



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN LIPOSOMAL PARA LA
CO-ENCAPSULACIÓN DE DOXORRUBICINA Y 5-FLUOROURACILO.”**

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

I.Q. HÉCTOR VÁZQUEZ BECERRA



TUTOR: DR. LUIS A. MEDINA VELÁZQUEZ

AÑO: 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

LIC. BALFRED SANTAELLA HINOJOSA
Coordinador de la Unidad de Administración del Posgrado
Presente

Me es grato informarle que el Comité Académico en su sesión del 18 de mayo del presente, autorizó al alumno **HECTOR VAZQUEZ BECERRA**, con número de cuenta 508001491, presentar su examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias, quien defenderá el proyecto de investigación titulado: "**Elaboración y caracterización de una formulación liposomal para la co-encapsulación de doxorrubicina y 5-fluorouracilo**", realizado bajo la supervisión del Dr. Luis Alberto Medina Velázquez, ante el siguiente jurado:

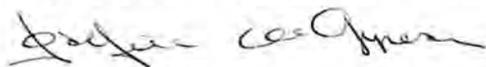
Presidente	Dr. David Díaz	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Jesús Gracia Fadrique	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda	CINVESTAV
Vocal	Dr. Andrés Navarrete Castro	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. David Quintanar Guerrero	FES-Cuautitlán, UNAM

Nota: Se recuerda a los miembros del jurado que el plazo máximo para revisión de la tesis es de 30 días naturales a partir de la recepción de la misma.

Este oficio cancela y sustituye al 409 de fecha 20 de mayo de 2009.

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 12 de enero de 2010.
Atentamente.



DRA. JOSEFINA DE GYVES MARCINIAK
Coordinadora del Programa

c.c.p. Integrantes del Jurado
Alumno
Expediente
Sección Escolar de la Coordinación de Posgrados, Facultad de Química

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan –IFUNAM, Instituto Nacional de Cancerología. México, D.F. Bajo la dirección del Dr. Luis Alberto Medina Velázquez, contando con el apoyo económico de una beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). Número de Becario: 206999.

Este trabajo fue presentado en los eventos y bajo las modalidades que a continuación se indican:

- **PRESENTACIÓN ORAL:** “Elaboración de un nanosistema liposomal de poliquimioterapia en el tratamiento del cáncer de mama”. **1er Simposio Nacional de Nanotecnología y Cáncer**; UAM, México, D.F. Octubre, 2009.
- **PRESENTACIÓN DE POSTER:** “Elaboración de un nanosistema liposomal para la encapsulación de doxorubicina y 5-fluorouracilo”. **QuimiUNAM**; México, D.F. Noviembre de 2009.
- **PRESENTACIÓN DE POSTER:** “Elaboración de un nanosistema liposomal para la encapsulación de doxorubicina y 5-fluorouracilo”. **Congreso de Innovación en Salud y Química Médica**; Boca del Río, Veracruz. Octubre 2009.

AGRADECIMIENTO ESPECIAL:

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto.

A la COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO (CEP), UNAM, por la beca otorgada dentro del programa de Fomento a la Graduación para la culminación del trabajo de Tesis.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO (UNAM) y al POSGRADO EN CIENCIAS QUÍMICAS, por albergarme en ellos, y brindarme la oportunidad de adquirir conocimientos científicos, valores humanos, técnicas y el deseo de aprender más y mejor cada día.

AL INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA (INCan) y a su personal, por el entero apoyo humano, científico y material, ofrecido durante la realización de este trabajo.



GRACIAS...

...DIOS: por que cuándo más confundido, temeroso y triste pude estar, me recordaste que las cosas siempre serán resueltas en el tiempo y modo adecuados. Que sólo debo confiar, descansar en ti y seguir trabajando.

...Dr. Luis Alberto Medina: por tu apoyo, confianza, enseñanzas y consideración. Pero sobre todo, por brindarme la oportunidad de hallar los motivos, causas y razones para realizar el trabajo diario, pese a las dificultades.

...Dra. Patricia García: por la importante colaboración a este trabajo, por el tiempo y enseñanza invertidos, por las llamadas de atención y por todo buen consejo a mi persona.

...Enrique Pérez Cárdenas, Elena Arechaga Ocampo, Jazmín M. Pérez, Rafael Jurado: por estar siempre dispuestos a compartir conmigo sus conocimientos, su experiencia y opinión. Por ser pacientes en su instrucción y generosos en su amistad.

... Carlos, Vicky, Liz, Alfredo, Alejandro, Carlos Jr., Deirdre, Itzel, Poncho, Karla, Vanesa, Arnulfo, Josefina, Edith, Julio, Yuritz: por la oportunidad de conocerlos, por hacer que las horas de trabajo se convirtieran en una aventura constructiva y divertida, por ayudarme a obtener la paciencia para comenzar de nuevo muchas veces sin caer en la desesperación. Y en especial a ti Mariana, que me recordaste que es posible sonreír ante los problemas, sacar fuerza de la desgracia y que en la reflexión crece la valentía.

...Elba, Omar, Mario, Morelia, Sonia, Edith, Pily, Oscar, Iván, y Moisés, por hacer que: cada problema tuviera solución, cada desvelo tuviera compañía, cada decisión contara con apoyo, cada día fuese mejor y, ante todo, porque en cada momento hallara un amigo con quién hablar.

...Cora, Eva, por que cada una a su manera, han sabido inyectarme ganas de vivir, de luchar y de vencer. Por hacerme ver que no puedo estar bien si no controlo mis emociones, sentimientos e impulsos, o si estropeo mi jornada por una palabra airada, un error profesional, una cita fallida, un resultado adverso. Por mostrarme que la vida es responsabilidad pero también anhelos y fe.

DEDICADO A...

...Esos ángeles que han visto pasar mi vida, estando ahí en cada momento. Han sabido hacer de mí un hombre que se ha sentido siempre envuelto en comprensión, para contar lo que cualquier hijo esconde. Ni un consejo sin razón, ni un regaño sin motivo. Por ustedes vine a este mundo, por ustedes soy lo que soy. Hoy dedico este logro a MIS PADRES por cada día en que me han dado su amor sin esperar nada.

...Mis hermanas y mis abuelitas: que con amor han sabido alentarme a seguir, mostrándome que nada que pueda conseguir sin pena y sin trabajo es verdaderamente valioso. Y que todo éxito requiere de un sacrificio.

...Mi sobrino ADAIR YAEL, que aún siendo un niño me ha enseñado la mayor de las ciencias: ser feliz y engendrar alegría, porque sin ella, toda existencia es baldía. Con su inocencia y múltiples ocurrencias ha sido capaz de llenar cada hueco en mi vida, sacudirme la pereza y encontrar de nuevo la esperanza.

...Coraabdi Pérez Luna, mi amiga incondicional, mi conciencia y fuerza para levantarme. Por que aunque tú misma digas que no hay personas imprescindibles en este mundo, hay quienes por sus actos, consejos, apoyo, cariño y hasta su misma presencia, se acercan demasiado a serlo. Y tú, en mi vida, has demostrado ser una de esas personas.

...Todas aquellas personas que dan día a día la batalla contra el CÁNCER. Por que son ustedes quienes hacen que el trabajo, los esfuerzos, los errores y los aciertos tengan sentido, tengan un fin, valgan la pena, en otras palabras, tengan un rostro, nombre y apellido.

EL ÉXITO COMIENZA CON LA VOLUNTAD

Si piensas que estás vencido, lo estás;

Si piensas que no te atreves, no lo harás;

Si piensas que te gustaría ganar, pero que no puedes, no lo lograrás;

Si piensas que perderás, ya has perdido:

Porque en el mundo encontrarás

Que el éxito empieza con la voluntad del hombre.

Tienes que estar seguro de ti mismo,

Antes de intentar ganar un premio;

La batalla de la vida no siempre la gana,

El hombre más fuerte o el más ligero;

Porque tarde o temprano,

El hombre que gana,

Es aquél que cree poder hacerlo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. LISTA DE ABREVIATURAS:	2
3. INTRODUCCIÓN	3
4. ANTECEDENTES	5
4.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER.....	5
4.1.1 Definición.....	5
4.1.2 Estadísticas del cáncer.....	5
4.1.3 Tratamiento	6
4.1.4 Quimioterapia.....	7
4.1.4.1 Agentes de quimioterapia	7
4.2 DOXORRUBICINA (Adriamicina)	8
4.2.1 Farmacología	9
4.2.2 Toxicidad.....	9
4.2.3 Uso común	10
4.3 5-FLUOROURACILO.....	11
4.3.1 Farmacología	12
4.3.2 Toxicidad.....	12
4.3.3 Uso común	12
4.4 LIMITACIONES DE LA QUIMIOTERAPIA	13
4.5 LIPOSOMAS.....	14
4.5.1 Liposomas como vectores de transporte y liberación de fármacos	14
4.5.1.1 Liposomas <i>Stealth</i>	15
4.5.1.2 Co-encapsulación de fármacos en liposomas	16
4.5.2 Características químicas de los liposomas	17
4.5.2.1 Proceso de formación.....	18
4.5.2.2 Fosfolípidos.....	19
4.5.2.3 Estabilidad en suspensión	20
4.5.3 Preparación de liposomas	21
4.5.3.1 Métodos de preparación	21
4.5.3.2 Homogenización del tamaño de los liposomas	23
4.5.3.3 Purificación de los liposomas	24
4.5.4 Caracterización fisicoquímica de las suspensiones liposomales	25
4.5.4.1 Cuantificación de fosfolípidos	25
4.5.4.2 Cuantificación del principio activo encapsulado	25
4.5.4.3 Determinación del tamaño de partícula	26
4.5.4.4 Determinación del potencial zeta	27
4.5.5 Liofilización de liposomas.....	28

5. JUSTIFICACIÓN	31
6. OBJETIVOS	32
6.1 OBJETIVO GENERAL	32
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES	32
7. DESARROLLO EXPERIMENTAL	33
7.1 MÉTODO PARA LA ELABORACIÓN DE LA SUSPENSIÓN LIPOSOMAL.....	33
7.1.1 Preparación de bicapa lipídica.....	33
7.1.2 Hidratación de bicapa lipídica	34
7.1.3 Remoción del fármaco no atrapado.....	35
7.1.4 Extrusión de las vesículas liposomales	35
7.1.5 Remoción del fármaco liberado durante la extrusión	36
7.2 EXPERIMENTO 1	37
7.2.1 Liposomas cargados con 5-fluorouracilo (5-FU).....	37
7.2.2 Liposomas cargados con doxorubicina (DOXO)	37
7.3 EXPERIMENTO 2	38
7.4 EXPERIMENTO 3	39
7.5 EXPERIMENTO 4	41
7.6 EXPERIMENTO 5	42
7.7 TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES LIPOSOMALES..	42
7.7.1 Cuantificación de fosfolípidos en la suspensión liposomal por técnica de Stewart	42
7.7.1.1 Preparación de ferrotiocianato de amonio (NH ₄ FeSCN).....	42
7.7.1.2 Curva patrón	42
7.7.1.3 Cuantificación de fosfolípidos en muestras	43
7.7.2 Medición de tamaño de partícula	44
7.7.3 Medición de potencial zeta	44
7.7.4 Cuantificación de fármaco encapsulado	45
7.7.4.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	45
7.7.4.2 Extracción de doxorubicina y 5-fluorouracilo	45
7.7.4.3 Preparación de la curva patrón para la cuantificación de los fármacos..	46
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	48
8.1 EXPERIMENTO 1	48
8.1.1 Tamaño de partícula.....	48
8.1.2 Potencial zeta	50
8.1.3 Cuantificación del fármaco encapsulado	51
8.2 EXPERIMENTO 2	55
8.2.1 Tamaño de partícula.....	55
8.2.2 Potencial zeta	55

8.2.3	Cuantificación del fármaco encapsulado	55
8.3	EXPERIMENTO 3	57
8.3.1	Tamaño de partícula.....	57
8.3.2	Potencial zeta	58
8.3.3	Cuantificación del fármaco encapsulado	59
8.4	EXPERIMENTO 4	61
8.4.1	Tamaño de partícula.....	61
8.4.2	Potencial zeta	62
8.4.3	Cuantificación del fármaco encapsulado	62
8.5	EXPERIMENTO 5	66
8.5.1	Tamaño de partícula.....	66
8.5.2	Potencial zeta	67
8.5.3	Cuantificación del fármaco encapsulado	67
8.6	CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS EN SUSPENSIONES LIPOSOMALES	70
8.7	RESUMEN DE RESULTADOS.....	72
9.	CONCLUSIONES	74
10.	BIBLIOGRAFÍA	75

1. RESUMEN

En el presente trabajo se describe una metodología y diversas modificaciones aplicadas a ésta, para la co-encapsulación de dos agentes antineoplásicos: doxorubicina y 5-fluorouracilo en una suspensión liposomal.

Se presenta también el efecto de las técnicas de sonicación, liofilización y extrusión sobre la estabilidad de las formulaciones, la homogenización del tamaño de las vesículas y la eficiencia de encapsulado de las suspensiones liposomales.

Finalmente, se describen los procedimientos desarrollados para llevar a cabo la caracterización de los liposomas. Éstos incluyen la determinación de algunos parámetros como el tamaño de las vesículas, el potencial zeta asociado a las mismas, la concentración de fosfolípidos en la suspensión, y la cuantificación del fármaco(s) atrapado(s), en los distintos lotes de liposomas preparados.

2. LISTA DE ABREVIATURAS

HSPC	Fosfatidilcolina hidrogenada de soya
CHOL	Colesterol
m-PEG	Metoxi-polietilenglicol en forma de sal de amonio de 1,2-Diaesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanoamina-N-[Metoxi-Polietilen glicol-2000]
α -Tocoferol	[(\pm)- α -Tocoferol]
DOXO	Doxorrubicina (Adriamicina)
5-FU	5-Fluorouracilo
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
PBS	Solución buffer de fosfatos (<i>Phosphate Buffer Solution</i>)
MLV's	Vesículas Multilaminares
LUV's	Vesículas Unilaminares Grandes
SUV's	Vesículas Unilaminares Pequeñas
RES	Sistema Retículo-endotelial
T _c	Temperatura de transición de fosfolípido
T _m	Temperatura de transición para una mezcla

3. INTRODUCCIÓN

Los datos estadísticos más recientes [1, 2] muestran que el cáncer es una de las principales causas de muerte en México y a nivel mundial [3, 4]. Esto probablemente se debe no sólo a la incidencia de la enfermedad sino también a la poca eficiencia de los tratamientos existentes que en su mayoría traen al paciente efectos secundarios importantes.

Actualmente la quimioterapia es uno de los tratamientos estándar [5] para el control de la enfermedad. Con ella se busca disminuir el riesgo de recurrencia, aparición de metástasis e incrementar las posibilidades de supervivencia del paciente [6].

De manera general es bien sabido que los fármacos antineoplásicos se caracterizan por tener una farmacocinética poco favorable y ser altamente tóxicos, observándose como resultado que sólo un porcentaje mínimo de la cantidad suministrada logra ingresar al tejido u órgano blanco y el resto se distribuye en diversas zonas adyacentes y órganos sanos del paciente; ocasionando serias repercusiones en él.

Con el desarrollo de liposomas cargados con combinaciones de agentes antineoplásicos, se busca incrementar las posibilidades de que los fármacos que se aplican lleguen al blanco de acción, disminuyendo de manera notable los efectos secundarios y toxicidad que comúnmente se presentan [7, 8].

Se ha observado que las características físicas y químicas de los liposomas constituyen un medio de transporte favorable para evadir el reconocimiento e inmediata degradación por parte de los medios de defensa del ser humano (sistema retículo-endotelial, RES) [9, 10].

Las vesículas liposomales como mecanismos de transporte y liberación de agentes citotóxicos, permiten depositar de manera más eficiente la dosis terapéutica necesaria para controlar y/o eliminar el tumor, reduciendo de manera significativa los efectos secundarios asociados a la acción

citotóxica de los fármacos. Contrarrestando la inespecificidad que caracteriza los tratamientos existentes.

Al encapsular el fármaco dentro de los liposomas, no sólo se disminuye la toxicidad asociada al fármaco *per se*, sino que además, es posible generar una liberación paulatina del medicamento disminuyendo los posibles efectos adversos que pueden producirse como resultado de una ingesta masiva del fármaco.

La co-encapsulación de agentes antineoplásicos en liposomas constituye un modelo idóneo para estudiar, en sistemas *in vitro* e *in vivo*, un posible incremento (sinergismo) de la respuesta que el paciente mostraría ante el tratamiento combinado [11, 12].

4. ANTECEDENTES

4.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER

4.1.1 Definición

El cáncer no es una enfermedad, sino más bien un conjunto amplio de enfermedades. El cáncer es un sistema renegado de crecimiento que se origina dentro del biosistema de un paciente. Existen al menos 100 tipos diferentes de cánceres, pero todos comparten una característica en común: el crecimiento descontrolado de las células que progresa hacia la expansión sin límites [13]. El cáncer puede originarse casi en cualquier parte del cuerpo. De manera general, se clasifican en: carcinomas, sarcomas, linfomas y leucemias.

El cuerpo está compuesto de muchos tipos de células, que crecen y se dividen para producir nuevas células conforme el cuerpo las necesita. Cuando las células envejecen, éstas mueren y son reemplazadas por células nuevas. En los tejidos normales, las tasas de crecimiento de nuevas células y la muerte de células viejas se mantienen en balance. En el cáncer este balance se altera como resultado de un crecimiento celular descontrolado o de la pérdida de la capacidad de la célula de someterse a suicidio celular mediante un proceso conocido como "apoptosis". Cuando las células dañadas no mueren cuando deberían morir, pueden formar una masa de tejido llamada tumor, que puede ser benigno o maligno.

Las células cancerosas pueden invadir el tejido a su alrededor y diseminarse a otros órganos del cuerpo mediante dos mecanismos: invasión y metástasis. La metástasis es la habilidad de las células cancerosas para penetrar en los vasos linfáticos y sanguíneos, circular a través del torrente sanguíneo y después invadir los tejidos normales en otras partes del cuerpo.

4.1.2 Estadísticas

En los últimos años, el cáncer se ha establecido como una de las principales causas de muerte en el mundo. La organización mundial de la salud (OMS) reporta que en el año 2005 el 13% de las

muerres ocurridas se debieron a diferentes tipos de cáncer y se pronostica un aumento en el número de muertes en los próximos años [1-3].

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) reporta que en el año 2006 los tumores malignos ocuparon el tercer lugar en la lista de principales causas de defunción en el país; por dicha causa fallecieron 63 888 personas, el volumen representa 12.9% del total de defunciones registradas en el año [4]. En la **Figura 1**, se muestra la distribución porcentual, según el tipo de tumor maligno, por sexo.

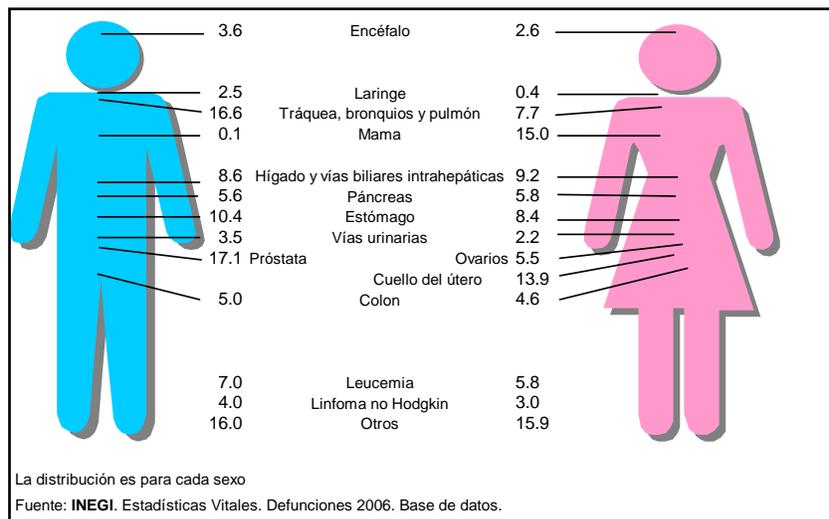


Figura 1. Distribución porcentual, según el tipo de tumor maligno, por sexo.

4.1.3 Tratamiento

La selección del tratamiento es compleja, considera una serie de factores y debe ser basada en las características clínico-patológicas de la enfermedad, principalmente en la etapa o estadio del cáncer [14-16].

Los tratamientos convencionales incluyen:

- a) Cirugía,
- b) Terapia con radiación dirigida al tumor,
- c) Quimioterapia,
- d) Drogas biológicas y,
- e) Tratamientos hormonales.

4.1.4 Quimioterapia

La quimioterapia, tiene por objetivo detener la proliferación de las células cancerosas generando en ellas y en su información genética, daños importantes que la llevan a procesos de senescencia, arresto celular, o bien, de muerte o suicidio celular (apoptosis).

Así mismo, esta terapia es empleada de manera simultánea con otros procedimientos para eliminar cúmulos microscópicos de células metastásicas con el fin de disminuir el riesgo de recurrencias y poder incrementar la tasa de supervivencia de los pacientes [5, 6].

La quimioterapia se administra, por vía intravenosa o de forma oral, en ciclos: un período de tratamiento seguido por un período de recuperación y así sucesivamente. Esto con el fin de permitir la recuperación del paciente ante los efectos secundarios que se presentan.

Una gran limitante del uso de esta terapia son los efectos secundarios que ésta produce, los cuales dependen de los fármacos que recibe el paciente. En general, los fármacos antineoplásicos afectan las células del cuerpo que se dividen con rapidez. Éstas incluyen, entre otras, las de la sangre (eritrocitos, linfocitos, macrófagos, etc.). Cuando las células de la sangre son afectadas, los pacientes tienen más probabilidades de contraer infecciones, o de sangrar con facilidad y pueden tener menos energía durante e incluso cierto tiempo después del tratamiento. Como resultado de la quimioterapia, los pacientes pueden perder cabello (alopecia) y presentar síntomas como: falta de apetito, náuseas, vómitos, diarrea o llagas en la boca. Esta situación merma en gran medida la calidad de vida de los pacientes promoviendo que en ocasiones los tratamientos no se concluyan ante la deserción del enfermo.

4.1.4.1 Agentes de quimioterapia

Entre los agentes de quimioterapia más utilizados, las antraciclinas se han convertido en la base sustancial del tratamiento de diversos tipos de cáncer siendo la adriamicina (doxorubicina) el medicamento más estudiado. Diversos estudios han evaluado [17] el efecto de la administración combinada de antraciclinas con fármacos como ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluorouracilo (CMF), entre otros agentes químicos utilizados rutinariamente en la terapia del cáncer [18-22].

Demostrando la posibilidad de incrementar la supervivencia libre de enfermedad (SVLE) mediante esta práctica.

La administración combinada de agentes antineoplásicos puede potencializar la respuesta que el paciente muestra ante el tratamiento ordinario [23]. Estudios de investigación clínica realizados durante los últimos 30 años han determinado las combinaciones más eficaces [11, 12, 20]. En el **Cuadro 1** se mencionan algunos de los fármacos empleados en el tratamiento del cáncer.

Nombre de marca	Nombre genérico
Adriamycin	Doxorrubicina
Cytosan	Ciclofosfamida
Ellence	Epirubicina
Navelbine	Vinorelbina
Taxol	Paclitaxel
Taxotere	Docetaxel
Xeloda	Capecitabina
Gemzar	Gemcitabina

Cuadro 1. Fármacos de uso común en el tratamiento del cáncer.

Dos de los agentes de mayor uso para el tratamiento farmacológico de la enfermedad son la doxorrubicina y el 5-fluorouracilo.

4.2 DOXORRUBICINA (Adriamicina)

Tipo de antibiótico que proviene del hongo *Streptococcus peucetius*. Las antraciclinas forman un grupo de antibióticos altamente citotóxicos utilizados como agentes antineoplásicos en una amplia variedad de indicaciones. Son utilizados desde hace décadas, casi siempre asociados a otros fármacos antineoplásicos con perfiles farmacológicos complementarios para potenciar su eficacia anticancerosa [24-27]. Actualmente, están comercializados como: doxorrubina, daunorrubicina, epirubicina, idarrubicina y mitoxantrona.

El término antraciclina deriva de su estructura química, que contiene un anillo antracénico (tres anillos hexagonales condensados linealmente), aunque la mayoría de las moléculas pertenecientes a este grupo, salvo la mitoxantrona, en realidad tienen un núcleo formado por cuatro anillos condensados (naftafeno). Todos ellos contienen además amino azúcares o análogos de estos.

4.2.1 Farmacología

Las antraciclinas comparten un mismo mecanismo de acción citotóxico. Son activos sobre la cadena de ADN, afectando a su integridad e impidiendo la replicación normal. Actúan intercalándose entre las parejas de bases de la doble hebra de ADN, promoviendo la deformación de la cadena. Al intercalarse afectan la acción de las topoisomerasas, enzimas nucleares que resuelven los problemas topológicos que surgen durante la replicación y transcripción [28-30].

Además de otros cambios químicos importantes, generan un bloqueo de la topoisomerasa II (ADN girasa), un mecanismo parecido al de los alcaloides del podofilo (etopósido, tenipósido). Actúan preferentemente sobre la fase S (síntesis de ADN) del ciclo celular, aunque también actúan durante la fase G2 (post-síntesis).

Las antraciclinas también provocan cortes en el ADN por un mecanismo complejo. Por una parte forman radicales libres por reacción de la antraciclina con iones férricos (Fe^{3+}), formando un complejo que participa en el ciclo de óxido-reducción, como hace la bleomicina. Por otro lado, tienen acción directa sobre la membrana celular.

Estos compuestos, pueden provocar una disminución en el número de células sanguíneas presentes en la médula ósea. Su uso por periodos extensos puede provocar daño severo al corazón, incluso años después de haber dejado de tomarlo.

4.2.2 Toxicidad

Los pacientes tratados con este tipo de fármacos son susceptibles de manifestar importantes reacciones adversas cardíacas, especialmente insuficiencia ventricular izquierda aguda,

principalmente con dosis superiores a 550 mg/ml lo que supone un evidente factor limitante de la dosis y, consecuentemente de su utilidad terapéutica; también pueden aparecer con frecuencia arritmias cardíacas o flebitis si se usan vasos sanguíneos pequeños o si se repiten las inyecciones en un mismo vaso.

La cardiotoxicidad puede manifestarse en forma de arritmia directamente después de la administración del fármaco; los cambios en el electrocardiograma, que incluyen el aplanamiento de la onda T y la depresión S-T, pueden durar hasta dos semanas después de la administración. Además de la dosis total administrada, la edad de los pacientes por encima de los 70 o por debajo de los 15 años se considera como un factor adicional de riesgo cardiotóxico para las antraciclinas. Así mismo, se ha indicado que el tratamiento concomitante o anterior con mitomicina, ciclofosfamida o dacarbazina potencializa la cardiomiopatía inducida por las antraciclinas [31-33].

4.2.3 Uso común

Este medicamento se usa para tratar:

- Cáncer de mama
- Cáncer de ovarios
- Cáncer de células transitorias de la vejiga
- Cáncer broncogénico al pulmón
- Cáncer a la glándula tiroides
- Cáncer gástrico
- Sarcomas de tejido blando y osteogénicos
- Neuroblastoma
- Tumor de Wilms
- Linfoma maligno (Hodgkin y no-Hodgkin)
- Leucemia mieloblástica aguda
- Leucemia linfoblástica aguda
- Sarcoma de Kaposi relacionado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirido (SIDA)

La doxorubicina también se usa para tratar el tumor de Ewing; carcinomas escamocelulares en la cabeza, el cuello, el cuello uterino y la vagina; carcinomas en los testículos, la próstata y el útero; y el mieloma múltiple refractario [34].

4.3 5-FLUOROURACILO (5-FU)

El 5-fluorouracilo es un potente antimetabolito utilizado en algunas formas de cáncer, algunos de éstos, de la piel; sin embargo, las indicaciones de uso dependen de la vía de administración y se maneja en presentaciones tópicas, crema y solución; o sistémicas, solución inyectable por vía endovenosa gota a gota.

Los medicamentos conocidos como antimetabolitos toman una apariencia similar a la de los nutrientes de las células normales, que son los que las células cancerosas necesitan para crecer. Las células cancerosas absorben el 5-fluorouracilo, lo que luego dificulta su crecimiento. Para ejercer su efecto antitumoral, el 5-FU requiere ser metabolizado hasta la forma de ribonucleótidos o desoxiribonucleótidos activos. Los nucleótidos formados son el 5'-fluoro-2'-deoxiuridina-5'-monofosfato (FdUMP) y la 5'-fluorouridina-trifosfato (FdTMP). El FdUMP es un potente inhibidor de la enzima timidilato sintetasa (TS) enzima encargada de la síntesis *de novo* de pirimidinas, el FdTMP se incorpora al ADN interfiriendo en su síntesis. El 5-FU a través de su fosforibosilación y con la participación de enzimas cinasas se convierte a 5'-fluorouridina-5'-trifosfato (FUTP), compuesto que se incorpora al ARN limitando su síntesis [24-26].

El primero en informar sobre la síntesis y actividad biológica del 5-fluorouracilo fue el equipo de trabajo del doctor Charles Heidelberger y sus colegas a finales de la década de los cincuenta. Fue uno de los primeros fármacos utilizados en oncología y desde que se descubrió la característica carcinostática del 5-fluorouracilo, se han buscado maneras de atacar las células tumorales y estudiado la forma en que éste fármaco actúa. Posteriormente se desarrollaron derivados con resultados más o menos satisfactorios.

4.3.1 Farmacología

El 5-fluorouracilo es un fármaco que bloquea la reacción de metilación del ácido desoxiuridílico para convertirlo en ácido timidílico mediante la inhibición de una enzima que es importante para la síntesis de la timidina, que siendo parte de la molécula de ADN detiene su formación. El fármaco es específico de la fase S (síntesis) del ciclo celular.

El 5-FU interviene en la síntesis de ADN e inhibe en poco grado la formación de ARN. Ambas acciones se combinan para promover un desequilibrio metabólico que resulta en la muerte de la célula. La actividad inhibitoria del fármaco, por su analogía con el ácido nucleico uracilo, tiene afectación sobre el veloz crecimiento de las células neoplásicas que aprovechan preferentemente la molécula del uracilo para la biosíntesis del ácido nucleico. Los efectos de una privación de ADN y ARN afectan en mayor medida a las células que crecen y se multiplican sin control y en menor proporción a las células normales [35, 36].

4.3.2 Toxicidad

Los efectos secundarios del 5-fluorouracilo son comunes e incluyen: adelgazamiento del cabello o cabellos más quebradizos que lo usual, cefalea (dolor de cabeza), debilitamiento o dolores en el cuerpo, oscurecimiento o sequedad de la piel o de las uñas, ampollas en la piel o acné, pérdida de apetito o de peso [37].

4.3.3 Uso común

El 5-FU es empleado en el tratamiento de los carcinomas de mama, tracto gastrointestinal, vejiga, ovario y de células escamosas de cabeza y cuello. Se utiliza en enfermedad de Bowen, basaliomas superficiales solos o acompañados. Estados precancerosos y en situaciones en que la radiación sea imposible o no se pueda intervenir quirúrgicamente. Se ha notado que el 5-FU no tiene eficacia alguna en espoliomas. La solución inyectable se utiliza en ciertos casos como paliativo de los carcinomas de seno, recto y colon cuando no pueda intervenirse quirúrgicamente [27, 28].

La administración secuencial con doxorubicina brinda una mayor respuesta ante la enfermedad (cáncer); sin embargo, la aplicación de manera simultánea no ha sido posible debido a la alta toxicidad que cada uno de los agentes antineoplásicos manifiesta.

4.4 LIMITACIONES DE LA QUIMIOTERAPIA

La falla terapéutica en un paciente con cáncer se debe a numerosas razones que en algunos casos pueden ser atribuidas a fallas farmacocinéticas o farmacodinámicas tales como el desarrollo de resistencia de las células cancerosas hacia los fármacos [38] y una inadecuada concentración del fármaco a nivel tumoral, ya que el agente debe ser capaz de penetrar eficientemente al tejido tumoral y alcanzar todas las células cancerosas a una concentración suficiente para ejercer un efecto terapéutico completo [39].

El micro-ambiente dentro de un tumor es significativamente diferente al de otros tejidos normales. Factores como el flujo sanguíneo tumoral, permeabilidad celular y densidad celular, así como el incremento de la presión intersticial, pueden impedir la penetración y deliberación del fármaco desde el plasma hasta el tumor y la distribución dentro del tumor, llevando a una relación compleja entre la concentración en el plasma, intersticio, y células neoplásicas [40].

Evidencias preliminares han sugerido que la concentración de los fármacos quimioterapéuticos en un tumor puede correlacionarse directamente con la respuesta a la quimioterapia; así que la eficacia de los agentes antineoplásicos para el tratamiento de tumores sólidos depende, en parte, de su capacidad de lograr concentraciones citotóxicas adecuadas del fármaco dentro del tumor, por lo que es necesario desarrollar e implementar técnicas y metodologías que contrarresten los mecanismos de resistencia y que garanticen una alta disposición y exposición de agentes antineoplásicos directamente dentro de la matriz tumoral. Pero que permitan a la vez, disminuir los efectos tóxicos que los fármacos puedan ejercer en el organismo.

Una alternativa es el uso de “vehículos o acarreadores” que permitan el traslado de los principios activos hasta la célula cancerosa evitando en cierta medida que la mayor parte del

agente citotóxico ingrese a órganos o tejidos sanos. Entre estos vehículos, unos de los más ampliamente estudiados han sido los liposomas o vesículas fosfolipídicas.

4.5 LIPOSOMAS

Los liposomas son vesículas esféricas de dimensiones coloidales (entre los 80 y los 200 nanómetros) hechas de una o más biláminas fosfolipídicas. El grosor de cada bilámina o bicapa es de alrededor de 4 nm [41]. Las vesículas liposomales están constituidas por un grupo de moléculas anfifílicas que dan a éstas, características especiales. Su estructura se podría describir como series concéntricas de moléculas que tienen una cabeza polar, una cola no polar y en donde cada molécula tiene dos cadenas hidrofóbicas.

Los liposomas pueden transportar fármacos: integrando las moléculas de dichas sustancias a su membrana, intercalándolas entre las bicapas, disolviendo las moléculas en las bicapas o bien, atrapando los fármacos al interior del liposoma.

4.5.1 Liposomas como vectores de transporte y liberación de fármacos

Por tres décadas, los liposomas han mostrado un gran potencial para el transporte de fármacos y radiofármacos de uso terapéutico y en procedimientos de diagnóstico [42-44]. Debido a su composición (lípidos comúnmente encontrados en soya y huevo) estos no muestran efectos tóxicos o inmunológicos en el organismo. Además, su versatilidad para transportar fármacos y la relativa facilidad que manifiestan para la manipulación de su membrana que, a su vez permite controlar su comportamiento cinético dentro del organismo, los convierte en moléculas transportadoras de gran utilidad en un tratamiento de terapia dirigida para cáncer [45-51].

Dependiendo del fármaco de interés, los liposomas pueden servir como transportadores de liberación [52] controlada o simplemente como un vehículo solubilizante biocompatible para agentes poco solubles. Debido a su tamaño, estas vesículas muestran características farmacocinéticas únicas. Éstas incluyen eliminación vía sistema retículo endotelial, lo cual brinda un tiempo de circulación sistémica relativamente extenso y una distribución en hígado y riñón.

Las vesículas liposomales exhiben una extravasación y acumulación preferencial en el sitio de tumores sólidos debido a una incrementada permeabilidad endotelial y a un drenado linfático reducido en esos tejidos. Estos efectos han sido definidos como una permeabilidad aumentada y un efecto de retención [53]. De acuerdo a lo anterior, la liberación liposomal es una manera de modificar las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de agentes terapéuticos.

Estas modificaciones pueden, en cierta medida, aumentar la eficacia terapéutica de los fármacos antitumorales (incrementando la concentración en el tumor) y reducir o modular sus perfiles de toxicidad [54, 55].

Varios fármacos antineoplásicos, incluyendo paclitaxel [56], 5-fluorouracilo [57] y doxorubicina [58], han sido formulados con éxito utilizando vesículas fosfolipídicas como sistemas de liberación del fármaco.

Ya en el tumor, el liposoma puede interactuar con las células ya sea por fusión o absorción con la membrana celular. En el primer caso, la carga es liberada directamente en el citoplasma. En el segundo caso, la carga se libera y acumula alrededor de la membrana celular y ésta es absorbida por la célula [59].

4.5.1.1 *Liposomas Stealth*

Desde sus inicios, el diseño de sistemas liposomales para la liberación de agentes citotóxicos, se enfrentó a diversos obstáculos farmacológicos; entre ellos, la identificación, captura y degradación por parte del sistema retículo-endotelial (RES), la dificultad para predecir patrones de extravasación liposomal, así como la obtención de formulaciones estables fisicoquímicamente [60, 10].

Para resolver la problemática del reconocimiento por parte del RES se adicionó un material inerte (polietilenglicol, PEG) a la superficie del liposoma. A esta tecnología se le denominó liposomas *stealth* [61].

El caso más contundente de esta aplicación es el desarrollo de doxorubicina liposomal pegilada (*Doxil* en Estados Unidos y *Caelyx* en Europa y México), la cual ha mostrado una mayor acumulación en el tumor sólido debida a la aumentada permeabilidad y al efecto de retención, y ha

permitido disminuir la cardiotoxicidad limitante de dosis, relativa al fármaco libre [58]. A la fecha ésta es la única formulación liposomal pegilada aprobada por la *Federal Drug Administration* (FDA) en los Estados Unidos y por la *European Medicines Agency* (EMA) en la Unión Europea, para el tratamiento del sarcoma de *Kaposi*, el cáncer de mama metastásico y el cáncer de ovario recurrente [58, 62].

Se han realizado ya, algunas investigaciones para la co-encapsulación en liposomas de agentes de quimioterapia, sin embargo, ninguna de estas formulaciones han sido aún aprobadas para su aplicación en pacientes.

4.5.1.2 Co-encapsulación de fármacos en liposomas

Mayer y colaboradores [64], han investigado la aplicación de liposomas como vehículos liberadores de combinaciones de fármacos. El uso de combinaciones de agentes terapéuticos se ha convertido en una estrategia adoptada con frecuencia en el tratamiento clínico del cáncer.

A pesar de que la interacción entre fármacos a diferentes concentraciones y proporciones de uno respecto a otro, ha sido sistemáticamente estudiada en modelos *in vitro*, estas proporciones no pueden ser trasladadas fácilmente a sistemas *in vivo* debido a características farmacocinéticas diferenciales de los diversos fármacos.

La co-encapsulación de dos fármacos en liposomas puede “sincronizar” la distribución de los fármacos, si éstos pueden ser atrapados de manera estable al interior de los liposomas. Esto, teóricamente permitiría una traslación de los resultados de modelos *in vitro* a *in vivo*, lo que resulta sumamente importante ya que, actualmente, las combinaciones son evaluadas de manera empírica en el contexto de las pruebas clínicas.

Los liposomas cargados con combinaciones de fármacos exhiben las propiedades farmacocinéticas de los propios liposomas, tales como circulación prolongada, eliminación por ruta retículo endotelial, permeabilidad incrementada y acumulación en el tumor mediada por la retención. Estas características pueden incrementar la eficacia terapéutica y reducir la toxicidad de esos fármacos.

Los fármacos atrapados dentro de un liposoma no son activos biológicamente y deben ser liberados para ingresar a su blanco intracelular.

En los tumores sólidos, se ha demostrado que los liposomas son tomados predominantemente por macrófagos de infiltración tumoral [65], los cuales “activan” el fármaco liposomal mediante la degradación de la membrana liposomal.

En base a las diferencias inherentes entre agentes terapéuticos, los agentes co-encapsulados pueden ser liberados desde los liposomas a diferentes velocidades dificultando la predicción de las concentraciones efectivas del fármaco libre dentro del microambiente tumoral.

Sin embargo, una co-encapsulación estable sincroniza la distribución del fármaco al menos al punto de extravasación de la vasculatura, brinda una liberación de la combinación de fármacos a una velocidad específica, y puede proveer ventajas terapéuticas únicas como el sinergismo terapéutico.

Este concepto ha sido mostrado por Mayer y colaboradores en combinaciones de irinotecan/fluoxuridine, daunorrubicina/cytarabine, y cisplatino/daunorrubicina [64]. En otros estudios, doxorrubicina y verapamil co-encapsulados mostraron ser altamente efectivos contra células que presentan resistencia multifármaco [66].

La habilidad de los transportadores liposomales de fármacos para determinar la farmacocinética de agentes *in vivo*, ha favorecido enormemente el potencial traslacional de las combinaciones de fármacos identificadas *in vitro*. Así mismo, provee una herramienta evaluable para proyecciones preclínicas de combinaciones de agentes terapéuticos para desarrollo clínico.

4.5.2 Características químicas de los liposomas

La afinidad que presentan los liposomas por diversos tejidos puede ser modificada mediante la preparación de vesículas que contienen fosfolípidos con diferentes configuraciones en las cadenas de ácidos grasos. Estas micropartículas pueden ser sólidas o líquidas a temperaturas definidas [67, 68].

Modificando la carga sobre la vesícula liposomal es posible influir de manera importante su distribución en el cuerpo humano. Las vesículas cargadas negativamente, por ejemplo, ingresan a la célula por un proceso de fusión. Esto permite que el fármaco sea descargado dentro del citoplasma de la célula. Por otro lado, las vesículas neutras, son incorporadas dentro de la célula por fagocitosis. Esto genera una exposición del fármaco al sistema hidrolítico lisosomal de las células. Los liposomas de carga positiva y los neutros presentan procesos de difusión más lentos que aquellos cargados negativamente.

4.5.2.1 Proceso de formación

Las moléculas lipídicas que constituyen la bicapa adoptan de manera espontánea (una vez que están en solución acuosa) un arreglo que consiste en flexionarse o plegarse y exponer sus grupos polares (cabezas) hacia la fase acuosa. Las partes hidrocarbonadas de naturaleza hidrofóbica (colas), se empaquetan formando un retículo regular en el que cada una de ellas se encuentra unida a sus vecinas mediante interacciones de *van der Waals*. Es decir, se forma una estructura esférica estable a partir de una bicapa de hojas cerradas, concéntricas, de lípidos bimoleculares que aíslan los compartimentos acuosos.

La localización exacta del fármaco en el liposoma depende sobre todo de las características fisicoquímicas del fármaco y de la composición de los lípidos constituyentes [69]. Liposomas estables son formados sólo a temperaturas superiores a la temperatura de transición de la mezcla de fosfolípidos (T_m) de la fase “gel a líquido-cristalino,” la cual representa la temperatura del punto de fusión de las cadenas acilo. Todos los fosfolípidos tienen una temperatura de transición (T_c) característica y ésta depende de la naturaleza del grupo polar y de cuan largas son las cadenas acilo así como del grado de insaturación de las mismas [69, 70].

Por encima de la temperatura de transición, los fosfolípidos forman una fase líquida-cristalina que presenta una incrementada movilidad de las cadenas acilo. Al disminuir la temperatura por debajo de T_c , se genera una transición a un estado de gel mucho más rígido. Esta transición restringe la movilidad de las cadenas acilo, estrechamente empaquetadas. Cuando las moléculas líquidas adoptan un arreglo para formar estructuras de bicapas cerradas conteniendo agua y solutos, los fármacos son atrapados entre los planos adyacentes de las cabezas polares.

Esta generación de compartimentos ha sido ampliamente estudiada por Roerdink y colaboradores [71].

Dado que los fosfolípidos con doble cadena presentan una configuración espacial de tipo cilíndrica, la estructura que resulta favorecida es la bicapa lipídica. Esto es contrastante con el caso de fosfolípidos con una sola cadena, cuya configuración espacial es más bien cónica, generando una estructura estable de tipo micelar, como se observa en la **Figura 2** [72, 73].

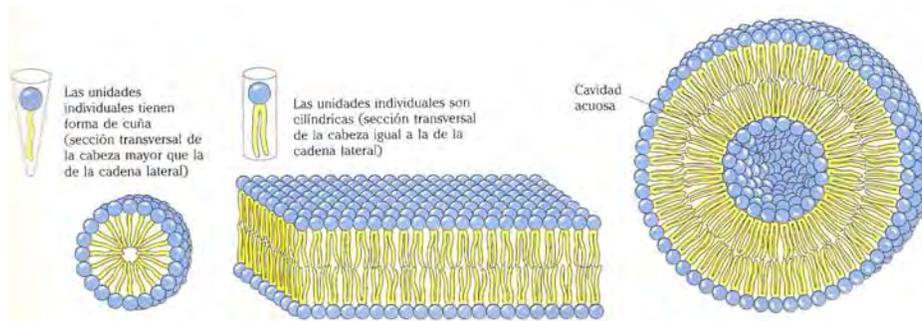


FIGURA 2. Esquema comparativo de la estructura micelar y la estructura liposomal.

Las vesículas liposomales pueden adoptar diferentes conformaciones y de acuerdo a ellas se clasifican en multilaminares (MLV), si poseen varias bicapas concéntricas, o unilaminares. A su vez, las unilaminares pueden ser pequeñas (SUV) o grandes (LUV) como se muestra en la **Figura 3** [41, 74-76]. Estas conformaciones están en función del tipo y longitud del fosfolípido, del grado de insaturación que presenta el ácido graso, así como del método empleado para la preparación de las vesículas [76].

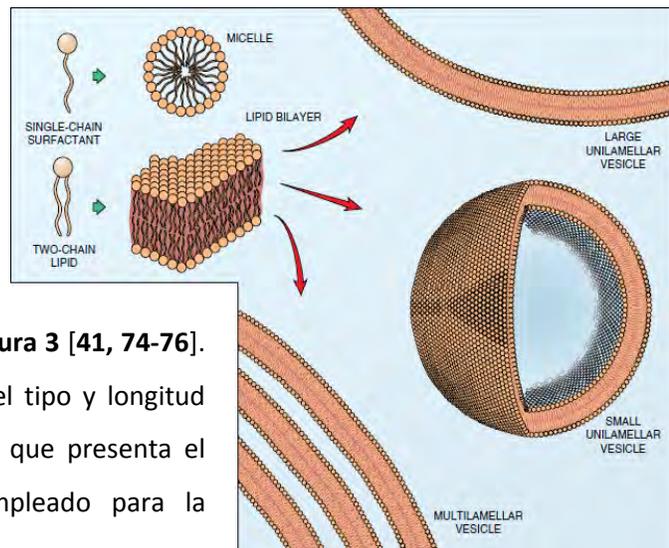


Figura 3. Conformaciones de vesículas liposomales [41].

4.5.2.2 Fosfolípidos

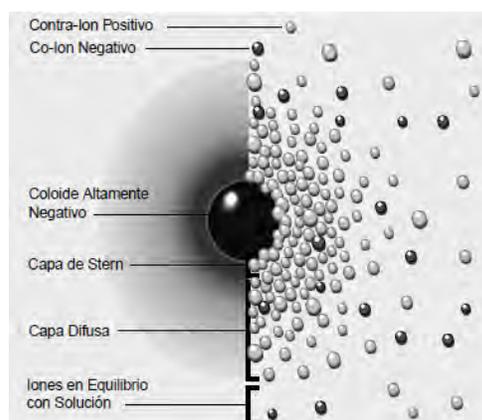
Una gran variedad de fosfolípidos puede ser usada para preparar liposomas. El lípido más usado es la fosfatidilcolina [77, 78] la cual ha sido empleada de manera individual o bien en combinación

con colesterol. Se sabe que el colesterol ayuda a condensar el empaquetamiento de fosfolípidos en las bicapas por encima de la T_c . Así mismo, el colesterol reduce la permeabilidad de las bicapas hacia los compuestos encapsulados. Al intercalarse entre los lípidos de la bicapa, el grupo hidroxilo (-OH) permanece cerca de las cabezas polares de los lípidos y es quien entra en contacto con la fase acuosa [41, 79]. El anillo tipo esteroideo interactúa con las cadenas acilo reduciendo de manera significativa el movimiento de deslizamiento entre los fosfolípidos [73, 80].

Para las moléculas de fármaco encapsulado en el espacio acuoso, la bicapa sirve como una barrera de difusión, permitiendo que los liposomas sirvan como un sistema de ingreso a velocidad controlada.

4.5.2.3 Estabilidad en suspensión

Por su tamaño microscópico, las fuerzas de unión en la superficie del coloide y el líquido son las que determinan su comportamiento. Uno de los mayores efectos de la superficie es el de fenómenos electrocinéticos. Cada coloide contiene una carga eléctrica que generalmente es de naturaleza negativa, aunque también puede ser positiva. Estas cargas producen fuerzas de repulsión electrostática entre los coloides vecinos. Si la carga es suficientemente elevada los coloides permanecen discretos, dispersos y en suspensión. Reduciendo o eliminando estas cargas se obtiene el efecto opuesto y los coloides se agregan y sedimentan fuera de la suspensión [81].



Se usa el modelo de la doble capa para visualizar la atmósfera iónica en la proximidad del coloide cargado y para explicar como actúan las fuerzas eléctricas de repulsión (ver **Figura 4**). Es posible entender este modelo como una secuencia de etapas que ocurren alrededor de un solo coloide negativo, si los iones que neutralizan sus cargas son extraídos repentinamente.

Figura 4. Modelo de la Doble Capa. La vista izquierda muestra el cambio en la densidad de carga alrededor del coloide. La derecha muestra la distribución de iones positivos y negativos alrededor del coloide cargado.

La teoría DLVO (llamada así por Derjaguin, Landau, Verwey y Overbeek) es la clásica explicación de los coloides en suspensión. Esta se basa en el equilibrio entre las fuerzas de repulsión electrostática y atracción tipo *van der Waals*. La teoría DLVO explica la tendencia de los coloides a agregarse o permanecer separados al combinar la atracción de *van der Waals* y la curva de repulsión electrostática: la curva combinada es llamada la energía neta de interacción. A cada distancia el pequeño valor se resta del mayor valor para dar la energía neta. El valor neto se representa entonces arriba si es repulsivo o abajo si es atractivo, y así se forma la curva [82].

Dependiendo de nuestros propósitos es posible alterar el entorno del coloide para aumentar o disminuir la barrera energética. Varios métodos pueden ser usados para este propósito, tales como cambios en la atmósfera iónica, el pH o adicionando compuestos activos para afectar directamente la carga del coloide. En cada caso la medida del potencial zeta indicará el efecto de la alteración, principalmente en su estabilidad.

4.5.3 Preparación de liposomas

4.5.3.1 Métodos de preparación

Los dos métodos de mayor uso para la preparación de sistemas liposomales para la incorporación de fármacos son el de hidratación de la bicapa lipídica y el de evaporación de fase reversa. En ambos casos, los componentes del liposoma son mezclados y disueltos en un solvente orgánico, el cual será posteriormente evaporado formándose una fina película lipídica (ver **Figura 5**).

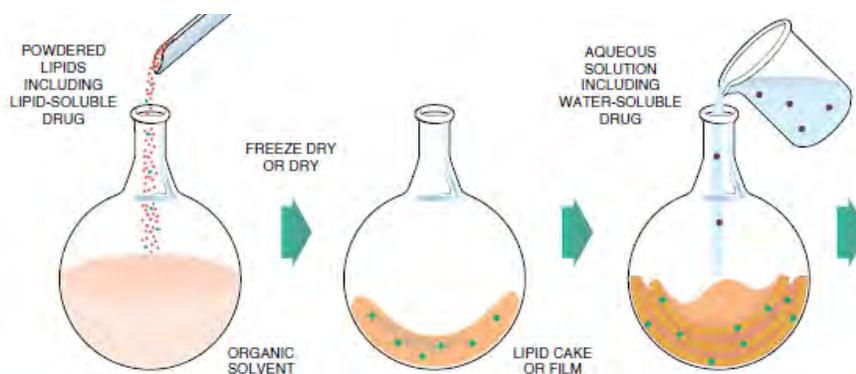


Figura 5. Preparación de liposomas.

En el primer método, la hidratación de los lípidos seguida de una agitación de alta intensidad produce una suspensión de vesículas multilaminares grandes (MLV). Estas resultan demasiado grandes y heterogéneas, y su capacidad de carga se ve disminuida por la irregularidad de las multilaminas impidiendo su uso. Diversos métodos mecánicos, son empleados para disminuir el tamaño de la suspensión. Los liposomas son subsecuentemente homogenizados (ver **Figura 6**) por sonicación, filtración o bien, por extrusión [41].

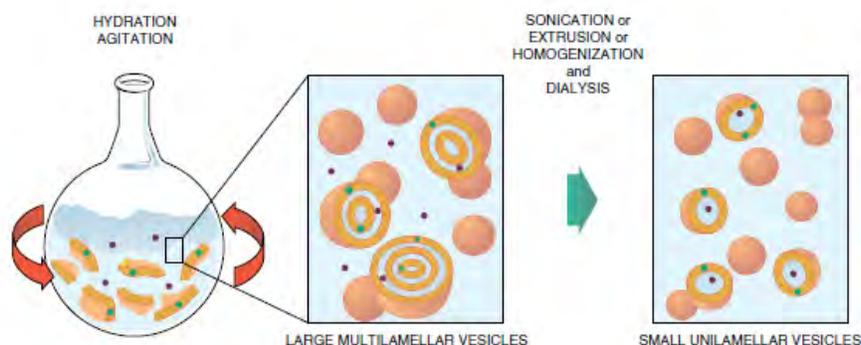


Figura 6.Proceso de hidratación y homogenización de tamaño de las vesículas liposomales.

En el segundo método [76, 83] para la preparación de vesículas liposomales, el fosfolípido es disuelto primeramente en un solvente orgánico y posteriormente esta disolución se adiciona al medio acuoso en agitación vigorosa. El solvente orgánico es removido bajo vacío y la dispersión o emulsión liposomal resultante es homogenizada por filtración o extrusión.

El tratamiento mecánico de las vesículas multilaminares (MLV's) produce fragmentos pequeños de bicapas, los cuales pueden agregarse y formar una nueva estructura esférica cerrada. El tamaño de los liposomas resultantes depende de un balance entre las energías del sistema y la disipada, así como de la flexibilidad de la cadena hidrocarbonada.

La sonicación (uso de ondas sonoras) también puede ser empleada a fin de producir vesículas. Su uso favorece la obtención de vesículas unilaminares pequeñas (SUV's) [72, 76].

Para usos terapéuticos, una suspensión liposomal debe ser definida de manera precisa en lo que respecta a la concentración de fármaco y de lípidos, distribución de tamaño, porcentaje de moléculas de fármaco no encapsulado, pH, osmolaridad, conductividad, presencia de posibles productos de degradación y endotoxinas.

4.5.3.2 Homogenización del tamaño de los liposomas

La homogenización del tamaño de las vesículas fosfolípídicas resulta sumamente importante cuando estas se pretenden cargar con una concentración dada de algún fármaco para alguna aplicación posterior de tipo terapéutico [84]. Diferentes estudios han determinado que los requerimientos básicos que deben cumplir estos sistemas para ser funcionales son: ser cerrados y unilaminares y que las vesículas sean razonablemente grandes para poder atrapar un volumen apreciable, evitando así, problemas asociados con sistemas muy pequeños [85] o altamente curvados. Al homogenizar el tamaño también se logra que la vesícula posea igual potencial de membrana en toda la bicapa y que la distribución de los fosfolípidos sea simétrica.

Las vesículas preparadas por cualquiera de los métodos antes mencionados presentan heterogeneidad de tamaño. Por lo que es indispensable la aplicación de algún método adicional para producir liposomas de menor tamaño y con una distribución regular del mismo. Uno de los métodos más eficaces para llevar a cabo dicho efecto es la extrusión [86, 76].

El proceso consiste en hacer pasar varias veces la suspensión liposomal a través de filtros de policarbonato con tamaños de poro deseados. Para facilitar el paso de la suspensión, esta puede ser sometida a presiones de nitrógeno, argón o incluso aire. El proceso debe llevarse a cabo a la T_c del fosfolípido (ver **Figura 7**).

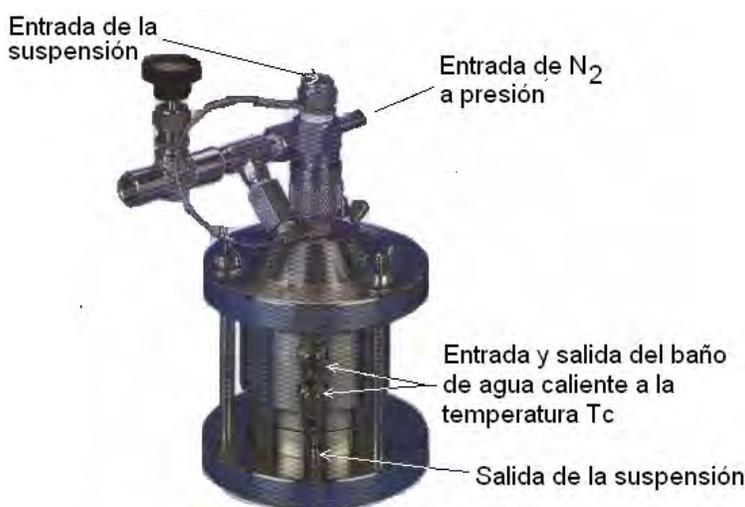


Figura 7. Equipo de extrusión para homogenización de tamaño de liposomas [87].

4.5.3.3 Purificación de los liposomas

La purificación de los liposomas tiene dos principales objetivos:

- a) Remover el material de bajo peso molecular que no haya sido atrapado en el interior acuoso del liposoma por encapsulación (compuestos hidrofílicos) o bien, por una incorporación poco efectiva dentro de la bicapa lipídica (compuestos hidrofóbicos).
- b) Remover fármaco que fue atrapado de inicio y posteriormente liberado durante la homogenización de tamaño (por la ruptura de multicapas), o bien, por difusión mediante la membrana lipídica (al no alcanzar la estabilización dentro del liposoma).

Existen tres principales métodos para la purificación de los liposomas:

- 1) Columna de filtración: Es en esencia una difiltración bajo fuerza gravitacional o por diferencia hidrostática entre el reservorio del solvente y el orificio de salida. Sephadex G-50 o G-100 son usados comúnmente. También pueden ser utilizados Sepharose 2B-6B o Sephacryl S200-S1000 [88-90].
- 2) Centrifugación: Se pueden aplicar tres diferentes tipos de centrifugación, la diferencial, por gradiente de densidad y a través de tamices moleculares. De manera reciente, se ha implementado la ultracentrifugación diferencial de alta velocidad para eliminar los liposomas más grandes de la suspensión liposomal, obteniéndose altas concentraciones de SUV's [76, 91].
- 3) Diálisis: Es un proceso de difusión selectiva de iones a través de una membrana de carácter semipermeable, que se utiliza para la separación de moléculas de diferente tamaño. La suspensión liposomal a purificar es vertida al interior de membranas (hechas de celulosa u otro material) con un tamaño de poro adecuado. Posteriormente, la membrana es sumergida en un medio provisto de iones que inducirán el intercambio y la consecuente purificación [44, 57].

4.5.4 Caracterización fisicoquímica de las suspensiones liposomales

4.5.4.1 Cuantificación de fosfolípidos

Existen dos métodos espectrofotométricos para llevar a cabo la cuantificación de los fosfolípidos contenidos en las suspensiones finales de liposomas:

a) Ensayo Bartlett [92, 76]:

El principio de Bartlett se basa en la determinación colorimétrica de fosfato inorgánico. El contenido fosfolipídico de los liposomas puede determinarse después de la destrucción de los fosfolípidos con ácido perclórico para obtener fosfato inorgánico a partir de ellos [47, 93]. El fosfato inorgánico es convertido a ácido fosfomolibdico por la adición de molibdato de amonio, el cuál es reducido a un complejo de color azul por el ácido 4-amino-2-naftilsulfónico en calentamiento. El complejo colorido puede ser determinado colorimétricamente a una longitud de onda (λ) de 830 nm. Este ensayo ha sido modificado por Barenholz y colaboradores [94].

b) Ensayo Stewart [95]:

En el ensayo de Stewart para fosfolípidos, la habilidad de los fosfolípidos para formar complejos con ferrotiocianato de amonio en una solución orgánica, es aprovechada. La ventaja de este método es que la presencia del fosfato inorgánico no interfiere con el ensayo (a diferencia del ensayo de Bartlett). Un simple factor de conversión es usado para transformar los valores de absorbancia (a una $\lambda=488$ nm) en miligramos de fosfolípido [95]. Dado que este factor es diferente para fosfolípidos con grupos polares diferentes, el método no se puede aplicar a muestras donde existe una mezcla desconocida de fosfolípidos.

4.5.4.2 Cuantificación del principio activo encapsulado

La determinación de la cantidad del principio activo atrapado en los liposomas es esencial antes de poder estudiar el comportamiento de dicho material atrapado en sistemas físicos o biológicos. Una vez que se ha removido todo el material no asociado a liposomas, por las técnicas

de purificación antes descritas, se debe estudiar minuciosamente las características fisicoquímicas de la sustancia encapsulada y las técnicas analíticas aplicables según sea el caso [45, 76]. Entre las técnicas de mayor uso y precisión se encuentran la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) y las técnicas espectrofotométricas.

4.5.4.3 Determinación del tamaño de partícula

La medición del tamaño de las partículas (vesículas lipídicas) presentes en una suspensión liposomal, puede llevarse a cabo por diferentes técnicas. Algunas de ellas son: la Microscopía de transmisión electrónica, la microscopía confocal y la Espectroscopía de Correlación Fotónica.

Esta última, se basa en el fenómeno de dispersión dinámica de luz (DLS) y en la dispersión cuasi-elástica de luz (QELS). Es aplicable a partículas suspendidas en un líquido, que presentan un estado de movimiento aleatorio debido al movimiento Browniano. Cuando un haz de luz se hace incidir en la dispersión coloidal, las partículas dispersan parte de la luz en todas direcciones. Si la luz es coherente y monocromática, como en el caso de un láser (ver **Figura 8**), es posible observar fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad dispersada usando un detector adecuado como un fotomultiplicador capaz de operar en modo de contador de fotones. Estas fluctuaciones, surgen del hecho que las partículas son suficientemente pequeñas como para someterse a un movimiento térmico aleatorio (Browniano) y que la distancia entre ellas varía constantemente [96, 97].

Para partículas con diámetro promedio de 250 nm, la intensidad de la luz dispersada es dependiente del ángulo. Esta dispersión dinámica de luz (Dispersión de Mie) usa la dispersión para medir el promedio de difusión de las partículas. Usando la ecuación de Stokes Einstein y conociendo la viscosidad del medio, el diámetro de las partículas puede ser calculado.

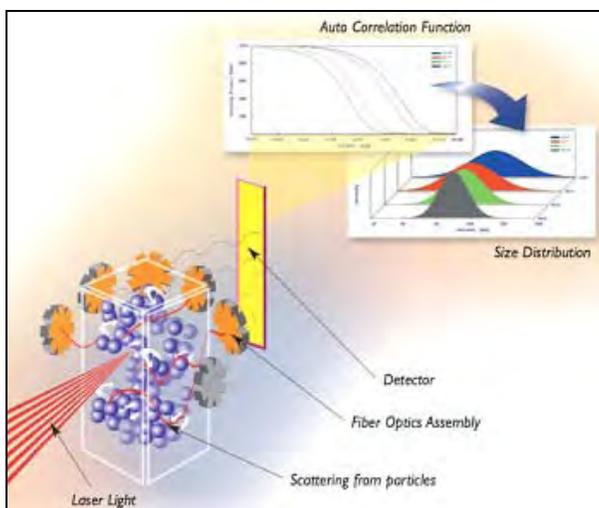


Figura 8. Medición de tamaño de partícula mediante dispersión dinámica de luz (DLS).

4.5.4.3 *Determinación del potencial zeta.*

Un factor crucial para mantener el flujo normal en los capilares es la conservación del máximo estado de dispersión de las partículas suspendidas en un coloide. Esto impide que las partículas se agreguen y formen precipitados bloqueando pequeños vasos. El potencial zeta es la medida de la fuerza eléctrica que existe entre átomos, moléculas, partículas y/o células en un líquido. En los seres vivos esto evita la coagulación intravascular. Por esto, cuanto mayor sea esta fuerza dispersora, mayor estabilidad tendrá la solución y mayor será su capacidad para acarrear partículas en suspensión. A su vez cuantas más partículas puedan coexistir en el medio, más efectiva resultará la suspensión liposomal [98, 83].

El **Cuadro 2** muestra, de manera simple, la relación entre la estabilidad de una solución y su potencial zeta [98].

Cuadro 2. Relación de estabilidad y potencial zeta de una suspensión.

Estabilidad	Potencial Zeta (mV)
Muy buena. Dispersión extrema	-100 a -60 mV
Buena	-60 a -40 mV
Moderada	-40 a -30 mV
Umbral de leve dispersión	-30 a -15 mV
Umbral de aglomeración	-15 a -10 mV
Fuerte aglomeración y precipitación	-5 a +5 mV

El potencial zeta se presenta donde se unen la capa difusa y la de *Stern* y puede ser medido de una manera muy simple, mientras que la carga de la superficie y su potencial resultan difíciles de determinar. Este potencial 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.

Su determinación en una solución, es posible aplicando un campo eléctrico en el líquido, lo que hará que las partículas cargadas se muevan hacia el polo positivo o negativo del campo aplicado. La dirección elegida por las partículas indica claramente el signo de la carga que poseen. La velocidad con la cual se trasladan es proporcional a la magnitud de la carga. Determinando ambas, dirección y velocidad, bajo la influencia de un campo eléctrico conocido es posible calcular la movilidad y el potencial zeta [99-101].

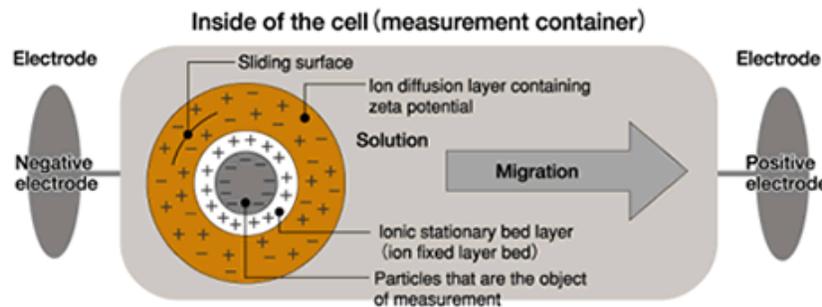


Figura 9. Esquema para la determinación del potencial zeta (ζ).

4.5.5 Liofilización de liposomas

La liofilización se usa frecuentemente para mejorar la estabilidad fisicoquímica de liposomas que serán empleados como sistemas terapéuticos. Esta técnica remueve el agua libre del liposoma, mediante un proceso de sublimación [102-106], provocando que el agente terapéutico quede atrapado en una matriz sólida. En este estado, la degradación química de compuestos lábiles, que pueden ser afectados en gran medida durante un proceso de secado convencional, puede ser retrasada de manera significativa [107].

La liofilización involucra varias etapas:

- Congelación (y acondicionamiento en algunos casos) a bajas temperaturas.
- Secado por sublimación del hielo (o del solvente congelado) del producto congelado, generalmente a muy baja presión.
- Almacenamiento del producto seco en condiciones controladas.

Generalmente, al liofilizar adecuadamente un material, éste se puede almacenar por períodos muy largos con reducciones muy bajas de sus características organolépticas, físicas, químicas y biológicas.

La congelación del material

Cada producto debe congelarse de una manera tal que garantice que sufrirá pocas alteraciones en el proceso posterior de sublimación. Se debe conocer con precisión:

- La temperatura en la que ocurre la máxima solidificación,
- La velocidad óptima de enfriamiento,
- La temperatura mínima de fusión incipiente.

Se busca que el producto ya congelado tenga una estructura sólida sin intersticios en los que haya líquido concentrado para propiciar que todo el secado ocurra por sublimación. Se pueden obtener distintas mezclas de estructuras luego de la congelación que incluyen cristales de hielo, eutécticos, mezclas de eutécticos y zonas vítreas/amorfas. Estas últimas son propiciadas por la presencia de azúcares, alcoholes, cetonas, aldehídos y ácidos, así mismo como por las altas concentraciones de sólidos en el producto inicial.

El secado por sublimación

El proceso de secado como tal puede ocurrir o no a bajas presiones pero en tales condiciones es mucho más eficiente el proceso difusivo. El paso de hielo a vapor requiere gran cantidad de energía que suministrada en alto vacío pues la interface de secado se mueve hacia el interior de la

muestra y el calor tiene que atravesar capas congeladas (sistemas liofilizados en bandeja, sin granular) o secas (en granulados), generándose un considerable riesgo de fusión del material intersticial o quemar la superficie del producto que ya está seco.

Cuando se realiza el secado mediante la liofilización se distinguen tres fases o etapas. Cuando en el proceso de liofilización se comienza el calentamiento, empieza a formarse un frente de sublimación o interfase entre la capa seca y la capa congelada de la muestra el cual avanza progresivamente, y para un determinado instante, a una temperatura de interfase (T_s) le corresponde una determinada Presión de saturación (P_i).

La transferencia de masa ocurre por la migración de vapores a través de la capa seca de la muestra bajo la acción de una diferencia de presión, esta transferencia es alta cuando la diferencia de presión es grande. Las tres fases que se distinguen son [102, 103]:

Fase 1: Llamada etapa conductiva. Inicialmente, por el calentamiento de la muestra, la velocidad de sublimación crece rápidamente hasta llegar a un máximo. El tiempo para agotar esta fase es relativamente corto; en ella se lleva a cabo la mayor parte de remoción de agua del producto (entre un 75-90%), siendo el mecanismo preponderante la transferencia de calor por conducción.

Fase 2: Primera etapa difusiva. Muestra un descenso importante de la velocidad de sublimación debido a la formación de una capa porosa de material seco que opone resistencia creciente al flujo de calor y al vapor a medida que procede el secado.

Fase 3: Segunda etapa difusiva. La velocidad de sublimación continúa decreciendo de forma que se aproxima a cero. Esto debido a que el calor necesario para retirar el agua ligada es más alto que el calor de sublimación.

5. JUSTIFICACIÓN

En el presente proyecto se plantea el interés por desarrollar sistemas de transporte y liberación de agentes citotóxicos, que permitan depositar de manera más eficiente la dosis terapéutica necesaria para controlar y/o eliminar un tumor, y reducir de manera significativa los efectos secundarios asociados con la acción citotóxica de los fármacos antineoplásicos.

Baste mencionar que una gran limitante en el tratamiento de los padecimientos oncológicos que actualmente se llevan a la práctica clínica, está asociada con el alto grado de toxicidad que se produce en tejido sano como efecto de la inespecificidad que caracteriza a los tratamientos de quimio y radioterapia. Los efectos secundarios que se observan durante la realización del tratamiento no solo merman la calidad de vida del paciente oncológico, sino que además determinan que los pacientes no puedan continuar con la totalidad del tratamiento, reduciendo la expectativa del éxito del procedimiento terapéutico.

Al co-encapsular diferentes fármacos antineoplásicos dentro de vesículas liposomales, no solo se pretende disminuir la toxicidad asociada a estos y generar una liberación paulatina de los agentes citotóxicos, específicamente se pretende potenciar el mecanismo de acción al suministrar un tratamiento combinado que disminuya los posibles efectos adversos que pueden producirse como resultado de una ingesta masiva de dichas sustancias en forma libre y por separado.

Particularmente, el desarrollo del proyecto plantea ofrecer a los pacientes que son atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología, una alternativa de tratamiento de menor costo y menor toxicidad, mejorando su calidad de vida durante y después del tratamiento.

6. OBJETIVOS

6.1 OBJETIVO GENERAL

Elaboración y caracterización fisicoquímica de una formulación liposomal para la co-encapsulación y transporte de los agentes de quimioterapia doxorubicina y 5-fluorouracilo.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Implementar técnicas de encapsulación de doxorubicina (adriamicina) y 5-fluorouracilo en liposomas.

- Realizar pruebas para la evaluación fisicoquímica de la formulación liposomal, que permitan establecer su composición, morfología, eficiencia y estabilidad de carga del fármaco, así como la estabilidad de las vesículas en suspensión.

7. DESARROLLO EXPERIMENTAL

7.1 MÉTODO PARA LA ELABORACIÓN DE LA SUSPENSIÓN LIPOSOMAL

A continuación se describen las metodologías implementadas en la elaboración de las diferentes suspensiones liposomales que se utilizaron para encapsular doxorubicina y 5-fluoracilo, mediante la técnica de rehidratación de lípidos. Se describen primero la metodología general utilizada en la elaboración de la suspensión y posteriormente se especifican las variantes experimentales para cada caso particular de los fármacos.

7.1.1 Preparación de bicapa lipídica [41, 76]

En un vaso de precipitados de 50 ml se depositaron: Fosfatidilcolina hidrogenada de soya (HSPC) y Colesterol (CHOL) para la constitución de la membrana liposomal, Metoxi-polietilenglicol (m-PEG) en forma de sal de amonio de 1,2-Diaesteroil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[Metoxi-polietilenglicol-2000] para formar el recubrimiento estérico del liposoma y, α -Tocoferol [(±)- α -Tocoferol] como medio preservador (antioxidante) de los fosfolípidos. Las proporciones molares utilizadas inicialmente se muestran a continuación:

$$\begin{array}{l} \text{HSPC : CHOL : m-PEG : } \alpha\text{-Tocoferol} \\ 51 : 42.5 : 5 : 1.5 \end{array}$$

Los componentes fueron disueltos en 10 ml de cloroformo (*Sigma-Aldrich*, USA.), a temperatura ambiente, empleando un agitador y parrilla magnéticos.

Una vez obtenida una mezcla homogénea, ésta se trasvasó a un matraz de bola de 500 ml y se sometió a agitación continua en un rotavapor (*Laborota-400, Heidolph*, Alemania), manteniendo el sistema a 40°C, bajo una presión reducida de vacío y a una velocidad de agitación de 240 rpm, hasta evaporar por completo el solvente orgánico. Posteriormente, el matraz de bola

se mantuvo bajo condiciones de presión reducida y con una agitación constante de 60 rpm por un periodo de 30 minutos.

Cabe resaltar que se debió tener especial cuidado durante la evaporación del disolvente a fin de que los fosfolípidos no llegasen a cristalizarse, pues se observó que esto repercute directamente en la formación de la bicapa lipídica y por ende en la de los liposomas.

Una vez formada la bicapa lipídica (cama de lípidos) sobre las paredes del matraz, éste se retiró del rotavapor y se colocó dentro de un desecador, al que le fue aplicado vacío, donde la muestra permaneció durante 24 hrs con el fin de secar por completo la cama lipídica.

7.1.2 Hidratación de bicapa lipídica

En función de la proporción másica: fármaco/fosfolípido (m/m), se procedió a pesar el fármaco (5-FU o DOXO) y disolverlo.

La mitad de la masa del fármaco se colocó en un vaso de precipitados y se disolvió en una solución de sulfato de amonio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) de concentración 300 mM, previamente preparada y filtrada a través de un sistema *Corning CA (Cellulose Acetate)* de acetato de Celulosa con tamaño de poro de 0.22 μm .

El resto del fármaco se agregó y disolvió en un segundo vaso de precipitados con una solución de PBS (*Phosphate Buffer Solution*) esterilizada a 110°C por un periodo de 20 minutos, que contenía una concentración 300 mM de sacarosa y cuyo pH se ajustó a 6.3 unidades con HCl estéril.

Ambas soluciones se agitaron vigorosamente a 65°C durante 30 min. Al término, el fármaco en sulfato de amonio se agregó a la cama lipídica haciendo pasar la solución a través de un filtro de 0.22 μm . El matraz con la cama lipídica y la solución de sulfato de amonio se colocó en el rotavapor donde se mantuvo a una velocidad de 120 rpm por un periodo de 30 minutos y a una temperatura de 65°C, que corresponde a la temperatura de transición (T_c) del fosfolípido (HSPC).

La segunda solución (PBS + fármaco) se adicionó al matraz de bola siguiendo el mismo proceso de filtrado y agitación.

Una vez concluida la agitación, el matraz se dejó en reposo a temperatura ambiente por una hora. Posteriormente la solución fue trasvasada a un tubo cónico (*BD Falcon™*, USA.) y se conservó a 4°C hasta su posterior utilización.

Todos los procedimientos descritos anteriormente se realizaron dentro de una campana de flujo laminar *SterilGARD®* III (BAKER Company, USA.), utilizando material estéril que fue protegido de la luz al igual que los fármacos utilizados, con el fin de evitar la degradación de estos últimos.

7.1.3 Remoción del fármaco no atrapado

Para este fin se empleó la técnica de diálisis pasiva con membranas para diálisis de 3500 Da (*Spectra/Por®*, Canada). Como medio de purificación se utilizó PBS con una concentración 300 mM de sacarosa y con un pH de 6.3, que se preparó y esterilizó previamente.

Se usó una relación 1/20 (volumen/volumen) de suspensión liposomal/medio de diálisis (PBS). Cada 24 horas el medio fue sustituido por medio libre de fármaco hasta completar 72 horas. Una vez concluido este tiempo, la suspensión se extrajo de la membrana y fue colocada en un tubo cónico estéril. El tubo se protegió de la luz y se conservó a 4°C hasta el siguiente procedimiento.

7.1.4 Extrusión de las vesículas liposomales [84, 88]

El proceso de extrusión se utilizó para homogenizar el tamaño de las vesículas liposomales. La extrusión se llevo a cabo del modo siguiente:

Primero, el volumen de la suspensión se duplicó con PBS (sacarosa 300 mM y pH=6.3) para facilitar el proceso. Antes de la extrusión, la suspensión se llevó a 65°C sumergiendo el tubo cónico

con la preparación liposomal en un baño de agua a dicha temperatura. Posteriormente, la suspensión se hizo pasar, bajo condiciones estériles, por un equipo de extrusión (*LipexTM Extruder*, *Northern Lipids*, Canada) que se mantuvo a la temperatura de transición de los fosfolípidos (HSPC, $T_c=65^\circ\text{C}$) mediante un baño recirculador. Se empleó una presión moderada (300-800 psi) de nitrógeno para conducir la suspensión a través de los filtros de policarbonato *Whatham* (*Nucleopore Northern Lipids*, Canada) de 400 nm (2x), 200 nm (2x) y 100 nm (5x). Una vez que se completaron los ciclos de extrusión, los liposomas se conservaron a 4°C y protegidos de la luz. Todo el proceso se realizó dentro de la campana de flujo laminar.

7.1.5 Remoción del fármaco liberado durante la extrusión

Se empleó nuevamente la técnica de diálisis pasiva. La suspensión se colocó en membranas para diálisis (Spectra/ PorÒ MWCO: 3500, Canada). Como medio de purificación se empleó PBS con una concentración 300 mM de sacarosa, y con un pH de 6.3, que se esterilizó previamente. Se utilizó una relación 1/20 (v/v) de suspensión liposomal/PBS, durante este proceso.

7.2 EXPERIMENTO 1

7.2.1 Liposomas cargados con 5-fluorouracilo (5-FU)

Se prepararon dos lotes de 12 ml de liposomas tipo *Stealth* (100 y 50 nm respectivamente), empleando una proporción másica 1:13 del fármaco respecto a los componentes hidrofóbicos (fosfolípidos), y un tercer lote (100 nm) usando una relación 1:6. Se consideró una concentración final de 5 mg/ml de 5-FU en los tres lotes.

7.2.2 Liposomas cargados con doxorubicina (DOXO)

Se prepararon dos lotes de liposomas (100 nm) tipo *Stealth*, de 10 ml c/u, utilizando una proporción másica 1:40.5 de DOXO respecto a la cantidad de componentes hidrofóbicos. Se consideró una concentración final de 0.74 mg/ml de DOXO. Fueron aplicadas dos variantes en términos del procedimiento de encapsulación:

- a. Lote 1. Se realizó la hidratación invirtiendo el proceso habitual (descrito en la sección **7.1**), es decir, en este caso se utilizó primero una solución de DOXO en PBS, y posteriormente se agregó la solución de DOXO en sulfato de Amonio (300 mM) a la cama lipídica.
- b. Lote 2. Se realizó el mismo procedimiento de rehidratación descrito para el Lote 1, pero, en un tercer paso de hidratación, fue agregada una solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (700 mM) para inducir la formación de un gradiente con la finalidad de incrementar la encapsulación de DOXO.

7.3 EXPERIMENTO 2

La siguiente metodología se implementó para evaluar un posible incremento en la eficiencia de encapsulación de 5-FU, así como una mejora en el proceso de homogenización del tamaño de las vesículas, en función de la cantidad de colesterol utilizada en la formulación.

La preparación de la cama lipídica se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Sección 7.1). La proporción molar utilizada en este caso fue la siguiente:

HSPC : CHOL : m-PEG : α -Tocoferol
55 : 35.5 : 7 : 2.5

Se preparó un lote de liposomas (100 nm) tipo *Stealth* de 10 ml empleando una proporción molar 1:6 (5-FU: fosfolípidos). Se consideró una concentración final de 5 mg/ml de 5-fluorouracilo.

7.4 EXPERIMENTO 3

En este procedimiento se generó un gradiente mayor en la zona transmembrana de los liposomas, con el fin de facilitar el ingreso de los fármacos a su interior. Se consideró para este estudio, la preparación de dos tipos de suspensiones, una para la encapsulación de DOXO y otra para la co-encapsulación de DOXO y 5-FU.

El gradiente se describe como el cociente de la relación:

$$\frac{[(NH_4)_2SO_4]_{INTERIOR_del_LIPOSOMA}}{[(NH_4)_2SO_4]_{EXTERIOR_del_LIPOSOMA}}$$

Para ello se desarrollaron dos estrategias. Por una parte, se incrementó la concentración de sulfato de amonio, que contendría la solución para rehidratar la cama lipídica; y por otro lado, se implementó un proceso de liofilización a fin de remover la totalidad del medio de suspensión (PBS).

El procedimiento utilizado en la formación de estos liposomas es el mismo que se describió con anterioridad, salvo las siguientes modificaciones:

- La proporción másica utilizada para la preparación de la suspensión liposomal con DOXO fue 1:8 (fármaco: componentes hidrofóbicos); y para la suspensión de co-encapsulación de DOXO y 5-FU la proporción fue 1:4. El cálculo de la masa requerida para cada componente se hizo considerando una concentración final de 2 mg/ml en la suspensión de DOXO y de 1mg/ml para cada fármaco en la suspensión de co-encapsulación.
- En la rehidratación de la bicapa lipídica se utilizó, desde el inicio, un volumen total (10 ml) de sulfato de amonio 700 mM. A diferencia de la metodología anterior, en la solución de sulfato de amonio no se disolvió parte del fármaco (DOXO o 5-FU) a encapsular.
- Previo a la extrusión, se implementaron ciclos de sonicación, con un equipo D150H *Ultrasonic Cleaner* (DELTA, USA.) con una potencia de salida de 150 W, con el fin de facilitar la

homogenización del tamaño de los liposomas. Se aplicaron cinco ciclos: 2 min de sonicación seguidos de 2 minutos de relajación a una temperatura de 30°C.

- Después de la sonicación los liposomas, cargados con el sulfato de amonio, se liofilizaron por 24 horas en un equipo *Free Zone*[®] 7670521 (*Freeze Dry System Labconco*, USA.). Al término, la suspensión se mantuvo en refrigeración (4°C).
- Se prepararon soluciones de los fármacos en PBS (300 mM de sacarosa, pH 6.3). Para las soluciones de doxorrubicina, se usó clorhidrato de doxorrubicina liofilizado contenido en frascos ampulas de la marca *DOXOLEM*[®] (*Lemery S.A. de C. V.*). Para el 5-fluorouracilo, se utilizó este compuesto grado reactivo (pureza $\geq 99\%$, TLC) (*Sigma*, USA.).
- La suspensión liofilizada se reconstituyó con la solución del fármaco a encapsular mediante agitación a 3000 rpm durante tres minutos hasta homogenizar la mezcla: liposomas – sulfato de amonio – fármaco – PBS. Posteriormente, esta mezcla se trasvasó a un matraz de bola que se agitó en el rotavapor a 180 rpm por 30 minutos y a una temperatura de 65°C. La suspensión resultante se almacenó a 4°C.
- La suspensión de liposomas cargados con alguno de los fármacos (DOXO o 5-FU) o bien, con una combinación de ambos, se sometió nuevamente a sonicación, aplicando dos ciclos: 1 minuto de sonicación y un periodo de relajación de 2 minutos a una temperatura de 30°.
- Durante la extrusión, se tomaron muestras de 1 ml al término de cada ciclo de filtración (400, 200 y 100 nm), a fin de evaluar el grado de liberación de fármaco del interior de los liposomas debido a este proceso.

7.5 EXPERIMENTO 4

Al observar que el gradiente de sulfato de amonio (**Experimento 3**) funcionaba de manera favorable como promotor de la encapsulación de los fármacos doxorubicina y 5-fluorouracilo en sistemas independientes o bien, en el mismo sistema liposomal, se decidió incrementar la concentración de la solución de sulfato de amonio que se emplearía para cargar los liposomas con dicha sal y con ello generar una fuerza impulsora que permitiera el ingreso de cantidades superiores de los fármacos a la zona acuosa de las vesículas formadas.

Para este fin se preparó un solución 1 M de sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en agua desionizada. La preparación de la suspensión liposomal se realizó siguiendo la misma metodología descrita con anterioridad, salvo que en este caso el tiempo de liofilización fue de 36 horas. Las proporciones molares que se emplearon fueron las mismas del Experimento 2:

HSPC : CHOL : m-PEG : α -Tocoferol
55 : 35.5 : 7 : 2.5

Durante el experimento se evaluaron los siguientes lotes:

1. Liposomas cargados con DOXO evaluando dos concentraciones de fármaco (2 y 4 mg/ml) en la suspensión final resultante. En ambos casos la proporción másica (fármaco: fosfolípidos) fue de 1:8.
2. Liposomas cargados con 5-FU, considerando una concentración de 2 mg/ml en la suspensión final, y una proporción másica 1:8.
3. Liposomas cargados con la combinación DOXO-5FU, considerando una concentración final de 1 mg/ml para cada fármaco. La proporción másica también fue de 1:8.

7.6 EXPERIMENTO 5

Para disminuir la pérdida de fármaco encapsulado durante el proceso de extrusión, se implementó una nueva metodología. En este caso los liposomas cargados con sulfato de amonio y preparados de acuerdo con el procedimiento descrito en el **Experimento 4**, se sometieron primeramente a extrusión, hasta alcanzar un tamaño promedio de 200 nm, y posteriormente fueron liofilizados y cargados con fármaco(s). Finalmente los liposomas fueron nuevamente sometidos a sonicación y extruidos para llevarlos a un tamaño \approx 100 nm.

7.7 TÉCNICAS PARA LA CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES LIPOSOMALES

7.7.1 Cuantificación de fosfolípidos en la suspensión liposomal por técnica de Stewart [76, 95]

7.7.1.1 Preparación de ferrotiocianato de amonio (NH_4FeSCN)

Se pesaron 27 g de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (*Sigma-Aldrich*, Alemania) y 30 g de tiocianato de amonio (NH_4SCN) (*Sigma-Aldrich*, Alemania) y se disolvieron en un litro de agua desionizada, agitando vigorosamente la mezcla por un periodo de 20 min, hasta homogenizarla.

7.7.1.2 Curva patrón

Se pesaron 25 mg de HSPC en un vaso de precipitado, y posteriormente éstos se disolvieron en 10 ml de cloroformo (CHCl_3). A continuación la solución se homogenizó agitándola a 3000 rpm por un periodo de 3 minutos, obteniendo una solución homogénea con una concentración de 2.5 mg/ml. Posteriormente, se realizó una dilución 1:10 de dicha solución. Esta nueva solución, con concentración de 0.25 mg/ml, se agitó nuevamente, hasta ser homogenizada.

Se tomaron volúmenes de 0.1, 0.2, 0.3 0.4 y 0.5 ml de dicha solución y se colocaron en tubos de vidrio con tapa (por triplicado). Cada tubo se aforó a 2 ml con cloroformo, y posteriormente se agitaron vigorosamente por un 1 min. En cada muestra se agregaron 2 ml de ferrotiocianato de amonio (NH_4SCN), se agitaron durante 1 min y posteriormente se centrifugaron (*Centrifuge 5702 R, Eppendorf, USA.*) a una velocidad de 3500 rpm durante 5 min y manteniendo una temperatura de 4°C.

Se observó la formación de una fase colorida (fase acuosa) en la parte superior de cada tubo y una fase incolora (fase orgánica) en la parte inferior. La fase acuosa se retiró con una pipeta Pasteur, y la fase clorofórmica se depositó en una celda de cuarzo de 1 cm de longitud. La celda se colocó en un espectrofotómetro *DUÒ 530 (Beckman coulterTM, USA.)*, y se leyó la absorbancia correspondiente a una longitud de onda $\lambda=488$ nm. El procedimiento se repitió con cada uno de los tubos.

7.7.1.3 Cuantificación de fosfolípidos en muestras

Se tomó una muestra de 5 μl de cada uno de los lotes de liposomas y se colocó en un tubo de vidrio, posteriormente se aforó con cloroformo hasta un volumen de 2 ml. Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente y se leyó la absorbancia correspondiente a la fase orgánica. De igual manera que para los puntos de la curva patrón, las muestras de liposomas se prepararon y evaluaron por triplicado.

Debido a que la doxorrubicina presenta una absorbancia con $\lambda=470$ nm, muy cercana a la λ en la que se miden los fosfolípidos, para las suspensiones que contenían DOXO fue necesario remover dicho fármaco de las muestras antes de procesarlas con la técnica de Stewart.

Para ello se realizó lo siguiente:

1. Se tomaron muestras de 10 μl (por triplicado) de cada uno de los lotes de liposomas y se colocaron en un microtubo (*Eppendorf, USA.*) de 2 ml.
2. Se adicionaron 90 μl de agua desionizada y se agitó la mezcla moderadamente durante 1 minuto.

3. Posteriormente, se tomaron 30 μl de la dilución anterior (1:10) y se colocaron en un tubo de vidrio con tapón.
4. El agua presente en la muestra, donde se disolvió la mayoría de la doxorubicina, se secó con nitrógeno gaseoso.
5. Posteriormente se agregaron 15 μl más de agua desionizada, a fin de disolver las trazas de doxorubicina que pudiesen estar presentes.
6. El agua se removió nuevamente con nitrógeno.

7.7.2 Medición de tamaño de partícula

Las mediciones de tamaño de partícula se realizaron a 25°C utilizando un equipo 90PLUS *Particle size & Zeta sizer* (Brookhaven Instruments, USA.), basado en el fenómeno de dispersión dinámica de la luz [96, 97]. Para ello, se disolvieron muestras de 5 μl de cada lote de liposomas en 2.5 ml de una solución de KCl 10 mM dentro de una celda de plástico. Se realizaron tres mediciones de tres minutos cada una, empleando los siguientes parámetros: Temperatura=25°C, Viscosidad=0.890 cP, Índice de refracción= 1.330, Ángulo=90° y λ =657.0 nm. La calibración del equipo se realizó con una suspensión de microesferas de poliestireno en agua (Duke Scientific Corporation, USA.) con las siguientes características: Diámetro Certificado=92 nm \pm 3.7, Desviación estándar=7.0 nm, Coeficiente de variación=7.6%, Diámetro hidrodinámico=89–94 nm (PCS), Densidad de la microesfera=1.05 g/cm³, Índice de refracción=1.59 a 589 nm, Concentración aproximada=1%.

7.7.3 Medición de potencial zeta

Se tomaron muestras de 5 μl de cada lote de liposomas. Posteriormente cada muestra se disolvió en 2.5 ml de una solución 1 mM de KCl dentro de una celda de plástico [99]. La celda se colocó en el equipo 90PLUS *Particle size & Zeta sizer* y se llevó a cabo la medición a 25°C, considerando un pH=5.30, una concentración de 1 mg/ml y una constante dieléctrica=78.54. La calibración del equipo se hizo utilizando el estándar de referencia BI-ZR3 (Brookhaven Instruments Corporation, USA.), con las siguientes características: polvo azul oscuro de origen inorgánico, tamaño de partícula \approx 300 nm, valor promedio de potencial zeta= $-(53 \pm 4)$ mV, conductancia \approx 320 $\mu\text{S} \pm 10\%$.

7.7.4 Cuantificación de fármaco encapsulado

7.7.4.1 Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Las concentraciones de doxorrubicina y de 5-fluorouracilo en las suspensiones liposomales se cuantificaron utilizando métodos descritos previamente [58, 62, 63], con algunas modificaciones.

Para la cuantificación de 5-fluorouracilo se empleó un equipo *Waters 650E solvent delivery* (*Waters Assoc.* Milford MA, USA) con un inyector de 20 μ l (*Rheodyne*, Cotati Ca, USA.), así como un detector UV486. En el caso de doxorrubicina, se utilizó el mismo equipo *Waters 650E* y además un equipo *WATERS-ALLIANCE 2695*, acoplados ambos a un detector de fluorescencia.

7.7.4.2 Extracción de doxorrubicina y 5-fluorouracilo

Para extraer la DOXO y el 5-FU de las vesículas liposomales, se desarrolló el procedimiento que a continuación se describe:

1. Se tomó una muestra de 100 μ l de cada suspensión y se colocó al interior de un tubo *Corning® Cryogenic* de 5 ml.
2. Se adicionaron 10 μ l de una solución del estándar interno correspondiente con concentración 10 μ g/ml (daunorrubicina para la DOXO y 5-clorouracilo para el 5-FU).
3. Se agregaron 2 ml de una mezcla Isopropanol/cloroformo en proporciones 1/1 (v/v).
4. La mezcla contenida en el tubo se homogenizó, agitando a 3000 rpm por un periodo de 3 min.
5. La solución se centrifugó a 6000 rpm, 4°C y por un periodo de 10 min.
6. Se tomaron y desecharon 500 μ l de la parte superior de la solución.
7. Del sobrenadante (1.5 ml) se tomó 1 ml y se trasvasó a un microtubo (*Eppendorf*, USA.) de 2 ml donde se llevó a sequedad total colocándolo en un baño a 40°C y sometiéndolo a una corriente de nitrógeno gaseoso.

8. Tras secar por completo la muestra, ésta se resuspendió en 100 μ l de la fase móvil correspondiente, formiato de amonio (pH=3) para el caso de doxorubicina y KH_2PO_4 (pH=3) en el caso de 5-fluorouracilo.
9. La nueva solución se homogenizó e inyectó en el equipo de HPLC.
10. La concentración de fármaco presente en la solución liposomal se calculó mediante una curva patrón preparada con cada fármaco.

7.7.4.3 *Preparación de la curva patrón para la cuantificación de los fármacos*

Se prepararon soluciones a cuatro diferentes concentraciones de DOXO y 5-FU: 20, 10, 5 y 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en PBS (pH=6.3 y con una concentración 300 mM de sacarosa).

Se siguió el mismo procedimiento descrito anteriormente, utilizando liposomas blanco (sin fármaco) como vehículo.

Condiciones para la cuantificación de 5-fluorouracilo por Cromatografía Líquida de Alta Resolución**(HPLC):**

Columna:	μ BondaPack C-18, 3.9 x 150 mm
Fase móvil:	KH ₂ PO ₄ con pH=3.0
Flujo:	1.5 ml/min
Presión:	1200-1300 psi
Temperatura:	20°C
Tiempo de corrida:	5 min
T de retención para 5-Fluorouracilo:	2.5 min
T de retención para 5-Clorouracilo:	4.1 min
λ :	266 nm

Condiciones para la cuantificación de doxorubicina por Cromatografía Líquida de Alta Resolución**(HPLC):**

Columna:	μ BondaPack C-18, 3.9 x 150 mm
Fase móvil:	55 % de formiato de amonio con pH=3.0 45 % de acetonitrilo
Flujo:	2.0 ml/min
Presión:	1500-1600 psi
Temperatura:	20°C
Tiempo de corrida:	3 min
T de retención para Doxorubicina:	1.0 min
T de retención para Daunorrubicina:	1.3 min
$\chi\lambda$	480 nm
e λ	580 nm
Gain	1
EUFS	1000

8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

8.1 EXPERIMENTO 1

8.1.1 Tamaño de partícula

En la **Tabla 1** se presentan los tamaños de partícula que se midieron para los lotes 1, 2 y 3, cargados con 5-fluorouracilo (5-FU), y de los dos lotes que fueron cargados con doxorrubicina (DOXO). El Lote 2 de 5-FU se hizo pasar por ciclos adicionales (5x) de extrusión a través de filtros de 50 nm, a fin de evaluar posibles mejoras en la homogenización del tamaño al compararlo con el Lote 1 de 5-FU que se preparó de la misma manera, pero que se sometió al proceso normal de extrusión (hasta filtros de 100 nm). En el Lote 3 se modificó la proporción másica (fármaco:fosfolípidos). Para los lotes de DOXO la variación se realizó en términos de la técnica de rehidratación (Ver **Desarrollo Experimental**) así como en la relación másica empleada del agente antineoplásico respecto a los fosfolípidos.

Tabla 1. Tamaño de partícula de liposomas del Experimento 1.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Diámetro efectivo (nm)	Índice de polidispersión	Tipo de distribución poblacional de tamaño
1	5-FU	1:13	167.3 ± 0.7	0.128	Bimodal
2	5-FU	1:13	158.8 ± 0.3	0.189	Bimodal
3	5-FU	1:6	121.5 ± 0.7	0.145	Bimodal
1	DOXO	1:40.5	205.1 ± 1.0	0.155	Bimodal
2	DOXO	1:40.5	191.5 ± 0.9	0.177	Bimodal

El índice de polidispersión mide la homogeneidad de la muestra de liposomas con respecto a su diámetro. Un valor de 0.0 representa una muestra completamente homogénea, mientras que un valor de 1.0 representa una muestra totalmente heterogénea. El tipo de distribución poblacional de tamaño indica la presencia de una, o más zonas o distribuciones de tamaños. La **Figura 1** ejemplifica el caso del Lote 3 de 5-FU, donde se observan dos poblaciones de tamaño, 103.5 nm y 338.9 nm. Un comportamiento similar se observa en los otros lotes.

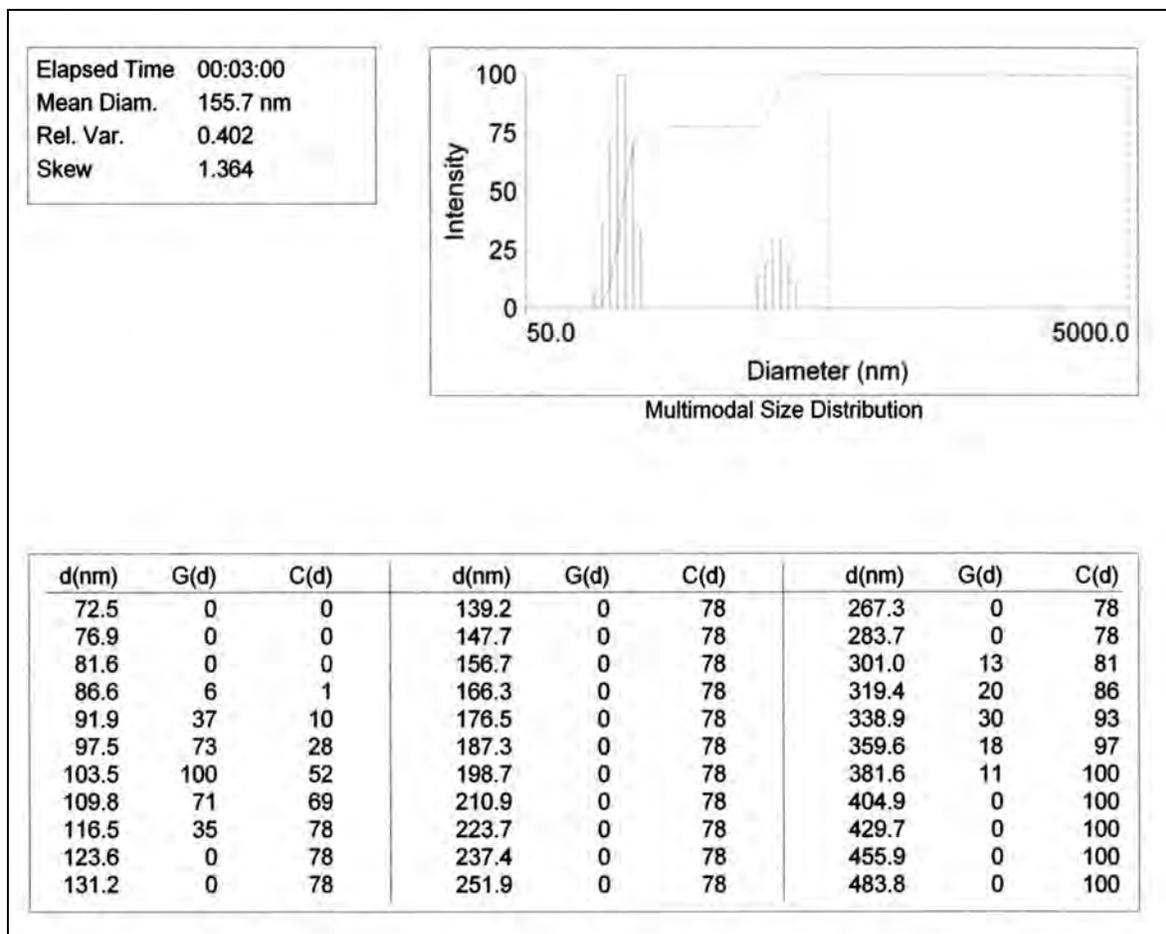


Figura 1. Determinación del tamaño de partícula del Lote 3 de 5-FU en *90Plus Particle Sizing Software Ver. 4.09*. Arriba a la derecha, se observa el histograma con las dos concentraciones de tamaño en la muestra. Abajo, distribución poblacional de tamaño.

Los resultados indican que la proporción fármaco:fosfolípidos, posiblemente influye en el tamaño de los liposomas después de la extrusión. En el caso de los Lotes 1 y 2 de 5-FU, preparados con una relación 1:13 (fármaco:fosfolípidos), el tamaño promedio de las vesículas es 167.3 ± 0.7 y 158.8 ± 0.3 nm respectivamente, mientras que para el Lote 3, elaborado con una relación 1:6, el tamaño pudo ser disminuido hasta 121.5 ± 0.7 nm. Aparentemente, una concentración mayor de fosfolípidos en la suspensión produce vesículas con una membrana más rígida, dificultando la disminución de su tamaño durante el proceso de extrusión [109-111]. Por otra parte, también es posible que la presencia de las moléculas de fármaco al interior de las vesículas genere un requerimiento estérico impidiendo que el volumen de las vesículas pueda ser reducido más allá de un cierto límite [112, 113].

8.1.2 Potencial zeta

La **Tabla 2** muestra el los valores de potencial zeta para los diferentes lotes preparados durante este experimento.

Tabla 2. Datos correspondientes a la medición del potencial zeta.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Potencial zeta (mV)	Estabilidad asociada
1	5-FU	1:13	-33.14 ± 2.52	Moderada
2	5-FU	1:13	-28.11 ± 2.09	Umbral de leve dispersión
3	5-FU	1:6	-33.06 ± 3.37	Moderada
1	DOXO	1:40.5	-34.84 ± 3.40	Moderada
2	DOXO	1:40.5	-32.13 ± 2.78	Moderada

En la tabla anterior se observa que, con excepción del Lote 2 de 5-FU, los lotes preparados poseen potenciales superiores a los -30 mV. Dichos valores de potencial zeta permiten inferir que la metodología implementada y el uso del buffer de fosfatos como medio dispersor, producen suspensiones estables, independientemente del fármaco que ha sido atrapado al interior de las vesículas.

El valor de potencial para el Lote 2 de 5-FU, muestra que al hacer pasar la suspensión por filtros con tamaño de poro de 50 nm, es probable que se indujera una variación en la distribución de cargas presentes alrededor de los liposomas, reduciéndose la fuerza de dispersión entre los mismos [83, 99].

Los resultados también indican que el potencial zeta no se modificó en función de la relación fármaco/fosfolípidos (masa/masa). Es decir, se obtuvieron valores semejantes, independientemente de la proporción utilizada (1:6, 1:13 o bien 1:40.5). Esto último sugiere que el valor para dicho potencial es afectado únicamente por el tamaño de las vesículas, la naturaleza del fosfolípido que constituye la membrana de los liposomas y el método que se emplea para su elaboración.

8.1.3 Cuantificación del fármaco encapsulado

La **Figura 2**, muestra la curva patrón utilizada para la cuantificación de doxorubicina encapsulada en liposomas mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC). En la figura se grafica la concentración ($\mu\text{g/ml}$) del fármaco (DOXO) vs el cociente de la altura del pico (señal) de DOXO entre la altura del pico de daunorrubicina (DAUNO), que es el estándar interno. Este cociente se utiliza para corregir posibles variaciones asociadas con el proceso de preparación de la muestra. Se muestra la regresión lineal de la ecuación asociada a la curva.

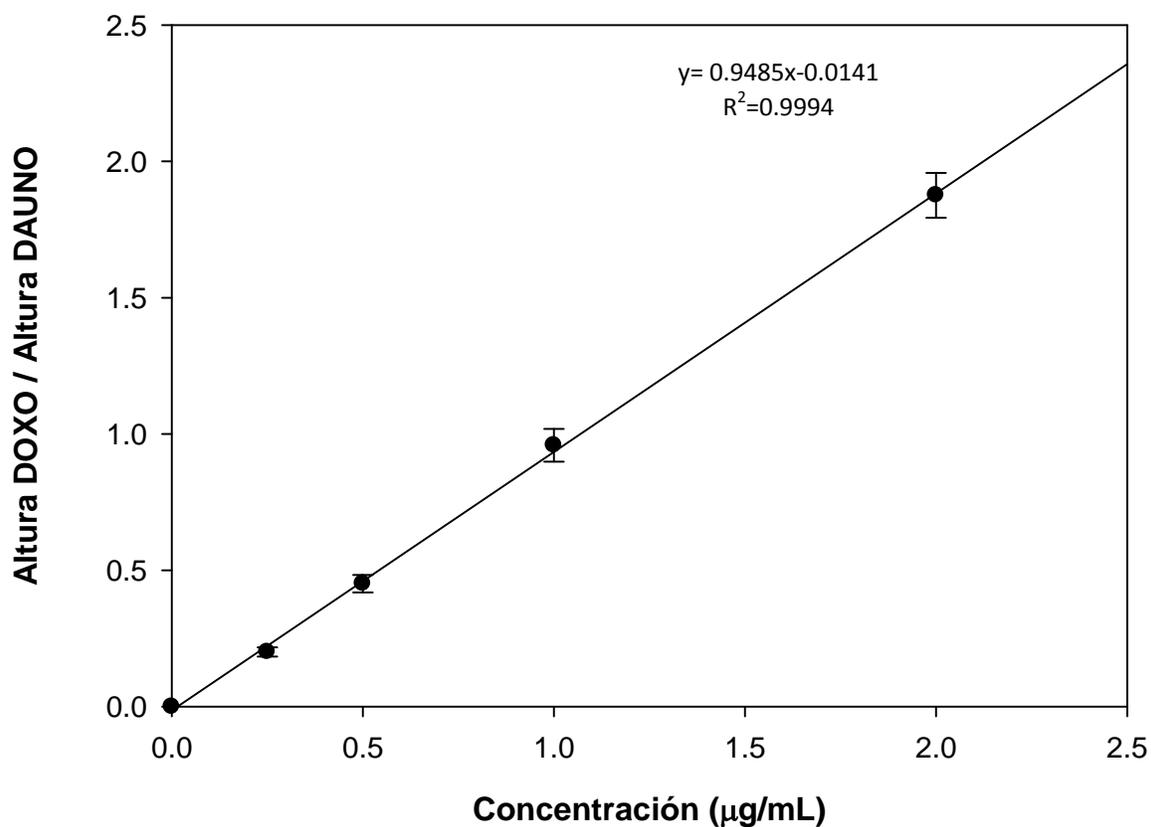


Figura 2. Curva patrón para la cuantificación de doxorubicina en liposomas.

En la **Figura 3**, se muestra la curva patrón para la cuantificación de 5-FU. Es importante mencionar que la cuantificación de los fármacos (DOXO y 5-FU) se hizo de manera independiente, aún cuando una misma suspensión liposomal contuviera ambos fármacos. Esto, es debido a que cada fármaco requiere una fase móvil y un sistema de detección diferentes. Al igual que en la **Figura 1**, se grafica la concentración vs el cociente de la altura de los picos. En este caso el estándar interno fue 5-clorouracilo (5-CU).

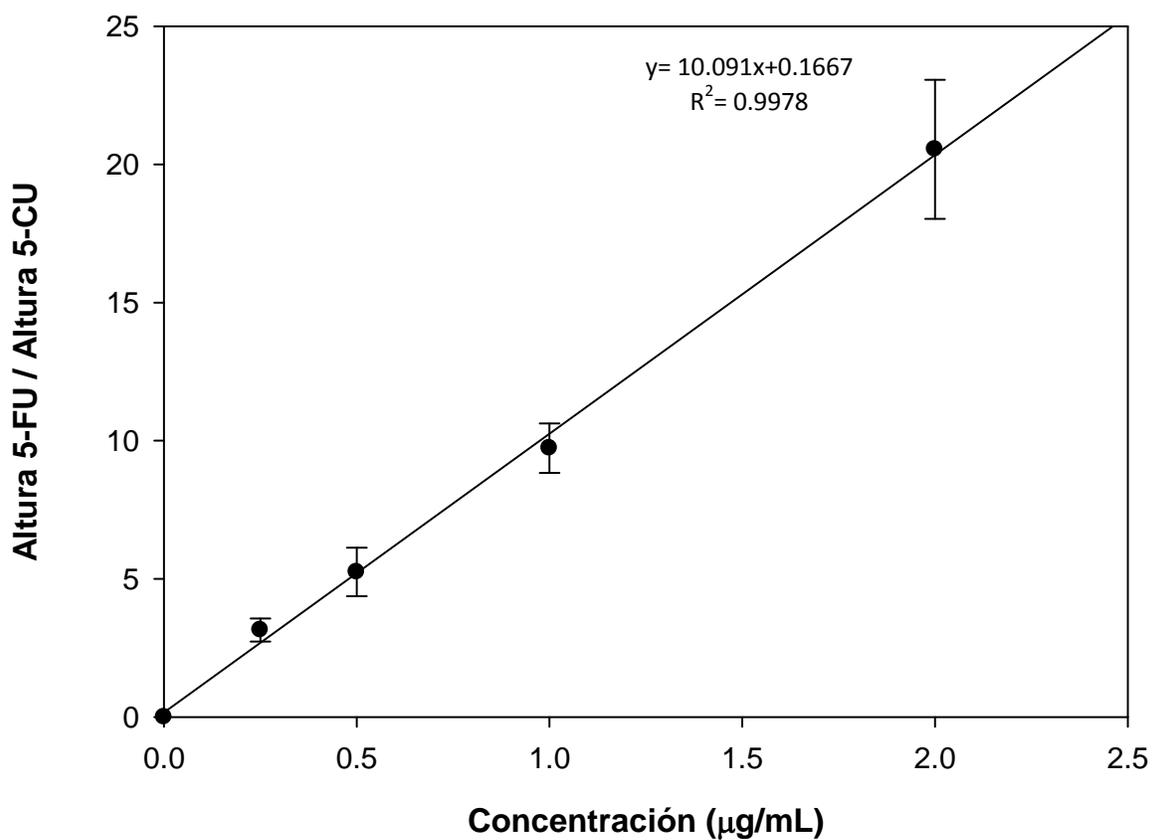


Figura 3. Curva patrón para la cuantificación de 5-fluorouracilo en liposomas.

En la **Tabla 3**, se presentan las eficiencias de encapsulación de los Lotes 1 y 2 de DOXO.

Tabla 3. Cuantificación de doxorubicina en liposomas del Experimento 1.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Eficiencia (%)
1	DOXO	1:13	740	4.7 ± 0.87	0.63
2	DOXO	1:13	740	3.9 ± 0.20	0.53

Como se puede observar, las eficiencias de encapsulación para ambos lotes fueron menores al 1%. Es posible que la baja eficiencia se deba a la manera en que fue realizada la rehidratación de la bicapa lipídica: en ambos lotes el proceso se llevó a cabo primeramente con la solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y posteriormente con la solución de PBS, en ambas soluciones se incluyó parte del fármaco a encapsular. Al quedar atrapados de manera simultánea el sulfato de amonio y la DOXO durante la formación de las vesículas, se esperaba tener una concentración similar de cada uno dentro y fuera del liposoma, y al agregar una cantidad adicional de DOXO en el PBS, se esperaba producir un gradiente de concentración, que en teoría produciría un intercambio de moléculas del fármaco, proveniente del exterior del liposoma, por las moléculas del sulfato de amonio que fue atrapado al interior del mismo.

Sin embargo, es posible que la ausencia de un gradiente de pH adecuado (mediante una mayor concentración de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) limitara el ingreso de los fármacos al interior de los liposomas. Abraham S.A. y colaboradores [114], han demostrado que la carga eficiente de bases débiles anfipáticas (como DOXO y 5-FU) debe ser inducida mediante métodos de carga activa basados en la formación de un ΔpH de transmembrana, así como en la acumulación de niveles de fármaco que exceden la solubilidad de los agentes terapéuticos dentro del liposoma. Madden y colaboradores en su trabajo de 1990 [115], probaron que los gradientes de pH a través de los liposomas dan lugar a una precipitación del fármaco mediante una asociación de éste, o bien, mediante la interacción del agente terapéutico con sales presentes en el espacio acuoso del liposoma produciendo una acumulación del principio activo al interior de las vesículas. En nuestro caso el ΔpH de transmembrana no fue generado, y por consiguiente, el ingreso de fármaco al interior de liposomas no fue posible. Probablemente el fármaco encapsulado se logró durante la formación de las vesículas y es muy posible que durante el proceso de extrusión, gran parte del fármaco inicialmente encapsulado se haya liberado dejando al final una pequeña cantidad de éste al interior del liposoma ($< 5 \mu\text{g/ml}$).

Las eficiencias de encapsulación para los Lotes 1, 2 y 3 de 5-FU son presentadas en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Cuantificación de 5-fluorouracilo en liposomas del Experimento 1.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Eficiencia (%)
1	5-FU	1:13	5000	55.4 ± 4.15	1.11
2	5-FU	1:13	5000	46.6 ± 1.08	0.93
3	5-FU	1:6	5000	8.8 ± 0.32	0.18

La eficiencia de encapsulación para el Lote 2 (extruido hasta 50 nm), fue ligeramente menor a la alcanzada por el Lote 1, pese a que ambos lotes fueron preparados bajo las mismas condiciones. Tras el paso de las vesículas multilaminares (MLV's) o bien, de las vesículas unilaminares grandes (LUV's) a través de los filtros de polycarbonato, se ha reportado [116] que nuevas vesículas de menor tamaño (SUV's) son formadas y éstas logran atrapar parte del fármaco que fue liberado durante la ruptura de las vesículas más grandes. Sin embargo, en nuestro caso no se observó que la eficiencia de encapsulación mejorara al tratar de reducir el tamaño de las vesículas, y se considera que gran parte del fármaco se libera durante la extrusión y no logra ser encapsulado nuevamente.

Respecto al Lote 3, se observa una importante disminución en la concentración final de 5-FU respecto a la conseguida en los Lotes 1 y 2. Esta disminución se asocia con el cambio en la relación másica de fármaco:fosfolípidos. Se considera que al disminuir la concentración de fosfolípidos en la suspensión, el número de vesículas producidas es menor, y en consecuencia la cantidad de fármaco encapsulado también es menor.

8.2 EXPERIMENTO 2

Modificación de proporciones molares en la formulación de la suspensión liposomal.

Considerando la importancia que tiene el colesterol en la membrana liposomal, al ser éste uno de los parámetros que determinan la rigidez de las vesículas, se modificó la proporción molar de colesterol en la formulación liposomal pasando de un 42.5 % a un 37.5%.

8.2.1 Tamaño de partícula

La **Tabla 5**, muestra la medición del tamaño de partícula para la suspensión liposomal correspondiente al Lote 4 de 5-FU preparado con la nueva formulación.

Tabla 5. Tamaño de partícula de liposomas del Experimento 2.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Diámetro efectivo (nm)	Índice de polidispersión	Tipo de distribución poblacional de tamaño
4	5-FU	1:6	126.8 ± 0.2	0.092	Unimodal

8.2.2 Potencial zeta

En la **Tabla 6**, se muestra el potencial zeta medido para el Lote 4 de 5-FU.

Tabla 6. Datos correspondientes a la medición del potencial zeta

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Potencial zeta (mV)	Estabilidad asociada
1	5-FU	1:6	-38.02 ± 2.78	Moderada

8.2.3 Cuantificación del fármaco encapsulado

La eficiencia de encapsulación para el Lote 4, se muestran en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Cuantificación de 5-fluorouracilo en liposomas del Experimento 2.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Eficiencia (%)
1	5-FU	1:6	5000	13 ± 0.34	0.26

El tamaño de las vesículas (**Tabla 5**) no presentó una diferencia substancial respecto al Experimento 1. Sin embargo, el índice de polidispersión disminuyó considerablemente en esta suspensión. Así mismo, la distribución poblacional fue unimodal vs una distribución bimodal obtenida para el Lote 3 de 5-FU, preparado en el experimento anterior. Diferentes autores han demostrado que al disminuir el porcentaje de colesterol, la membrana liposomal adquiere menor rigidez facilitando la homogenización de su tamaño [41, 73, 79, 81].

El valor del potencial zeta mostrado en la **Tabla 6** no presenta diferencia significativa con respecto a los valores de las suspensiones del Experimento 1. Como ya se ha comentado, este potencial no está relacionado con las proporciones de cada componente que fueron empleadas para la preparación de la película lipídica; sino con la naturaleza de los fosfolípidos, el tamaño de partícula y el método de preparación empleado para la generación de los liposomas. [117-119]

Se observó un ligero incremento en la eficiencia de encapsulación (**Tabla 7**) de 5-FU, en comparación al Lote 3 (**Tabla 4**). Como ha sido reportado por El Maghraby G.M.M., y cols. en 2005 [120] y por Glavas-Dodov M. y cols. [121], el colesterol brinda a la membrana del liposoma rigidez y estabilidad al intercalarse entre las cadenas de fosfolípidos. Así mismo, el incremento o disminución de la cantidad de colesterol, hace que la permeabilidad, es decir, la capacidad de la membrana para permitir el ingreso o egreso de sustancias, se vea limitada en el primer caso y optimizada en el segundo caso. Es probable que al aumentar la permeabilidad de la membrana liposomal en el Lote 4, se favoreciera el ingreso de 5-FU a las vesículas, sin embargo el incremento es mínimo y se considera que la pobre eficiencia de encapsulación está más bien asociada con el proceso de rehidratación y extrusión.

Se decidió utilizar la proporción molar de colesterol de 37.5% para el resto de los experimentos.

8.3 EXPERIMENTO 3

Incremento del gradiente y secado por liofilización.

Durante este experimento se generó un mayor gradiente de sulfato de amonio entre la zona intra y extraliposomal, a fin de aumentar la concentración de fármaco al interior de los liposomas al incrementar de manera indirecta el gradiente de pH de membrana.

Para tal efecto se adoptaron dos estrategias, por una parte, la solución de sulfato de amonio con que se rehidrató la película lipídica fue modificada de 300 mM a 700 mM.

Por otra parte, el sulfato de amonio extraliposomal se removió mediante un proceso de liofilización de 24 horas, creando una diferencia más grande entre la concentración de esta sal al interior del liposoma y la concentración presente en el medio dispersor.

8.3.1 Tamaño de partícula

En la **Tabla 8** se muestran las mediciones del tamaño de partícula de los Lotes 1, 2 y 3 – liofilizados.

Tabla 8. Tamaño de partícula de liposomas del Experimento 3.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Diámetro efectivo (nm)	Índice de polidispersión	Tipo de distribución poblacional de tamaño
1	DOXO	1:8	158.2 ± 2.8	0.236	Bimodal
2	DOXO	1:8	139.3 ± 5.9	0.139	Unimodal
3	DOXO-5FU	1:4	151.5 ± 2.3	0.265	Bimodal

Como se puede apreciar los tamaños de partícula son semejantes a los alcanzados en los Experimentos 1 y 2. Únicamente el Lote 2 presentó una distribución de tipo unimodal en la población de tamaños disminuyendo el índice de polidispersión.

8.3.2 Potencial zeta

En la **Tabla 9**, se muestran las mediciones de potencial zeta para los lotes 1, 2 y 3 –liofilizados.

Tabla 9. Datos correspondientes a la medición del potencial zeta.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Potencial zeta (mV)	Estabilidad asociada
1	DOXO	1:8	-8.78 ± 1.25	Umbral de aglomeración
2	DOXO	1:8	-11.58 ± 0.71	Umbral de aglomeración
3	DOXO- 5FU	1:4	-9.40 ± 1.05	Umbral de aglomeración

Como se puede apreciar, los lotes de liposomas preparados con esta técnica presentaron potenciales zeta inferiores a los alcanzados durante los Experimentos 1 y 2.

Considerando que la liofilización es un proceso que permite la remoción del medio dispersor de los liposomas para evitar la degradación de los componentes de la membrana y estabilizando el tamaño de las vesículas cuando se utiliza un crioprotector [122, 123, 124], como la sacarosa utilizada en este caso [121], no deberían existir modificaciones en la distribución de las cargas capaces de inducir un cambio en el potencial zeta.

Se ha reportado que un factor que puede afectar de manera directa en el valor de dicho potencial es el pH o el cambio en la atmósfera iónica [82, 99]. Hope y Wong en 1995 constataron que, si un fármaco es incubado con LUV's (vesículas unilaminares grandes) que han sido cargadas previamente con sulfato de amonio en una solución no equilibrada, una cierta cantidad de amonio neutro se difundirá hacia el exterior de la vesícula creando un sistema desequilibrado y acidulado (pH~2.7), en la zona interna del liposoma.

Al respecto, los valores obtenidos en esta medición podrían ser resultado de un cambio en el pH del medio; sin embargo, en el experimento no se midió el pH de las suspensiones, por lo que no es posible confirmar esta hipótesis.

8.3.3 Cuantificación del fármaco encapsulado

En las **Tablas 10 y 11**, se presentan las eficiencias de encapsulación de DOXO y 5-FU para los lotes preparados con esta metodología. Se muestran las eficiencias de encapsulación durante el proceso de extrusión a través de los diferentes tamaños de membrana. Esto permitió evaluar la pérdida de fármaco encapsulado en cada cambio de membrana.

Tabla 10. Cuantificación de doxorubicina en liposomas del Experimento 3.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Eficiencia (%)
1, pre-extrusión	DOXO	1:8	2000	175.9	8.8
1, 400 nm			2000	96.5	4.8
1, 200 nm			2000	84.8	4.2
1, 100 nm			2000	59.6	3.0
2, pre-extrusión	DOXO	1:8	2000	131.6	6.6
2, 400 nm			2000	58.3	2.9
2, 200 nm			2000	44.5	2.2
2, 100 nm			2000	26.0	1.3
3, pre-extrusión	DOXO-5FU	1:8	1000	26.5	2.6
3, 400 nm			1000	17.8	1.8
3, 200 nm			1000	16.4	1.6
3, 100 nm			1000	16.0	1.6

Tabla 11. Cuantificación de 5-fluorouracilo en liposomas del Experimento 3.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Eficiencia (%)
3, pre-extrusión	DOXO-5FU	1:8	1000	22.5	2.2
3, 400 nm			1000	18.1	1.8
3, 200 nm			1000	15.6	1.6
3, 100 nm			1000	15.3	1.5

Para el caso de los Lotes 1 y 2 de DOXO, se observó una pérdida considerable ($\approx 50\%$) del fármaco encapsulado al pasar por la membrana de 400 nm. Al finalizar la extrusión por membrana de 100 nm la eficiencia de encapsulación se redujo en un factor de entre 3 y 4. Los resultados muestran que las modificaciones en la técnica de preparación de los liposomas (gradiente de sulfato de amonio y la liofilización) favorecieron la eficiencia de encapsulación. Sin embargo, se aprecia de

manera notable que el proceso de extrusión, a través de las distintas membranas, favorece la liberación del fármaco del interior del liposoma.

En el caso del Lote 3 (**Tabla 10**), se observó que al finalizar el proceso de extrusión el porcentaje de fármaco liberado fue $\approx 40\%$. A diferencia de los Lotes 1 y 2, en esta suspensión no fue posible incrementar de manera importante la encapsulación inicial empleando el método de carga remota. Las eficiencias de encapsulación alcanzadas fueron similares para ambos fármacos tanto al inicio de la extrusión (2.6 % para DOXO y 2.2 % para 5-FU), como al final de ella (1.6 % y 1.5 % respectivamente).

Es posible que la inclusión de ambos agentes antineoplásicos en la misma solución de rehidratación restrinja la encapsulación simultánea de los mismos. Por una parte, el gradiente de concentración de sulfato de amonio podría no ser suficiente para llevar a cabo el intercambio simultáneo de los fármacos por iones NH_3 . Por otro lado, DOXO y 5-FU tienen valores semejantes de pKa y ambos son bases débiles anfipáticas, lo que podría producir una competencia entre ellos limitando su ingreso a la cavidad acuosa de los liposomas.

Aunque la metodología para generar las vesículas de los tres lotes fue la misma: hidratación de película lipídica, S.B. Kulkarni y colaboradores han descrito una serie de factores que pueden llegar a afectar las características del liposoma y la eficiencia de encapsulación [125, 126], entre ellas se incluyen las condiciones de preparación o el tiempo y velocidad de agitación durante el proceso de rehidratación.

8.4 EXPERIMENTO 4

Variación del Gradiente

Con el fin de mejorar la encapsulación simultánea de DOXO y 5-FU, se empleó una solución de sulfato de amonio 1 M durante la rehidratación de la cama lipídica para inducir una fuerza impulsora (“*driven force*”), generada por el gradiente de pH que se produce como un efecto del gradiente de sulfato de amonio, que indujera el flujo de ambos fármacos hacia el interior de la vesícula. En el experimento se utilizó la técnica de liofilización durante la elaboración de los liposomas, y se consideraron dos concentraciones de DOXO en la solución de rehidratación: 2 y 4 mg/ml.

8.4.1 Tamaño de partícula

En la **Tabla 12**, se muestran las mediciones de tamaño de partícula de las suspensiones liposomales.

Tabla 12. Tamaño de partícula de liposomas del Experimento 4.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Diámetro efectivo (nm)	Índice de polidispersión	Tipo de distribución poblacional de tamaño
1B	DOXO (4 mg/ml)	1:8	176.3 ± 8.9	0.162	Bimodal
2B	DOXO (2 mg/ml)	1:8	136.8 ± 5.3	0.122	Unimodal
3B	DOXO-5FU	1:8	120.7 ± 1.4	0.087	Unimodal
4B	5FU	1:8	116.7 ± 1.4	0.078	Bimodal

Los datos indican que la implementación del proceso de sonicación, previo a la extrusión, facilitó la homogenización y la disminución del tamaño de las vesículas. Esto se explica en virtud de que la sonicación causa la ruptura de las MLV's de gran tamaño, produciéndose vesículas unilaminares más pequeñas, cuyas dimensiones pueden ser reducidas con facilidad.

No obstante, en los Lotes 1 y 2 se aprecia un incremento del diámetro efectivo, en comparación con los de los Lotes 3 y 4. Es probable que esta diferencia se relacione con la mayor concentración de fármaco encapsulada en los primeros lotes. Es decir, que el requerimiento espacial de un

mayor número de moléculas atrapadas en la cavidad acuosa impida disminuir el tamaño de las vesículas por debajo de cierto umbral.

8.4.2 Potencial zeta

En la **Tabla 13**, se muestran los valores de potencial zeta para las suspensiones preparadas en el Experimento 4.

Tabla 13. Datos correspondientes a la medición del potencial zeta.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Potencial zeta (mV)	Estabilidad asociada
1B-liofilizado	DOXO (4 mg/ml)	1:8	-33.04 ± 0.89	Moderada
2B-liofilizado	DOXO (2 mg/ml)	1:8	-37.38 ± 1.47	Moderada
3B-liofilizado	DOXO-5FU	1:8	-38.69 ± 1.58	Moderada
4B-liofilizado	5FU	1:8	-32.37 ± 1.06	Moderada

Los valores de potencial zeta para todos los lotes fueron semejantes a los obtenidos para las suspensiones de los experimentos anteriores. Estos potenciales corresponden a una estabilidad moderada.

8.4.3 Cuantificación de fármaco encapsulado

La **Tabla 14**, muestra las eficiencias de encapsulación de doxorubicina para los lotes 1B, 2B y 3B.

Tabla 14. Cuantificación de doxorubicina en liposomas del Experimento 4.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Eficiencia (%)
1B, pre-extrusión	DOXO	1:8	4000	441.01	11.03
1B, 400 nm			4000	296.11	7.40
1B, 200 nm			4000	217.65	5.44
1B, 100 nm			4000	172.41	4.31
2B, pre-extrusión	DOXO	1:8	2000	262.47	13.12
2B, 400 nm			2000	83.59	4.18
2B, 200 nm			2000	42.82	2.14
2B, 100 nm			2000	27.92	1.40
3B, pre-extrusión	DOX-5FU	1:8	1000	127.93	12.79
3B, 400 nm			1000	52.07	5.21
3B, 200 nm			1000	38.54	3.85
3B, 100 nm			1000	25.05	2.50

Los resultados muestran que existe una dependencia entre la concentración inicial del fármaco que se utilizó durante la rehidratación de la cama lipídica y la concentración final encapsulada. Se observa que al incrementar la concentración inicial del fármaco en el PBS, la cantidad intraliposomal también aumenta. En el caso del Lote 1B, al utilizar 4000 $\mu\text{g/ml}$ de DOXO/PBS para reconstituir los liposomas, la concentración encapsulada antes de iniciar la extrusión fue de 441 $\mu\text{g/ml}$, mientras que en el Lote 2B al reconstituir con 2000 $\mu\text{g/ml}$ (DOXO/PBS) se obtuvo una encapsulación de 262 $\mu\text{g/ml}$. Para el Lote 3B, se observa un comportamiento similar. Este resultado muestra que el incremento en el gradiente de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ aunado a una saturación del medio dispersor (PBS) con fármaco, promueve el intercambio entre la DOXO y los iones NH_3 a través de la membrana [127], incrementando la cantidad de fármaco encapsulado.

Sin embargo, los resultados hacen también evidente que el proceso de extrusión conlleva a la liberación del fármaco, resultando en una reducida eficiencia de encapsulación después de utilizar la membrana de 100 nm. Si bien el tamaño final de los liposomas se encuentra en el rango de tamaño esperado (≈ 100 nm), tal como se muestra en la **Tabla 12**, la reducida eficiencia de encapsulación hizo necesario considerar una modificación en el proceso de homogenización del tamaño por medio de la extrusión.

En la **Tabla 15**, se muestran las eficiencias de encapsulación de 5-fluorouracilo para los Lotes 3B y 4B- Liofilizados.

Tabla 15. Cuantificación de 5-fluorouracilo en liposomas del Experimento 4.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Eficiencia (%)
3B, pre-extrusión	DOXO-5FU	1:8	1000	1.03	0.10
3B, 400 nm			1000	0.127	0.013
3B, 200 nm			1000	0.063	0.006
3B, 100 nm			1000	0.037	0.003
4B, pre-extrusión	5-FU	1:8	2000	0.320	0.016
4B, 400 nm			2000	0.150	0.007
4B, 200 nm			2000	0.116	0.007
4B, 100 nm			2000	0.086	0.004

Contrario a lo observado para la DOXO, las eficiencias de encapsulación para 5-FU disminuyeron notablemente con respecto a lo obtenido en los experimentos anteriores. Esta disminución se apreció cuando el 5-FU se combinó con DOXO (Lote 3B), así como en la suspensión que sólo incluyó 5-FU (Lote 4B). Es posible que la baja encapsulación de 5-FU, se deba principalmente a la naturaleza de dicha molécula y la pobre respuesta de ésta con el método de carga remota al utilizar un gradiente de sulfato de amonio. Es decir, el gradiente de sulfato de amonio parece no favorecer el ingreso de este fármaco al interior del liposoma; o bien, que el ΔpH de transmembrana es insuficiente para hacer que esta molécula tienda a acumularse en la fase acuosa de la vesícula liposomal.

Se ha reportado [128] que el 5-fluorouracilo no se acumula dentro del liposoma si la zona acuosa interior presenta un pH inferior a 4, esto sin importar que el 5-FU posea un pKa de 8.04. Situación que contrasta con la incorporación de la DOXO, que posee un pKa de 8.2. Pese a que la doxorubicina es una amina lipofílica (en su forma libre), presenta un coeficiente de partición octanol/agua de 12.6 aproximadamente [129]. Por otro lado, 5-fluorouracilo no tiene un grupo libre amino y posee un coeficiente de partición mucho menor (0.13 aproximadamente). Ello indica una mayor dificultad de esta molécula para lograr atravesar una barrera lipofílica, como la membrana liposomal.

Otra posible razón para la baja eficiencia de encapsulado es que, cuando el pH es cercano a 7, se ha observado que la forma neutra del 5-FU tiene una importante actividad de superficie con una concentración micelar crítica estimada en 80 nM [130]. Por tanto, si algunas moléculas de 5-FU adoptan la forma de micelas, su permeabilidad a través de la bicapa lipídica y su captura en el núcleo acuoso de la vesícula resultan más difíciles debido a un mayor tamaño y a la consiguiente limitación en la transferencia de masa.

8.5 EXPERIMENTO 5

Modificación en los procesos de Extrusión y Sonicación.

Con esta metodología se planeó reducir las pérdidas de fármaco encapsulado debidas al proceso de extrusión. Para ello, una vez que los liposomas fueron cargados con sulfato de amonio (concentración 1M), éstos se sonicaron y extruyeron posteriormente hasta completar los ciclos a través de filtros con tamaño de poro de 200 nm. A continuación, las vesículas fueron liofilizadas y más tarde reconstituidas con la solución del fármaco a encapsular. Finalmente, el tamaño de los liposomas se homogenizó complementando el proceso de extrusión al hacerlas pasar a través de filtros de 100 nm.

8.5.1 Tamaño de partícula

En la **Tabla 16**, se presentan las mediciones de tamaño de partícula de los lotes 1 a 4.

Tabla 16. Tamaño de partícula de liposomas del Experimento 5.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Diámetro efectivo (nm)	Índice de polidispersión	Tipo de distribución poblacional de tamaño
1	DOXO (2 mg/ml)	1:8	208.8 ± 1.2	0.254	Bimodal
2	5FU	1:8	161.4 ± 0.6	0.109	Bimodal
3	DOXO (4 mg/ml)	1:8	232.3 ± 1.5	0.285	Bimodal
4	DOXO-5FU	1:8	138.7 ± 3.1	0.189	Bimodal

Pese a que de manera posterior a la carga del fármaco, los liposomas se hicieron pasar por extrusión a través de filtros de 100 nm, los diámetros promedio de las vesículas no se redujeron al intervalo esperado de los 100 nm. Tal como se explicó anteriormente, el proceso de liofilización puede actuar como un estabilizante del tamaño [121], en consecuencia, es posible que al llevar a los liposomas hasta el tamaño de los 200 nm, y liofilizarlos posteriormente, el proceso resulte en la estabilización de la membrana debido a que la sacarosa, incluida en el PBS y utilizada como crioprotector, forma junto con los grupos polares una matriz vítrea durante el congelamiento y exhibe una movilidad molecular baja después del secado. Probablemente, la formación de esta matriz sólida dificulte el proceso de extrusión para reducir el tamaño.

Por otra parte, Crommelin y colaboradores en 1994 [131] así como van Winden y Crommelin en 1999 [132], demostraron que además de la presencia de crio-protectores, parámetros como la composición de la bicapa, intervalo y temperatura de congelamiento y el nivel de agua residual desempeñan un papel crítico en la conservación de la estructura, tamaño y forma de la membrana después que ésta es liofilizada.

8.5.2 Potencial zeta

La **Tabla 17**, se muestran los potenciales zeta de las suspensiones preparadas.

Tabla 17. Datos correspondientes a la medición del potencial zeta.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Potencial zeta (mV)	Estabilidad asociada
1	DOXO	1:8	-17.65 ± 2.27	Umbral de leve dispersión
2	5FU	1:8	-28.66 ± 1.08	Umbral de leve dispersión
3	DOXO (doble [C])	1:8	-24.71 ± 1.99	Umbral de leve dispersión
4	DOXO-5FU	1:8	-12.06 ± 2.54	Umbral de aglomeración

Los valores de potencial zeta muestran que las suspensiones preparadas con esta metodología constituyen soluciones poco estables que denotan una tendencia a la formación de precipitados.

Al rehidratar la película lipídica con una solución de concentración elevada de sulfato de amonio, el entorno de coloide se modifica aumentando o disminuyendo la barrera energética o punto de máxima dispersión. Es decir, podría producirse una modificación de pH debida a un exceso de iones que podría dar lugar a la agregación de los liposomas [81, 98, 117, 133].

8.5.3 Cuantificación de fármaco encapsulado

En la **Tabla 18**, se presentan las eficiencias de encapsulación de DOXO para los Lotes 1, 2 y 3, preparados con esta metodología.

Tabla 18. Cuantificación de doxorubicina en liposomas del Experimento 5.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Eficiencia (%)
1, 200 nm	DOXO	1:8	2000	1564.69	78.23
1, 100 nm			2000	144.3	7.21
3, 200 nm	DOXO	1:8	4000	3407.87	85.20
3, 100 nm			4000	903.83	22.6
4, 200 nm	DOX-5FU	1:8	1000	686.49	68.65
4, 100 nm			1000	34.46	3.45

La eficiencia de encapsulación inicial de doxorubicina, previa a la extrusión por filtro de 100 nm, se incrementó considerablemente en los tres lotes de liposomas (68 – 85 %). La mayor eficiencia de encapsulación (22.6 %), observada después de la extrusión, corresponde al Lote 3 que fue reconstituido con una solución de DOXO de concentración 4000 $\mu\text{g/ml}$. En el Lote 1, reconstituido con una solución de concentración 2000 $\mu\text{g/ml}$, la eficiencia de encapsulación final fue de 7.21 %. Estos resultados, coinciden con el efecto de saturación [123, 124] observado y descrito en el experimento anterior.

En la misma **Tabla 18**, se aprecia una pérdida del fármaco encapsulado superior al 40% durante la última etapa de la extrusión (200 a 100 nm), evidenciando nuevamente que este proceso no es óptimo para la homogenización de vesículas que ya han sido cargadas con algún agente antineoplásico.

En la **Tabla 19**, se presentan las eficiencias de encapsulación de 5-FU de los Lotes 2 y 4, preparados durante este experimento.

Tabla 19. Cuantificación de 5-fluorouracilo en liposomas del Experimento 5.

Lote	Fármaco encapsulado	Proporción másica (fármaco:fosfolípidos)	Concentración Inicial ($\mu\text{g/ml}$)	Concentración final ($\mu\text{g/ml}$)	Eficiencia (%)
2, 200 nm	5FU	1:8	2000	192.69	9.63
2, 100 nm			2000	12.01	0.60
4, 200 nm	DOXO-5FU	1:8	1000	125.87	12.59
4, 100 nm			1000	5.00	0.50

Las eficiencias de encapsulación para los lotes de liposomas cargados con 5-fluorouracilo disminuyeron apreciablemente. Este mismo efecto se observó en las suspensiones preparadas con los Experimentos 3 y 4, lo que sugiere que el método de carga mediante un gradiente de sulfato de amonio no es adecuado para inducir el ingreso de este fármaco al interior de liposomas con estas condiciones.

8.6 CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS EN SUSPENSIONES LIPOSOMALES.

Se cuantificó por el método colorimétrico de Stewart [95], la concentración de fosfolípidos (HSPC) en cada una de las suspensiones liposomales. La cantidad cuantificada se comparó con la cantidad empleada para la preparación de la película lipídica que posteriormente fue rehidratada. Dado que el HSPC es el componente primordial de la membrana liposomal, es posible estimar la eficiencia de formación de vesículas mediante cada metodología. Para ello se empleó la siguiente fórmula:

$$Eficiencia_de_formación_de_liposomas = \left(\frac{g_de_HSPC\ en_la_suspensión_final}{g_de_HSPC_en_la_cama_lipídica} \right) \times 100$$

Tabla 20. Cuantificación de HSPC en suspensiones liposomales.

Lote	Experimento	Fármaco	g finales de HSPC	g Iniciales de HSPC	% Eficiencia
1	1	5-FU	0.23	0.43	52.11
2	1	5-FU	0.26	0.43	59.16
3	1	5-FU	0.06	0.17	37.68
1	1	DOXO	0.05	0.08	58.32
2	1	DOXO	0.05	0.08	68.90
1	1	5-FU	0.06	0.17	36.21
1	2	DOXO	0.02	0.10	16.19
2	2	DOXO	0.02	0.09	24.25
3	2	DOX-5FU	0.03	0.09	28.70
1	3	DOXO (4 mg/ml)	0.07	0.22	31.44
2	3	DOXO (2mg/ml)	0.01	0.09	16.78
3	3	DOXO-5FU	0.03	0.18	16.79
4	3	5-FU	0.03	0.09	32.31
1	4	DOXO (2mg/ml)	0.01	0.09	16.32
2	4	5-FU	0.02	0.09	17.66
3	4	DOXO (4 mg/ml)	0.09	0.22	41.55
4	4	DOXO-5FU	0.02	0.18	10.45

En la **Tabla 20**, se observa que la metodología más eficiente para la generación de vesículas fue la empleada durante el Experimento 1.

Al comparar el Lote 3 del Experimento 1 y el Lote 1 del Experimento 2, se aprecia que la eficiencia con que se generaron las vesículas fue semejante para ambos lotes. Considerando que para el Lote

3 se empleó el 42.5% de colesterol en la formulación mientras que en el Lote 1 del Experimento 2 se utilizó el 35.7%, los resultados (37.68 y 36.21 % de eficiencia respectivamente) sugieren que la formación de las vesículas depende principalmente del método de preparación y de la naturaleza de los componentes y no de las proporciones en que éstos son combinados para la formación de la película lipídica.

Aparentemente, durante los Experimentos 3, 4 Y 5, la formación de vesículas fue deficiente y una variabilidad importante entre lotes preparados bajo las mismas condiciones podría indicar que otros factores como el tiempo y la velocidad de la agitación podrían ser fundamentales.

En lo que respecta al Lote 3 del Experimento 5, la eficiencia lograda (22%) al encapsular DOXO, podría estar relacionada con una formación efectiva de vesículas (> 40%), en comparación al resto de lotes realizados siguiendo el mismo método.

8.7 RESUMEN DE RESULTADOS

A continuación se enlistan los resultados más relevantes observados durante este trabajo:

- La encapsulación de doxorubicina (DOXO) y 5-fluorouracilo (5-FU) en liposomas mediante un método de carga pasiva en los Experimentos 1 y 2, resultó ser ineficaz.
- La modificación de la proporción de colesterol en la formulación favoreció la homogenización del tamaño de las vesículas al proporcionar menor rigidez a la membrana de las mismas. Sin embargo, no tuvo un efecto significativo en la eficiencia de encapsulación.
- La implementación del proceso de sonicación aunado a la extrusión, permitió eficientar la reducción del tamaño de los liposomas una vez que éstos habían sido cargados con los fármacos.
- Se observó que el proceso de extrusión propicia pérdidas importantes ($\approx 50\%$) de los fármacos inicialmente encapsulados afectando fuertemente la eficiencia final. Estas pérdidas pueden ser controladas sometiendo las vesículas a extrusión (hasta 100 nm) una vez que se ha encapsulado sulfato de amonio en ellas y antes de ser cargadas con algún agente antineoplásico.
- Las modificaciones realizadas, durante los Experimentos 3-5, sobre el método de carga remota de bases débiles anfipáticas, mediante un gradiente de sulfato de amonio, permitió mejorar la encapsulación de DOXO. No obstante, pese a tener características semejantes, el 5-FU tuvo poca respuesta ante el mismo método. Por consiguiente se recomienda el uso de otras técnicas para su encapsulación, o bien, su inclusión en la zona lipofílica del liposoma.
 - Se observó que el incremento en la eficiencia de encapsulación de la DOXO está relacionado con la diferencia de concentraciones de sulfato de amonio utilizadas, y con el grado de saturación del medio dispersor con el fármaco a encapsular durante la rehidratación.
- El tamaño de las vesículas aparentemente está relacionado con la proporción molar fármaco: fosfolípidos, así como con la concentración final de cada suspensión. Una

concentración elevada posiblemente implica la necesidad de un espacio intraliposomal que no puede ser reducido y que se manifiesta como un mayor diámetro efectivo.

- El valor de potencial zeta (ζ) de las suspensiones fue fuertemente afectado por variables como: tamaño de partícula y el pH. Pese a ello, los valores de dicho potencial registrado para los diferentes Experimentos, mostraron que las formulaciones poseen por lo menos una estabilidad moderada.
- La experiencia desarrollada en este trabajo permitió establecer los parámetros necesarios para la cuantificación de los fármacos, extraídos de los liposomas preparados, por la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

9. CONCLUSIONES

Los procedimientos desarrollados y evaluados durante este trabajo permitieron establecer los pasos necesarios para llevar a cabo una metodología que permita la co-encapsulación de doxorrubicina y 5-fluorouracilo. Sin embargo, los resultados mostraron que las técnicas implementadas no fueron adecuadas para lograr dicha co-encapsulación. Particularmente, la eficiencia de encapsulación del 5-fluorouracilo en las vesículas liposomales, de manera individual, fue muy inferior a lo logrado con la doxorrubicina. A pesar de los resultados, el trabajo realizado permitió identificar los parámetros que deben ser optimizados y vislumbrar los cambios necesarios en la metodología efectuada en este estudio, con el fin de incrementar la eficiencia de encapsulación de ambos fármacos, en un sistema liposomal estable y con las dimensiones adecuadas (≈ 100 nm), cuya concentración sea adecuada para su uso terapéutico.

Se considera para el trabajo a futuro, el utilizar variaciones en las proporciones molares y en la relación másica fármaco/fosfolípidos; profundizar más en la técnica sonicación-extrusión para homogenizar el tamaño de las vesículas en el rango de los 100 nm, sin que esto resulte en una reducción de la eficiencia de encapsulación de los fármacos así como la estabilidad de la suspensión liposomal. Particularmente se plantea la opción de incluir el 5-FU en la membrana liposomal y mantener la DOXO al interior de la vesícula.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Mundial de la Salud (WHO), **2009**.
<http://www.who.int/whosis/whostat/2009/es/index.html>
2. Mathers C. Loncar D. "Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030", *PLoS Medicine*, **3**, 442, **2006**.
3. Ferlay J., Bray F., Pisan P, Parkin D. M.; "Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide", *Globocan*, **2002**.
4. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). México, Agosto de **2008**.
<http://www.inegi.gob.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2008/cancer08.d>
[oc](#)
5. Bland K.I., Menck H.R., Scott-Conner C.E., et al.; "The National Cancer Data Base 10-year survey of breast carcinoma treatment at hospitals in the United States", *Cancer*, **83**, 1262-1273, **1998**.
6. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, et al.; "Breast cancer", *Lancet*, **365**, 1727-41, **2005**.
7. Goyal P., et al.; "Liposomal Drug Delivery Systems: Clinical Applications", *Acta Pharm.*, **55**(1), 1-25, **2005**.
8. Park, J.W.; "Liposome-Based Drug Delivery in Breast Cancer Treatment", *Breast Cancer Res.*, **4**(3), 95-99, **2002**.
9. Robert N.J., et al; "The Role of the Liposomal Anthracyclines and Other Systemic Therapies in the Management of Advanced Breast Cancer", *Semin. Oncol.*, **31**(6 Sup. 13), 106-46, **2004**.
10. Gabizon, A. A., Shmeeda H, Zalipsky S.; "Pros and Cons of the Liposome Platform in Cancer Drug Targeting"; *J. Liposomes Res.*, **16**(3), 175-183, **2006**.
11. "French Epirubicin Study Group: A prospective randomized phase III trial comparing combination chemotherapy with cyclophosphamide, fluorouracil and either doxorubicin or epirubicin". *J Clin Oncol*, **6**, 679-88, **1988**.
12. "The Italian Multicentre Breast Study with epirubicin: Phase III randomized study of fluorouracil, epirubicin and cyclophosphamide vs fluorouracil doxorubicin and cyclophosphamide in advanced breast cancer. An Italian Multicentre Trial". *J Clin Oncol.*, **6**, 976-982, **1988**.
13. *National Cancer Institute* (NCI). "Comprehensive Cancer Information".
<http://www.cancer.gov/>

14. <http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/breast/patient>
15. DeVita, V. T. Jr., Hellman, S.; Rosenberg, S.; "Cancer: Principles & Practice of Oncology". 7th Ed., **2004**.
16. Lazcano, P. E.; Tovar, G. V.; Alonso, D. P.; Romieu, I.; Lopez, C. L.; "Cáncer de mama. Un hilo conductor histórico, presente y futuro". *Instituto Nacional de Salud Pública, México.*; 38, 139-152, **1996**.
17. Goldstein, L.; O'Neill, A.; Sparano, J., et al.; "E2197: phase III AT (doxorubicin/docetaxel) vs AC (doxorubicin/cyclophosphamide) in the adjuvant treatment of node positive and high risk node negative breast cancer". *Proc Am Soc Clin Oncol*, 23(Suppl 16) Abstr 512, **2005**.
18. Mamounas, E.P.; Bryant, J.; Lembersky, B., et al; "Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28". *J Clin Oncol*; 23, 3686-3696, **2005**.
19. Buzdar, A.U.; Singletary, S.E.; Valero, V., et al.; "Evaluation of paclitaxel in adjuvant chemotherapy for patients with operable breast cancer: preliminary data of a prospective randomized trial". *Clin Cancer Res*; 8, 1073-1079, **2002**.
20. Gianni, L.; Baselga, J.; Eiermann, W., et al.; "Feasibility and tolerability of sequential Doxorubicin/paclitaxel followed by cyclophosphamide, methotrexate and fluorouracil and its effects on tumor response as preoperative therapy". *Clin Cancer Res*, 11, 8715-8721, **2005**.
21. Henderson, I. C.; Berry, D. A.; Demetri, G. D. et al; "Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer". *J Clin Oncol*; 21, 976-983, **2003**.
22. Roché, H.; Fumoleau P.; Spielmann, M. et al; "Five years analysis of the PACS 01 trial; 6 cycles of FEC100 versus 3 cycles of FEC 100 followed by 3 cycles of docetaxel for the adjuvant treatment of node positive breast cancer". *Breast Cancer Res and Treat*, 88, S16 (Abstr 27), **2004**.
23. Cole, B. F.; Gelber, R. D.; Gelber, S.; Coates, A. S.; Goldhirsch, A.; "Polychemotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised clinical trials with quality-adjusted survival analysis". *The Lancet*, 358, Issue 9278, 277-286, **2001**.
24. "Drug information". *American Society of Health-System Pharmacists*, **2002**.
25. Trissel, L. A.; "Handbook on injectable drugs". 11° Ed., *American Society of Hospital Pharmacist*, **2001**.
26. Solimando, D.; Bressler, I.; Kintzel, P.; Geraci, M.; "Drug Information Handbook for Oncology". 2a Ed. *American Pharmaceutical Association*, **2000-2001**.
27. Fischer, D. S.; Konbf, M. T.; Durivage, H. J.; "The Cancer Chemotherapy Handbook". Ed. Mosby. **1998**.
28. "Cancer Drug Manual". *British Columbia Cancer Agency (BCCA)*, **1994**.

29. "Compendium of Pharmaceuticals and Specialties". Adriamycin®, *Canadian Pharmacists Association*, **2006**.
30. Somasundaram, S.; Edmund, N.A.; Moore, D.T.; Small, G.W.; Shi, Y.Y.; Orlowski, R.Z.; "Dietary curcumin inhibits chemotherapy-induced apoptosis in models of human breast cancer". *Cancer Res*, 62(13), 3868-3875, **2002**.
31. Lipshutz, S., *et al.*; "Late cardiac effects of Doxorubicin therapy for acute lymphoblastic leukemia in childhood". *N Engl. J Med*; 324, 808-15, **1991**.
32. Kesavan, S. *et al.*; "Anthracycline-Induced Cardiotoxicity". *Ann Intern Med*, 125, 47-58, **1996**.
33. Steinherz. L., *et al.*; "Cardiac Toxicity 4 to 20 years after Completing Anthracycline Therapy". *JAMA*, 266,1672-1677, **1991**
34. http://www.theoncologyinstitute.com/pdfs/chemotherapy_drugs/spanish/Adriamysin%20-%20Doxil%20-%20doxorubicin%20SPANISH.pdf
35. Noordhuis, P.; Holwerda, U.; Van der Wilt, C. L.; Van Groeningen, C. J.; Smid, K.; Meijer, S.; Pinedo, H. M. and Peters, G. J.; "5-Fluorouracil incorporation into RNA and DNA in relation to thymidylate synthase inhibition of human colorectal cancers". *Annals of Oncology*, 15, 1025-1032, **2004**.
36. Parker, W. B.; Cheng, Y. C.; "Metabolism and mechanism of action of 5-fluorouracil". *Pharmacol Ther*, 48(3), 381-95, **1990**.
37. Beuzeboc, P.; Pierga, J.Y.; Stoppa L. D.; Etienne, M. C.; Milano, G. and Fouillait, P.; "Severe 5-fluorouracil toxicity possibly secondary to dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency in a breast cancer patient with osteogenesis imperfect". *European Journal of Cancer*, 32, Issue 2, 369-370, **1996**.
38. Chu, E.; Allegra, C. J.; "Mechanisms of clinical resistance to 5-fluorouracil chemotherapy". *Cancer treatment and research*, 87, 175-195, **1996**.
39. Minchinton, A. I. and Tannock, I. F., "Drug penetration in solid tumours". *Nature Reviews Cancer*, 6, 583-595, **2006**.
40. Chaplin, D. J. and Hill, S. A.; "Temporal heterogeneity in microregional erythrocyte flux in experimental solid tumours". *Br J Cancer*, 71(6), 1210–1213, **1995**.
41. Lasic, D. D.; "Liposomes". *Science & Medicine*, 34-43, **1996**.
42. Allen T. M.; "Liposomal Drug Formulations. Rationale for Development and What We Can Expect for the Future". *Drugs*, Nov **56**(5), 747-756, **1998**.
43. Gabizon, A. A.; "Liposomal Drug Carrier Systems in Cancer Chemotherapy: Current Status and Future Prospects". *Journal of Drug Targeting*, 10, No. 7, 535-538, **2002**.

44. Riché, E. L.; Erickson, B. W.; Cho, M. J.; “Novel Long-circulating Liposomes Containing Peptide Library-lipid Conjugates: Synthesis and In Vivo Behavior”. *Journal of Drug Targeting*, 12, No. 6, 355-361, **2004**.
45. Janoff, A. S.; Dekkener, M.; “Liposomes”. *Inc. New Jersey, U.S.A.*, 1-63, **1999**.
46. Torchilin, V. P.; “Recent Advances with liposomes as Pharmaceutical Carriers”. *Nature reviews*, 4, 145-160, **2005**.
47. Perez-Soler, R.; Francis, K; Al-Baker, S.; “Preparation and characterization of liposomes containing a lipophilic cisplatin derivative for clinical use”. *Journal microencapsulation*, 11(1), 41-54, **1994**.
48. Burger, K.; Staffhorst, R. *et al*; “Nanocapsules: lipid-coated aggregates of cisplatin with high cytotoxicity”. *Nature medicine*, 8 (1), 81-85, **2002**.
49. Harrington, K. J.; Rowlinson-Busza, G.; Syrigos, K. N.; “Pegylated Liposomes encapsulated Doxorubicin and Cisplatin Enhance the Effect of Radiotherapy in a tumor Xenograft Model”. *Clinical Cancer Research*, 6, 4939-4949, **2000**.
50. Allen, T. M.; Sapra, P.; Moase, E.; “Use of the post-insertion method for the formation of ligand-coupled liposomes”. *Cellular & molecular biology letters*, 7, 889-894, **2002**.
51. Ramachandran, S.; Quist, A. P.; Kumar, S. and Lal R.; “Cisplatin Nanoliposomes for Cancer Therapy: AFM and Fluorescence Imaging of Cisplatin Encapsulation, Stability, Cellular Uptake, and Toxicity”. *Langmuir*, 22(19), 8156–8162, **2006**.
52. Mauer, N.; Fenske, D. B.; Cullis, P. R.; “Developments in liposomal drug delivery systems”. *Expert Opin Biol Ther*, 6, 923–947, **2001**.
53. Maeda, H; Wu, J., Sawa, T.; Matsumura, Y.; Hori, K.; “Tumour vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review”. *J Control Release*, 65, 271– 84, **2000**.
54. Goyal, P., *et al.*; “Liposomal Drug Delivery Systems: Clinical Applications”. *Acta Pharm.*, 55(1), 1–25, **2005**.
55. Park, J. W.; “Liposome–Based Drug Delivery in Breast Cancer Treatment”. *Breast Cancer Res.*, 4(3), 95–99, **2002**.
56. Campbell, R. B.; Balasubramanian, S. V.; Straubinger, R. M.; “Influence of cationic lipids on the stability and membrane properties of pacli-taxel-containing liposomes”. *J Pharm Sci.* 90(8), 1091–1105, **2001**.
57. Jin, Y., *et al.*, “Pharmacokinetics and Tissue Distribution of 5-Fluorouracil Encapsulated by Galactosylceramide Liposomes in Mice”. *Acta Pharmacol Sin.*, 26(2), 250–256, **2005**.

58. Gnad-Vogt, S.U., *et al.*; "Pegylated Liposomal Doxorubicin and Mitomycin C in Combination with Infusional 5-Fluorouracil and Sodium Folinic Acid in the Treatment of Advanced Gastric Cancer: Results of a Phase II Trial". *Anticancer Drugs*, 16(4), 435-440, **2005**.
59. Kuhl, T.L.; Leckband, D.E.; Lasic, D.D.; Israelachvili, J.N.; "Modulation of interaction forces between bilayers exposing short-chained ethylene oxide headgroups". *Biophysical Journal*, 66, Issue 5, 1479-1488, **1994**.
60. Papahadjopoulos, D., *et al.*; "Sterically Stabilized Liposomes: Improvements in Pharmacokinetics and Antitumor Therapeutic Efficacy", *Actas, Academia Nacional de Ciencias, Estados Unidos*, 88(24), 11460-11464, **1991**.
61. Cattel, L.; Ceruti, M. y Dosio, F.; "From Conventional to Stealth Liposomes: A New Frontier in Cancer Chemotherapy", *L Chemoter*, 16(4), 94-97, **2004**.
62. Rose, P. G.; "Pegylated Liposomal Doxorubicin: Optimizing the Dosing Schedule in Ovarian Cancer". *Oncologist*, 10(3), 205-214, **2005**.
63. Miranda da Costa, C. A. and Moraes, Â. M. "Encapsulation of 5-fluorouracil in liposomes for topical administration". *Acta Scientiarum. Technology*, 25 (1), 53-61, **2003**.
64. Mayer, L.D; Harasym, T.O.; Tardi, P.G., *et al.*; "Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: Controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice". *Mol Cancer Ther*, 5, 1854-63, **2006**.
65. Mayer, L.D.; Dougherty, G.; Harasym, T.O.; Bally, M.B.; "The role of tumor-associated macrophages in the delivery of liposomal doxorubicin to solid murine fibrosarcoma tumors". *J Pharmacol Exp Ther*, 280, 1406-1414, **1997**.
66. Wang, J.; Goh, B.; Lu, W., *et al.*, "In vitro cytotoxicity of Stealth liposomes co-encapsulating doxorubicin and verapamil on doxorubicin-resistant tumor cells". *Biol Pharm Bull*, 8, 822-828, **2005**.
67. Bassett, J. B.; Anderson, R .U. and Tucker, J. R.; "Use of temperature-sensitive liposomes in the selective delivery of methotrexate and cis-platinum analogues to murine bladder tumor". *J. Urol.*, 135, 612-615, **1986**.
68. Magin, R. L.; and Niesman, M. R.; "Temperature dependant drug release from large unilamellar liposomes". *Cancer Drug Delivery*, 1, 109-117, **1984**.

69. Gregoroadid, G. and Senior, J.; "The phospholipid component of small unilamellar liposomes controls the rate of clearance of entrapped solutes from the circulation". *FEBS Lett.*, **119**, 43-46, **1980**.
70. Kiwada, H.; Akimoto, M.; Araki, M.; Tsuji, M. and Kato, Y.; "Application of synthetic liposomes based on acyl aminoacids or acyl peptides as drug carriers. I: Their preparation and transport of glutathione into the liver". *Chem. Pharm. Bull.*, **35**, 2935-2942, **1987**.
71. Roerdink, .F. H.; Daemen, T.; Bakker-Woudenberg, I. A. J. M.; Storm, G.; Cromelyn, D. J. A. and Schephof, G.L.; "Therapeutic utility of liposomes". In *drug delivery systems: Fundamentals and techniques*, Johnson, P. and Lloyd-Jones, J.G., Eds. VCH Horwood Ltd., Chichester, 66-80, **1987**.
72. Lasic, D. D.; "Liposomes in gene delivery". *CRC press*. U.S.A., 67-113, **1997**.
73. Stryer, L.; "Bioquímica". *Reverté*. 3a edición Tomo 1. Barcelona España, 289-312, **1988**.
74. Torchilin, V. P.; "Targeted delivery of imaging agents". *CRC Press*. U. S. A., 149-173, **1995**.
75. Berenholz, Y.; "Relevancy of Drug Loading to liposomal formulation therapeutic efficacy". *Journal of liposome Research*, **13**(1), 1-8, **2003**.
76. Torchilin, V. P.; Weissig, V.; "Liposomes". *Oxford*. Second edition. Boston MA, U.S.A., pp. 3-75, 149-164, 193-286, 305-335, **2003**.
77. Scherphof, G.; Morsetlet, H.; Regts, J. and Wilschut, J.; "The involvement of the lipid phase transition in the plasma-induced dissolution of the multilamellar phosphatidyl-choline vesicles". *Biochem. Biophys. Acta*, **556**, 196-207, **1979**.
78. Citovsky, V.; Blumenthal, R. and Loyter, A.; "Fusion of Sendai virions with phosphatidyl-choline-cholesterol liposomes reflects the viral activity required for fusion with biological membranes". *FEBS Lett.*, **193**, 135-140, **1985**.
79. Voet, D.; "Bioquímica". *Ediciones Omega*. Barcelona, España, 293-328, **1992**.
80. Drummond, D. C., Meyer, O., *et al.*; "Optimizing Liposomes for delivery of Chemoterapeutic agents to solid tumors". *The Americ. Society for Pharmac. and Experimental Therap.*, **51**, Issue 4, 691-743. **1999**.
81. "Everything you want to know about Coagulation & Flocculation". *Zeta-Meter Inc.*, Fourth Edition. Staunton, Virginia, U.S.A., April **1993**.
82. "Curso de potencial zeta". *Zeta-Meter Inc.* **2009**.
<http://www.zeta-meter.com/redchile.pdf>

83. Arulsudar, N.; Subramanian, N.; Mishra, P.; Chuttani, K.; Sharma, R. K. and Murthy, R. S. R.; "Preparation, characterization, and biodistribution study of technetium-99m-labeled leuprolide acetate-loaded liposomes in ehrlich ascites tumor-bearing mice". *The AAPS Journal*, 6, No. 1, 45-56, **2004**.
84. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G. and Cullis, P. R.; "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential". *Biochim. Biophys. Acta*, 812, 55-65, **1985**.
85. Schuh, J. R.; Banerjee, U.; Müller, L. and Chan, S. I.; "The phospholipid packing arrangement in small bilayer vesicles as revealed by proton magnetic resonance studies at 500 MHz". *Biochim. Biophys. Acta*, 687, 219-225, **1982**.
86. Peleg-Shulman, T., Gibson, D., *et al.*; "Characterization of sterically stabilized cisplatin liposomes by nuclear magnetic resonance". *Biochemica et Biophysica*, 1510, 278-291, **2001**.
87. <http://www.northernlipids.com/products/documents/Extruder%20Assembly%20and%20Operating%20Manual.pdf>
88. Lash, J.; Weissig, V.; Brandl, M.; "Preparation of liposomes" – chapter 1 – *Liposomes, Practical approach*, Torchilin, V. P. Second edition; Oxford University Press, Boston MA. U.S.A., **2003**.
89. Jederström, G.; Rusell, G.; "Size exclusion chromatography of liposomes on different gel media". *J Pharm Sci.* 70(8), 874-8, **1981**.
90. Per, L.; Cheng-Ming, Z., *et al.*; "Chromatographic approaches to liposomes, proteoliposomes and biomembrane vesicles". *Journal of Chromatography*, 720, 103-120, **1999**.
91. Barenholz, Y.; Gibbes, D. and Bauer, K. H. *Drug Dev. Ind. Pharm*, 15, 655, **1989**.
92. Bartlett, G.R. "Phosphorus assay in column chromatography." *J. Biol. Chem.*, 234, 446. **1959**.
93. Zuidam, N. J.; Vrueth, R. de; Crommelin, D. J.A.; "Characterization of liposomes" – chapter 2 – *Liposomes, Practical approach*, Torchilin, V. P. Second edition; Oxford University Press, BOSTON MA. U.S.A., **2003**.
94. Barenholz Y. and Crommelin, .D. J. A. in "*Encyclopedia of pharmaceutical technology*", ed. J. Swarbrick, p.1 Marcel Dekker, New York. **1994**.
95. Stewart, J.; "Colorimetric Determination of Phospholipids with Amonium Ferrothiocyanate". *Analytical Biochemistry*, 104, 10-14, **1980**.
96. Clark, N. A.; Lunacek, J. H. and Benedek, G. B.; "A study on Brownian motion using light scattering". *American Journal of physics*, 38, No. 5, 575-585, **1970**.

97. Englitz, Bernhard; "Dynamic light scattering", *Biophysical Measurement* (Physics 173) - UCSD - Spring **2002**.
98. Riddick, Thomas; "Control of colloid stability through zeta potential, with a closing chapter in its relationship to a cardiovascular disease". Zeta-Meter, Inc. New York, NY. (US) **1968**.
99. "Zeta potential Analyzer Instruction Manual". *Brookhaven Instruments Co.*, **2007**.
100. Lewis *et al*; "Industrial chemistry of colloidal and amorphous materials". *Mac-millan*, **1942**.
101. Mysels, K. J.; "Introduction to colloid chemistry interscience" *Ed. Wiley*, NY, U.S.A., **1959**
102. MacKenzie A. P.; "The physic-chemical basis for the freeze-drying process, "International Symposium on freeze-drying of biological products, Washington, D. C. 1976. *Develop. Biol. Standard.*, S. Karger, Basel, 36, 51–67, **1977**.
103. MacKenzie A. P.; "Solvent exchange and removal-lyophilization". International Workshop on Technology for Protein Separation and Improvement of Blood Plasma Fractionation. Reston, Virginia, 1977. *DHEW Publication No. (NIH) 78–1422*, **1978**.
104. MacKenzie A. P.; "Collapse during freeze-drying—qualitative and quantitative aspects". In: Goldblith, S. A.; Rey, L. and Rothmeyer, W. W.; eds. *Freeze-Drying and Advanced Food Technology*, Academic Press, London, 27 –307, **1975**.
105. Adams, G. D. J.; *Drying Tech*, 9, 891–925, **1991**.
106. Barbosa-Cánovas, G. y Vega-Mercado, H.; "Osmotic dehydration". En Dehydration of foods. Food engineering series. *Ed. Chapman & Hall. New York*, pp. 265-288, **1996**.
107. Madden, Thomas D. and Boman, Nancy; Chap. 11 – "Lyophilization of Liposomes" in *Liposomes. Rationale Design*. The liposome Company, Inc. Princeton, New Jersey. Janoff, Andrew S.; Ed. Marcel Dekker, Inc. **1999**.
108. Gabizon, A.; "Stealth liposomes and tumor targeting: One step further in the quest for the magic bullet". *Clinical Cancer Research*, 7, 223-225, **2001**.
109. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Webb, G. and Cullis, P. R.; "Production of large unilamellar vesicles by a rapid extrusion procedure. Characterization of size distribution, trapped volume and ability to maintain a membrane potential". *Biochimica et Biophysica Acta*, 812, 55-65, **1985**.
110. Hope, M. J.; Bally, M. B.; Mayer L. D.; Janoff, A. S. and Cullis, P. R.; "Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles." *Chemistry and Physics of Lipids*, 40, 89-108, 1986.
111. Mayer L. D.; Hope, M. J. and Cullis, P. R.; "Vesicles of various sizes produced by a rapid extrusion procedure". *Biochimica et Biophysica Acta*, 858, 161-168, **1986**.

- 112.** Wang, J. C.; Goh, B.; LU, W. L.; Zhang, Q.; Chang, A.; Liu, X. L.; Mc Tan, T. and LEE, H. S.; “In Vitro Cytotoxicity of Stealth Liposomes Co-encapsulating Doxorubicin and Verapamil on Doxorubicin-Resistant Tumor”. *CellsBiol. Pharm. Bull*, 28(5) 822—828, **2005**.
- 113.** Abraham, S. A.; McKenzie, C.; Masin, D.; Ng, R.; Harasym, T. O.; Mayer, L. D. and Bally, M. B.; “In Vitro and in Vivo Characterization of Doxorubicin and Vincristine Coencapsulated within Liposomes through Use of Transition Metal Ion Complexation and pH Gradient Loading”. *Clinical Cancer Research*, 10, 728–738, **2004**.
- 114.** Abraham, S. A.; Waterhouse, D. N.; Mayer, L. D.; Cullis, P. R.; Madden, T. D. and Bally, M. B.; “The Liposomal Formulation of Doxorubicin” in *Methods in Enzymology*, vol. 391. LIPOSOMES, Part E, Section 1, 4, 71–94, **2005**.
- 115.** Madden, T. D.; Harrigan, P. R.; Tai, L. C.; Bally, M. B.; Mayer, L. D.; Redelmeier, T. E.; Loughrey, H. C.; Tilcock, C. P.; Reinish, L. W. and Cullis, P. R. “The accumulation of drugs within large unilamellar vesicles exhibiting a proton gradient: A survey”. *Chem Phys. Lipids*. 53, 37-46, **1990**.
- 116.** Olson, F.; Hunt, C. A.; Szoka, F. C.; Vail, W. J.; and Papahadjopoulos, D.; “Preparation of liposomes of defined size distribution by extrusion through polycarbonate membranes.” *Biochimica et Biophysica Acta*, 557, 9-23, **1979**.
- 117.** Labhasetwar, V.; Mohan M. S. and Dorle, A.K.; “A study on zeta potential and dielectric constant of liposomes”. *J. Microencapsulation*, 11(6), 663-668, **1994**.
- 118.** <http://www.iesmat.com/Lectura%20recomendada/Productos-MAL/DLS-Size%20and%20zeta%20potential%20characterisation%20of%20liposomes.pdf>
- 119.** Salvati, A.; Ristori, S.; Oberdisse, J.; Spalla, O.; Ricciardi, G.; Pietrangeli, D.; Giustini, M. and Martini, G; “Small Angle Scattering and Zeta Potential of Liposomes Loaded with Octa(carboranyl)porphyrine”. *J. Phys. Chem. B*, 111 (35), 10357–10364, **2007**.
- 120.** El Maghraby, G. M. M.; Williams, A. C. and Barry, B. W.; “Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas. International”. *Journal of Pharmaceutics*, 292, Issues 1-2, 179-185, **2005**.
- 121.** Glavas-Dodov, M.; Fredro-Kumbaradzi E.; Goracinova, K.; Simonoska, M.; Calis, S.; Trajkovic-Jolevska, S.; Hincal A. A.; “The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU”. *International Journal of Pharmaceutics* 291, 79–86, **2005**.
- 122.** Harrigan, P. R.; Madden, T. D. and Cullis, R. R.; “Protection of liposomes during dehydration or freezing”. *Chem. Phys. Lipids*, 52, 139–149, **1990**.

- 123.** Suzuki, T.; Komatsu, H. and Miyajima, K., "Effects of glucose and its oligomers on the stability of freeze-dried liposomes". *Biochim. Biophys. Acta* 1278, 176–182, **1996**.
- 124.** Janicki, S.; Jankowski, J.; Szulc, J.; Woyczkowski, B. and Sznitowska, M.; "The effect of cryoprotectants on the physical properties of large liposomes containing sodium diclofenac". *Acta Pol. Pharm.* 59, 187–191, **2002**.
- 125.** Kulkarni, S. B.; Betagèri, G. V. and Sing, M.; "Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes". *J. Microencapsul.*, 12, 229–246, **1995**.
- 126.** Kulkarni, S. B. and Betageri G. V. in *Pharmaceutical Particulate Carriers, Therapeutical application*, Rolland, A. ed., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 82–135, **1993**.
- 127.** Kalra, Ashish V. and Campbell, Robert B. "Development of 5-FU and Doxorubicin-Loaded Cationic Liposomes against Human Pancreatic Cancer: Implications for Tumor Vascular Targeting". *Pharmaceutical Research*, 23(12), **2006**.
- 128.** Krogsgaard-Larsen, P., *et al.*; "A textbook of drug design and development". 2 ed. *Copenhagen: Harwood Academic*, **1996**.
- 129.** Crommelin, D. J. A.; Schreier, H. "Liposomes" in: *Colloidal Drug Delivery Systems* by Kreuter, J. (Ed.) New York: Marcel Dekker Inc., pp.73-191, **1994**.
- 130.** Elorza B. *et al.* "Characterization of 5-fluorouracil loaded liposomes prepared by reverse-phase evaporation or freeze-thawing extrusion methods: study of drug release". *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, 1153(2), 135-142, **1993**.
- 131.** Crommelin, D. J. A.; Grit, M.; Talsma, H. and Zuidam, N. J.; "Liposomes as carriers for drugs and antigens: approaches to preserve their long-term stability". *Drug Dev. Ind. Pharm.* 20, 547–556, **1994**.
- 132.** van Winden, E. C. and Crommelin, D. J.; "Short term stability of freeze-dried lyoprotected liposomes". *J. Control. Release* 58, 69–96, **1999**.
- 133.** Glavas-Dodov, M.; Fredro-Kumbaradzi, Emilija; Calis, Sema, Goracinova, Goracinova, Mladenovska, Kristina, Simonovska¹, Maja; Hincal, Atila A.; "Formulation and characterization of 5-fluorouracil loaded liposomes". *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedonia*, 23 (1), pp. 13–18, **2004**.