

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS DE DELTAMETRINA.  
INFLUENCIA DE DIFERENTES ESTEROLES SOBRES SUS  
CARACTERÍSTICAS**

***T E S I S***

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

***QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA***

P R E S E N T A

**Mónica Griselda Mézquita Alcocer**

**México D.F.**

**2009**

Jurado asignado:

Presidente: Norma Trinidad González Monzón

Vocal: María del Socorro Alpizar Ramos

Secretario: María Josefa Bernad Bernad

1er. Suplente: Joaquín González Robledo

2º. Suplente: Iván Alejandro Franco Morales

Este trabajo se desarrolló en el laboratorio Anexo 1 E/F de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesora

Dra. María Josefa Bernad Bernad

Supervisor técnico

Q.F.B. María Antonieta Alvaréz Polo

Sustentante

Mónica Griselda Mézquita Alcocer

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas y acunarme entre sus muros, permitiéndome forjar los cimientos de lo que ahora soy.

A la Facultad De Química por todo lo aprendido en sus aulas y por todo aquello vivido fuera de ellas

A mi asesora, la Dra. Ma. Josefa Bernad Bernad por permitirme compartir esta experiencia contigo, gracias por tu paciencia, dedicación y amistad.

A las Profesoras Norma Trinidad González Monzón y a la María del Socorro Alpizar Ramos por su ayuda en la revisión de esta tesis.

A todos mis profesores ya que cada uno ha contribuido en la formación de la profesionista que ahora soy.

Gracias a la USAI por facilitarme sus equipos

A Dios por todo lo que me ha dado y enseñado a través de todas sus formas y lenguajes.

## **Dedicatorias**

A mis Padres José Antonio y Olga por su cariño, apoyo, comprensión pero sobre todo por su paciencia, gracias por el inmenso amor con el que llenan mi vida día con día, sin ustedes no sería lo que soy y no tendría nada de lo que tengo, esta tesis es también un logro de ustedes.

A mi hermana Mirza, por ser mi guía en este camino llamado vida, eres una gran persona, amiga y compañera, gracias por dejarme volar pero siempre tendiéndome la mano, te quiero mucho.

A toda mi familia en general por su cariño.

A Edith, por ser una gran amiga, por apoyarme siempre tanto en las aulas como fuera de ellas.

A Armando por mostrarme otra perspectiva de la vida y enseñarme a vivir de una forma diferente, no tengo palabras para expresar lo que significas para mí, gracias.

A las chicas, Adriana, Ingrid y Lourdes, que a su manera me han adoptado como parte de la familia, gracias por dejarme aprender de ustedes.

A Oswaldo, porque eres un gran amigo, una gran persona, no tengo palabras para agradecerte todo lo que me has brindado.

A todos los Finitos, ha sido grandioso conocerlos y compartir con ustedes este tiempo.

A todos mis amigos durante la carrera por su apoyo y camaradería, gracias

“Es un orgullo ser de sangre azul y de piel dorada”

## INDICE

<b>INDICE</b>	<b>1</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>6</b>
2.1. Enfermedades Parasitarias	7
2.1.1 Principales parasitosis del ganado vacuno	9
2.1.1.1 Ectoparasitosis	10
2.1.1.1.1 Enfermedades parasitarias producidas por garrapatas	10
2.1.1.1.2 Enfermedades parasitarias producidas por Piojos	13
2.1.1.1.3 Sarnas	13
2.2. Garrapata	14
2.2.1 Importancia de la garrapata en la ganadería	14
2.2.2 El ciclo biológico de las garrapatas	15
2.2.3. Adaptabilidad ecológica	17
2.3 Piretroides	18
2.3.1 Piretroides que no contienen un grupo alfa-ciano (aletrina, d-fenotrina, permetrina, tetrametrina, cismetrina y bioresmetrina) (Tipo I: T-síndrome)	19
2.3.2 Piretroides que contienen el grupo alfa-ciano sobre el 3-fenoxibencil alcohol (deltametrina, cipermetrina, fenvalerato y fenpropanato) (Tipo II: CS-síndrome)	20
2.3.3 Deltametrina	20
2.3.3.1 Identidad, propiedades físicas y químicas	20
2.3.3.2 Producción y empleo	21
2.3.3.3 Ingestión, metabolismo y excreción	22
2.3.3.4 Efectos en los seres humanos	23
2.4 Sistemas de liberación	23
2.4.1 Definición y aplicación	23
2.4.2 Consideraciones para el desarrollo de un sistema de liberación modificada	25
2.4.3 Clasificación de los mecanismos de liberación	27

2.5.Liposomas	36
2.5.1 Definición de liposomas	36
2.5.2 Composición y clasificación	38
2.5.3 Metabolismo de liposomas	40
2.5.4 La lecitina, los esteroides y su importancia en los liposomas	41
2.5.5 Técnicas de preparación	43
2.5.6 Caracterización de liposomas	44
2.5.6.1 Microscopía Óptica	45
2.5.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	45
2.5.6.3 Tamaño de partícula ( $\phi$ )	46
2.5.6.4 Potencial Z ( $\zeta$ )	46
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>48</b>
3.1. Objetivo General	48
3.2. Objetivos Particulares	48
<b>IV. Parte Experimental</b>	<b>49</b>
4.1. Reactivos	49
4.2. Equipos e Instrumentos	50
4.3. Metodología	51
4.3.1 Formación de liposomas	51
4.3.2. Formación de Liposomas	54
4.3.3. Caracterización de los liposomas	55
4.3.3.1 Microscopía Óptica	55
4.3.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)	55
4.3.3.3 Tamaño ( $\phi$ ) y potencial Z ( $\zeta$ )	56
<b>V. Resultados y Análisis de resultados</b>	<b>57</b>
5.1 Aspecto de las dispersiones	57
5.2 Microscopía Óptica	58
5.3 Microscopía electrónica	60
5.4 Tamaño de Partícula ( $\phi$ )	63
5.5 Potencial Z ( $\zeta$ )	66
<b>VI. CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>74</b>

## I. INTRODUCCIÓN.

Desde que el hombre comenzó a criar animales para su beneficio surgió también la preocupación por la salud de los mismos. Las enfermedades parasitarias fueron y son un azote para las producciones ganaderas. Éstas patologías están adquiriendo progresivamente una gran importancia por su efecto directo sobre la sanidad global del animal<sup>[1]</sup>, debido al contacto muy estrecho y constante de los animales, lo que favorece el contagio y diseminación de las enfermedades. La garrapata sigue siendo hasta la fecha una de las plagas que provoca grandes pérdidas a la ganadería en México. Si no se realiza un tratamiento adecuado a tiempo, estas enfermedades pueden tender a la cronicidad, con el coste económico que puede suponer a nivel de la explotación<sup>[1]</sup>.

Como consecuencia, estos parásitos han desarrollado resistencia principalmente a los compuestos organofosforados y amidinas, entre otros, aumentando con esto la complejidad en el control.

Las diferentes acciones del parásito sobre el hospedador (expoliatriz, traumática, irritativa, tóxica, antigénica etc.) repercuten negativamente en las producciones del animal afectado. En la acción expoliatriz, el parásito sustrae sustancias nutritivas que ahectoparásitos y endoparásitos son responsables de ejercer, entre otras, una acción traumática por su localización a nivel de las diferentes porciones del intestino, a nivel de los vasos sanguíneos, linfáticos entre otros órganos.<sup>[1]</sup>

Sus efectos no sólo se derivan de su acción como parásitos en sí, sino de su capacidad de transmitir a sus hospederos importantes enfermedades causadas por diferentes agentes como: virus, protozoarios, bacterias y rickettsias. Lo anterior, resulta en pérdidas de producción y productividad, además de contaminación de alimentos para el consumo humano<sup>[2]</sup>.

Al manejarse un gran número de animales la administración de fármacos, sobre todo cuando se hace individualmente es difícil y tardado adicionalmente los tratamientos

son con dosis diaria, para el caso de la deltametrina el tratamiento de los animales es en baños quincenales. Por lo que surge una pregunta: ¿Cómo reducir la frecuencia de administraciones y mantener las concentraciones terapéuticas de la deltametrina en los animales?<sup>[2]</sup>

Debido a lo anterior surge la propuesta de una formulación de liberación modificada. Las formas farmacéuticas de liberación modificada modifican la velocidad y el sitio de liberación del principio activo respecto a las formas farmacéuticas de liberación inmediata con el mismo principio activo, teniendo como objetivo la reducción en la frecuencia de administración para mejorar el cumplimiento terapéutico.

En la actualidad uno de los sistemas más utilizados para modificar la liberación de los principios activos son los *sistemas de encapsulación*: los liposomas son vesículas selladas, concéntricas cuyas paredes están formadas por una bicapa lipídica, generalmente fosfolípidos y que encierran como mínimo un compartimento interior acuoso. Pueden tener un diámetro en el orden de los nanómetros ó los micrómetros. Los fosfolípidos usados generalmente son: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, esfingomiélin, diesteoilfosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina u otros lípidos como el colesterol y el  $\beta$ -sitosterol. Con el objetivo de incrementar la eficiencia de encapsulación y estabilidad se han diseñado liposomas con modificaciones en la carga superficial. Con la adición de estearilamida se obtienen liposomas con carga positiva y fosfatidilserina, ácido fosfatídico o diacetilfosfato para carga negativa. Otro parámetro importante es la temperatura de transición de los fosfolípidos, determinado por su composición de ácidos grasos, lo que influye en la permeabilidad de los liposomas y en su forma de interactuar con la célula. También se han diseñado liposomas de forma tal que pueden dirigirlos hacia determinados órganos. En estos se encuentran los llamados liposomas sensibles al pH y a la temperatura. Los liposomas pueden ser clasificados atendiendo al número de lamelas: vesículas multilamelares (MLV), formados por un compartimento acuoso central y varios interlamelares así como un número variable de bicapas, con un tamaño de partícula de 400 - 350 nm; vesículas unilamelares, formadas por una bicapa que engloba un solo compartimento acuoso, con un diámetro entre 20-50 nm



las SUV (pequeñas vesículas unilamelares, por sus siglas en inglés) y entre 50 - 250 nm las LUV (grandes vesículas unilamelares, por sus siglas en inglés). Existen diferentes técnicas para obtener un liposoma, la mayoría se fundamentan en la *encapsulación pasiva*, lo que se sustenta en la capacidad de los liposomas de englobar un determinado volumen acuoso y solutos en el contenido, durante el proceso de formación<sup>[3]</sup>.

Una vez que se haya logrado la encapsulación del activo, esta debe interactuar con la célula para liberarse posteriormente al citosol o a la membrana plasmática. Estas interacciones pueden ser por: adsorción, fusión, transferencia lipídica o por contacto entre el liposoma y la célula. Luego la liberación es rápida, por lo que se habla solamente de un efecto retraso de la biodisponibilidad del activo<sup>[3]</sup>.

La biodistribución de los liposomas está relacionada con el tiempo de vida media que permanecen en circulación sanguínea, en general son fagocitados por los macrófagos. Se acumulan fundamentalmente en bazo, hígado y médula ósea y pueden interactuar con compuestos citosólicos<sup>[3]</sup>.

La propuesta para resolver este problema, es empleando los avances hasta ahora alcanzados por la Tecnología Farmacéutica, como es la implementación de un sistema de liberación modificada, en donde la liberación de la deltametrina a partir de la forma farmacéutica permitirá una prolongación del tiempo de liberación del fármaco y será controlado para seguir una cinética preestablecida.

---

---

## **II. ANTECEDENTES.**

### **Antiparasitarios en veterinaria.**

En los sistemas de producción ganadera del mundo, las afecciones parasitarias son consideradas como causa importante de pérdidas en la productividad ganadera, debido a daños tales como: morbilidad y mortalidad de los animales, reducción de los niveles de producción y productividad, alteraciones reproductivas y altos costos del control, entre otros. Los últimos treinta años se han caracterizado por el desarrollo y aplicación en distintas áreas ecológicas del mundo, de numerosas estrategias de control de endo y ectoparásitos que afectan la producción animal. La mayoría de ellas mostraron ser altamente eficaces, prácticas y económicas para el control de parásitos, (antihelmínticos, acaricidas, insecticidas). Casi sin excepción y en la medida que los antiparasitarios fueron perdiendo eficacia, esto como consecuencia de la resistencia desarrollada por los parásitos, estas estrategias se hicieron menos rentables, comprometiendo en algunos casos, el propio sustento del sistema productivo.<sup>[4]</sup>

Esta resistencia de las poblaciones parasitarias se ha desarrollado en un marco mundial de profundas transformaciones políticas, sociales y económicas que, sin duda, modificaron la actitud del productor agropecuario ante la problemática del control parasitario. Resulta fácil instaurar una estrategia de control cuando la economía de un país o región se encuentra en apogeo, los fármacos son eficaces y el productor se encuentra dispuesto a colaborar. La situación cambia radicalmente, cuando la empresa agropecuaria presenta problemas de financiamiento y el productor debe enfrentar otras prioridades, como es el caso de nuestro país.<sup>[4]</sup>

La disponibilidad futura de nuevos antiparasitarios en nuevas formulaciones ó nuevas formas farmacéuticas de éstos, no sólo se encuentra comprometida por el progresivo aumento de los casos de resistencia y los crecientes costos de investigación y desarrollo, sino también por una cierta falta de conocimiento y competencia para el descubrimiento de nuevos fármacos y/o formas farmacéuticas. Además, el "elevado umbral" que significó el descubrimiento y desarrollo de fármacos endectocidas por sus características de espectro y potencia, ha complicado las posibilidades para que la industria farmacéutica pueda desarrollar a corto plazo alguna molécula "superior", que justifique una inversión en

investigación y desarrollo. Es por lo anterior la búsqueda de nuevas formulaciones con moléculas ya existentes. Es así como se ha indicado que dado el alto costo y bajo retorno de la investigación y desarrollo de parasiticidas, en el futuro se requerirá de nuevos enfoques en el proceso de descubrimiento de fármacos y de formulación de las ya existentes, lo que implicará un mayor componente de investigación básica y tal vez, mayores costos.

El escenario de principios de siglo XXI se caracteriza además por la crisis económica del sector agropecuario, por mercados cada vez más regionalizados, competitivos y exigentes. En este marco económico productivo, si no ocurre un cambio drástico en el enfoque de control, cabe esperar un aumento progresivo de casos de resistencia múltiple en distintas especies/géneros de endo y ectoparásitos junto a la posibilidad de crear desequilibrios ecológicos y ocasionar la presencia de residuos de pesticidas en carne, leche y lana.

El reto radica en encontrar estrategias de control que permitan una combinación del uso prudente y racional de los antiparasitarios disponibles, así como estrategias de control no químicas, que aseguren mantener las poblaciones parasitarias por debajo de su umbral económico, que no produzcan residuos en carne y leche y que tengan un mínimo impacto ambiental.

## **2.1 Enfermedades Parasitarias.**

Cuando se habla de “parasitosis” esto representa un capítulo fundamental dentro de la salud ganadera, pues provocan esencialmente afecciones de la piel, tejidos adyacentes y anexos, que además de dar lugar a cuadros clínicos que en algunos casos llegan a la muerte del animal provocando pérdidas de carne, lo cual se ve reflejado en una disminución de los rendimientos productivos. Sin entrar en definiciones estrictas podemos decir que un parásito se trata de un organismo más pequeño que vive dentro o sobre otro organismo más grande y a sus expensas. Este organismo más grande es el hospedador, o sea es el organismo que hospeda al parásito y los hay de diferentes tipos<sup>[4]</sup>.

Cuando el parásito vive en continua e íntima asociación con el hospedador, depende metabólicamente del mismo y lo perjudica en mayor o menor grado, causándole un daño

en su salud, pudiendo llevarlo a la muerte, afectando en forma directa la economía de la producción.

En animales de cría, los parásitos debilitan al animal, retrasan su crecimiento y producción, además de traer todo tipo de perjuicios, que parecen difíciles de manejar y como toda enfermedad si no es atacada a tiempo, puede terminar en la afección muy perjudicial para la salud de la población de ganado.

### **CLASIFICACIÓN ELEMENTAL**

Los grupos de parásitos son diversos, siendo en su gran mayoría invertebrados, cestodos (tenias), trematodos, nematodos (gusanos cilíndricos), insectos (moscas, mosquitos, piojos), arácnidos (ácaros de la sarna, garrapata).

Protozoarios unicelulares		tripanosoma, coccidios, babesia	
Metazoarios Pluricelulares	Helmintos o Vermes	Chatos	Cestodes (tenias)
		Acantocéfalos	
		Cilíndricos	Nematodos
	Artrópodos	Insectos	Moscas, mosquitos, piojos
		Arácnidos	Ácaros, garrapatas

**Tabla 1. Clasificación de algunos parásitos<sup>[5]</sup>**

Dichos grupos de parásitos actúan sobre el animal hospedador por diferentes mecanismos de acción, llegando a causar en el animal un mismo perjuicio pero de diversas formas. Por ejemplo pérdida de la ganancia diaria de peso causada por diarrea crónica o por irritación y/o estrés prolongado e intenso.

### **ACCIÓN PATÓGENA DE LOS PARÁSITOS**

La acción patógena que los parásitos ejercen sobre sus hospedadores puede ser:

1) **Mecánica:** es la acción que ejerce el parásito por su mera presencia al ocupar espacios, por ejemplo: el intestino, u otras cavidades, pueden obstruirse por la presencia en su luz de nematodos de tamaño considerable<sup>[5]</sup>.

2) **Expoliatriz:** es la acción que ejerce el parásito al alimentarse a expensas del hospedador. Hay grados de expoliación<sup>[5]</sup>:

a) El parásito puede consumir los alimentos del hospedador incluidos sus desechos.

b) El parásito puede consumir la sangre del hospedador (parásito hematófago).

3) **Traumática:** es la acción que ejerce el parásito al lesionar los tejidos del hospedador (parásito histiófago)<sup>[5]</sup>.

4) **Tóxica:** acción producida por la liberación de ciertos metabolitos del parásito que al ser absorbidos producen daños celulares<sup>[5]</sup>.

5) **Trasmisión de enfermedades:** los parásitos son capaces de transmitir otros parásitos, bacterias, virus o rickettsias<sup>[5]</sup>.

## **ECTO Y ENDO PARÁSITOS**

Los **ectoparásitos** viven en el exterior de sus hospedadores, adheridos a la piel, plumas, branquias, etc. Ellos son por ejemplo los ácaros de la sarna, las garrapatas, las pulgas y los piojos<sup>[5]</sup>.

Los **endoparásitos** viven en el interior de sus hospedadores (intestino, pulmones, riñones, etc.), y son por ejemplo los nematodos gastrointestinales, pulmonares o renales respectivamente<sup>[5]</sup>.

### **2.1.1 Principales parasitosis del ganado vacuno.**

Dependiendo del sistema de explotación, tienen más importancia unas parasitosis que otras. Por ejemplo, en los sistemas intensivos algunas infecciones sólo se presentan de forma esporádica debido a las escasas oportunidades que tienen los animales de

contagiarse, pero otros procesos son más prevalentes precisamente en los animales mantenidos de esa forma. No obstante, otras enfermedades parasitarias, no guardan una relación demasiado estrecha con el tipo de producción de la explotación. A su vez los ectoparásitos y endoparásitos son responsables de ejercer una acción traumática por su localización entre otros órganos a nivel de porciones intestinales, a nivel de los vasos sanguíneos, linfáticos, etc. Estos traumatismos posibilitan la entrada de gérmenes diversos, dando aparición de infecciones secundarias, que pueden ser más graves que la parasitosis inicial<sup>[1, 4]</sup>.

A continuación se expone un grupo de enfermedades catalogadas como ectoparasitosis las cuales son causadas por ectoparásitos y el tratamiento que se tiene actualmente para cada una de ellas.

### **2.1.1.1 Ectoparasitosis.**

Dentro de este grupo se engloban las enfermedades parasitarias que se transmiten a través de vectores externos (garrapatas, piojos, sarnas, entre otras).

#### **2.1.1.1.1 Enfermedades parasitarias producidas por garrapatas.**

Son infestaciones causadas básicamente por garrapatas de la familia ixodidae y de la familia Argasidae que realizan una acción traumática sobre el hospedador alimentándose de líquidos tisulares y de sangre. Se desarrollan en épocas del año con temperaturas altas (primavera-verano). La humedad al igual que la temperatura son factores que determinan el desarrollo del parásito<sup>[1]</sup>.

Un tratamiento adecuado y ampliamente utilizado consiste en bañar a los animales con productos organofosforados o a base de piretroides (deltametrina). El tratamiento con inyecciones de avermectinas subcutáneas al 1% también ha demostrado su efectividad<sup>[1]</sup>.

En el caso particular de la deltametrina el método de tratamiento de mayor difusión es el de baño de inmersión, ya que se logra que el animal se moje totalmente y así el se pone en contacto con los distintos estadios evolutivos de la garrapata. El ganado trae consigo

las neo-larvas fijadas en su cuerpo las cuales fueron colectadas en los potreros y las llevan al baño las cuales allí mueren. Para lograr la "limpieza del ganado" es necesario repetir el baño a intervalos regulares (21 días) durante por lo menos 9 meses, ya que cualquier descuido que permitiera la evolución de una sola teleogina, ésta reinfestará el campo con sus aproximadamente 3.500 huevos y todo el esfuerzo, lamentablemente resultará nulo. Es necesario recordar que un buen manejo y control del bañadero son los factores que aseguran óptimos resultados en un baño<sup>[6]</sup>.

Algunas recomendaciones de los baños son: No bañar en horas de intenso calor o frío, ni cuando el animal está muy cansado o sediento. Los animales encerrados por la tarde deberán bañarse a la mañana del día siguiente; en su defecto, sí el encierre es por la mañana, podrán bañarse a la tarde. No efectuar baño cuando hay mucho barro en los corrales. No bañar cuando exista amenaza de lluvia. En caso de llover dentro de las 12 horas de haberse bañado, se deberá repetir el mismo. El producto a utilizar debe conservarse en su envase original, cerrado y al abrigo del medio ambiente, evitando temperaturas extremas<sup>[6]</sup>.

Cubicación. Frecuentemente se toma la capacidad del bañadero con fórmulas geométricas o por comentario del personal o propietario anterior, esto provoca errores; por consiguiente, se deberá tomar un recipiente de 1 ó 5 litros perfectamente calibrado y con esto calibrar un recipiente más grande (lata de 20 litros). Una vez calibrado se llenará la pileta de reposición (cachimbó) del baño, es conveniente si tiene 1000 litros, ponerle una cubicación a los 500 litros (marcar). En caso de no disponer de este tipo de pileta, se realizará la operación con un tambor de 200 litros. Durante el llenado del bañadero debe hacerse la primera marca en la varilla a los 4000 ó 5000 litros, después ir señalando cada 1000 litros hasta los 8000 litros y, hasta completar el nivel de nado se marcará cada 500. Ante posible ingreso de agua en la pileta, en el caso de lluvias, inundaciones etc., y para tener un mejor control de la misma, se deberán cubicar 2000 litros más sobre el nivel de nado e ir marcando cada 500. Una vez cubicado el baño se prepara el pie en la forma que se explica en la etiqueta del producto. Se agitará la emulsión en forma enérgica haciendo pasar 50 - 70 animales para que el pie de baño tenga una emulsión uniforme. Estos animales deben volver a mezclarse con la tropa para ser bañados nuevamente<sup>[6]</sup>.

Baño: Se irán introduciendo los animales al baño; de inmediato el horquillero le sumergirá por primera vez la cabeza. Si al colocarlo, el animal sumergió la cabeza, la sumergida no

se cuenta. Los 15 segundos que el animal debe permanecer en el baño comenzarán a contarse a partir de la caída al bañadero. Cada horquillero se hará responsable de dos animales y no más, pues hay que frenarlo con la horquilla para que estén el tiempo necesario. Con cada animal que se introduce al baño se incorpora también una cantidad apreciable de materiales extraños (barro, bosta, etc.), que van decantando lentamente y arrastran en su caída al principio activo que tiene la característica de adherirse a las partículas sólidas del baño. Esto hace que las reposiciones y refuerzos deban hacerse en tiempo y forma correctos. Estas operaciones se realizarán al desgaste del 10% del bañadero y no más, ni aún al terminar, porque sino el baño se empobrece y los animales reciben subdosis. No eliminar los pelos y partículas que se encuentran en flotación, mezclando éstas con agitadores antes de iniciar el baño<sup>[6]</sup>.



**Figura 1. Baño garrapaticida para ganado vacuno<sup>[6]</sup>**



A su vez se ha de tener en cuenta que las garrapatas transmiten enfermedades parasitarias, que son incluidas dentro del grupo de las zoonosis, como la Piroplasmosis (*Babesiosis, Theileriosis*). Estos parásitos son transmitidos al hospedador por medio de la saliva de las garrapatas infectadas<sup>[4]</sup>.

#### **2.1.1.1.2 Enfermedades parasitarias producidas por Piojos**

Existen dos tipos de piojos, los chupadores de los géneros *Linognathus*, *Solenoptes* y *Haematopinus*, y los masticadores del género *Damalinio* que se sitúan a nivel del cuello, espalda, región perineal y cola de los animales afectados<sup>[1]</sup>.

Los piojos masticadores se alimentan de restos de piel y escaras y ejercen una acción irritativa sobre el hospedador. Por el contrario los piojos chupadores entran en contacto con la sangre, y ejercen una acción hematófaga y traumática. Los animales afectados por estos piojos presentan un intenso prurito, se frotan contra objetos y pueden llegar a provocarse auto-lesiones y alopecias generalizadas<sup>[1]</sup>.

Un tratamiento muy extendido se basa en la utilización de baños con productos organofosforados, piretroides y carbamatos. La utilización de avermectinas inyectables también ha demostrado su eficiencia frente a piojos chupadores, ayudando a controlar significativamente los masticadores, que si son cubiertos por los tratamientos a base de avermectinas tópicas o “pour-on”<sup>[1]</sup>.

#### **2.1.1.1.3 Sarnas.**

Infestaciones causadas por la presencia de ácaros de los géneros *Psoropes*, *Chorioptes*, *Demodex* y *Sarcoptes*<sup>[1]</sup>.

Estos ácaros que viven en la piel de los animales afectados, se transmiten por contacto directo o a través de utensilios contaminados. Estos parásitos ejercen una acción traumática sobre el animal alimentándose de sangre y linfa y provocando un intenso prurito que cursa con la aparición de pápulas/ pústulas que al cabo de unos días se

convertirán en costras. Es aconsejable que el tratamiento antiparasitario se realice previa limpieza en las costras<sup>[1]</sup>.

Se puede seleccionar un tratamiento tópico a base de piretroides organofosforados, o carbamatos.

## **2.2. Garrapata.**

### **2.2.1 Importancia de la garrapata en la ganadería.**

La garrapata figura como uno de los ectoparásitos de mayor importancia económica a escala mundial, por las mermas que ocasiona en la producción de ganado bovino, caprino, vacuno, lanar y caballo<sup>[7]</sup>.

Una consecuencia directa de la parasitación por garrapatas son la menor cantidad de alimentos ingeridos por el ganado, las pérdidas de peso por toxinas e irritación, las anemias producidas por pérdidas de sangre transmisión de hemoparásitos y la considerable depreciación de las pieles a causa de las perforaciones producidas por los piquetes. Además, estas perforaciones permiten el acceso de bacterias, micosis termales y larvas de moscas (miasis)<sup>[7]</sup>.

Al lesionar la piel para chupar sangre, muchas especies de garrapatas pueden transmitir también los más diversos agentes patógenos; como son virus, bacterias, riquetsias y protozoos. Esto puede conducir a enfermedades agudas, crónicas o incluso a la muerte<sup>[7]</sup>. De las estimadas 1,000 millones de cabezas de ganado vacuno en el mundo, entre el 70 y 80% vive en países tropicales y subtropicales en los que la garrapata es activa durante todo el año<sup>[7]</sup>.

La pérdida de peso en un bovino parasitado por garrapatas *Boophilus spp.* se calcula en 0.26Kg/garrapata/año y por *Amblyomma ssp.* hasta 1.09 Kg/garrapata/año. Esto ocasiona pérdidas de varios miles de millones de dólares en la economía pecuaria mundial. En México, el último cálculo oficial reportó que la infestación por garrapata *Boophilus spp.*

provocó pérdidas por concepto de pieles de más de cuarenta y siete millones de dólares por año<sup>[7]</sup>.

### **2.2.2 El ciclo biológico de las garrapatas.**

Su ciclo biológico está compuesto por cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto. Las garrapatas hembras ponen los huevesillos en áreas de vegetación abundante, el tiempo de eclosión de los huevos depende de la especie y de las condiciones del medioambiente, después de este periodo se libera la larva y se mueve en el pasto en busca de su primer hospedador y su primer alimento, después de esta comida la larva se deja caer y muda para convertirse en ninfa y comienza la búsqueda de su próximo huésped, una vez alimentada la ninfa nuevamente se deja caer para mudar a adulto, la adulta ya diferenciada se alimenta por un tiempo determinado, durante este tiempo se enjurgita aumentando su peso hasta 100 veces, copula y se deja caer al hábitat empezando a ovopositar y con ello se cierra el ciclo de la vida. Posteriormente la garrapata adulta hembra muere, el macho se puede alimentar varias veces. Todas las etapas están fuertemente influidas por el ambiente, cuando las condiciones son favorables el ciclo es menor debido a que la garrapata no entra en periodo de latencia y es relativamente corto, cuando no, las garrapatas tienen la facultad de entrar en un período de latencia lo cual les permite persistir en el ambiente hasta por 250 días o más<sup>[7, 8]</sup>.

## CICLO DE VIDA DE LA GARRAPATA

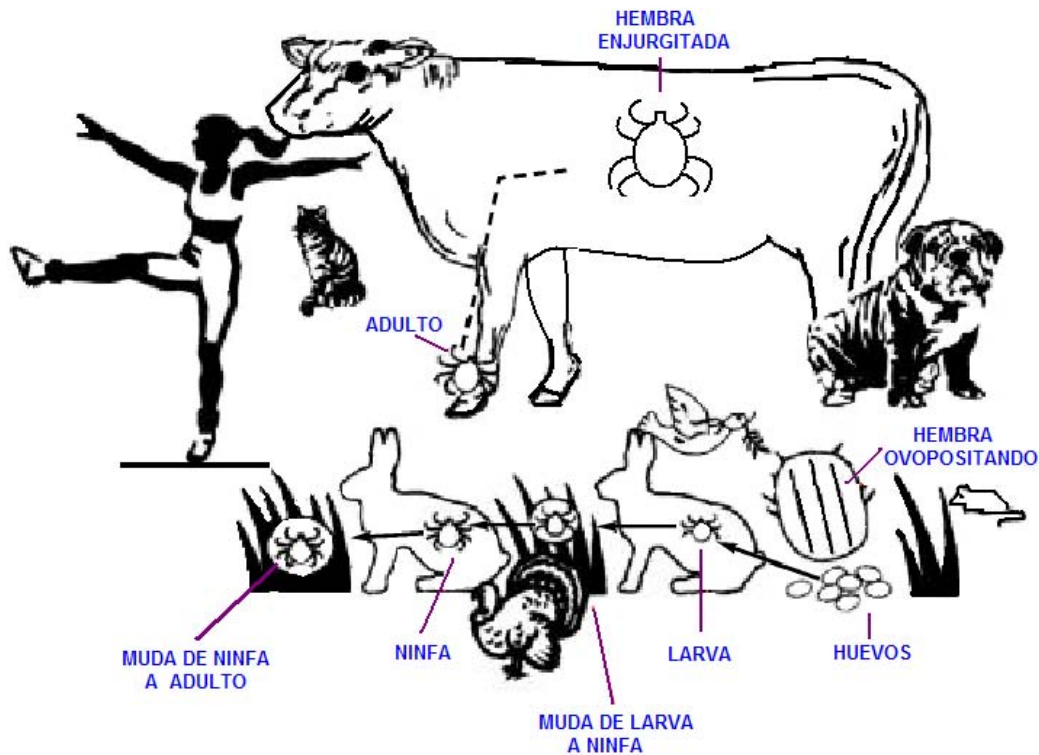


Figura 2. Ciclo biológico de la garrapata<sup>[8]</sup>

El ciclo biológico de los ixodidos se caracteriza por el número de animales que parasitan durante su vida. Ciertas variedades pasan toda su vida parasitaria sobre un solo animal; algunas parasitan sobre dos, mientras que otras son parásitos consecutivos de tres animales huéspedes. El conocimiento de estas peculiaridades es importante para la lucha contra las garrapatas. Se conocen alrededor de 650 especies pertenecientes a 13 géneros de ixodidos<sup>[7, 8]</sup>.

En México se han identificado 43 especies de 7 géneros de la familia *Ixodidae*: *Boophilus* sp., *Amblyomma* spp., *Dermacentor* spp., *Anocentor* spp., *Haemphysalis* spp., *Rhipidephalus* spp. e *Ixodes* spp.<sup>[7, 8]</sup>

De la familia de *Argasidae* los 3 géneros más importantes en México son: *Otobius* spp., *Ornithodoros* spp. y *Argas* con un total de 8 especies reportadas<sup>[7, 8]</sup>.

Agente Infeccioso	Transmisor	Enfermedad
Babesia bigemina	<i>Boophilus spp.</i>	Fiebre de Texas o Piroplasmosis
Babesia Boris	<i>Boophilus spp.</i> , <i>Ixodes spp.</i>	Hemoglobinuria epidémica
Anaplasma marginale	<i>Boophilus spp.</i> , <i>dermacentor spp.</i> , <i>Rhipicephalus spp.</i> , <i>Amblyomma spp.</i> , <i>Ixodes spp.</i> , <i>Haemaphysalis spp.</i>	Anaplasmosis
Anaplasma centrale*	<i>Boophilus spp.</i> , <i>Haemaphysalis spp.</i>	Anaplasmosis
Ehrlichia bovis	<i>Amblyomma spp.</i> , <i>Haemaphysalis spp.</i>	Rickettsias bovina
Borrelia* theileri	<i>Boophilus spp.</i>	Espiroquelosis Bovina

\*Posible presencia en el país.

**Tabla 2. Principales agentes infecciosos y enfermedades del bovino, transmitidas por garrapatas en México<sup>[7, 8]</sup>.**

### 2.2.3. Adaptabilidad ecológica.

La subsistencia de las garrapatas en sus diversos estados de evolución (huevo, larva, ninfa, adulto) está determinado por factores climatológicos como lluvias, sequías, altitud, heladas, temperaturas medias nocturnas y diurnas, tipo de vegetación, así como por la cantidad de animales a disposición de cuya sangre se alimentan estos parásitos<sup>[7]</sup>.

Cabe mencionar que los factores climatológicos afectan especialmente a los delicados huevesillos y a las fases no parásitas de la garrapata<sup>[7]</sup>.

Las hembras de los ixódidos después de haber chupado suficiente sangre buscan lugares protegidos en el suelo donde según la variedad deponen cantidades determinadas de huevos (*Boophilus spp.* entre 2,000-3,000, *Amblyomma spp.* Hasta 5,000). Es por esto que el microclima del suelo (vegetación espesa, temperatura y humedad relativa), están importante para su sobrevivencia<sup>[7]</sup>.

Estos huevesillos son muy sensibles a las sequías y las larvas que salen de ellos también evitan los ambientes secos y las altas temperaturas, a que estos factores les perjudican.

Las ninfas y especialmente las garrapatas adultas son mucho más resistentes a estos factores climatológicos<sup>[7]</sup>.

### **2.3 Piretroides**

Durante investigaciones a modificaciones de estructuras químicas de piretrinas naturales, un cierto número de piretroides sintéticos fueron producidos con diferentes propiedades físicas y químicas y una gran actividad biológica. Varios de los primeros piretroides sintetizados fueron comercializados de inmediato, muchos de estos para el control de insectos de casa. Otros piretroides más recientemente sintetizados han sido introducidos como insecticidas en la agricultura y en la ganadería por su excelente actividad.<sup>[9]</sup>

Los piretroides constituyen otro grupo de insecticidas en adición a los organoclorados, organofosforados, carbamatos y otros compuestos. Entre los más comercializados se encuentran la aletrina, resmetrina, d-fenotrina, tetrametrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalarato, permetrina, etc<sup>[10]</sup>.

Químicamente los piretroides sintéticos son ésteres de ácidos específicos (ej. Ácido crisantémico, ácido cisantémico halo-sustituido, ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico) y de alcoholes (ej. Aletrolona, alcohol 3-fenóxibecilico). Para ciertos piretroides el o los centros asimétricos existe en el ácido y/o el alcohol secundario, y los productos comerciales algunas veces consisten en una mezcla de ambas isómeros ópticos, (1R,1S o d/l) y geométrica (cis / trans). Sin embargo más de la actividad insecticida de muchos de estos productos reside solamente en uno o dos isómeros<sup>[9, 10]</sup>.

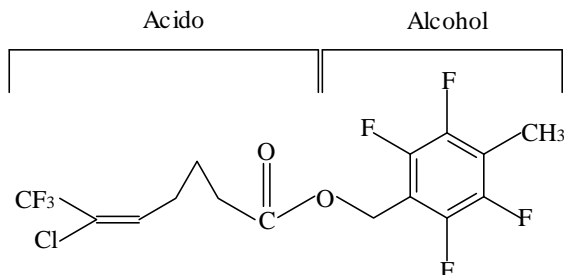
Los piretroides son neurotóxicos, actúan sobre los axones en el sistema nervioso central y periférico por la interacción con los canales de sodio en mamíferos y/o insectos. Una sola dosis produce signos tóxicos en mamíferos, tal como son temblores, hiperexcitabilidad, salivación, coreo-atetosis y parálisis. Los signos desaparecen fácil y rápidamente y los animales se recuperan generalmente con una semana. En niveles cercanos a una dosis letal los piretroides sintéticos causan cambios transitorios en el sistema nervioso tal como es la inflamación axonal y/o degeneración de la mielina en el nervio ciático. Ellos no son considerados causa de retraso neurotóxico de el tipo inducido por algunos compuestos organofosforados.

El mecanismo de toxicidad de los piretroides sintéticos y su clasificación es de dos tipos.<sup>[9]</sup>

<sup>10]</sup> Basados en estudios de fijación sobre receptores del ácido gamma-aminobutírico (GABA) los piretroides sintéticos pueden ser clasificados dentro de dos tipos<sup>[11]</sup>:

- Los piretroides que no son alfa-ciano.

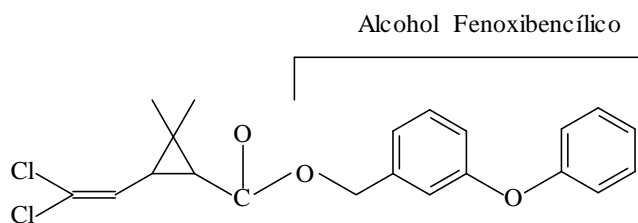
**Teflutrina**



Tipo I: No contienen el grupo alfa-ciano-3-fenoxibe

- Los piretroides alfa-ciano-3-fenoxibencil.

**Permetrina**



Tipo II: Contienen el grupo alfa-ciano sobre el 3-fenoxibencil :

**2.3.1 Piretroides que no contienen un grupo alfa-ciano (aletrina, d-fenotrina, permetrina, tetrametrina, cismetrina y bioresmetrina) (Tipo I: T-síndrome).**

Los piretroides que no contienen el grupo alfa-ciano dan un aumento pronunciado a la actividad repetitiva en órganos de los sentidos y en las fibras nerviosas sensoriales. Estos compuestos, también inducen una repetitividad pronunciada de disparos de la terminal nerviosa del motor presináptico en la unión neuromuscular. No hay efecto significativo del insecticida sobre la liberación de neurotransmisores o en la sensibilidad de la membrana subsináptica, sobre las fibras de la membrana muscular. El disparo presináptico repetitivo fue también observado en el ganglio parasimpático tratado con estos piretroides<sup>[11]</sup>.

Los piretroides sintéticos actúan directamente sobre el axón a través de la interferencia con el mecanismo de los canales de sodio que permite la generación y conducción de cada impulso nervioso. El estado transicional de los canales de sodio es controlado por dos mecanismos de acción separados, referidos a la activación y desactivación de los canales<sup>[11]</sup>.

La presencia del piretroide en el organismo afecta la corriente del canal de sodio durante la despolarización, la apertura rápida de la activación del canal y el lento cierre proceden normalmente. Sin embargo una vez que el canal de sodio está abierto la activación queda restringida en la posición de apertura a la molécula del piretroide. Aunque básicamente todos los piretroides tienen el mismo mecanismo de acción, existen diferentes tipos de relajación para varios de los piretroides<sup>[11]</sup>.

### **2.3.2 Piretroides que contienen el grupo alfa-ciano sobre el 3-fenoxibencil alcohol (deltametrina, cipermetrina, fenvalerato y fenpropanato) (Tipo II: CS-síndrome).**

Los piretroides con el grupo alfa-ciano causan una intensa repetitividad en la línea lateral del órgano en la forma de alargamiento en la cadena del impulso. Cada una de las cadenas de impulsos puede alargarse hasta más de un minuto y conteniendo miles de impulsos. La duración de las cadenas de los impulsos nerviosos y el número de impulsos por cadena se incrementa con la disminución de la temperatura<sup>[11]</sup>.

Los estudios que se han realizado sugieren que los piretroides que contienen el grupo alfa-ciano afectan principalmente los canales de sodio en la membrana del nervio y causan una prolongación en la cadena del impulso nervioso aumentando la trascendencia en la permeabilidad del sodio en la membrana durante la excitación<sup>[11]</sup>.

### **2.3.3 Deltametrina.**

#### **2.3.3.1 Identidad, propiedades físicas y químicas.**

La deltametrina fue sintetizada en 1974 y comercializada por primera vez en 1977. Químicamente es el isómero (cis) de 8 ésteres estereoisoméricos del análogo dibromo del ácido crisantémico, ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-dibromovinil) ciclopropanocarboxílico (Br<sub>2</sub>CA)



con alcohol alfa-ciano-3-fenoxibencílico<sup>[11]</sup>. La deltametrina es un piretroide sintético de amplio espectro y agente neurotóxico de rápida actividad. La deltametrina de calidad técnica tienen las siguientes características:

Color	Blanco
Estado Físico	Polvo
Nombre IUPAC	(S)-alfa-Ciano-3-fenoxibencil (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimeilciclopropanocarboxilato
Sinónimos	Decametrina, Decis <sup>®</sup> , K-othrin <sup>®</sup> .
Formula Molecular	C <sub>22</sub> H <sub>19</sub> Br <sub>2</sub> NO <sub>3</sub>
Peso Molecular	505.2
Estructura Química	
Punto de fusión	98-101°C y contiene más del 98% del material.
Solubilidad (A 20°C)	2µg/L en agua, es muy soluble en la mayoría de disolventes aromáticos, acetona, etanol, metanol, dioxano, THF, DMSO, dimetilformamida.
Presión de vapor (A 25°C)	2.0 x 10 <sup>-6</sup> Pa
Estabilidad	Es estable a la luz, el calor y el aire, pero inestable en medios alcalinos.
Densidad Relativa (agua=1)	0.5g/cm <sup>3</sup>

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la deltametrina<sup>[11]</sup>

### 2.3.3.2 Producción y empleo.

El consumo mundial de deltametrina en 1987 era de aproximadamente 250 toneladas. La deltametrina se utiliza en cultivos como de café, maíz, cereales, las hortalizas y lúpulo y en productos almacenados. Se emplea también en higiene animal, en la lucha contra los vectores y en salud pública. Se fabrica comúnmente como solución concentrada emulsionable, solución concentrada en pequeñísimo volumen, polvo humectable, solución concentrada, en suspensión y polvo para utilización en seco sola o en combinación con otros plaguicidas<sup>[11]</sup>.

### **2.3.3.3 Ingestión, metabolismo y excreción.**

La deltametrina se absorbe fácilmente por vía oral y con menor facilidad por la piel, pero la tasa de absorción depende considerablemente del disolvente o vehículo. La deltametrina absorbida se metaboliza y se excreta fácilmente.

La toxicidad y el modo de acción de la deltametrina se han estudiado extensivamente. Después de la administración de una sola dosis a ratas (1.75 mg/kg vía intravenoso, 7.5 o 10 mg/kg intraperitoneal, o a 15 o 50 mg/kg vía oral), fueron observadas las siguientes reacciones: salivación profusa, fuertes temblores del cuerpo, lagrimación y mortalidad fue observada. Los efectos neurotóxicos de la deltametrina se han atribuido sobre todo a su atascamiento a los canales voltaje-sensibles del sodio. Compuestos de la misma familia se consideran neurotóxicos, según lo demostrado por la correlación de los niveles de deltametrina en cerebro con el inicio de muestras del envenenamiento en ratas. La inyección intracerebral de deltametrina producen signos de neurotoxicidad en un minuto o menos en ratones. No se localizó ningún estudio de toxicidad en el cual los metabolitos de deltametrina fueran administrados a animales<sup>[9]</sup>.

Los datos de toxicocinética para la deltametrina y otros piretroides son incompletos y en algunos casos contradictorios. Es conocido que la deltametrina es absorbida rápidamente cuando es administrada por vía oral e intraperitoneal y es incorporada fácilmente al sistema nervioso central reportándose concentraciones mucho más altas de deltametrina en la mayoría de las regiones del cerebro que en plasma de ratas dosificadas por vía oral, mientras que se ha documentado niveles relativamente bajos del cerebro en ratas después de una administración intraperitoneal<sup>[9]</sup>.

Se sabe que el metabolismo de deltametrina en ratones y ratas esta mediado por una esterasa en el anillo del éster y por hidroxilación en el citocromo P450. Las constantes metabólicas para estas vías de administración fueron determinadas recientemente *in vitro* para la rata adulta macho Sprague-Dawley. Esta documentado que el 27% de una dosis de 2.4 mg/kg vía intravenosa de deltametrina en ratas hembras fué excretada en las heces, posiblemente como metabolitos. Por vía oral se observó que 13-20% de la deltametrina fue eliminado en heces de las ratas en un plazo de 2-4 días después del bolo oral que dosificaban con 0.9-1.6 deltametrina/kg<sup>[9]</sup>.

Los modelos fisiológicos basados en la farmacocinética han sido herramientas útiles en análisis de la dosis-respuesta y el gravamen de riesgo de una variedad de productos químicos tóxicos. Sin embargo no hay un modelo fisiológico farmacocinético publicado de la deltametrina u otros piretroides<sup>[9]</sup>.

#### **2.3.3.4 Efectos en los seres humanos.**

La deltametrina puede provocar sensaciones cutáneas en los trabajadores expuestos. Se han reportado varios casos de intoxicación no mortal debidos a exposición ocupacional por no respetar las precauciones de seguridad. Son síntomas frecuentemente reportados adormecimiento, picor, formicación y sensación de ardor, y vértigo. En ocasiones se ha descrito un eritema maculoso. La mayor parte de esos síntomas son temporales y desaparecen en 5 o 7 días. No se han reportado reacción adversa a largo plazo. Se han descrito tres casos no mortales de intoxicación por deltametrina tras la ingestión de varios gramos del producto<sup>[11]</sup>.

### **2.4 Sistemas de liberación.**

#### **2.4.1 Definición y aplicación**

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 riesgos de toxicidad en algunos casos o pérdida de eficacia en otros dentro del intervalo de dosificación aplicado.

Durante los siglos XIX y XX se presentó la revolución de los fármacos y se desarrollaron nuevos productos como polvos o líquidos de administración oral o aplicación externa. A partir de la década de los 30's se comienza a trabajar sobre los sistemas de liberación

controlada. En 1937 la *Royal Society of Medicine* en Londres describe un método para formular hormonas de administración subcutánea que presentan una liberación continua durante tres meses en diversos animales. Esta idea se practicó de manera eficiente en 1950 para mejorar el crecimiento del ganado y en las últimas dos décadas el desarrollo de formulaciones de liberación sostenida de administración intramuscular y subcutánea se ha incrementado en la industria farmacéutica humana y veterinaria<sup>[12, 13]</sup>.

La aplicación de los sistemas de liberación controlada tiene por objeto la eficiencia terapéutica y la seguridad, disminuyendo la dosis y el número de administraciones. Así mismo mediante estos sistemas es posible transportar y liberar proteínas, así como dirigir los fármacos a lugares específicos reduciendo su toxicidad<sup>[14]</sup>.

Los nuevos sistemas de liberación modificada abarcan los conceptos de liberación sostenida o prolongada, retardada y rápida. La primera comprende cualquier sistema de suministros de fármaco que logre la liberación lenta a lo largo en un período prolongado, que retarda la liberación del fármaco y su aparición en la circulación. La segunda define un perfil de liberación de fármaco constante, abarca los sistemas que pueden ser sometidos a un control específico en la liberación con la finalidad de mantener niveles constantes de fármaco en plasma. La liberación rápida se caracteriza por alcanzar concentraciones terapéuticas rápidamente (como en una infusión) pero el perfil cae también rápidamente (fig. 3)<sup>[15, 16]</sup>.

El desarrollo de un sistema de liberación modificada de fármacos requiere del conocimiento de parámetros que influyen en la liberación y absorción del fármaco. Es importante conocer las propiedades químicas y fisicoquímicas del fármaco, sus características farmacocinéticas, así como la interacción de éste con el sistema de liberación y los fluidos biológicos<sup>[15, 17]</sup>.

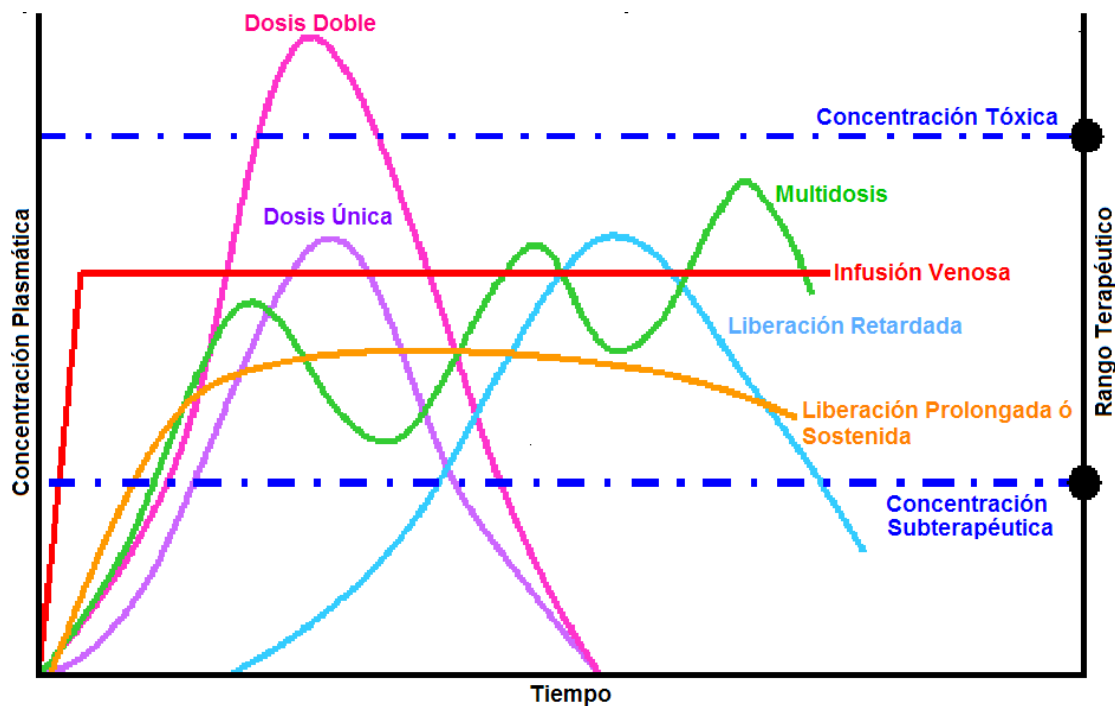


Figura. 3. Perfiles de liberación<sup>[18]</sup>

#### 2.4.2 Consideraciones para el desarrollo de un sistema de liberación modificada.

Durante el desarrollo de un sistema de liberación es necesario considerar la biocompatibilidad de todos los agentes, los cuales deben ser químicamente inertes, no carcinogénicos, hipoalergénicos y estables en el sitio de administración y no desencadenar respuesta inmunológica. En el ramo veterinario la elección de la ruta de administración considera aspectos como la especie, la dosis y el costo. Las vías de administración más utilizadas en este campo son: bucal, nasal, rectal, oral, intravaginal, intramuscular, dérmica y transdérmica; y con ellas se abarca desde unas horas hasta días o años de liberación del fármaco. Algunos de los parámetros involucrados en el desarrollo de un sistema de liberación controlada de fármacos son los siguientes:

##### Fisicoquímicos

pKa: Afecta la permeabilidad en función del pH y el estado iónico del fármaco. La solubilidad se incrementa con la ionización pero la absorción disminuye. En el caso de formas parenterales los cambios del estado de ionización pueden provocar precipitación del fármaco que conduciría a una irritación local, el tamaño de partícula del precipitado puede afectar el perfil de liberación<sup>[17]</sup>.

*Coeficiente de partición:* Indica la lipoficidad del fármaco que puede influir en el paso de éste a través de las barreras biológicas para ser absorbido. La liberación del fármaco desde una matriz está relacionada directamente con la diferencia de solubilidad en esta y el medio al que se libera<sup>[17]</sup>.

*Solubilidad:* La solubilidad del fármaco en el polímero que constituye el sistema, determina la velocidad de liberación. También la solubilidad que presente el fármaco en el medio de disolución al que va a llegar influye en la velocidad de liberación, esta solubilidad se puede mejorar con el uso de cosolventes. Es importante que al hacer estudios de liberación del sistema se mantengan condiciones sink (concentración de soluto 10 veces por debajo de la solubilidad)<sup>[17]</sup>.

*Estabilidad:* La estabilidad del fármaco a factores como pH, humedad y temperatura, tanto en el proceso de fabricación como en su transporte y almacenamiento para garantizar la seguridad del producto y su efecto terapéutico<sup>[17]</sup>.

*Difusividad:* La difusión es el paso de moléculas de fármaco a través de la matriz polimérica o del reservorio y se lleva a cabo por un gradiente de concentración del fármaco e involucra el doblamiento de las cadenas poliméricas para dejar el espacio necesario para la difusión del fármaco. Esta propiedad resulta importante porque de ella depende la velocidad con la que el fármaco sea liberado por este mecanismo<sup>[17]</sup>.

*Potencia:* La potencia se refiere a la dosis necesaria de un fármaco para alcanzar un efecto determinado. Si se necesita administrar un fármaco por absorción transdérmica se requerirá uno de enorme potencia dada la limitada capacidad de la piel para absorber medicamentos<sup>[19]</sup>.

### **Farmacocinéticas**

*Absorción:* Es una etapa importante principalmente en las formas de dosificación orales ya que de la eficiencia de este proceso depende en muchas ocasiones el efecto terapéutico que se desea. Cuando los fármacos presentan biodisponibilidad deficiente se recomienda su administración parenteral o la incorporación de los mismos en un sistema de liberación controlada<sup>[15]</sup>.

*Distribución:* Una vez que el fármaco es absorbido se distribuye en el organismo dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Esta distribución puede ocasionar toxicidad en algunos órganos por lo cual se busca un sistema de liberación modificada que este dirigido a un sitio específico<sup>[15]</sup>.

*Metabolismo:* Los fármacos que presentan metabolismo de primer paso o los fármacos susceptibles a condiciones fisiológicas como el pH gástrico y la unión a proteínas plasmáticas son candidatos para un sistema de liberación modificada en una formulación parenteral. <sup>[15]</sup>.

*Eliminación:* Cuando la excreción es dependiente de las concentraciones plasmáticas, la liberación modificada puede afectar la rapidez de eliminación para mantener la concentración del fármaco en plasma y alargar su efecto. Los fármacos cuya vida media en el organismo es muy corta (esto es de 6-8 hrs) son buenos candidatos para incorporarlos en un sistema de liberación modificada<sup>[15, 17]</sup>.

### **2.4.3 Clasificación de los mecanismos de liberación**

Los sistemas de liberación controlada se pueden clasificar de acuerdo a su mecanismo de liberación de la siguiente manera<sup>[16, 17]</sup>:

1. Velocidad de liberación preprogramada.
2. Activación modulada de la liberación
3. Regulación por retroalimentación.
4. Liberación dirigida.

Las tres primeras se refieren a un control en el tiempo de liberación y la última se refiere aun control en la ubicación espacial en la que es liberado el fármaco

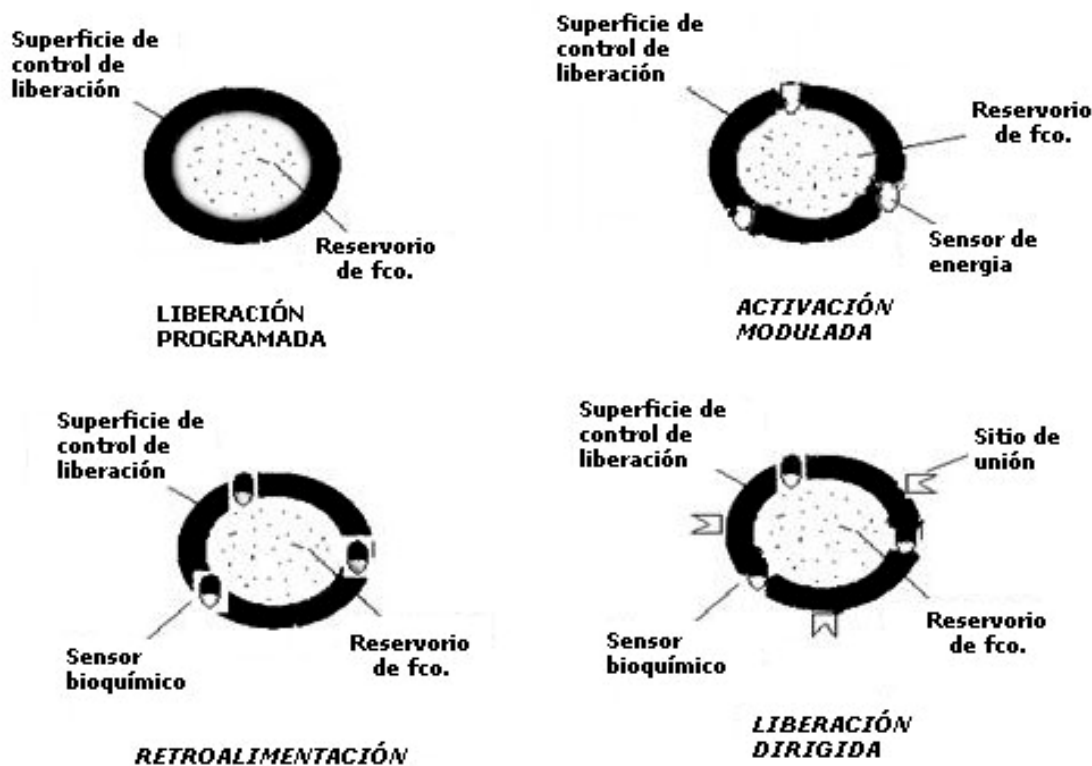


Figura 4. Mecanismos de liberación

1. *Velocidad de liberación preprogramada:* El perfil de liberación se controla por difusión molecular del fármaco a través de una barrera. Se describe mediante la segunda Ley de difusión de Fick. Existen tres tipos<sup>[16, 17]</sup>:

a) Permeación a través de una membrana polimérica: El fármaco se encapsula con una membrana de permeabilidad específica para formar un reservorio el cual puede ser sólido, una suspensión o una solución. La liberación depende de los coeficientes de partición y difusión del fármaco, de la porosidad de la membrana y de la concentración del fármaco en el reservorio (ec. 1)

$$Q/t = (K_{m/r} K_{a/m} D_d D_m / K_{m/r} D_m h_d + K_{a/m} D_d h_m) (C_R) \quad (\text{ec. 1})$$

$Q/t$  es la velocidad de liberación del fármaco.

$(K_{m/r}, K_{a/m})$  son los coeficientes de partición interfacial entre el fármaco y la e la membrana y la capa de difusión.

$D_d, D_m$  son los coeficientes de difusión a través de la membrana de grosor ( $h_m$ ) y a través de la capa de difusión de grosor ( $h_d$ ).

$C_R$  es la concentración del fármaco en el dispositivo



b) Difusión a través de una matriz polimérica: El reservorio es preparado como una dispersión homogénea del fármaco en el polímero (hidrofílico o lipofílico), esta dispersión puede lograrse mediante diferentes técnicas como la de difusión del disolvente o por una fusión del polímero. La liberación está controlada por la cantidad de fármaco en el reservorio, la solubilidad de este en el polímero y su difusión a través de la matriz (ec. 2)

$$Q/t^{1/2} = (2AC_R D_P)^{1/2} \quad (\text{ec. 2})$$

- $Q/t^{1/2}$  es la velocidad de liberación del fármaco  
**A** es la dosis inicial de fármaco.  
**C<sub>R</sub>** es la solubilidad del fármaco en el polímero.  
**D<sub>P</sub>** es la difusión del fármaco a través de la matriz polimérica

c) Microreservorio: Implica la microdispersión de una suspensión acuosa del fármaco con un polímero mediante un proceso mecánico de dispersión (homogenización). La liberación es dependiente de variables fisicoquímicas como la solubilidad del fármaco en el polímero y se lleva a cabo por difusión o disolución (ec. 3)

$$dQ / dt = (d_p D_d m K_p h_d + D_d h_p m K_p) [n S_p - (D_1 D_1 (1-n) / h_1) (1/K_1 + 1/K_m)] \quad (\text{ec. 3})$$

- dQ / dt** es la velocidad de liberación del fármaco.  
**K<sub>1</sub>, K<sub>m</sub>, K<sub>p</sub>** son coeficientes de partición del fármaco y el reservorio, entre el reservorio y la membrana y entre la membrana y el medio de difusión.  
**D<sub>1</sub>, D<sub>p</sub>, D<sub>d</sub>** representan la difusión a través del reservorio de grosor ( $h_1$ ); a través de la membrana de grosor ( $h_p$ ); y a través de la capa de difusión de grosor ( $h_d$ ).  
**m = a/b** y es la relación entre la cantidad de fármaco dentro (a) y fuera (b) de la matriz.  
**S<sub>1</sub>, S<sub>p</sub>** son la solubilidad del fármaco en el compartimiento líquido y en la matriz polimérica.

2. *Activación modulada de la liberación*: La liberación del fármaco desde un reservorio o matriz puede ser facilitada por el suministro de energía mediante diferentes medios. Dependiendo del tipo de energía usada y el proceso de aplicación, estos sistemas se clasifican como físicos, químicos o bioquímicos<sup>[16, 17]</sup>.

## a) Mecanismos físicos

- Presión osmótica: La liberación se modula mediante un gradiente de presión osmótica entre el reservorio del fármaco y el medio que lo cubre. Depende de la permeabilidad al agua y del área superficial efectiva de la membrana semipermeable utilizada. La diferencia de presión provoca la reducción de volumen en el reservorio liberando el fármaco de manera controlada. La formulación puede ser sólida o en solución.

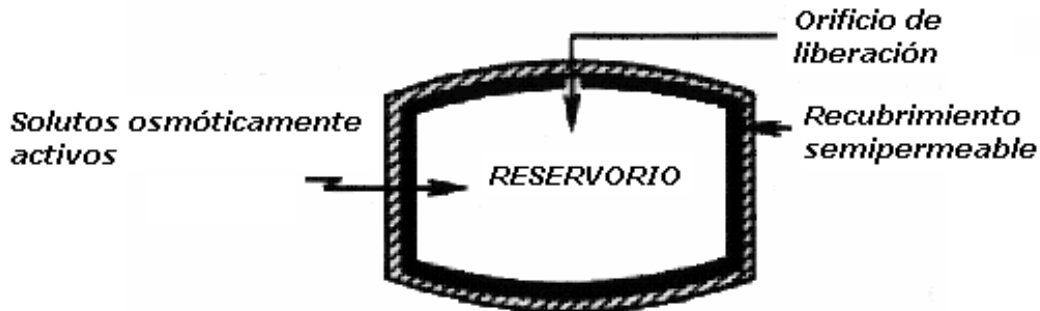


Figura 5. Regulación por presión osmótica

- Presión hidrodinámica: Esta es constituido por un contenedor en el que se encuentra el reservorio de fármaco, entre estos compartimientos se encuentra una capa absorbente de un polímero hidrofílico, la cual genera una diferencial de presión hidrodinámica que reduce el volumen del reservorio forzando al fármaco a salir por un orificio de manera controlada.

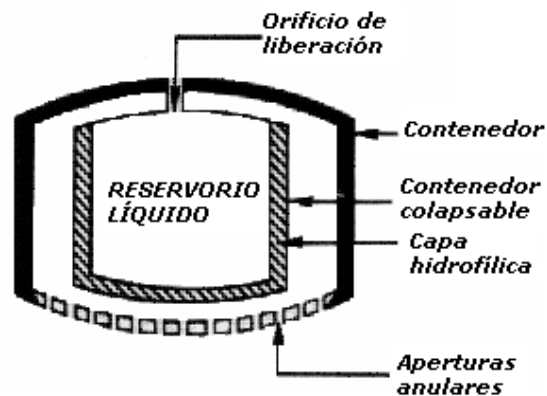


Figura 6. Regulación por presión hidrodinámica

- Presión de vapor: El fármaco es administrado con un dispositivo para infusión el cual se separa de un sistema de bombeo por una división de libre movimiento que contiene un fluor de fluorocarbono que vaporiza a la temperatura corporal. Esta

vaporización genera una presión que desliza la división y provoca la salida del fármaco con un flujo continuo. La liberación se controla por la diferencia de presión, la viscosidad de la formulación y el tamaño de la cánula de infusión.

- Activación mecánica: El reservorio de fármaco es contenido en un equipo con un sistema mecánico de bombeo que libera el fármaco en una cavidad específica como la nariz, el volumen liberado es independiente de la fuerza aplicada y la duración de la activación.
- Activación magnética: El reservorio es una dispersión del fármaco en una matriz polimérica. La liberación es lenta por la incorporación de un mecanismo electromagnético (anillos magnéticos) que es activado por vibración.

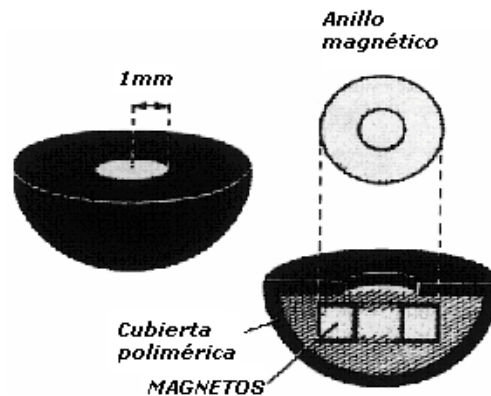


Figura 7. Regulación magnética

- Sonoforesis: Utiliza energía ultrasónica para abrir los poros de una membrana que contiene el reservorio del fármaco para que este pueda ser liberado.
- Ionotoforesis: utiliza corriente eléctrica para activar y modular la difusión pasiva del fármaco a través de una membrana biológica como la piel facilitando su permeación.
- Hidratación: El reservorio es homogéneamente dispersado en una matriz de un polímero hidrofílico que se hincha por hidratación.

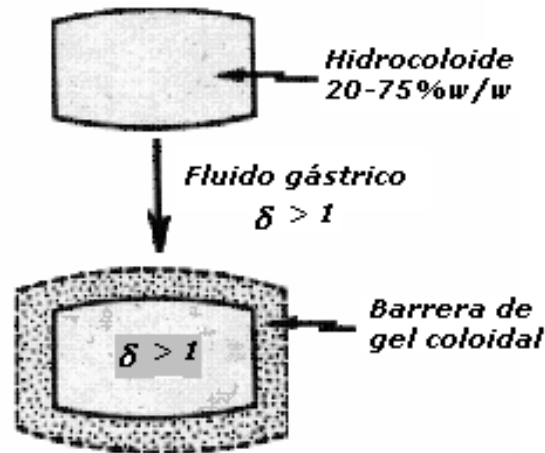


Figura 8. Activación por hidratación

## b) Mecanismos Químicos

- Activación por pH: Permite dirigir la liberación en una región con un rango de pH específico. El reservorio es una dispersión del fármaco con un polímero sensible a cambios de pH que se encapsula con una membrana polimérica como de etilcelulosa. El fármaco es liberado por difusión y controlado por la solubilidad de la membrana y la permeabilidad.

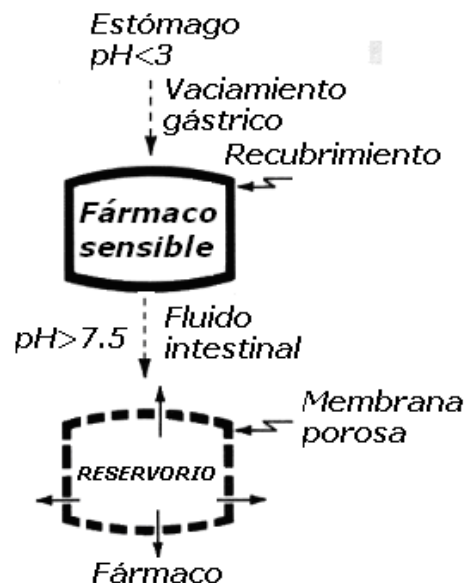
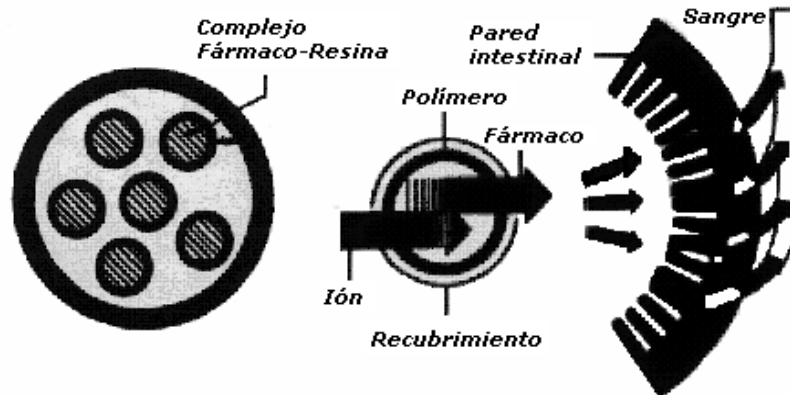


Figura 9. Regulación por pH

- Activación iónica: Es utilizada para fármacos iónicos. Se forma un complejo entre el fármaco y una resina de intercambio iónico con un contraión adecuado, este complejo se recubre con un polímero como el polietilenglicol 400 y se encapsula con una membrana de etilcelulosa (permeable al agua) que regula la liberación por difusión del fármaco en un medio electrolítico con el que intercambia iones.



**Figura 10. Activación iónica**

- Hidrólisis: El reservorio del fármaco es dispersado homogéneamente con un polímero en sistemas particulados. La liberación del fármaco es regulada por la hidrólisis que es capaz de degradar el polímero del que se constituyen las partículas

c) Mecanismos bioquímicos

- Activación enzimática: El reservorio es encapsulado en microesferas junto con un polímero biodegradable. En donde la liberación es activada por la hidrólisis enzimática del polímero mediante una enzima específica en un cierto tejido.

3. *Regulación por retroalimentación*: La regulación se realiza por la concentración de una sustancia química presente en el organismo, la cual es detectada por un receptor que se encuentra dentro del sistema de liberación. Existen varios tipos<sup>[16, 17]</sup>:

a) Bioerosión. El fármaco es dispersado en una matriz polimérica que es recubierta por una enzima específica como la ureasa, la cual al encontrarse con su sustrato urea, la degrada generando amonio que incrementa el pH del medio e induce la degradación del polímero para liberar el fármaco.

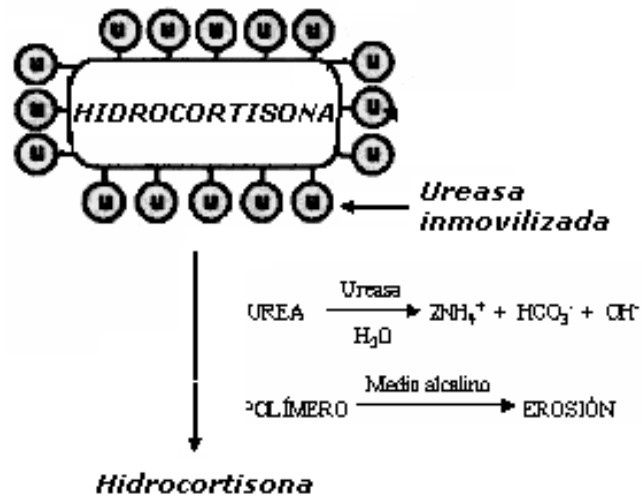


Figura 11. Bioerosión

b) Biorrespuesta: El fármaco es contenido en una membrana polimérica sensible a la penetrabilidad de un agente químico que se encuentra presente en el tejido.

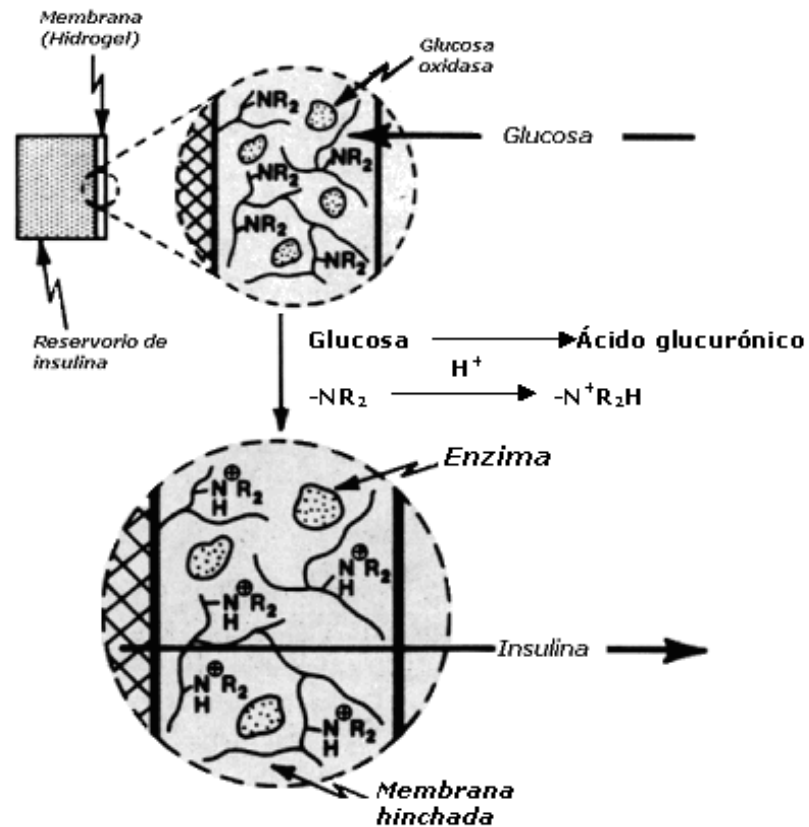


Figura 12. Biorrespuesta

c) Autorregulación: Depende del mecanismo de unión reversible y competitiva. El reservorio es encapsulado con una membrana polimérica semipermeable, la liberación es regulada por la penetración de un agente químico que estimula la salida del fármaco.

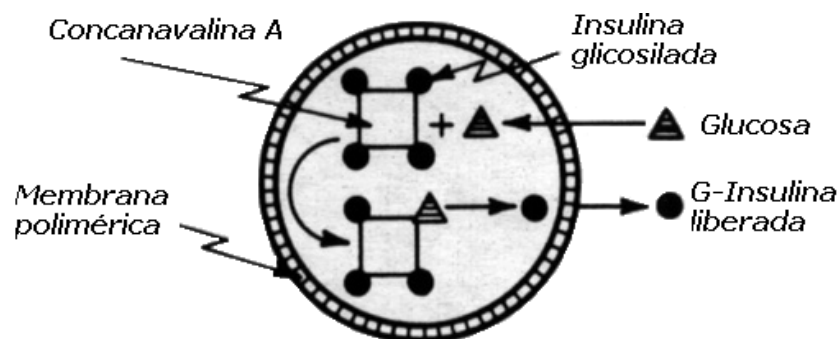


Figura13. Autorregulación

4. *Liberación dirigida*: El desarrollo de un sistema de liberación dirigido a un sitio específico busca reducir la toxicidad de ciertos fármacos inespecíficos. El diseño de estos dispositivos implica la incorporación de un elemento de reconocimiento como un

anticuerpo, para que se una selectivamente a una célula o tejido blanco de tal manera que el fármaco contenido en el sistema donador pueda ser depositado en ese lugar y ejerza su efecto. Algunos sistemas también incluyen un agente solubilizante que facilite la disponibilidad del fármaco<sup>[16, 17]</sup>.

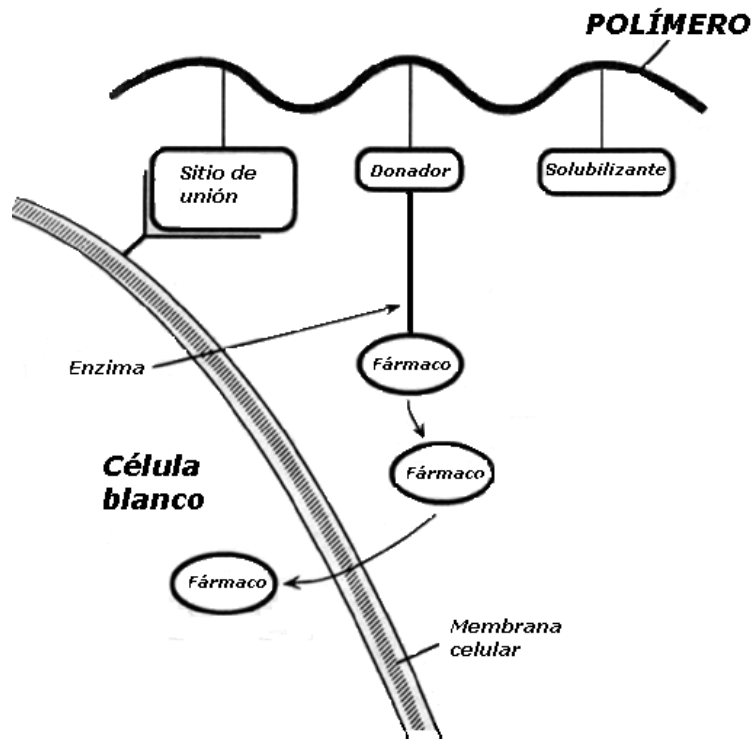


Figura 14. Liberación dirigida

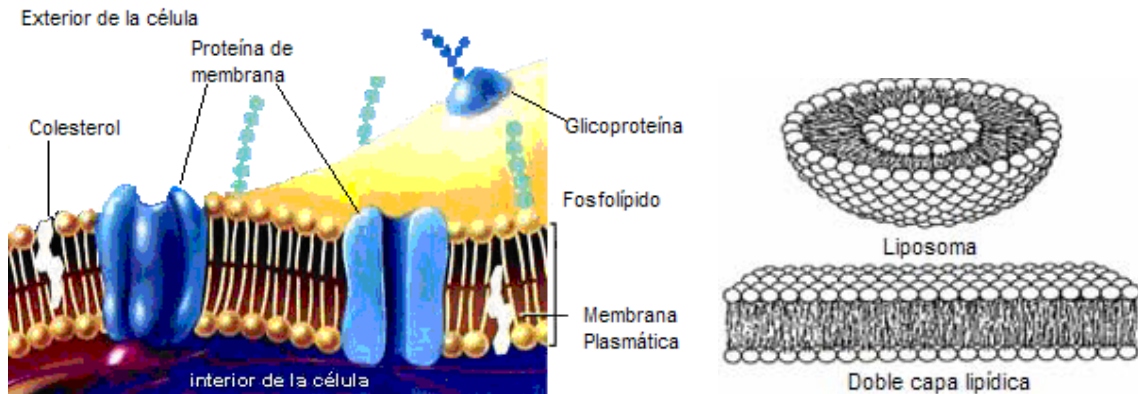
## 2.5 Liposomas

### 2.5.1 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 y se les aplica una fuerza externa formando una población de vesículas con rangos variados de tamaño que van desde diez nanómetros hasta diez micras de diámetro<sup>[20]</sup>.



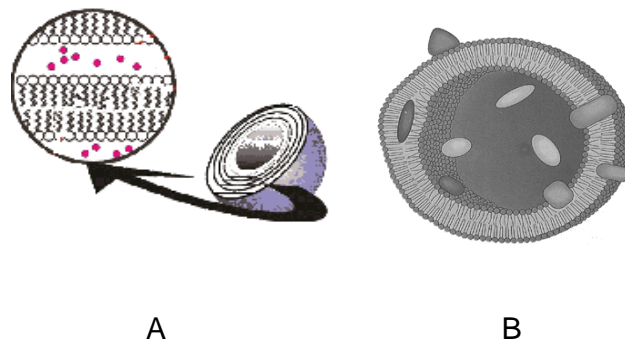
La estructura de bicapa lipídica no es exclusiva de los liposomas ya que esta conformación se encuentra en todas las membranas biológicas en donde además de incluirse la fosfolípidos encontramos proteínas y carbohidratos (Figura 2).



**Figura.15. 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 targetting (específico para cierto tipo de células u órganos)<sup>[21]</sup>.

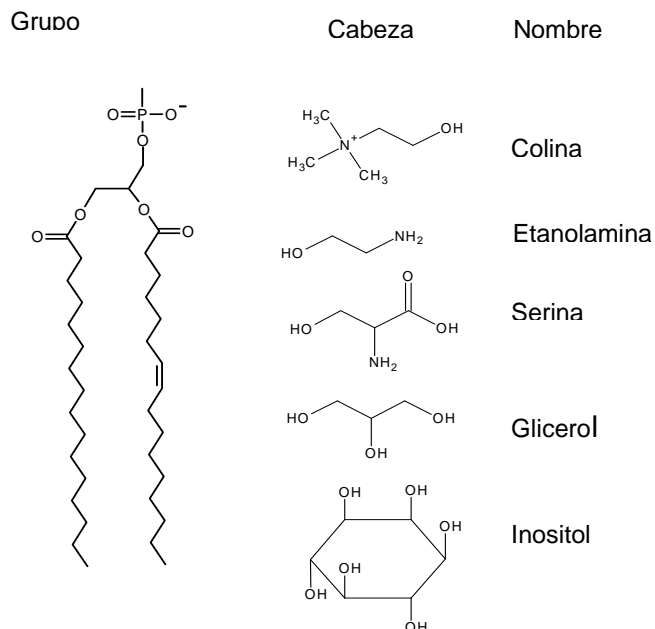
Cuando se incluye un fármaco en liposomas este queda atrapado en el centro del liposoma si se trata de un fármaco soluble en agua, pero si es insoluble o poco soluble este se verá atrapado en la fase lipídica del liposoma (entre las cadenas alifáticas) como se ejemplifica en la figura 16<sup>[22]</sup>.



**Figura 16. 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.**

## 2.5.2 Composición y clasificación

Los liposomas están formados en su mayoría por fosfolípidos. Los fosfolípidos son una clase de moléculas que tienen una cabeza polar con un grupo fosfórico y dos cadenas (colas) no polares formadas a partir de hidrocarburos. Dada esta conformación se clasifican como moléculas anfifílicas, que por tener actividad superficial reciben en nombre de tensoactivos. Hay muchas especies de fosfolípidos las cuales proceden de combinar diferentes cabezas polares y diferentes tipos de cadenas hidrocarbonadas



**Figura 17. Representación del grupo fosfatidil y los diferentes grupos que funcionan como cabeza polar de la molécula.**

La formación de agregados lipídicos en agua depende de varios factores como la concentración de fosfolípidos<sup>[20]</sup>, temperatura<sup>[23]</sup>, fuerza iónica<sup>[24]</sup> y presencia de otras moléculas<sup>[25]</sup>. 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>.

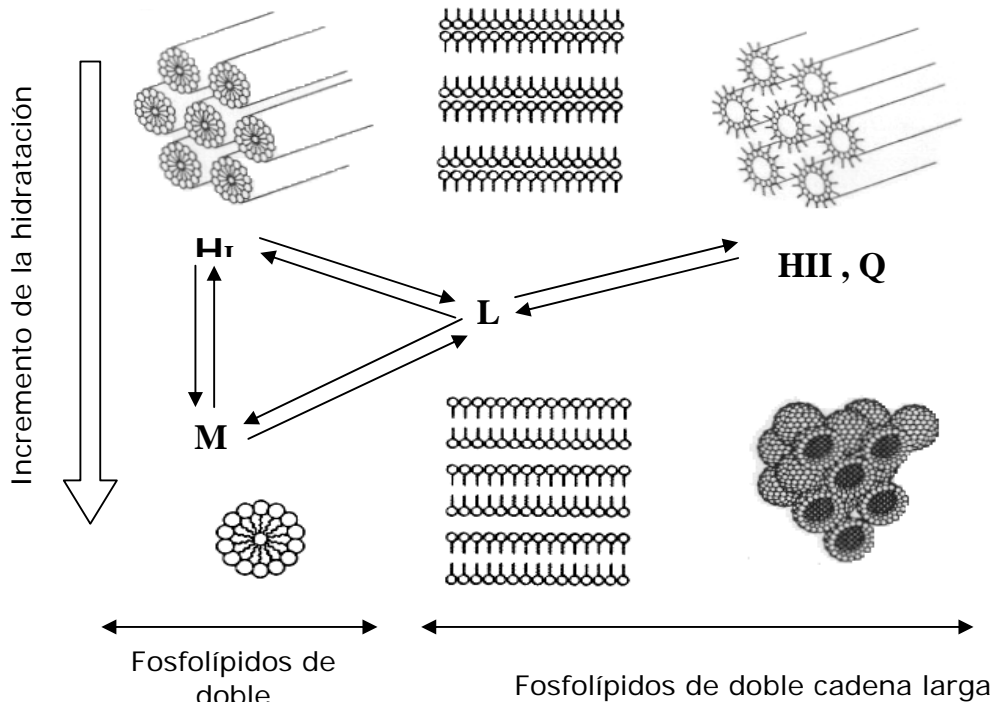
Las fases comúnmente encontradas en sistemas agua-lípidos son:

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.

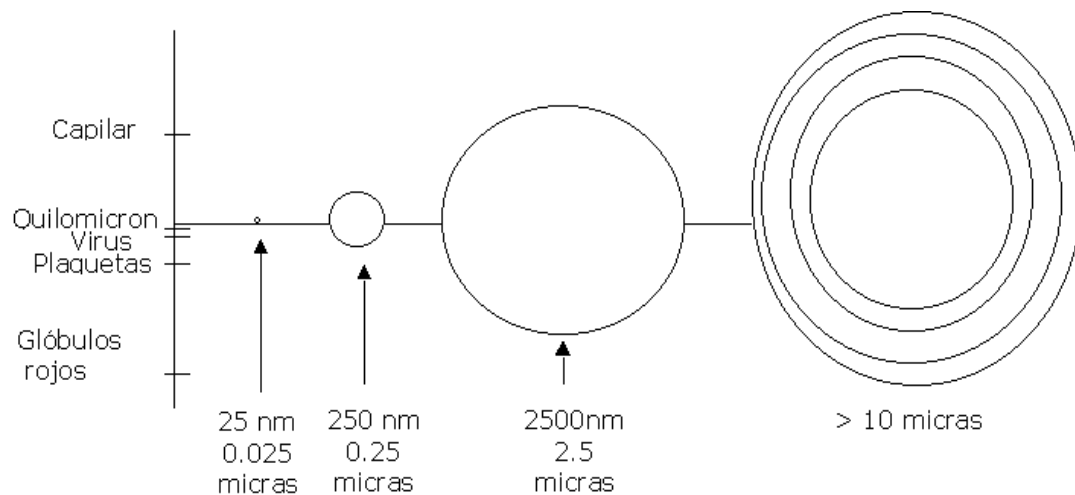
Cúbica (Q). Fase discontinua constituida de micelas esféricas con las cabezas polares formando una película continua orientada hacia fuera (agua)



**Figura 18. 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 19. Comparación entre de diferentes tamaños de liposomas y estructuras fisiológicas**

### 2.5.3 Metabolismo de liposomas

Dependiendo de su tamaño, carga eléctrica y composición, en el plasma sanguíneo los liposomas son atacados por lipoproteínas y opsoninas, 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 que se mencionan a continuación<sup>[16]</sup>:

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

#### **2.5.4 La lecitina, los esteroides y su importancia en los liposomas**

Los esteroides son importantes componentes de las membranas naturales y la incorporación de los esteroides dentro de la bicapa de los liposomas puede traer acerca de los mejores cambios en las propiedades de estas membranas. En los mamíferos el esteroide predominante es el colesterol, con una cantidad significativa de 7-dehidro-colesterol que es encontrado en las membranas subcelulares. Comúnmente los esteroides que se encuentran en las plantas son el estigmasterol y sitosterol mientras el ergosterol es un esteroide endógeno de hongos y algunos protozoarios. Las características comunes de todos estos esteroides son los grupos 3 B-hidroxil, núcleos planares de esteroides y una cadena lateral, estos grupos son esenciales para las características del comportamiento de los esteroides en la membrana para ser demostrado<sup>[22]</sup>.

El colesterol por sí mismo no forma estructuras en bicapas, pero puede ser incorporado hasta las membranas fosfolípídicas en altas concentraciones, por arriba de las proporciones molares 1:1 o 2:1 de colesterol a fosfatidilcolina. En membranas naturales, la proporción molar varía de 0.1 – 1, dependiendo de la anatomía y la localización celular. Siendo una molécula anfipática, el colesterol se inserta hasta la membrana con un grupo hidroxil orientado paralelamente a la superficie acuosa y la cadena alifática está alineada paralelamente a las cadenas acil en el centro de la bicapa. Los grupos 3-B-hidroxil están en posición en el mismo nivel con los residuos carboxilo de los ésteres vinculados a los fosfolípidos. La presencia de los núcleos de esteroides rígidos a lo largo de los primeros 10 carbonos de las cadenas de fosfolípidos tienen el efecto de reducir el libre movimiento de estos carbonos, mientras al mismo tiempo se crea un espacio de rango ancho del movimiento de los carbonos remanentes al final de la cadena. En ciertas concentraciones de colesterol el área de las membranas está ocupada por la combinación de las cadenas acil y esteroide en igual cantidad o equivalente a las que están ocupadas por las cabezas de fosfatidilcolina, las membranas de fosfatidilcolina con altos niveles de colesterol no muestran las cadenas inclinadas que son observadas en la fase de los compuestos de liposomas puros de fosfatidilcolina<sup>[22]</sup>.

A continuación se describen las características fisicoquímicas de la lecitina, el colesterol y el  $\beta$ -sitosterol.

Color	Casi blanco, pero es transformado rapidamente a Amarillo cuando entra en contacto con el aire
Estado Físico	
Nombre IUPAC	L- $\alpha$ -fosfatidilcolina
Sinónimos	Lecitina, fosfatidil colina , L- $\alpha$ -(dipalmitoil)lecitina .
Fórmula Molecular	$C_{42}H_{82}NO_8P$
Peso Molecular	760.09 g/mol
Estructura Química	
Solubilidad (A 20°C)	Insoluble en agua pero puede formar dispersiones coloidales. Soluble en 12 partes en: alcohol, cloroformo, éter, en aceites minerales y ácidos grasos.
Saponificación	196
Estabilidad	Estable, ligeramente sensible al calor y al aire, e incompatible con fuertes agentes oxidantes.
$d_4^{24}$	1.0305

Tabla 4. Datos Físicoquímicos de la Fosfatidilcolina

Color	Blanco
Estado Físico	Cristales
Nombre IUPAC	Colest-5-en-3 $\beta$ -ol
Sinónimos	Colesterin
Fórmula Molecular	$C_{27}H_{46}O$
Peso Molecular	386.64g/mol
Estructura Química	
Punto de fusión	148-150°C
Solubilidad (A 20°C)	Prácticamente insoluble en agua ( 0.2mg/100mL H <sub>2</sub> O), ligeramente soluble en alcohol , 1g/2.8mL éter, 1g/4.5mL cloroformo, también es soluble en benceno, aceites y grasas.
Estabilidad	Es estable . Incompatible con fuertes agentes oxidantes.
Densidad Especifica	1.07

Tabla 4. Datos Físicoquímicos del Colesterol

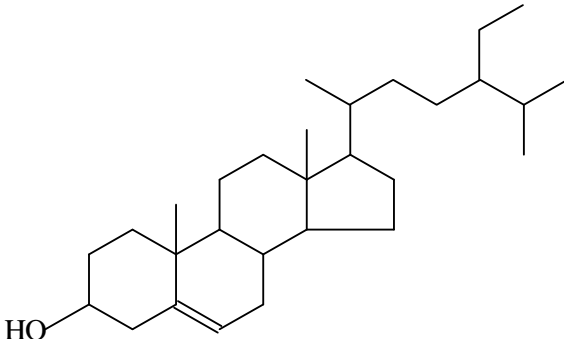
Color	Blanco
Estado Físico	Cristales
Nombre IUPAC	(3β)-estigmaste-5-en-3-ol
Sinónimos	Campesterol, 22:23-dihidroestigmasterol, α-dihidrofucosterol, α-fitosterol cincol, cupreol, sitosterin.
Fórmula Molecular	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub>
Peso Molecular	414.69 g/mol
Estructura Química	
Punto de fusión	138.15°C
Solubilidad (A 20°C)	Casi insoluble en agua, soluble en solventes orgánicos.
Estabilidad	Estable, sensible a temperaturas elevadas.

Tabla 6. Datos Fisicoquímicos del β-Sitosterol

### 2.5.5 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) 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 durante 15 minutos, garantizando tamaños pequeños y formas uniformes.

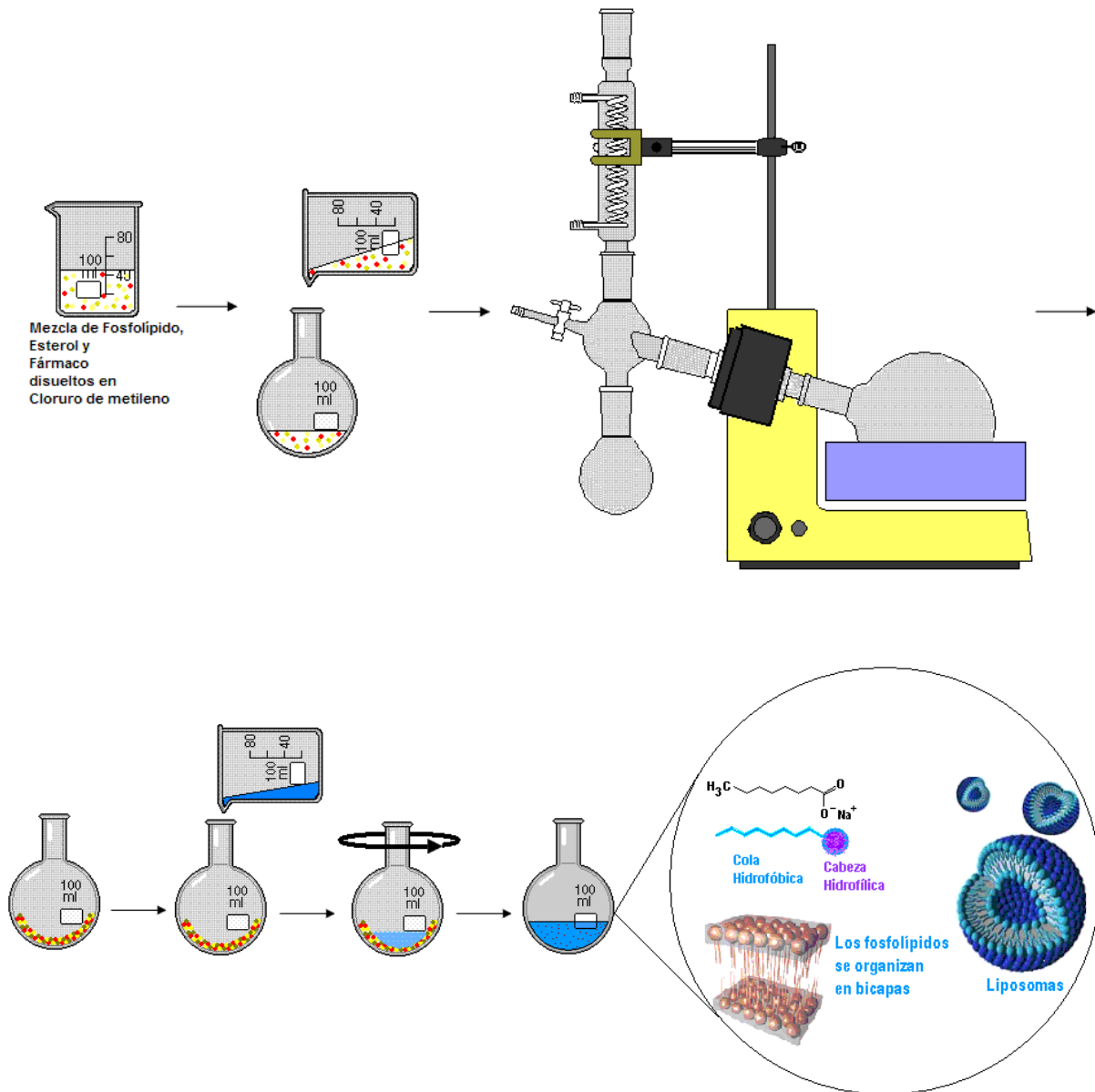


Figura 20. Método de evaporación en fase reversa

### 2.5.6 Caracterización de liposomas

El estudio de liposomas merita examinar diferentes características (Número de liposomas, el tamaño, la carga) 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:

### **2.5.6.1 Microscopía Óptica**

El microscopio óptico es esencial para el análisis de muestras pequeñas, debido a que se emplea para aumentar o ampliar las imágenes de objetos y organismos no visibles a simple vista. Las partículas no coloreadas se captan en el microscopio como faltos de color y transparentes, con poca estructura interna, puesto que no presentan suficiente contraste. Con la ayuda de coloraciones se consigue una absorción diferencial de luz de modo que las distintas estructuras se visualizan.

### **2.5.6.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

El microscopio electrónico de barrido (SEM) es un instrumento que permite la observación y caracterización superficial de materiales orgánicos e inorgánicos, entregando información morfológica del material analizado. A partir de él se producen distintos tipos de señales que se generan desde la muestra y se utilizan para examinar muchas de sus características. Las principales utilidades del SEM son la alta resolución ( $\sim 100\text{\AA}$ ), la gran profundidad de campo que le da la apariencia tridimensional a las imágenes y la sencilla preparación de las muestras. El SEM cuenta con una resolución de 3 nm en alto vacío y una magnificación de hasta 300,000X (Fig. 21).

Cuando el haz de electrones choca contra la muestra, ocurren interacciones entre dichos electrones y los átomos que componen la muestra. De ahí surgen señales tales como: electrones secundarios, electrones retrodifundidos, rayos x característicos, electrones Auger, catodoluminiscencia. Todas estas señales se producen simultáneamente pero cada una de ellas son captadas por detectores diferentes.

Uno de los detectores más comunes es el de electrones secundarios. Los mismos son emitidos desde la muestra como consecuencia de las ionizaciones surgidas de las interacciones inelásticas. Por esta razón, poseen baja energía (50 eV). Ellos brindan una imagen de la morfología superficial de la muestra. Por lo anterior la evaluación morfológica de las partículas se realiza mediante la técnica de microscopía electrónica de

barrido ya que con ella es posible contar con una evidencia del tamaño y forma de los liposomas obtenidos.

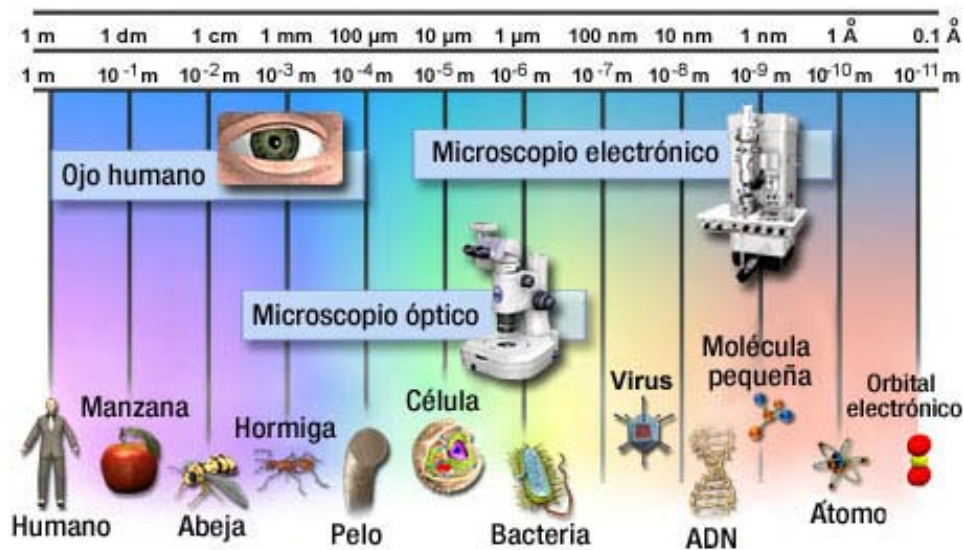


Figura 21. Relación de tamaños y partículas

### 2.5.6.3 Tamaño de partícula ( $\phi$ )

Se realiza mediante PCS (espectroscopia de correlación de fotones) y LD (difracción láser). La primera técnica mide la fluctuación de la intensidad de la dispersión de la luz causada por el movimiento de las partículas. La segunda se basa en el ángulo de difracción de la luz producido por las partículas, a menor tamaño se observan ángulos más grandes. Los equipos miden el tamaño de partícula de acuerdo a la intensidad, volumen y número<sup>[29]</sup>.

### 2.5.6.4 Potencial Z ( $\zeta$ )

La medición de este parámetro ayuda a predecir la estabilidad de las dispersiones coloidales. La medición se basa en la movilidad electroforética de las partículas, para lo cual existen varios métodos para medir este parámetro. La agregación disminuye a valores altos de potencial Z (mayores de +30mV y menores de -30mV) debido a la repulsión de las partículas cargadas. El conocimiento del potencial zeta es determinante

para estimar la unión a macrófagos y la agregación entre partículas. Prácticamente todos los coloides acuosos son negativos -14mV a -30mV. A más negativo la estabilidad aumenta, esto se consigue por la adición de electrolitos aniónicos. Si el potencial es de -30mV o menos, la repulsión es suficiente para conferir una gran estabilidad y entre -45 y 70 mV la estabilidad esta asegurada<sup>[29]</sup>.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo General**

- Elaborar liposomas con deltametrina y diferentes esteroides, utilizando el método de evaporación en fase inversa, para conocer cómo la relación Lecitina (LC):Esterol (Est) influye en tamaño y potencial Z de las vesículas formadas.

#### **3.2. Objetivos Particulares**

- Elaborar liposomas con deltametrina por el método de evaporación en fase inversa.
- Estudiar la influencia de la variación de la relación deltametrina/esteroles (colesterol y  $\beta$ -sitosterol) en el tamaño y potencial zeta de liposomas
- Determinar si los liposomas de deltametrina funcionan como un sistema de liberación controlada, para una posterior formulación.

## IV. Parte Experimental

### 4.1. Reactivos

- Cloruro de Sodio  
Cristales  
J.T. BAKER
- Hidroxido de Sodio  
Perlas  
J.T. BAKER
- Fosfato de Sodio Dibásico 12-Hidratado  
Cristales  
J.T. BAKER
- Fosfato de Sodio Monobásico Monohidratado  
Cristales  
J.T. BAKER
- Colesterol  
5-colesten-3 $\beta$ -ol  
Cristales  
Grado de pureza 99+ %  
SIGMA
- $\beta$ -Sitosterol  
Cristales  
Grado de pureza 44 %  
ALDRICH
- Lecitina  
L- $\alpha$ -fosfatidilcolina  
Grado de pureza 60 %  
SIGMA

## **4.2. Equipos e Instrumentos**

- Evaporador Rotatorio  
Modelo: LABOROTA 4000  
Marca: Heidolph
  
- Sonicador  
Modelo: Cole-Parmer 8890  
Marca: Cole Parmer
  
- Balanza Analítica  
Modelo: Explorer  
Marca: Ohaus
  
- Espectrofotómetro  
Modelo: S-2000  
Marca: Ocean Optics, Inc.
  
- pH / mV / °C meter  
Modelo: pH-500 Series  
Marca: Cole Parmer
  
- Microscopio Electrónico de Barrido  
Modelo: JSM-5900LV  
Marca: Jeol
  
- Zetasizer  
Modelo: ZS 3600  
Marca: Malvern Instrument

### 4.3. Metodología

#### 4.3.1 Formación de liposomas

El método empleado para la preparación de los liposomas con deltametrina durante este trabajo fue el de evaporación en fase reversa. Se empleó como disolvente orgánico Diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) y solución reguladora de fosfatos pH=7.5 concentración 0.1M para resuspender.

La solución reguladora de fosfatos pH= 7.5 se con el fosfato monobásico o dibásico y se titula dependiendo de lo anterior con una base o con un ácido, se ajusta le fuerza ionica a 0.1M con cloruro de sodio.

Para llevar a cabo este trabajo se procedió a preparar 25 mL de solución a una concentración final de 0.0001 M, conforme a los siguientes diagramas.

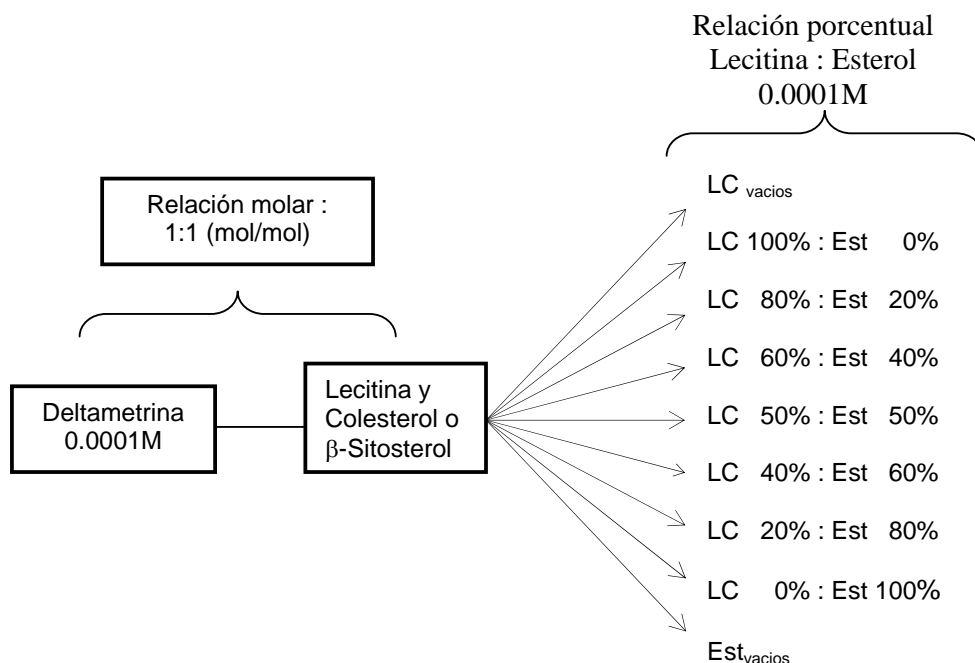


Figura 22. Diagrama que muestra la relación deltametrina/lecitina/esterol en la formulación de cada serie.

Como ya se mencionó anteriormente los liposomas de deltametrina, compuestos de Lecitina y de un estero (Colesterol o  $\beta$ -Sitosterol) se elaboran por el método de evaporación por fase reversa.

Se prepara una solución stock para cada una de las muestras (Deltametrina, Lecitina, Colesterol y  $\beta$ -Sitosterol) a una concentración 0.001M de la cual se toman las alícuotas correspondientes para preparar 25 mL de cada muestra de acuerdo a las relaciones presentadas en el diagrama anterior, la concentración de deltametrina es constante (0.0001M) y se varia la concentración de lecitina y estero dependiendo del porcentaje requerido para tener una concentración de 0.0001M. Los componentes se encuentran disueltos en dicloro metano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ). Se colocan los 25 mL de la muestra en un matraz bola de 1000mL, éste se coloca en el rotavapor a una inclinación de  $45^\circ$  a una temperatura de  $35^\circ\text{C}$  y 90rpm a presión reducida hasta formar una película con los lípidos y la deltametrina en el matraz y que todo el solvente orgánico haya sido evaporado. Luego se rehidrata la película con 25 mL de buffer de fosfatos a un pH= 7.5 y FI=0.1M de NaCl, se agita con fuerza para promover la formación de los liposomas, las muestras son vertidas en frascos adecuados (de 30mL) para el volumen obtenido se etiquetan y seguido de esto la muestra se somete a sonicación de 60KHz, a temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}$ ) durante 15 min para homogenizar el tamaño y la forma de los liposomas. Ya teniendo las muestras de los liposomas de deltametrina se procede a su caracterización.

Cabe mencionar que se elaboran muestras siguiendo las mismas relaciones establecidas en el diagrama anterior pero sin el fármaco (deltametrina), estas muestras son los blancos.



b) El procedimiento para la elaboración de los liposomas fue la siguiente

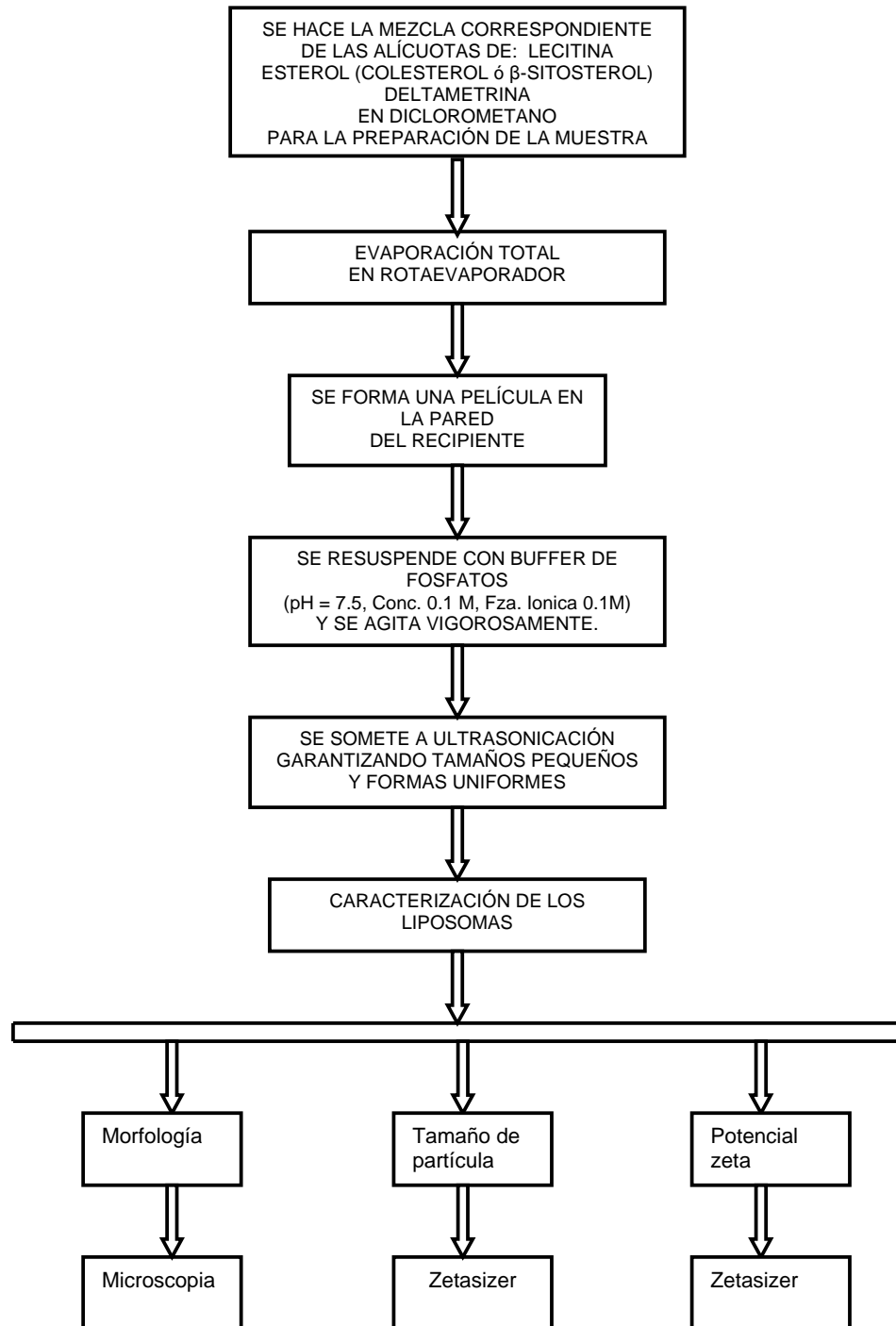


Figura 23. Metodología para elaboración y caracterización de liposomas.

### 4.3.2. Formación de Liposomas

Para conocer la influencia de diferentes tipos de esteroides y de la variación de las cantidades de los mismos en la elaboración liposomas y su contribución directa en el sistema de liberación de la deltametrina, se propusieron las siguientes relaciones molares de Lecitina /Esterol (tabla 4.1) manteniendo constante la concentración de la deltametrina en 0.0001M. El volumen de las muestras es de 25mL.

<b>Deltametrina</b>	<b>%Lecitina</b>	<b>%Esterol</b>
0.0001M	100 0.0001M	0
0.0001M	80 0.00008M	20 0.00002M
0.0001M	60 0.00006M	40 0.00004M
0.0001M	50 0.00005M	50 0.00005M
0.0001M	40 0.00004M	60 0.00006M
0.0001M	20 0.00002M	80 0.00008M
0.0001M	0	100 0.0001M

**Tabla. 7 Relaciones molares lecitina/esterol para las formulaciones**

Y para la recuperación de la capa lipídica formada en el matraz se utilizó para este caso es buffer de fosfatos pH 7.5 con una fuerza iónica 0.1M.

### **4.3.3. Caracterización de los liposomas.**

#### **4.3.3.1 Microscopía Óptica**

Para cada muestra se procede de la siguiente manera, se agita la muestra (aproximadamente 30 segundos) se toma una alícuota la cual es situada en el porta objetos, se le coloca azul de metileno y se cubre con el cubreobjetos y se coloca en la platina del microscopio, se observa con los objetivos de 10x, 40x y 100x.



**Figura 24. Microscopio Óptico**

#### **4.3.3.2 Microscopía Electrónica de Barrido (SEM)**

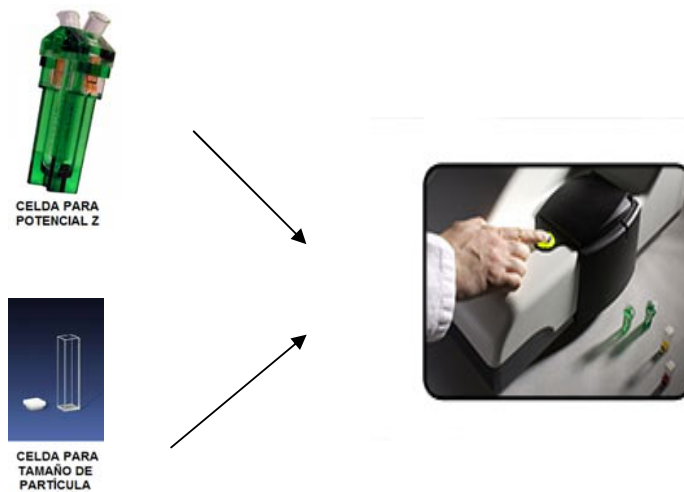
A cada una de las muestras obtenidas se procedió de la siguiente manera, se agita la muestra (por aproximadamente 30 segundos), se toma una alícuota se sitúa en papel carbón adecuado para el microscopio y se deja secar, luego se coloca la muestra en el microscopio y se observa para obtener la micrografía.



**Figura 25. Microscopio Electrónico**

### 4.3.3.3 Tamaño ( $\phi$ ) y potencial Z ( $\zeta$ )

Las muestras obtenidas son líquidas, para medir el tamaño de partícula se agitan (aproximadamente durante 30 segundos), se toman 2mL de la muestra y se coloca en la celda de cuarzo, se deja reposar durante 15 minutos esto es para evitar que el movimiento causado a las moléculas por la agitación afecte la medición, luego de transcurrido el tiempo de reposo se mide el tamaño de partícula. Para la medición del potencial Z se sigue el mismo procedimiento pero colocando la muestra en una celda para potencial Z.



**Figura 26. Zetasizer así como las celdas que usa el equipo para potencial Z y para tamaño de partícula.**

## **V. Resultados y Análisis de resultados**

### **5.1 Aspecto de las dispersiones.**

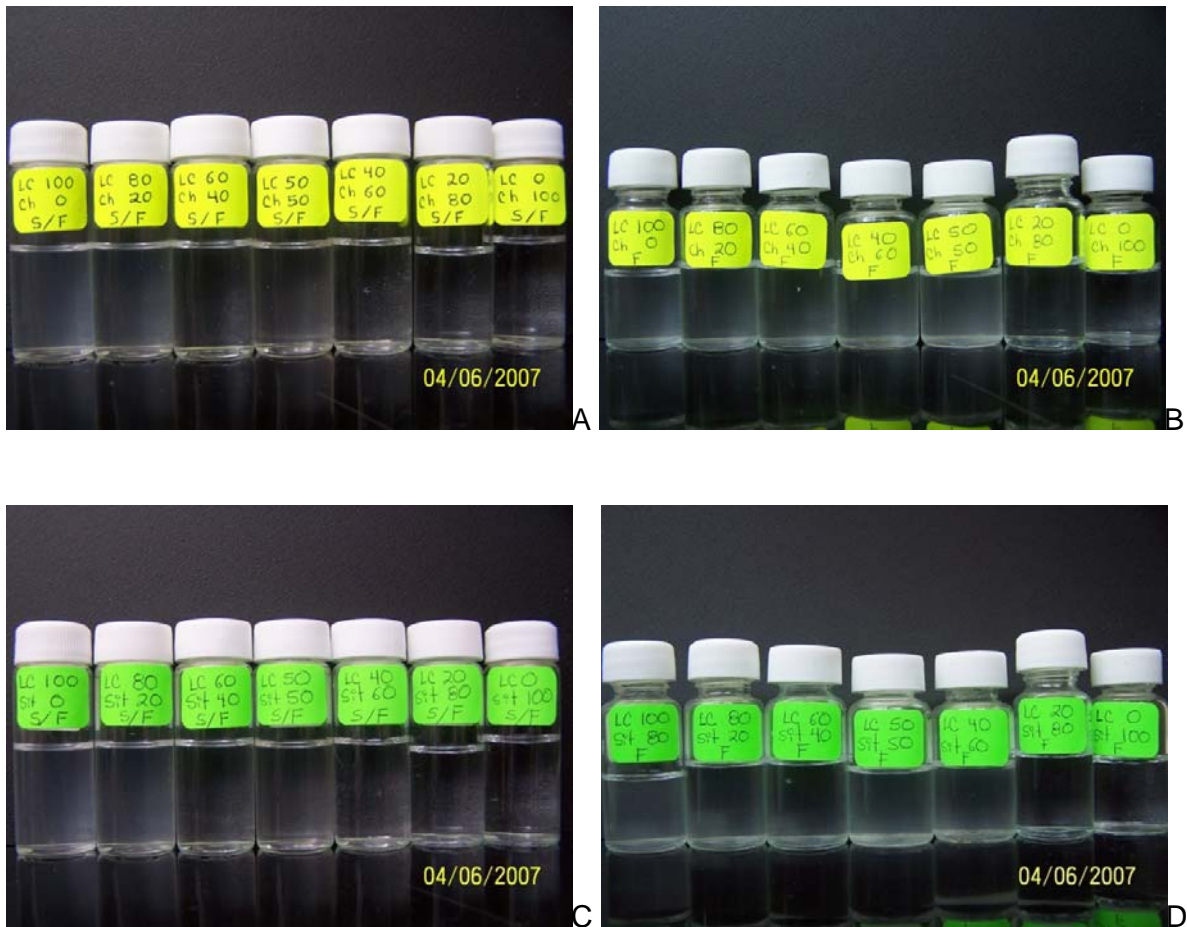
El aspecto que presentan en general las dispersiones de liposomas tienden a ser visualmente homogéneas entre las muestras de cada serie. Para todas las series la apariencia física de las muestras es translúcida sin separación de fases durante los primeros 3 a 4 días, cabe mencionar que para las proporciones de Lecitina 20% - Esterol 80% y Lecitina 0% -Esterol 100% en ambas series (colesterol y  $\beta$ -sitosterol) se da la presencia de partículas visualmente más grandes de color blanco aunque éstas son casi imperceptibles. Hay evidencia para suponer que este comportamiento es por la alta hidrofobicidad que presentan los esteroides, al estar en concentraciones elevadas se perciben de una manera más definida, ya que se ha encontrado en la bibliografía que los esteroides por si solos no son capaces de formar micelas ni liposomas. Después de 4 o 5 días presentan sedimentación en el fondo del frasco, el precipitado presenta una coloración blanco-lechosa y es fácilmente resuspendible ya que la muestras vuelven a tornarse uniformes después de agitarlas recobrando así su aspecto inicial.

Lo anterior se entiende con base a las características propias de las suspensiones floculadas, ya que no se observa la presencia de un sedimento compacto (cake), cuyo proceso de sedimentación se da de manera muy organizada, haciendo así que la adhesión entre las partículas sea muy fuerte y por lo tanto no fácilmente rompibles.

Las partículas defloculadas descienden en sedimento y son gradualmente comprimidas por el peso de cada una de ellas; la barrera energética es entonces vencida, permitiendo a las partículas ponerse en contacto unas con otras. Para resuspender y redispersar estas partículas, es necesario nuevamente vencer esta barrera energética alta. Ya que este no es fácilmente alcanzable por la agitación, las partículas tienden a permanecer fuertemente atraídas unas con otras y formar un cake duro ( sedimento compacto muy sólido). Cuando las partículas están floculadas, la barrera energética es aún mas grande para ser remontada, y entonces las partículas aproximadas residen en la segunda mínima energía, el cual está a una distancia de separación de aproximadamente de 1000 a 2000 Å. Esta distancia es suficiente para formar floculos de estructuras laxas.

En resumen las partículas defloculadas están débilmente unidas, el descenso rápido no forma un cake y son fácilmente resuspendibles; las partículas defloculadas descienden lentamente y eventualmente forman un sedimento en el cual la agregación ocurre con la siguiente conformación de un cake duro que es difícil de resuspender.

A continuación se presentan las muestras obtenidas de los liposomas con deltametrina.



**Figura 27. A) Serie de liposomas de Lecitina(Lc) y Colesterol(Ch) sin fármaco, B) Serie de liposomas de Lecitina(Lc) y Colesterol(Ch) con fármaco, C) Serie de liposomas de Lecitina(Lc) y Sitosterol (Sit) sin fármaco y D) Serie de liposomas de Lecitina(Lc) y Sitosterol(Sit) con fármaco**

## 5.2 Microscopía Óptica.

La presencia de liposomas se verificó mediante microscopía óptica, con esto se pudo constatar para todas las relaciones de las muestras obtenidas- la presencia de liposomas,

de forma general el número de liposomas que se observa en todas las muestras no es constante ya que como se puede observar en las figuras en algunos casos si se observa mayor presencia de liposomas que en otras muestras.

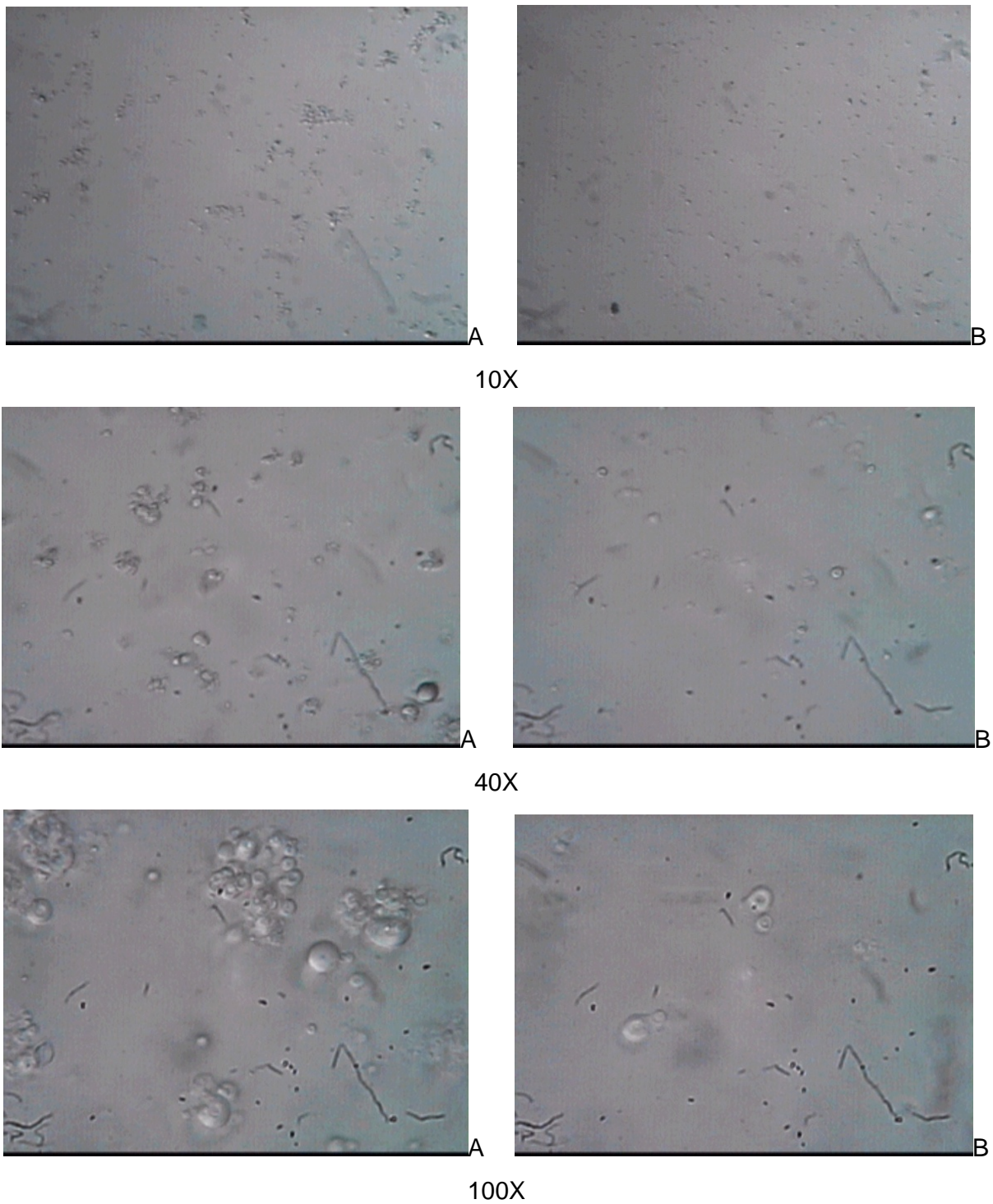
% Lecitina		100		80		60		50		40		20		0	
Serie	Contiene fármaco	Ch.	Sit.	Ch.	Sit.	Ch.	Sit.	Ch.	Sit.	Ch.	Sit.	Ch.	Sit.	Ch.	Sit.
Presencia de liposomas	F	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
	S/F	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
Formas esféricas o de dona	F	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	-	-	-	-
	S/F	++	++	+++	+++	++	++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
Formas amorfas	F	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	S/F	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
Poblaciones aglomeradas	F	++	++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-
	S/F	+	++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-

Ch = Colesterol  
 Sit =  $\beta$ -Sitosterol  
 +++ = Presencia  
 ++ = Regular presencia  
 + = Poca presencia  
 - = Ausencia

**Tabla 8. Observaciones en microscopio óptico y las características visuales que presentaron cada una de las series de liposomas.**

Observando la morfología de aquellos que son de mayor tamaño (mayores 10 $\mu$ m) se presentan con una forma redonda y de dona, también se puede observar que se encuentran en algunos casos en forma de agregados. Para los liposomas más pequeños (menores a 10 $\mu$ m) que no se aprecian por microscopía óptica se realizó una Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Las imágenes por microscopía óptica que se muestran a continuación corresponden a las muestras con una concentración de 50% Lecitina y 50% esterol para ambas series, esto se debe a que en ambas series es en donde mejor se aprecia las poblaciones de los liposomas.



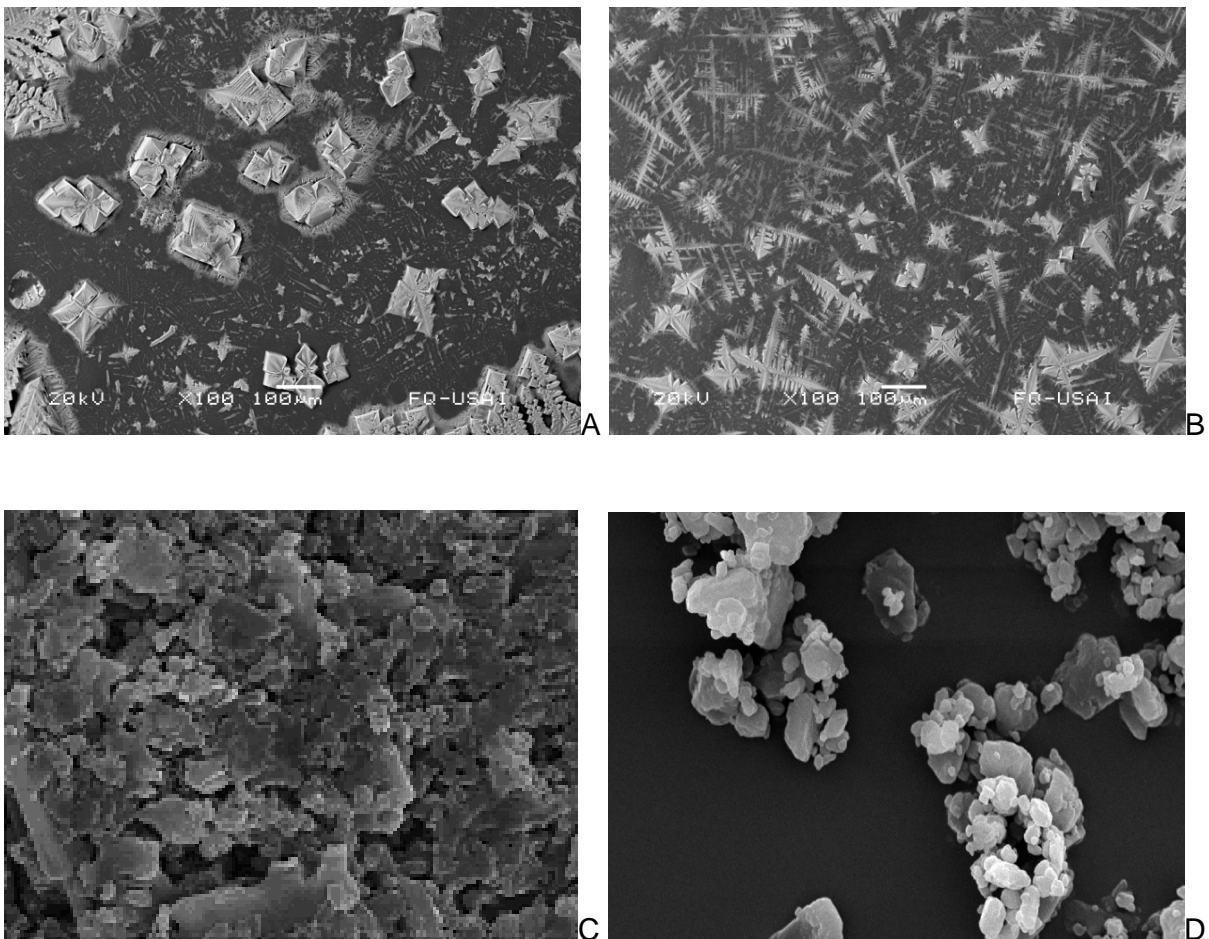
**Figura 28.. Microscopía Óptica de las muestras A) LC50 Ch50 y B) LC50 Sit50 en los aumentos de 10x, 40x y 100x**

### **5.3 Microscopia electrónica de Barrido (SEM).**

Se tomaron micrografías electrónicas de las materias primas: deltametrina, lecitina, colesterol y  $\beta$ -sitosterol con la finalidad de observar aspectos morfológicos. En estas



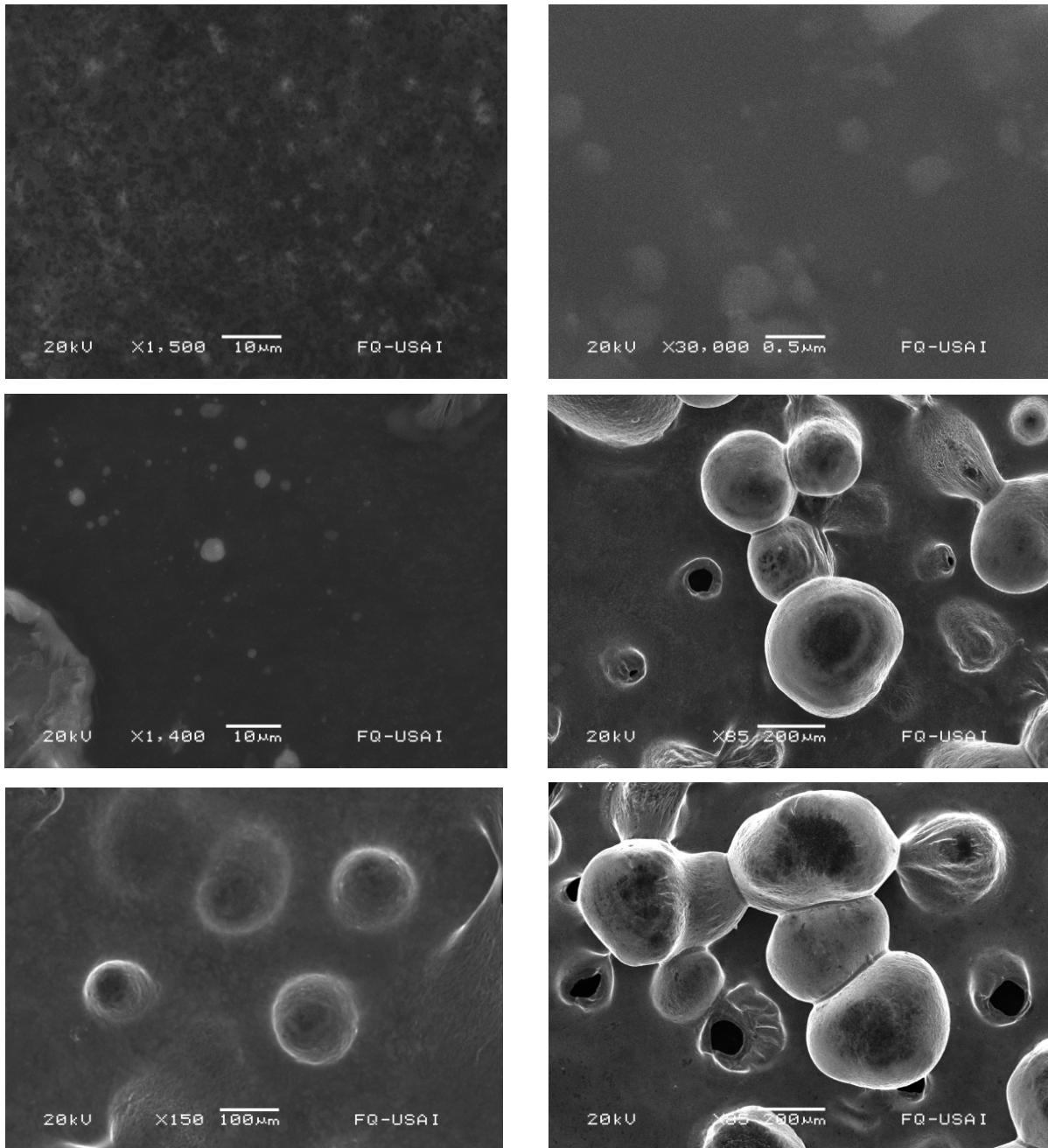
micrografías se observa una estructura en forma de cristales tanto para el colesterol como para el  $\beta$ -sitosterol, las estructuras de estos presentan una gran similitud entre si como era de esperarse debido a que su estructura química varía sólo por un grupo etilo (tablas 4, 5 y 6). Para la micrografía correspondiente a la lecitina se puede observar una estructura no cristalina con un aspecto butiráceo lo cual es de esperar ya que se trata de una mezcla de fosfolípidos. Con lo que respecta a la micrografía de la deltametrina se puede apreciar que hay agregados y la forma de los cristales es diferente a la del caso de los esteroides lo cual indica que cristalizan en un sistema diferente.



**Figura 29. Microscopia Electrónica de Barrido de A)  $\beta$ -sitosterol, B) Colesterol, C) Lecitina y D) Deltametrina.**

En las micrografías correspondientes a los liposomas se confirma efectivamente la presencia de estos, de una manera mas clara se observa con respecto a la microscopia óptica la morfología presentada por lo liposomas, éstos son esféricos. Se advierte la

presencia de tamaños muy variados desde aproximadamente 200 $\mu\text{m}$  hasta aproximadamente 150nm, éste es un intervalo grande lo que indica la existencia de poblaciones muy variables en cuanto a tamaños. Esto nos lleva a considerar la presencia de liposomas son multilamelares o debido a que se puede observar una fusión entre ellos podríamos pensar que los liposomas pequeños se han fusionado para dar estos liposomas de mayor tamaño lo cual puede deberse al proceso de liofilización por alto vacío de la cámara del equipo de SEM favorece la fusión de partículas y apelmazamiento como se ha informado en la bibliografía cuando no hay crioprotectores<sup>[30]</sup>.



A

B

**Figura 30. Micrografías electrónicas de las muestras A) LC50 Ch50 y B) LC50 Sit50 con fármaco.**

## **5.4 Tamaño de Partícula ( $\phi$ )**

La medida del tamaño de partícula es un parámetro extremadamente importante debido a que la estabilidad, la reactividad química, la opacidad, la fluidez de los fármacos son afectadas por el tamaño y las características de las partículas

Como se ha mencionado antes una de las ventajas de los liposomas es su capacidad de incluir moléculas de formas y tamaños diferentes, así como de sus características hidrofóbicas e hidrofílicas. En caso de componentes lípidos solubles los cuales son incorporados dentro de la membrana la máxima cantidad tomada por los liposomas es directamente proporcional a la cantidad de los componentes en la membrana esto es independiente del tamaño de los liposomas <sup>[31-33]</sup>.

El tamaño de partícula es un parámetro que depende de las variables del proceso de formación de liposoma, entre estas se encuentran numerosos factores que intervienen en el proceso como lo son el grosor de la capa de lípidos formada en el matraz después de la evaporación, el acomodo de las bicapas lipídicas al momento de rehidratar, el tiempo de agitación para la formación de los liposomas así como el tiempo de sonicación.

Para este caso en específico uno de los factores a considerar principalmente es el uso de dos tipos de esteroides (colesterol y el  $\beta$ -sitosterol) y la variación porcentual de estos con respecto a la lecitina en la composición molar.

Es importante recordar que se trabajaron con formulaciones blanco las cuales consistían en la misma relación molar pero con la excepción de que éstas no contienen principio activo (liposomas vacíos o liposomas sin fármaco).

En la tabla siguiente se muestran los resultados para cada una de las formulaciones realizadas

% Lecitina	Colesterol		$\beta$ -Sitosterol	
	Tamaño de partícula (nm)		Tamaño de partícula (nm)	
	Liposomas vacíos	Liposomas con Fármaco	Liposomas vacíos	Liposomas con Fármaco
100	256.8	156.6	256.8	156.6
80	165	137.2	235.4	787.4
60	203.4	339	254.6	998.8
50	213	494.4	653.4	408.8
40	232.8	315.6	714.17	620
20	359.8	489.2	837	914.8
0	269.4	424.4	486	307

Tabla 9. En la siguiente tabla se observan los valores promediados de los tamaños que presentan cada una de las muestras.

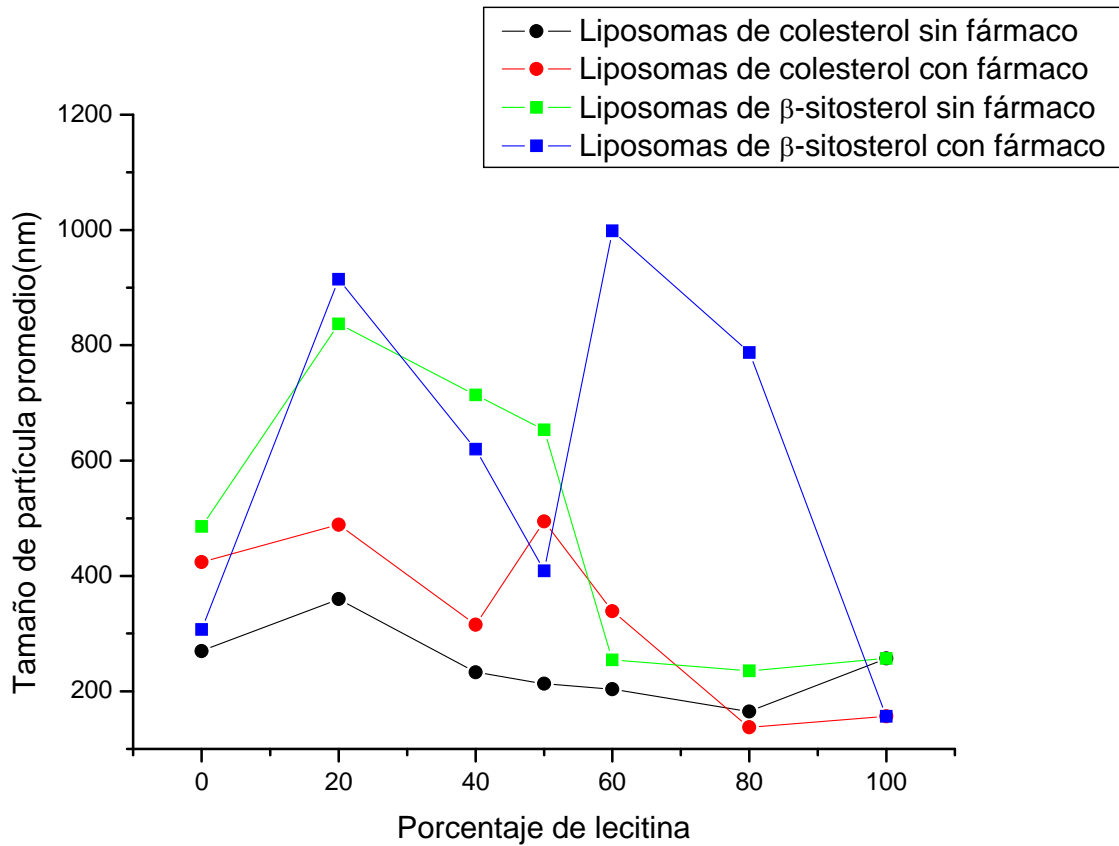


Figura 31. Gráfica del tamaño de partícula de las formulaciones obtenidas de liposomas.

El tamaño de los liposomas vacíos tanto para los de colesterol como para los de  $\beta$ -sitosterol es un tamaño menor que para aquellos que tienen incorporada la deltametrina. Lo cual puede ser un indicativo de que el fármaco interviene en el tamaño de las vesículas formadas, esto puede deberse a que el fármaco es hidrofóbico y se incorpora intercalándose entre las bicapas lipídicas que conforman la membrana de los liposomas en lugar del interior de los mismos en donde el medio es acuoso. Con lo anterior se estaría corroborando la encapsulación del fármaco en los liposomas elaborados.

Si se compara el tamaño de las vesículas formadas del colesterol con respecto al  $\beta$ -sitosterol el tamaño presentado por los liposomas en relación al  $\beta$ -sitosterol son mayores tanto en el caso de liposomas vacíos como en presencia del fármaco lo cual esta en concordancia con el volumen de cada una de estas moléculas, colesterol  $1239 \text{ \AA}^3$  y  $1321 \text{ \AA}^3$ .

Cuando se adicionan esteroides como parte de los lípidos para formar la membrana de los liposomas, independientemente cual de ellos sea, se advierte que el tamaño aumenta a medida que se incrementa la proporción de los mismos respecto a la lecitina, se mantiene una no muy clara tendencia en la aumento del tamaño de partícula. Esto se puede deber al volumen extra que ocupan los esteroides dentro de la bicapa, pero al llegar a una cantidad determinada (50%), es decir relación molar 1 a 1, el número de cadenas acílicas y esteroides se iguala entre ellos y con el grupo fosfatidilcolina, evitando la inclinación típica de la fase gel de la lecitina y por lo tanto dando un aumento al volumen total de las vesículas. A 60% de esterol, la formación de vesículas no se ve favorecida por la presencia de éste, así que de nuevo se forman liposomas con proporciones adecuadas, lo cual hace que el comportamiento sea similar al observado en relaciones menores. A partir del 50% de esterol en la mezcla que conforma a los liposomas, pareciera que los liposomas formados tienen una composición similar a los anteriores probablemente debido a que el esterol por encima de estas cantidades no es capaz de formar vesículas estables.

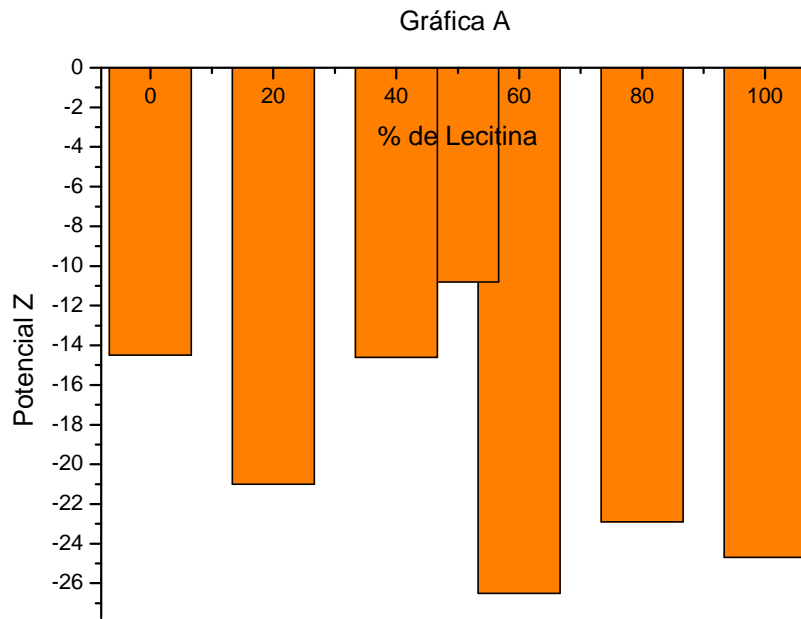
A grandes proporciones de esteroides, la cantidad de lecitina es muy pequeña por lo cual es probable que aunque se formen liposomas esto sea en menor concentración y lo que se mide es una suspensión de fármaco y esterol, ya que las medidas concuerdan con estándares de estas sustancias. Para los casos en los que la formulación está conformada al 100% del esterol y 0% de la lecitina está informado en la bibliografía que el colesterol ni

el  $\beta$ -sitosterol por si solos no tiene la capacidad de formar vesículas en este caso liposomas<sup>[34, 35]</sup>.

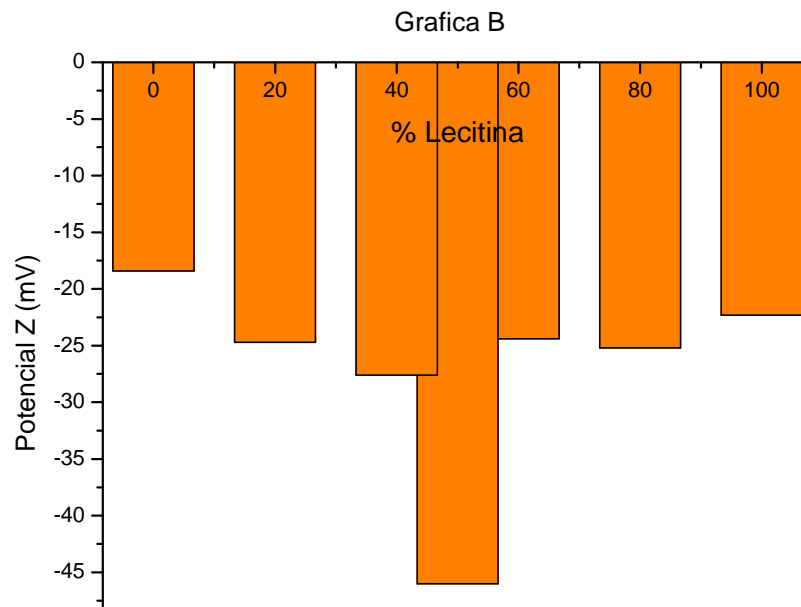
### **5.5 Potencial Z ( $\zeta$ )**

Casi todas las partículas en contacto con un líquido presentan una carga eléctrica en su superficie. Un punto de particular interés es el potencial donde se unen la capa difusa y la de Stern. Este potencial es conocido como el potencial zeta, el cual es importante porque puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial no pueden medirse. El potencial zeta puede ser una manera efectiva de controlar el comportamiento del coloide puesto que indica cambios en el potencial de la superficie y en las fuerzas de repulsión entre los coloides. Dicho de otra manera el potencial Z es un parámetro indicativo de la estabilidad de sistemas coloidales farmacéuticos como los liposomas obtenidos para cada una de las formulaciones, es decir que tanto pueden atraerse las partículas para formar agregados. Se recomienda que para resuspender fácilmente este tipo de preparados, el potencial Z tenga valores por debajo de +30mV o por debajo de -30mV, en donde está demostrado que las fuerzas de repulsión son menores que las de atracción.

A continuación se muestran las gráficas correspondientes a los liposomas vacíos de colesterol y  $\beta$ -sitosterol así como las gráficas correspondientes a los liposomas de colesterol y  $\beta$ -sitosterol ya con fármaco incorporado.

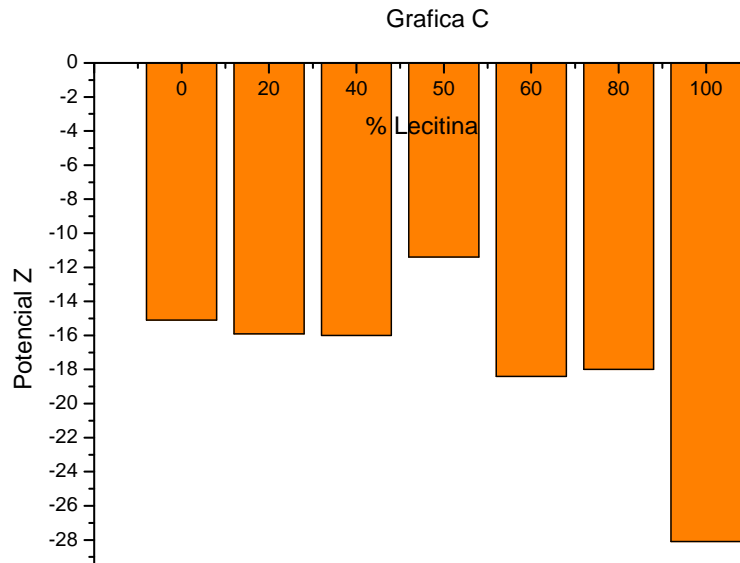


A) Liposomas de colesterol sin fármaco

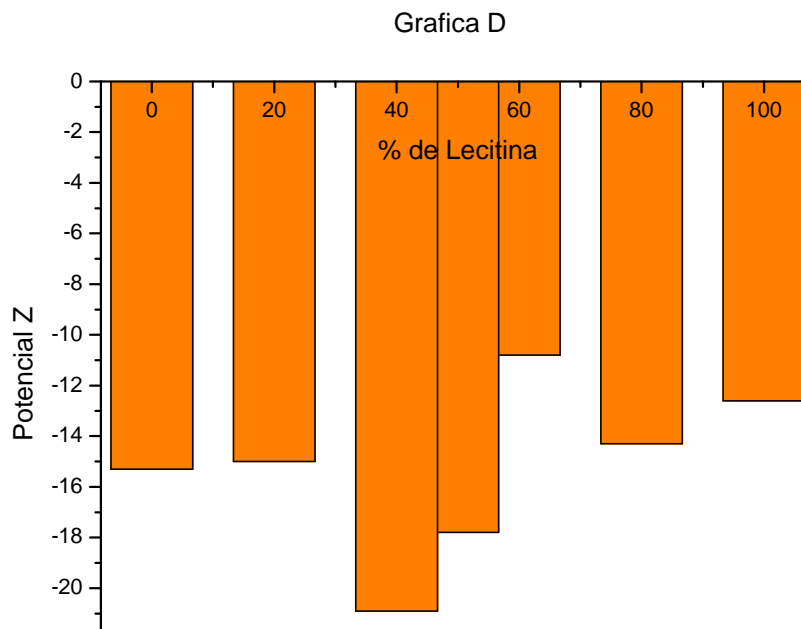


B) Liposomas de colesterol con fármaco





C) Liposomas de  $\beta$ -sitosterol sin fármaco.



D) Liposomas de  $\beta$ -sitosterol con fármaco.

Figura32 Gráficas de Potencial Z: A) Liposomas de colesterol sin fármaco, B) Liposomas de colesterol con fármaco, C) Liposomas de  $\beta$ -sitosterol sin fármaco y C) Liposomas de  $\beta$ -sitosterol con fármaco.

De las graficas que acabamos de observar se obtuvo la siguiente tabla con los valores promedio obtenidos para las formulaciones de liposomas.

% Lecitina	Colesterol		Sitosterol	
	Potencial Z (mV)		Potencial Z (mV)	
	Liposomas vacíos	Liposomas con Fármaco	Liposomas vacíos	Liposomas con Fármaco
100	-24.7	-22.3	-24.7	-22.3
80	-22.9	-25.2	-15.9	-14.3
60	-26.5	-24.4	-16	-10
50	-10.8	-46	-11.4	-17.8
40	-14.6	-26.7	-18.4	-10.9
20	-21	-24.7	-18	-15
0	-14.5	-18.4	-28.1	-15.3

Tabla 10. En la siguiente tabla se observan los valores promediados de los tamaños que presentan cada una de las muestras.

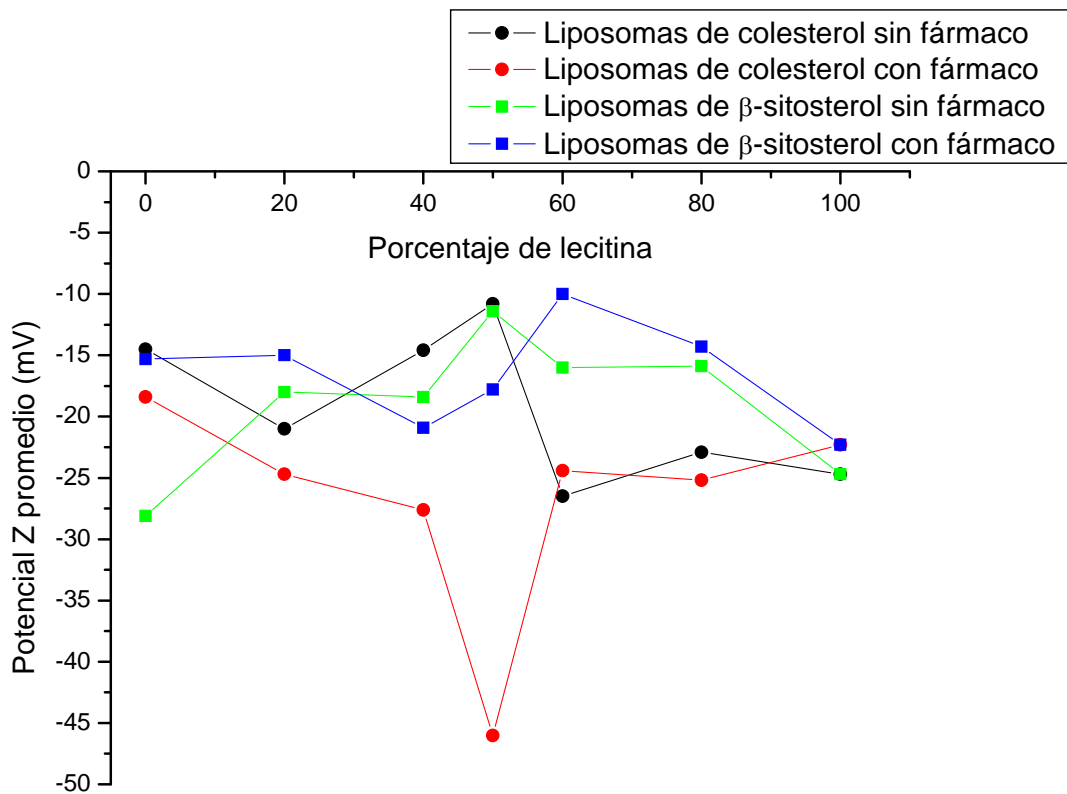


Figura 33. Grafica de potencial Z de las formulaciones obtenidas de liposomas.

Tanto en la tabla como en la gráfica se muestran los valores de potencial Z obtenidos para cada una de las formulaciones.

Cabe mencionar en el caso de liposomas vacíos en ausencia o presencia de esterol el potencial Z es muy bajo del orden de -10.8 a -28.1mV estos resultados difieren con respecto a los informados en la literatura, cuando no hay presencia de sales<sup>[31]</sup>. Esto se puede deber a una posible interacción con los iones Na<sup>+</sup>.

Se observa que el fármaco a bajas concentraciones de esterol éste prácticamente no interactúa con la superficie del coloide dado que los cambios del potencial Z son prácticamente insignificantes sin embargo y en similitud al estudio del tamaño de partícula a partir del 50% los cambios son más notorios mostrando una probable afinidad de la deltametrina por el esterol.

En consideración a la influencia de los cambios estructurales entre los esteroides sobre el potencial Z, se observa un comportamiento general en el cual el  $\beta$ -sitosterol confiere una menor carga en superficie que el colesterol. Esto puede deberse a que esta molécula presenta una menor densidad de carga en la superficie de los coloides, debido a mayor volumen ocupado dentro de la membrana de esta molécula.

En general, el comportamiento de los preparados con respecto a su potencial zeta es dependiente del tipo de esterol utilizado. En el caso del  $\beta$ -sitosterol se visualiza que al aumentar su concentración en el liposoma el potencial Z se ve incrementado (disminuye en su valor absoluto). Esto es debido a que la densidad de carga en la superficie se ve disminuida lo que indica que éste se va intercalando en la membrana entre las cadenas acílicas exponiéndose hacia el exterior entre los grupos fosfatidil que son los que dan las características eléctricas. Estos resultados están en concordancia con los resultados comentados en el apartado de tamaño de partícula. Sin embargo para el caso del colesterol y teniendo en cuenta otros estudios similares<sup>[34, 35]</sup> se comprueba que a bajas concentraciones (por debajo de 50%) esta molécula no se expone al exterior y por lo tanto no hay cambios en el potencial Z.

La única muestra que presenta un potencial Z que indica estabilidad física es la correspondiente a la de liposomas de colesterol con fármaco en la relación 50% colesterol

y 50% lecitina, lo cual indica que las fuerzas de repulsión son mayores que las fuerzas de atracción.

El potencial zeta de todas las muestras obtenidas a excepción de la ya mencionada, indica que su estabilidad física no va a ser la adecuada, puesto que oscila entre -28.1 y -10 mV. Lo que muestra de la posible formación de agregados, esto se puede corroborar visualmente y con las micrografías mostradas en la figura 30. El potencial Z indica que la estabilidad cinética no está siendo la adecuada por lo que se plantea cambiar la fuerza iónica al adicionar electrolitos o el cambiar el buffer utilizado, esto se plantea con la finalidad de favorecer la separación de partículas.

La repulsión electrostática llega a ser importante cuando los coloides se aproximan y la doble capa comienza a interferir, esta energía aumenta fuertemente cuando las partículas se acercan, esta energía llega a un valor máximo cuando las partículas están casi juntas y disminuye a cero fuera de la doble capa, su valor está relacionado con el potencial de la superficie. La atracción de van der Waals entre los coloides es ciertamente el resultado de las fuerzas entre las moléculas individuales de cada coloide, el efecto es aditivo, o sea una molécula del primer coloide experimenta la atracción de van der Waals de cada molécula del segundo coloide, esto se repite para cada molécula del primer coloide y la fuerza total corresponde a la suma de todas ellas.

Con lo anterior se podría decir que la formación de flóculos debido a la interacción de las cargas contenidas en los liposomas, las cuales están dadas por los grupos fosfatidil, la formación de flóculos y la adhesión coloidal en el sistema son provocadas por la interacción de las cargas de los liposomas contenidas tanto en la parte hidrofílica (aniónica) como la hidrofóbica (cadena hidrocarbonada) pues al estar en contacto las partes difusas o membranas de los coloides se presenta una redistribución de las cargas. Así como la existencia de fusión entre los mismos debido al mismo fenómeno. El hecho de que existan flóculos o fusión coloidal podría depender del tamaño del coloide, ya que entre mayor sea el tamaño de este, mayor es la carga contenida en el mismo y por lo tanto mayores son las fuerzas de atracción intercoloidal. Esto concuerda con lo observado en las micrografías de SEM.

## **VI. CONCLUSIONES.**

1. Se logró la elaboración de liposomas de deltametrina usando dos diferentes esteroides por el método de evaporación en fase inversa.
2. Se obtuvieron 28 lotes diferentes de formulaciones de liposomas, 14 de ellos con deltametrina y otras 14 formulaciones las cuales consistían en la misma relación molar pero con la excepción de que éstas no contienen principio activo (liposomas vacíos o liposomas sin fármaco).
3. Se corroboró en el análisis visual, microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido que para los casos en los que la formulación está conformada al 100% del esteroide y 0% de la lecitina como está informado en la literatura que el colesterol ni el  $\beta$ -sitosterol por si solos no tiene la capacidad de formar vesículas.
4. Las muestras obtenidas reflejan que la distribución de los tamaños no es homogénea, esto se observa en los resultados de tamaño de partícula los cuales están en el intervalo de 150nm-200 $\mu$ m.
5. Los tamaños de las muestras de liposomas nos indica que estos tienen una tendencia a adherirse e incluso fusionarse lo cual se corroboró con las micrografías de microscopía óptica y electrónica.
6. El potencial Z confirma el punto anterior y que con los valores obtenidos se espera que la formulación sea inestable, y presente aglomeraciones por lo cual se plantea hacer un reajuste de electrolitos y en la concentración de los mismos.
7. La relación fosfatidilcolina/esteroide y en su caso fosfatidilcolina/esteroide/deltametrina nos da cambios importantes en el estudio de la morfología, tamaño de partícula y potencial zeta de liposomas. Cabe mencionar que por apariencia de las muestras se preferiría las que necesitan un menor esfuerzo para su resuspensión que para este caso son las relaciones Lc100%-Est0, Lc80%-Est20%, Lc60%-Est40%, Lc50%-Ch50%, Lc 40%-Est60%.

8. Las perspectivas de este trabajo consisten en desarrollar una formulación conteniendo liposomas de deltametrina y teniendo en cuenta las variables que en este estudio se encontraron y que tienen influencia en la formación de liposomas, como lo son la relación lecitina esterol, el esterol utilizado (para este caso colesterol y  $\beta$ -sitosterol para determinar como afectan estos factores a la elaboración de liposomas y a su estabilidad.

**VII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Faus, J.Y. **Tratamientos de las parasitosis en Vacuno de Carne.** 2004  
<http://www.ganaderia.com.mx>
2. José Fernando Tang Ploog, A.R., Jorge Fabian Ruiz Herrera. **Evaluación de Eficacia y Tolerancia de una Solución Externa de Fenilpirazol (Fipronil) al 1% (Ectonil Pour On) para el control de infestaciones por garrapatas del Género Boophilus microplus en Ganado Vacuno en Crianza Intensiva.** 2006  
[http://www.agrovetermarket.com/pdf/antiparasitario/Ectonil%20Pour%20On/Efectividad%20Ectonil%20El%20cebadero%202006\\_.pdf](http://www.agrovetermarket.com/pdf/antiparasitario/Ectonil%20Pour%20On/Efectividad%20Ectonil%20El%20cebadero%202006_.pdf) [cited].
3. Gelabert Rodríguez, Y.E., Díaz González R., **Nuevas alternativas de inmovilización de activos oxidantes.** Revista cubana de investigaciones biomédicas, 2001. **20**(1): p. 70-72.
4. J.Pérez García, M.A.Á.S., et. al. **Enfermedades parasitarias del ganado vacuno: métodos de control.** Julio 2004
5. Drugueri, L. **Parasitología Veterinaria.** 2006  
<http://www.zoetecnocampo.com/Documentos/parasit1.htm>
6. Bavera, G.A. **Bañaderos.** 2005 [http://www.produccion-animal.com.ar/informacion\\_tecnica/instalaciones/14-banaderos.htm](http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/instalaciones/14-banaderos.htm)
7. Bayer. **Manual Bayer de la garrapata.** 2006 <http://sanidadanimal.com/manuales.php>
8. INFOMERIAL. **Garrapatas.** 2006 <http://www.webveterinaria.com/merial/Garrapata.pdf>
9. Choi, J.S. and D.M. Soderlund, **Structure-activity relationships for the action of 11 pyrethroid insecticides on rat Nav1.8 sodium channels expressed in Xenopus oocytes.** Toxicology and Applied Pharmacology, 2006. **211**(3): p. 233-244.
10. OMS. **Pesticide Residues in Food.** 1980  
<http://www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v080pr14.htm>.
11. OMS. **INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY. DELTAMETHRIN.** 1990 <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc97.htm>
12. Dash, A.K. and G.C. Cudworth, **Therapeutic applications of implantable drug delivery systems.** Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 1998. **40**(1): p. 1-12.
13. Matschke, C., et al., **Sustained-release injectables formed in situ and their potential use for veterinary products.** Journal of Controlled Release, 2002. **85**(1-3): p. 1-15.
14. Joseph R. Robinson, V.H.L.L., **Controlled Drug Delivery. Fundamentals and applications.** 2nd ed. Vol. 1. 1987, New York: Marcel Dekker Inc. 716.
15. Chien, Y.W., **Drug and the Pharmaceutical Science. A series of text books and monographs.** 2nd ed. Vol. 50. 1992, New York. Basel. Hong Kong: Marcel Dekker Inc. Capítulos 1-2.

16. Gennaro, A.R., **Remington Farmacia**. Décimo Novena ed. Vol. 2. 1998, Buenos Aires, Argentina: Editorial Panamericana. 2535-2559.
17. Rathbone M.J, G.R., **Controlled Release Veterinary Drug Delivery: Biological and Pharmaceuticals Considerations**. 2000, Amsterdam, Holanda: Elsevier Science B.V.
18. Zambrano, B.B.G., **Diseño, desarrollo y caracterización de nanopartículas de omeprazon y alcohol estearílico preparadas por diferentes técnicas.**, in *Farmacia*. 2004, Universidad Nacional Autónoma de México: México. p. 88.
19. Hardman, J.G., *Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica* 1996, México: McGraw-Hill Interamericana.
20. DE LA MAZA A , P.J.L.e.a., **Permeability changes in the phospholipid bilayer caused by nonionic surfactants**. Journal of colloid and interface science 1992. **148** (2): p. 310-316.
21. Colley, C.M.R., B.E. , **Liposome - from membrane model to therapeutic agent**. Trends in biochemical Sciences, 1976. **8**(1): p. 203-205.
22. Vladimir Torchilin, V.W., **Liposomes: A practical approach**. First ed. 1990, New York: Oxford University Press. 424pp.
23. Cohen, B.E., **Effect of temperature on non-electrolyte liposome permeability**. Acta Científica Venezolana Celular, 1974. **25**(1): p. 119.
24. Allen Z, e.a., **Effect of pH, ionic strength and oxygen burden on the chemical stability of EPC/cholesterol liposomes under accelerated conditions**. European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics, 2000. **50**(3): p. 357-364.
25. Lerebours, B., Wehrli, E. & Hauser, H., **Thermodynamic Stability and Osmotic Sensitivity of Small unilamellar phosphatidylcholine vesicles**. Biochemica et Biophysica Acta Lab, 1993: p. 49-60.
26. Takeo, M., *Disperse Systems*. 1999, Germany: WILEY-VCH.
27. Gregor, C., **Phospholipids Handbook**. 1995, USA: CRC. 297.
28. Frank D. Gunstone, F.B.P., *Lipid Technologies and Applications* 1997, USA. 834.
29. Müller, R.H., K. Mâders, and S. Gohla, **Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - A review of the state of the art**. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2000. **50**(1): p. 161-177.
30. Mohamed Mahmoud Nounou, L.E.-K., et. al, **Influence of deferent sugar cryoprotectants on the stability and physico-chemical characteristics of freeze-dried 5-fluorouracil plurilamellar vesicles**. DARU, 2005. **13**(4): p. 133-143.
31. T. Matthew Taylor, S.G., et. al, **Characterization of Antimicrobial-bearing Liposomes by Z-Potencial, vesicle size an encapsulación efficiency**. Food Biophysics, 2007. **2**(1): p. 1-9.
32. A.A. Al-Angary, M.A.A.-M., **Evaluation of liposomal formulations containing the antimalarial agent, arteether**. International Journal of Pharmaceutics, 1996. **128**: p. 163-168.



33. L.B. Lopes, M.V.S., et. al., **Studies on the encapsulation of diclofenac in small unilamellar liposomes of soya phosphatidylcholine.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2004. **39**: p. 151-158.
34. Yung-Hsu Chan, B.-H.C., et. al., **The influence of phytosterols on the encapsulation.** International Journal of Food Science and Technology, 2004. **39**: p. 985-995.
35. Jonas Henriksen, A.C.R., John H. Ipsen, **Vesicle fluctuation analysis of the effects of sterols on membrane bending rigidity.** Eur Biophys J, 2004. **33**: p. 732-741.