liposomas y que la relación 1:1 es la que tiene menor número de liposomas.

### 5.2.3 Porcentaje de encapsulación

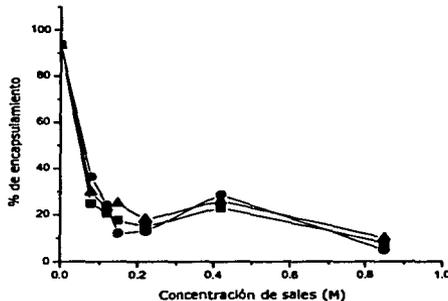


Figura 15. Porcentaje de encapsulación respecto a la concentración de sales en el medio: (■ ) relación 1:1, (● ) relación 1:10, (▲ ) relación 1:100

Para el caso del porcentaje de encapsulación se aprecia que la relación oxitetraciclina/fosfatidilcolina no influencia este valor ya que en los tres casos son muy parecidos entre ellos además de mantener una tendencia casi idéntica (figura 15) debiéndose probablemente a que el volumen total encapsulado no varía entre las relaciones porque en aquellas donde el tamaño de los liposomas disminuyó la cantidad de estos aumentó y viceversa al aumentar el tamaño de los liposomas la cantidad disminuyó. Con respecto a cada una de estas relaciones y su comportamiento al aumentar la concentración de sales en el medio (ruptura de la estructura del agua) la oxitetraciclina, que es poco soluble, presenta mayor afinidad con el agua ya que con la desorganización de esta por la presencia de las sales la oxitetraciclina presenta menor repulsión disminuyendo su necesidad de encapsularse dentro de los liposomas.

5.2.4 Potencial zeta

Para el potencial zeta ( $\varphi$ ) la influencia de la relación entre la oxitetraciclina y la fosfatidilcolina se reflejó en la disminución en los valores de  $\varphi$  ya que a mayor cantidad de grupos fosfatos por mayor concentración de fosfolípidos en el medio (carga negativa de la cabeza polar) al formarse los liposomas la superficie de los liposomas se torna negativa, lo que se ve reflejado por un aumento de valores negativos de  $\varphi$  entre las relaciones de oxitetraciclina y fosfatidilcolina.

Por lo que respecta a la influencia de la concentración de sales, como se puede apreciar en la figura 16 el  $\varphi$  aumentó, volviéndose más positivos, pero después de la concentración de 0.22 M se puede observar que la tendencia del potencial zeta es a mantenerse constante, esto debido muy probablemente a que los iones sodio del medio tiende a atraerse a los grupos fosfatos (superficie negativa del liposoma) pero llega el momento en que no se pega más sodio por efecto estérico, además de que no todos los grupos fosfato se encuentran reflejados en la superficie por la repulsión entre las cargas negativas y por efecto estérico.

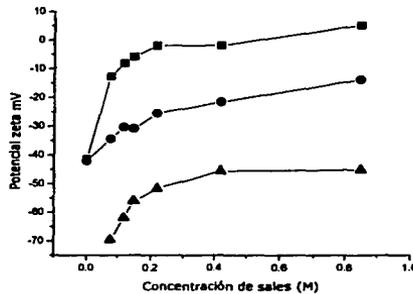
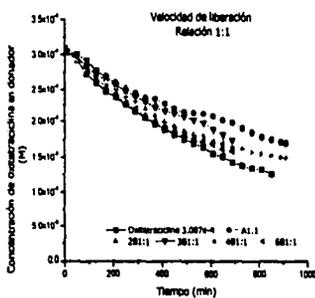


Figura 16. Potencial zeta respecto a la concentración de sales en el medio: (■) relación 1:1, (●) relación 1:10, (▲) relación 1:100

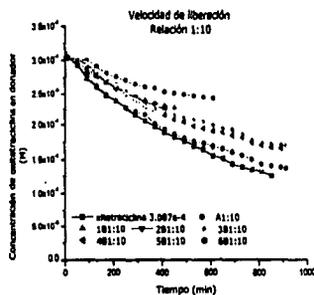
### **5.2.5 Velocidad de liberación**

Con los resultados obtenidos en la celda de difusión de Franz modificada se realizaron gráficas de concentración de oxitetraciclina en donador (M) vs tiempo con la finalidad de observar el cambio en la concentración del compartimiento donador y observar los cambios de concentración conforme al tiempo (figura 17).

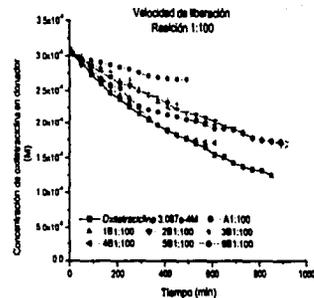
Para cada una de las relaciones se presentan las gráficas de las diferentes concentraciones de cloruro de sodio. Se puede observar que para cada relación oxi/PC (1:1, 1:10 y 1:100) la velocidad de liberación de la oxitetraciclina es lenta para las preparaciones donde la concentración de NaCl es menor y conforme aumenta esta concentración la velocidad de liberación aumenta, pareciéndose el comportamiento al de la oxitetraciclina en disolución (sin liposomas). De los resultados de porcentaje de encapsulamiento se observa que los valores más altos de encapsulación de oxitetraciclina son a 0 y 0.079 M; en estas concentraciones de NaCl la velocidad de liberación es menor con respecto a las demás concentraciones, porque al encontrarse menor cantidad de oxitetraciclina libre (fuera de los liposomas) su difusión es menor, y para que la oxitetraciclina encapsulada (80% aproximadamente) difunda hacia el medio receptor deberá salir del liposoma presentándose un efecto de paso a través doble membrana lo que hace lento el proceso de difusión. Por el contrario para la preparación 0.85 M de NaCl (la de mayor concentración) la velocidad de liberación de oxitetraciclina es muy parecida a la de oxitetraciclina en agua, ya que para esta relación la cantidad de oxitetraciclina fuera de los liposomas es muy alta por lo que la velocidad de liberación del preparado con liposomas es mayor que en el caso de las concentraciones menores.



A



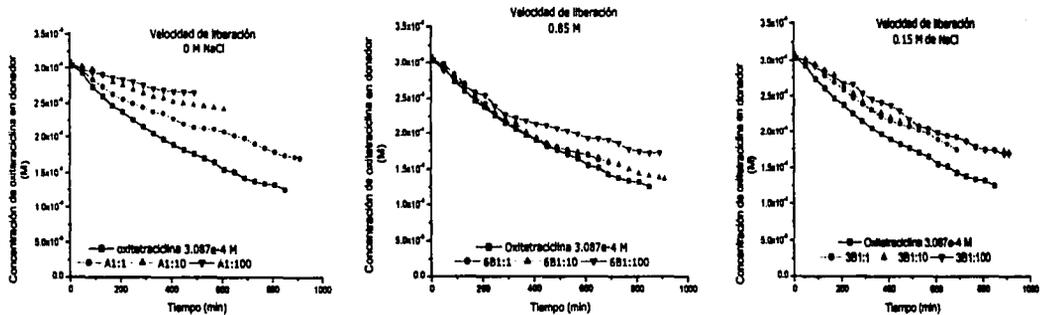
B



C

Figura 17. Gráficas de velocidad de liberación vs tiempo. A) Relación 1:1; B) Relación 1:10 y C) Relación 1:100. En cada una de las gráficas se presenta las ocho diferentes concentraciones de sales.

Para una misma concentración de sal, por ejemplo 0.15M, la velocidad de liberación de la oxitetraciclina es menor para la relación 1:100 oxi/PC, ya que aunque para las tres relaciones el porcentaje de encapsulación es el mismo (aproximadamente 20%) la cantidad de liposomas es mayor para 1:100 presentando mayor dificultad para la difusión de la oxitetraciclina libre que en la relación 1:1 que es la que presenta una velocidad de liberación más lenta ya que al haber menor cantidad de liposomas el paso de la oxitetraciclina libre al medio receptor se ve menos impedida. La misma tendencia se observa en todas las concentraciones de cloruro de sodio (figura 18).



**Figura 18.** Gráficas de velocidad de liberación vs tiempo. A) Concentración 0 M de NaCl; B) Concentración 0.15 M de NaCl y C) Concentración 0.85M de NaCl. En cada una de las gráficas se presentan las tres diferentes relaciones ox/PC.

## **6 CONCLUSIONES**

Los resultados indican que el método de evaporación en fase reversa para elaborar liposomas con oxitetraciclina es adecuado para lograr este fin. Las muestras reflejan una distribución homogénea y reducida distribución de tamaños, por lo que se considera que aplicando un sistema más efectivo para la reducción de tamaño (sonda ultrasónica por ejemplo) se podrán tener liposomas de menor tamaño y facilitar el proceso de esterilización si se propone como posible forma farmacéutica un parenteral.

La concentración de sales afecta a la formación de liposomas ya que conforme aumenta la concentración aumenta el número de liposomas y disminuyen el tamaño de liposomas, porcentaje de encapsulamiento y así como también el potencial zeta.

La relación oxitetraciclina/fosfatidilcolina da cambios importantes en el estudio de potencial zeta, tamaño y número de liposomas aunque no así para la eficiencia de encapsulamiento donde el fármaco queda atrapado en iguales porcentajes independientemente de la relación oxitetraciclina/fosfatidilcolina. Cabe mencionar que por apariencia se preferiría las que necesitan menor esfuerzo para su resuspensión que para este caso son los de la relación 1:1 que además son de apariencia menos grasa y no presenta separación de fases.

Los estudios de liberación de oxitetraciclina a partir de liposomas muestran que los liposomas funcionan como sistema de liberación controlada y que se puede reducir la velocidad de liberación de la oxitetraciclina desde liposomas alrededor de 10 veces con respecto a la solución de oxitetraciclina libre.

Las perspectivas del presente trabajo consisten en desarrollar una formulación conteniendo liposomas de oxitetraciclina teniendo en cuenta las variables que en este estudio se encontró tienen influencia en la formación de liposomas como son relación oxitetraciclina/fosfatidilcolina y concentración de sales; además de realizar estudios previos con mezclas de fosfolípidos y demás excipientes de la formulación para determinar como afectan estos factores a la elaboración de los liposomas y a la estabilidad.

**7 BILIOGRAFIA**

1. Stokstad, E. & Jukes, T. Further observations on the animal protein factor. *Proc Soc Biol Med* **73**, 523-528 (1950).
2. Ortega E., Arellano G. & Morales , M. Empleo de antibióticos en alimentos para animales y sus consecuencias sobre la salud pública. *Revista de Investigación Clínica* **40**, 423-432 (1988).
3. Díez P., C. V. Empleo de antibióticos en veterinaria. *Revista Española de Quimioterapia* **10** (1997).
4. Goodman & Gilman. *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (Interamericana M.G.H., México, 1996).
5. Merck Index Co. Inc. *The Merck Index* (Rahway,, USA, 2001).
6. Naranjo, F. G. *Prontuario de Especialidades Veterinarias-PLM* (Ediciones PLM S.A. de C.V.,, México, 1996).
7. Weiner, A. *Encyclopedia of pharmaceutical technology* (Marcel Dekker Inc, USA, 2002).
8. Remington. *Farmacía* (Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires Argentina,, 1998).
9. Asseraf, P. Drug Delivery Using Liposomes. *Gazette Medicale* **97**, 11-15 (1990).
10. Shalaev E. Phase diagram of 1,2-dioleoylphosphatidylketthanolamine (DOPE): water systems at subzero temperatures and a low waters contents. *Biochimica et Biophysica Acta* **1419**, 229-247 (1999).
11. Gupta, C. M., Bali, A. & Dhawan, S. Modification of Phospholipid Structure Results in Greater Stability of Liposomes in Serum. *Biochimica Et Biophysica Acta* **648**, 192-198 (1981).
12. Allen, T. M. & Everest, J. M. Effect of Liposome Size and Drug Release Properties on Pharmacokinetics of Encapsulated Drug in Rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **226**, 539-544 (1983).

13. Taylor, K. M. G., Taylor, G., Kellaway, I. W. & Stevens, J. Drug Entrapment and Release from Multilamellar and Reverse- Phase Evaporation Liposomes. *International Journal of Pharmaceutics Univ Coll Cardiff, Welsh Sch Pharm, Cardiff Cf1 1xl, S Glam, Wales* **58**, 49-55 (1990).
14. Carrion, F. J., Delamaza, A. & Parra, J. L. The Influence of Ionic-Strength and Lipid Bilayer Charge on the Stability of Liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science Terrassa, C Colon* **15**, E-08222 Tarrassa, Spain Csic, Ctr Invest & Desarrollo, Dept Tensioact, E-08034 Barcelona, Spain **164**, 78-87 (1994).
15. Zahirul M., K. I. Recent trends and progress in sustained or controlled oral delivery of some water soluble drugs: morphine salts, diltiazem and captopril. *Drug Dev Ind Pharm* **21**, 1037-1070 (1995).
16. Leyck S. & Dereu N. Improvement of the gastric tolerance of non-steroidal antiinflammatory drugs by polyene phosphatidylcholine (Phospholipon R100). *Eur. J. Pharmacolo* **117**, 35-42 (1985).
17. Paavola A., K. Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. *International Journal of Pharmaceutics* **199**, 85-93 (2000).
18. Bali, A., Dhawan, S. & Gupta, C. M. Stability of Liposomes in Circulation Is Markedly Enhanced by Structural Modification of Their Phospholipid Component. *Febs Letters* **154**, 373-377 (1983).
19. Farrel S., S. K. Controlled release of liposomes. *Journal of membrane science* **127**, 223-227 (1997).
20. New RRC. *Liposomes: a practical approach* (ed. Press, I.) (England, 1990).
21. Colley, C. M. & Ryman, B. E. Liposome - from Membrane Model to Therapeutic Agent. *Trends in Biochemical Sciences* *8rf, England* **1**, 203-205 (1976).

22. De la Maza A. & Parra J. Permeability changes in the phospholipid bilayer caused by noionic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* **148**, 310-316 (1992).
23. Cohen, B. E. Effect of Temperature on Non-Electrolyte Liposome Permeability. *Acta Cientifica Venezolana Celular, Caracas, Venezuela* **25**, 119-119 (1974).
24. Allen Z, P. J. Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions. Part 1: Lipid hydrolysis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **50**, 357-364 (2000).
25. Lerebours, B., Wehrli, E. & Hauser, H. Thermodynamic Stability and Osmotic Sensitivity of Small Unilamellar Phosphatidylcholine Vesicles. *Biochimica Et Biophysica Acta Lab, Ch-8092 Zurich, Switzerland Swiss Fed Inst Technol, Inst Zellbiol, Elektronenmikroskopie Lab, Ch-8092 Zurich, Switzerland* **1152**, 49-60 (1993).
26. Takeo M. *Disperse Systems* (ed. Wiley-VCH) (Germany, 1999).
27. CECV G. *Phospholipids handbook* (Merzel Dekker, USA, 1995).
28. Gunstone F., P. F. *Lipid Technologies and applications* (USA, 1997).
29. American Lechitin Co. in *Oxford*, (USA, 2000).
30. Hunter Robert. *Zeta potencial in colloid science* (ed. Francisco, S.) (Academic Press,, USA, 1981).
31. Werner, C. & Wendel A. Hepatic uptake and antihepatotoxic proprieties of vitamin E and liposomes in the mouse. *Chem Biol Interactions* **75**, 83-92 (1990).
32. Reszka, R., Fichtner, I., Nissen, E., Arndt, D. & Ladhoff, A. M. Preparation, Characterization, Therapeutic Efficacy and Toxicity of Liposomes, Containing the Antitumor Drug Cis-Dichlorodiamineplatinum(II). *Journal of Microencapsulation Berlin, Ger Dem Rep* **4**, 201-212 (1987).

33. Foldvári, M. & Gesztes, A. Dermal drug delivery by liposome encapsulation: clinical and electron microscopic studies. *J. Microencapsulation* **7**, 479-489 (1990).
34. Schaeffer, H. E. & Krohn, D. L. Liposomes in Topical Drug Delivery. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **22**, 220-227 (1982).
35. Cano Zepeda Araceli. in *FES Cuautitlán* (UNAM, 1995).
36. Kirby C., B. B. Accelerated ripening of cheese using liposomes-encapsulated enzyme. *International Journal Food Science Technology* **22**, 355-375 (1987).
37. Storm G., C. J. A. Liposomes: quo vadis? *PSTT* **1**, 19-31 (1998).
38. Juszyuski M., A. R. Perfumes loaded liposomes. *SÖFW* **117**, 259-262 (1991).