



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE FORMULACIONES
LIPOSOMALES DE DOXORRUBICINA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACEÚTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LIZBETH MARTÍNEZ ACEVEDO



MÉXICO, D.F.

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.

JURADO ASIGNADO:

Presidente: **Isaura Luisa Carrera García**

Vocal: **Alma Miriam Novelo Torres**

Secretario: **Luis Alberto Medina Velázquez**

Primer suplente: **María Teresa Buentello Rodríguez**

Segundo suplente: **Ma. Guadalupe Lemus Barajas**

Este trabajo experimental se desarrolló en el Laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM, Instituto Nacional de Cancerología. México D. F.

Asesor:

Dr. Luis Alberto Medina Velázquez

Supervisor técnico:

Dra. Patricia García López

Sustentante:

Lizbeth Martínez Acevedo

Agradecimiento especial

Al Programa de Becas de Inicio a la Investigación, PROBEI de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad (C.C.I.N.S.H.A.E) por el apoyo económico otorgado para la realización de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT-UNAM proyecto IN108610-2 por la beca otorgada.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM por brindarme la oportunidad de adquirir los conocimientos para mi formación integral como persona y profesionista.

A la Facultad de Química por ser mi segunda casa.

Gracias...

...DIOS, por que cuando pensé que las cosas eran imposibles, me diste la fuerza para hacerlas posibles aún cuando las esperanzas estaban secas.

..Dr. Luis por abrirme las puertas de su laboratorio, por la confianza, los consejos y las enseñanzas. Pero sobretodo, por enseñarme que en la ciencia muchas veces no se tiene lo que se espera, pero lo importante es no desesperar.

...Dra. Paty por su colaboración, los consejos y el tiempo invertido en la supervisión de este trabajo.

.. Dra. Elena Aréchaga Ocampo, Dra. Jazmín Pérez Rojas y QFB. Josefina García Rojas por haber compartido sus conocimientos y experiencia, por la paciencia y tiempo dedicado para que yo aprendiera.

...Vicky, Carlos, Héctor, Vane, Poncho, Edith, Alfredo, Carlitos, Itzel, Pablo, Karla: por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia inolvidable y divertida, por esas pláticas en el comedor, las aventuras extra laboratorio, el apoyo en mis crisis de desesperación y los consejos para ser una mejor persona, pero lo más importante es haberlos conocido porque ahora más que compañeros son mis amigos.

...Carlita por el apoyo recibido en cada decisión tomada, por la esperanza puesta en los sueños por cumplir. Y sobretodo, por que siempre he tenido una amiga con quien hablar.

... mis amigos por que cada desvelo tuvo compañía, cada tristeza tuvo consuelo y cada alegría tuvo satisfacción. Por contagiarme con sus ganas de vivir y por las muchas de experiencias vividas.

Dedicado a...

...Mis papás por que me aman a pesar de mis defectos, siempre con una palabra de aliento y alivio para mis tristezas, con sus buenos consejos o regaños justificados. A ustedes que creen en mí siempre y han estado en cada momento, que les debo la vida y ser quien soy. Simplemente dedico este logro por que estoy orgullosa de ser su hija.

... Latosito de Bruno por los 21 años de amistad y de ser mi hermano. Por que contigo cada problema tiene solución y si no la tiene para que preocuparte...por lo divertido que es estar contigo.

...Mi hermanita Faty, con su inocencia me ha enseñado que la vida no es más que reír, por que ser feliz es tan fácil con sus gestos de amor y su contagiosa risa.

...Mauricio...aunque físicamente ya no estés, vivirás en mi corazón por siempre. Es más fácil soportar la muerte sin pensar en ella, alimentándote solo de los recuerdos.

..Todas aquellas personas que luchan día a día contra el Cáncer por que son ustedes quienes hacen que el trabajo valga la pena.

*Dios, concédeme serenidad para
aceptar lo que no puedo cambiar,
valor para cambiar lo que si puedo
y sabiduría para reconocer la
diferencia.*

Índice

Resumen	10
Abreviaturas	11
1. Antecedentes	12
2. Introducción	17
2.1 Caracterización de liposomas	17
2.1.1 Pruebas de composición	18
2.1.2 Caracterización física	21
2.1.3 Pruebas de estabilidad	24
3. Justificación	27
4. Objetivos	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
5. Desarrollo experimental	28
5.1 Pruebas de composición	29
5.1.1 Cuantificación de fosfolípidos	29
5.1.2 Cuantificación de DOXO encapsulada	32
5.2 Parámetros físicos	35
5.2.1 Tamaño de partícula	35
5.2.2 Potencial zeta	36
5.3 Pruebas de estabilidad	38
5.3.1 Productos de degradación de fosfolípidos	38
5.3.1.1 Determinación de MDA	40
5.3.1.2 Determinación de 4-HNE	42

5.3.2	Prueba de liberación de principio activo <i>in vitro</i>	43
5.4	Análisis estadístico	46
6.	Resultados y discusión	47
6.1	Pruebas de composición	47
6.1.1	Fosfolípidos	47
6.1.2	Cuantificación de fármaco encapsulado	49
6.2	Parámetros físicos	50
6.2.1	Tamaño de partícula	50
6.2.2	Potencial zeta	53
6.3	Pruebas de estabilidad	54
6.3.1	Determinación de MDA y 4-HNE	54
6.3.2	Prueba de liberación de DOXO <i>in vitro</i>	57
7.	Conclusiones	60
8.	Bibliografía	61

Resumen

Las formulaciones liposomales han tenido gran impacto como vectores de transporte de agentes antineoplásicos, debido a que presentan una reducción considerable de los efectos tóxicos asociados a las dosis administradas.

El compuesto doxorrubicina, se considera como uno de los agentes más eficaces para el tratamiento del cáncer de mama y ovario metastásico pero su dosis se ve limitada por su elevada cardiotoxicidad.

La aprobación para el uso clínico y la comercialización de diferentes formulaciones liposomales, hace necesario establecer controles de calidad que garanticen la estabilidad, seguridad y eficacia terapéutica del producto farmacéutico.

El presente trabajo consistió en el diseño de pruebas fisicoquímicas en formulaciones comerciales de doxorrubicina liposomal, para establecer una guía de las pruebas mínimas de control de calidad de las formulaciones liposomales. En nuestro caso, información necesaria para las formulaciones en desarrollo por el laboratorio de Física Médica.

Abreviaturas

DOXO	Doxorrubicina
HSPC	Fosfatidilcolina de soya hidrogenada
PEG	Polietilen glicol
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
CCF	Cromatografía en capa fina
DSC	Calorimetría Diferencial de Barrido
CG	Cromatografía de gases
RMN	Resonancia magnética nuclear
FDA	Food Drug Administration
EMA	European Medicines Agency
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
MDA	Malondialdehído
4-HNE	4-hidroxinonenal
EPR	Efecto de aumento de permeabilidad y retención
ERO	Especies reactivas de oxígeno
1M2F	1-metil-2-fenilindol
TMPO	Tetrametoxipropano
PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos

1. Antecedentes

El cáncer es una de las enfermedades más devastadoras del mundo, cada año se reportan más de 10 millones de nuevos casos a nivel mundial [1].

Los quimioterapéuticos clásicos, como doxorrubicina, cisplatino y paclitaxel han mostrado una biodistribución poco favorable debido a su eliminación rápida de la circulación sanguínea, siendo una pequeña fracción del fármaco llega al tejido tumoral [2, 3, 4].

La necesidad de reducir los efectos secundarios asociados a las dosis administradas y de incrementar la efectividad de los agentes quimioterapéuticos, condujo al diseño de nanosistemas de liberación y transporte de fármacos, que han demostrado un mejor incremento de la concentración sanguínea del fármaco y la liberación dirigida hacia el tejido blanco tumoral [5, 6].

Entre los materiales constituyentes de los nanosistemas transportadores de fármacos se encuentran polímeros conjugados, nanopartículas poliméricas, transportadores de matriz lipídica (liposomas y micelas), dendrímeros, nanotubos de carbono y nanopartículas de oro. [1,4]

Los liposomas descubiertos en 1965 por Alec Bangham y colaboradores [7], son estructuras coloidales esféricas formadas por una bicapa lipídica que encierran un compartimiento acuoso. Para su elaboración, se utilizan fosfolípidos, con o sin la incorporación de colesterol o de otros materiales introducidos en la pared de los liposomas para dar alguna propiedad particular [8].

Las formulaciones liposomales, llamadas así cuando se emplean liposomas para encapsular principios activos [9], han sido usadas como acarreadores de fármacos por que [10]:

- a) Pueden encapsular agentes terapéuticos hidrofílicos o hidrofóbicos con alta eficiencia, ya sea en el espacio acuoso del liposoma o intercalándose en la bicapa de fosfolípidos.
- b) Protegen al fármaco de las condiciones externas que puedan causar su degradación.
- c) Pueden ser dirigidos con ligandos que llegan a blancos específicos en las células, tejidos y órganos.
- d) Son cubiertos con polímeros inertes y biocompatibles como el polietilen glicol (PEG) para prolongar su tiempo de circulación *in vivo* (vida media).
- e) Presentan estudios farmacocinéticos y perfiles de distribución diferentes que el fármaco libre, teniendo gran impacto como vectores de transporte de agentes antineoplásicos, debido a que presentan una reducción considerable de los efectos secundarios asociados a las dosis administradas.

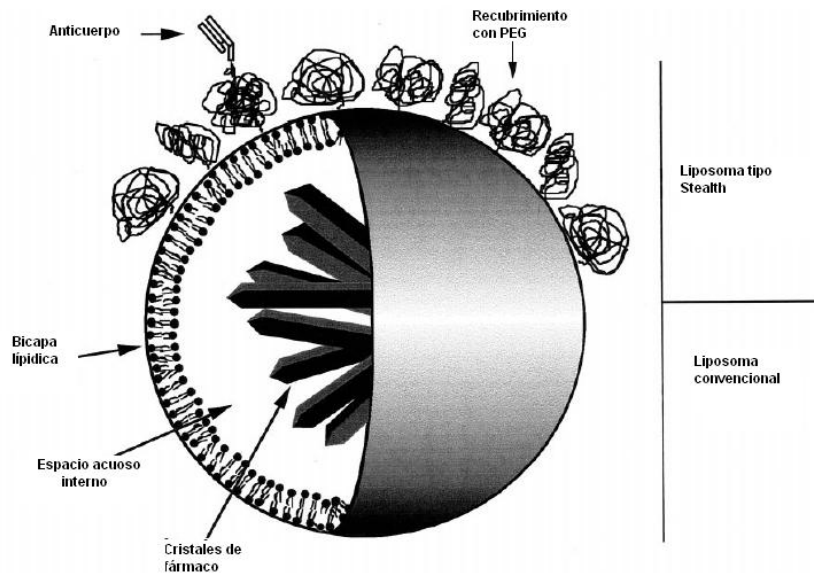


Figura1. Esquema de liposoma [5].

La aplicación de la nanomedicina ha sido fundamental para modificar las propiedades de ciertos agentes como la solubilidad, difusión, vida media de circulación, características de liberación del fármaco e inmunogenicidad. En las últimas dos décadas han sido desarrollados nanopartículas con agentes terapéuticos o de diagnóstico.

Hasta el 2008, 24 productos nanotecnológicos habían sido aprobados para uso clínico a nivel mundial, con un total de 5.4 billones de dólares en ventas. El 80% de estos productos incluye las formulaciones liposomales y conjugados poliméricos [20].

En 1995, Doxil, en Estados Unidos o Caelyx, en Europa y México, fue la primera formulación liposomal aprobada por la FDA (Food and Drug Administration) para el tratamiento del sarcoma de Kaposi asociado a VIH, con Doxorubicina como principio activo [6, 10].

Los estudios farmacocinéticos mostraron que Doxorubicina libre presenta una vida media de eliminación de 0.2 h y un área bajo la curva AUC de $4\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ en pacientes comparada con 2.5 h y $45\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ para Myocet (formulación liposomal de DOXO) y 55h y $900\mu\text{g}\cdot\text{h}\cdot\text{mL}^{-1}$ para Caelyx (formulación liposomal pegilada de DOXO) reduciendo de manera significativa la cardiotoxicidad asociada a las dosis administradas, siendo ésta la primera justificación para aprobar las formulaciones liposomales de antraciclinas [21].

Otras formulaciones liposomales con agentes terapéuticos usadas en la clínica se muestran en la siguiente tabla [10].

Tabla 1. Formulaciones liposomales existentes en el mercado.

Agente terapéutico	Nombre comercial	Compañía farmacéutica	Indicación	Administración
Amfotericina B	Abelcet	Enzon	Infecciones fúngicas	i.v.
Amfotericina B	AmBisome	Gilead Sciences	Infecciones fúngicas y por protozoarios	i.v.
Citarabina	DepoCyt	SkyePharma	Meningitis linfomatosa maligna	i.t.
Daunorrubicina	DaunoXome	Gilead Sciences	Sarcoma de Kaposi asociado a VIH	i.v.
Doxorrubicina	Myocet	Zeneus	Terapia combinada con ciclofosfamida en cáncer de mama metastásico	i.v.
Vacuna IRIV	Epaxal	Berna Biotech	Hepatitis A	i.m.
Vacuna IRIV	Inflexal V	Berna Biotech	Influenza	i.m.
Morfina	DepoDur	SkyePharma, Endo	Analgesia postquirúrgica	Epidural
Verteporfina	Visudyne	QLT, Novartis	Degeneración macular, miopía, histoplasmosis ocular.	i.v.
Doxorrubicina liposomal pegilada	Doxil/Caelyx	Ortho Biotech, Schering-Plough	Sarcoma de Kaposi asociado a VIH, cáncer de mama y ovario metastásico	i.m.
Estradiol micelular	Estrasorb	Novavax	Menopausia	Tópica

i.v., intravenosa; i.t., intratecal; i.m., intramuscular; VIH, virus de inmunodeficiencia humana; IRIV, virosoma reconstituido inmunopotenciador de la influenza.

Las formulaciones liposomales representan la primera generación de nanoacarreadores coloidales de fármacos vía parenteral aprobadas por la FDA (*Food Drug Administration*) y comercializadas.

Los productos nanotecnológicos, como las formulaciones liposomales, fueron autorizadas para su comercialización de acuerdo a la presente legislación, tanto en Europa como en Estados Unidos por la EMA (*European Medicines Agency*) y la FDA. Sin embargo los científicos, la industria farmacéutica y las entidades reguladores discuten la necesidad de establecer nuevas regulaciones para los productos de naturaleza nanotecnológica.

En agosto del 2002 se publicó una guía para las formulaciones liposomales de uso farmacéutico, que incluyen recomendaciones técnicas en cuanto a la química, manufactura, controles, estudios farmacocinéticos y de biodisponibilidad. Sin embargo, aún no es un documento oficial, por lo que el diseño de pruebas de caracterización fisicoquímica, para las formulaciones liposomales de doxorubicina, son una manera de establecer los controles de calidad de estos sistemas de transporte y liberación de fármacos, cuya naturaleza no permite emplear las pruebas aprobadas hasta ahora. Los procedimientos de control de calidad que se proponen en esta tesis están basados en las investigaciones de formulaciones liposomales de varios grupos de trabajo, en la guía de la FDA antes mencionada [9] y por la propia experiencia del laboratorio de Física Médica del INCan en la manufactura y evaluación de este tipo de formulaciones.

2. Introducción.

2.1 Caracterización de liposomas.

Las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones liposomales son críticas para garantizar la calidad del producto, ya que determinan su comportamiento *in vivo* e *in vitro*, por lo que deberán ser incluidas en las especificaciones. Se debe proporcionar una caracterización detallada, beneficiosa para una subsecuente evaluación si se realizan cambios en la manufactura. Las propiedades específicas de las formulaciones liposomales que se deben evaluar incluyen [22]:

Tabla 2. Ensayos de control de calidad de las formulaciones liposomales.

Pruebas de caracterización	Metodología
pH	Potenciómetro
Osmolaridad	Osmómetro
Volumen de atrapamiento	Medición de la fase acuosa intra liposomal.
Concentración de fosfolípidos	Ensayo de Bartlett Método de Stewart
Concentración de colesterol	HPLC Ensayo de colesterol oxidasa
Concentración de fármaco	Según el principio activo
Disolvente orgánico residual y metales pesados	RMN CG Protocolos farmacopeicos
Radio Fármaco/fosfolípido	Determinación del compuesto activo y la concentración de fosfolípidos
Estabilidad química	
Hidrólisis de fosfolípidos	HPLC CCF
Concentración de ácidos grasos no esterificados	HPLC Ensayo enzimático
Oxidación de fosfolípidos	Dienos conjugados Lipidoperóxidos Especies reactivas de TBA
Autoxidación de colesterol	HPLC CCF
Degradación de antioxidantes	HPLC CCF
Degradación de fármaco	Según el principio activo
Caracterización física	
Apariencia	Inspección visual
Distribución y tamaño de partícula	Dispersión dinámica de luz Dispersión de luz estática
Potencial zeta	Electroforesis

Comportamiento termotrópico, fase de transición y fase de separación	DSC
Porcentaje de fármaco libre	Según el principio activo
Ensayos microbiológicos	
Esterilidad	Protocolos farmacopeicos
Pirogenicidad (Nivel de endotoxinas)	Protocolos farmacopeicos

Los análisis químicos requieren la disolución, solubilización o extracción de los componentes liposomales, los cuales pueden ser completos o no selectivos lo que puede dificultar el análisis y cuantificación de cada uno de los componentes.

Los métodos se han dividido en:

- a) Métodos analíticos de los componentes liposomales.
- b) Métodos para estudiar las propiedades físicas de los liposomas.

De acuerdo con la guía de la FDA, las pruebas de evaluación de formulaciones liposomales se han dividido en pruebas de composición, pruebas de estabilidad y pruebas de caracterización física.

2.1.1 Pruebas de composición.

Los componentes de las formulaciones liposomales son el fármaco, los lípidos y otros excipientes. La farmacología, toxicidad y calidad de las formulaciones puede variar significativamente con cambios en la formulación, incluyendo la composición de lípidos. Es importante determinar la composición del producto y los rangos de variación de los componentes.

- a) Fosfolípidos

Los liposomas están constituidos por moléculas anfifílicas basadas en la estructura de los lípidos de las membranas biológicas, se componen de fosfolípidos y/o colesterol principalmente [23].

Estos lípidos se forman por una molécula de glicerol esterificada en las posiciones 1 y 2 por dos cadenas de ácidos grasos (glicerolípidos). Esta parte

hidrofóbica se une a una cabeza polar que puede contener el grupo fosfato (fosfolípidos). Las cabezas polares de los lípidos biológicamente relevantes pueden ser *zwitteriónicas*: fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, esfingomielina; cargadas negativamente: ácido fosfatídico, fosfatidil glicerol, fosfatidil serina, fosfatidil inositol, cardiolipina y glicolípidos. Las cadenas *ácilas* saturadas con frecuencia varían en longitud entre 10 y 18 carbonos; las de longitud mayor de 18 carbonos son usualmente insaturadas con uno, dos o tres dobles enlaces en configuración *cis* [24].

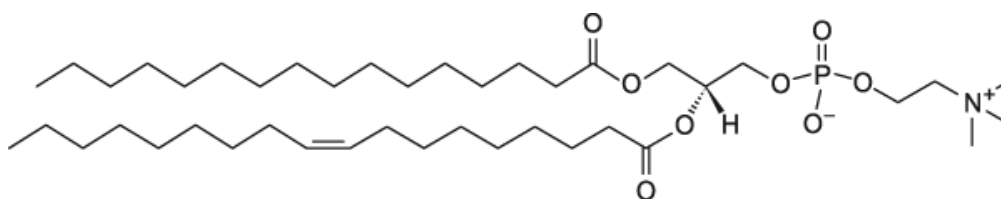


Figura 5. Estructura química de fosfatidilcolina

La calidad y pureza de la composición de lípidos puede afectar la calidad de la formulación liposomal, por tal motivo es necesario realizar la descripción y caracterización. Si el lípido es sintético o semisintético, la estructura base puede ser definida por técnicas espectroscópicas comparadas contra un estándar; en el caso de lípidos de origen natural se debe determinar el porcentaje de cada lípido y la composición de ácidos grasos [9].

La circulación sanguínea de los liposomas es afectada por la composición de lípidos, se sabe que el uso de fosfolípidos saturados o esfingomielina, reducen la fluidez de la membrana de los liposomas, prolonga su tiempo de circulación, mientras que los lípidos cargados negativamente acortan su tiempo de circulación [25].

b) Colesterol

La intercalación de moléculas de colesterol entre la bicapa de fosfolípidos de liposomas tiene tres efectos: incrementa la fluidez o microviscosidad de la bicapa, reduce la permeabilidad de la membrana a moléculas solubles en agua, estabiliza la membrana en presencia de fluidos biológicos como el plasma, reduce la interacción de los liposomas con proteínas plásmáticas [26].

c) Polietilen glicol (PEG)

El recubrimiento con polietilen glicol (PEG) en los liposomas es una barrera estérica y una superficie hidrofílica que reduce la interacción con proteínas plasmáticas y lipoproteínas, incrementando el tiempo de circulación sanguínea. Esta modificación incrementa la biodisponibilidad de los fármacos encapsulados y el proceso de liberación es más lento, minimizando la toxicidad y los efectos secundarios. Además del PEG, otros polímeros como la poliacrilamida, el alcohol polivinílico o la polivinilpirrolidona, han sido utilizados para lograr los mismos objetivos [27,44].

d) Principio activo

Doxorrubicina (DOXO) es un antibiótico antineoplásico aislado del cultivo de *Streptomyces peucetius* var. *Caesius* [11]. Su nombre químico es clorhidrato de (8S, 10S)-10-[(3-amino-2, 3, 6-trideoxi- α -L-lixo-hexopiranosil) oxi] - 7, 8, 9, 10 - tetrahidro- 6, 8, 11 - trihidroxi - 8 - (hidroxiacetil)-1-metoxi-5,12-naftacenodiona [12] . DOXO consiste en un núcleo de aglicona ligado a un amino azúcar a través de un enlace O- glucosídico en el carbono 7 (Figura 3) [13].

DOXO se clasifica como un antibiótico del grupo de la antraciclina, su actividad antineoplásica incluye tratamientos contra la leucemia aguda linfoblástica, la leucemia mieloblástica, los linfomas Hodgkin y no-Hodgkin; cáncer de mama, cáncer de pulmón y algunos tipos de sarcomas [14, 18, 19].

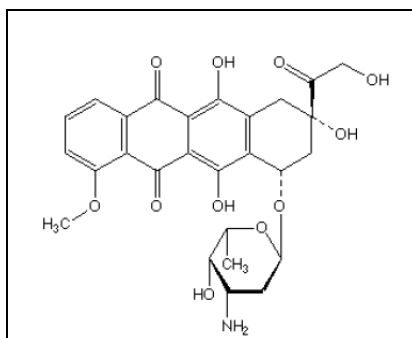


Figura 3. Estructura química de doxorubicina [15]

El anillo antracíclico es lipofílico, pero el anillo final saturado contiene abundantes grupos hidroxilos adyacentes al amino azúcar, produciendo el centro hidrofílico. La molécula es anfotérica, con funciones ácidas por el anillo fenólico y función básica por el amino azúcar. El grupo cromóforo de la estructura química está compuesto por los anillos aromáticos a los cuales se les atribuye el color rojo de la molécula [15, 16, 17].

2.1.2 Caracterización física

a) Tamaño de partícula

La acumulación de liposomas en tejido tumoral depende del tiempo de circulación en la sangre, la transferencia de liposomas desde el torrente sanguíneo al espacio intersticial del tumor y la retención local del liposoma en el tejido tumoral. En tumores, la permeabilidad del endotelio vascular es diferente comparada con la de los tejidos sanos, y el sistema linfático está poco desarrollado, permitiendo una filtración pasiva y constante del fármaco en el tumor, además de una retención en la masa tumoral a este efecto se le conoce como efecto de aumento de permeabilidad y retención (EPR). De acuerdo a los estudios realizados, el intervalo de tamaño para asegurar la acumulación en tejido tumoral es menor a los 200 nm de diámetro, aunque el tamaño óptimo es 100 nm [28].

El reconocimiento de los liposomas por el Sistema Fagocítico Mononuclear, está mediado por proteínas plasmáticas como inmunoglobulinas y factores del complemento, un decremento en el tamaño de los liposomas reduce su reconocimiento por estas proteínas [29].

Los métodos para la medición del tamaño de partícula están basados en la dispersión de la luz, donde la detección de la luz dispersada se realiza en un ángulo de 90° con relación a la luz incidente. La dispersión de la luz puede ser medida en estado estacionario en un espectrofluorómetro, o de forma dinámica en un instrumento equipado con un láser. Este último método, también

conocido como dispersión cuasielástica de la luz o espectroscopía de correlación fotónica, analiza la intensidad de la luz dispersada en milisegundos a través de un análisis de autocorrelación. El movimiento browniano de las partículas induce un ensanchamiento del espectro lo que se relaciona con la forma y tamaño de las partículas. La dispersión dinámica de la luz es el método más empleado para estimar el radio hidrodinámico promedio de partículas en suspensión y su índice de polidispersidad desde un rango de nanómetros a micras [30, 31, 32].

Los liposomas se pueden clasificar de acuerdo a su tamaño y el número de bicapas que forman la pared del liposomas, como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 .Clasificación y nomenclatura de liposomas en función del tamaño y número de bicapas [33].

Abreviatura	Nombre completo/laminaridad	Tamaño
MLV	Vesículas multilaminares	> 0.5 μm
OLV	Vesículas oligolaminares	0.1-1 μm
UV	Vesículas unilaminares	Todos los rangos de tamaños
SUV	Vesículas unilaminares pequeñas	40-100 nm
LUV	Vesículas unilaminares grandes	> 400 nm
GUV	Vesículas unilaminares gigantes	> 1 μm
MVV	Vesículas multivesiculares	> 1 μm

b) Potencial zeta

La estabilidad física de una formulación liposomal se determina por su comportamiento coloidal y su capacidad para retener las moléculas encapsuladas por largos períodos de tiempo, bajo diferentes condiciones experimentales o de almacenamiento. Una suspensión de partículas coloidales es estable si la fuerza de repulsión electrostática entre las partículas es

superior a las atracciones de Van der Waals existentes entre ellas. La composición iónica del medio de dispersión puede disminuir las fuerzas de repulsión favoreciendo el acercamiento de las partículas provocando su precipitación o floculación [34].

El potencial zeta es una estimación de la carga de la partícula, que puede ser medido, por electroforesis, debido a la diferencia de potencial existente en un sistema de interfase sólido-líquido, es decir, la diferencia de potencial entre la doble capa de Stern y la capa difusa (Figura 5). El control de la fuerza iónica del medio puede modificar el valor de potencial zeta, incrementando o disminuyendo su valor si se agregan iones adecuados [35]. El potencial zeta es útil para monitorear la estabilidad de las suspensiones liposomales y para verificar la reproducibilidad de diferentes lotes de una misma formulación, tanto el tamaño de partícula como el potencial zeta son parámetros característicos de cada lote.

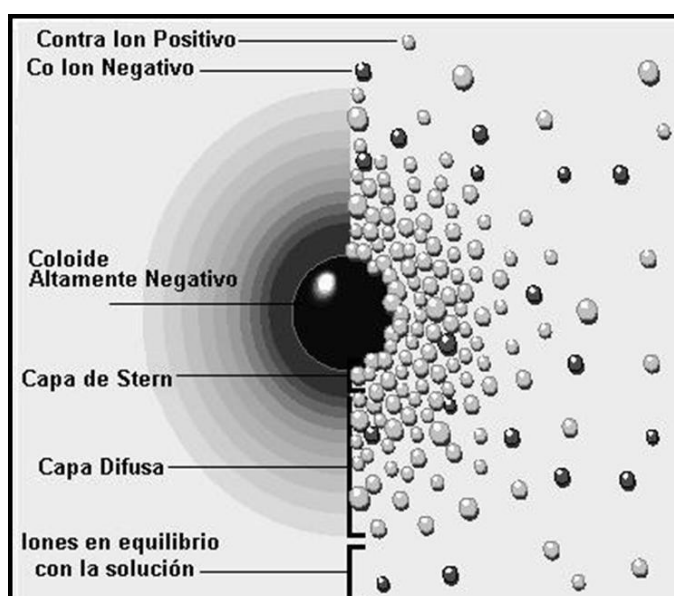


Figura 5. Distribución de cargas de un sistema coloidal de partículas negativas, donde se observa la capa de Stern y la capa difusa, la diferencia de potencial entre estas dos capas es el potencial zeta.

La relación entre la estabilidad física de la suspensión liposomal y el valor de potencial zeta se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Relación entre estabilidad del sistema coloidal y potencial zeta [46].

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

2.1.3 Pruebas de estabilidad

La estabilidad de una formulación es importante por tres razones: uniformidad, biodisponibilidad y apariencia. La estabilidad de los liposomas esta en función de su integridad y distribución de tamaño de las vesículas de lípidos. Los liposomas son susceptibles a la fusión, agregación y fugas del fármaco encapsulado durante el almacenamiento. Se puede evaluar por la estabilidad del fármaco encapsulado, así como por la estabilidad de los lípidos que componen la bicapa liposomal

a) Degradación de fosfolípidos

Los lípidos con ácidos grasos insaturados están sujetos a la degradación por oxidación, mientras que, tanto los lípidos saturados como insaturados están sujetos a hidrólisis para formar lisolípidos y ácidos grasos libres.

Los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) forman parte de los fosfolípidos, constituyentes de las bicapas lipídicas que componen las membranas, su degradación se denomina peroxidación lipídica y da como resultado la formación de 4-hidroxiálquenos (4HNE) y malondialdehído (MDA) como productos finales de reacción.

Esta peroxidación es un efecto importante ya que la destrucción de los PUFA de la membrana, junto con la formación de los puentes disulfuro de las cadenas proteicas y la ruptura de éstas, provoca el desmoronamiento de la estructura de la membrana que conduce a la pérdida de la permeabilidad y a la subsecuente ruptura.

La susceptibilidad de las membranas biológicas a la peroxidación depende del grado de insaturación y la posición de los doble enlaces en la membrana así como la presencia de iones hierro, ya que son estos los que catalizan las reacciones de oxidación y activan el oxígeno dando lugar a la formación de especies reactivas de oxígeno (EROS)

.

El proceso de peroxidación lipídica consta de una serie de reacciones en cadena que demuestra la capacidad de las EROS para producir reacciones dañinas [36].

El proceso de peroxidación se muestra en la figura 6.

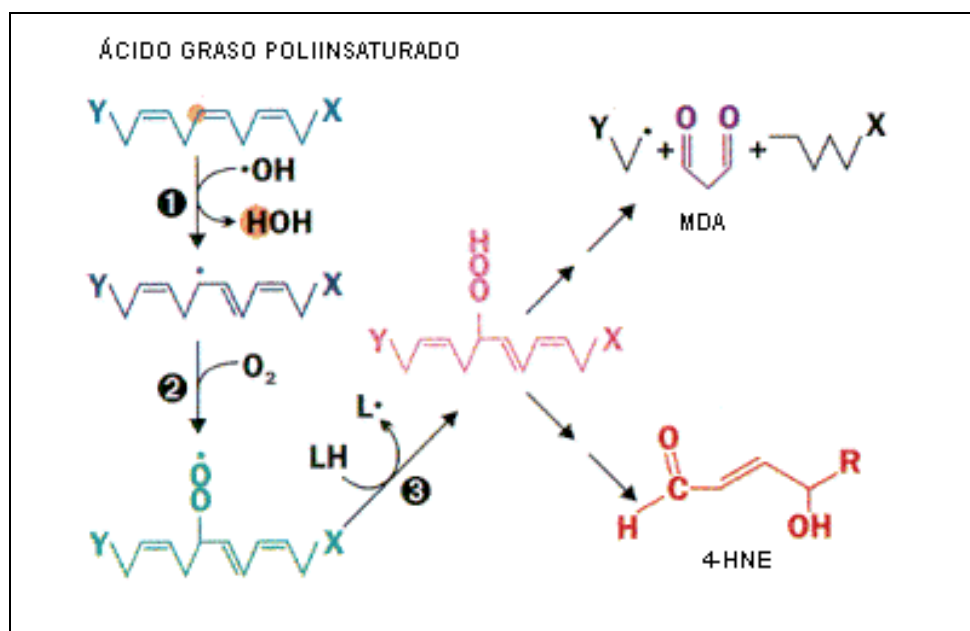


Figura 6. Oxidación de ácidos grasos poliinsaturados por EROS, donde MDA y 4HNE son los productos finales de la reacción.

Los productos finales de peroxidación lipídica pueden ser medidos por la formación de cromóforos estables [37].

b) Perfil de liberación *in vitro*

El mecanismo de liberación, coeficiente de difusión, velocidad de biodegradación y el medio biológico son factores que afectan la velocidad de liberación del principio activo [38]. El monitoreo de la cantidad de fármaco liberado a determinadas condiciones nos da información sobre la estabilidad de las formulaciones liposomales, ya que se requiere la retención del fármaco hasta su llegada al tejido de interés, y de esta manera garantizar que un porcentaje pequeño de fármaco queda libre para ser eliminado del organismo.

3. Justificación

Dada la naturaleza física y química de las suspensiones liposomales, no es posible aplicar únicamente las pruebas de control de calidad establecidas para las formas farmacéuticas convencionales existentes hasta ahora. Por lo tanto, es necesario establecer las especificaciones del producto farmacéutico para garantizar su seguridad y eficacia terapéutica. El diseño de pruebas fisicoquímicas para las formulaciones liposomales de doxorubicina comercial surge como una propuesta para el control de calidad mínimo que deben cumplir este tipo de sistemas de liberación y transporte de fármacos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Establecer pruebas de evaluación fisicoquímica de formulaciones liposomales de doxorubicina.

4.2 Objetivos específicos

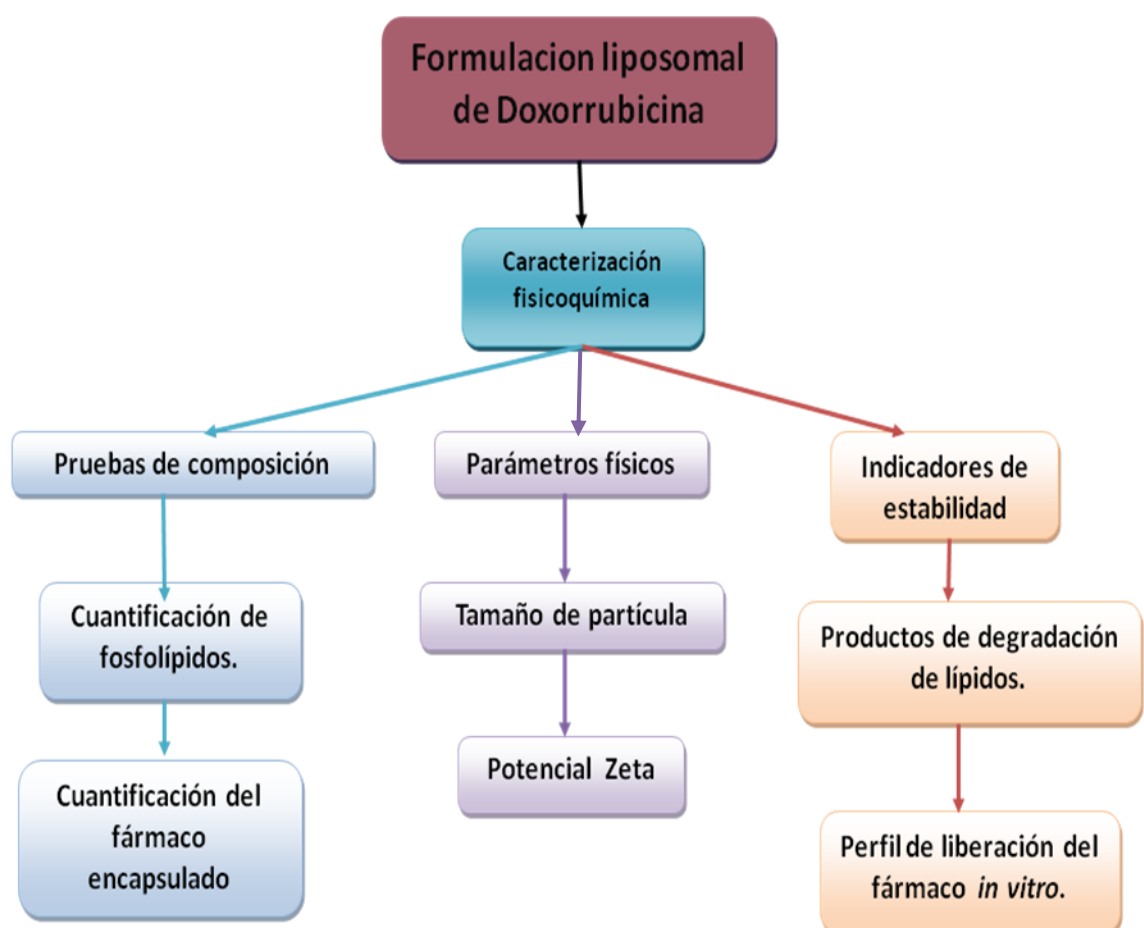
- Realizar la cuantificación de fosfolípidos de las formulaciones liposomales de doxorubicina.
- Determinar el tamaño de partícula y el potencial zeta.
- Cuantificar el principio activo encapsulado (Doxorrubicina).
- Determinar los productos de degradación de lípidos (malondialdehído y 4-hidroxinonenal).

- Establecer el perfil de liberación del fármaco *in vitro* de los nanosistemas.

5. Desarrollo experimental

El siguiente esquema muestra la metodología desarrollada en este trabajo de tesis, el cual se dividió en tres etapas:

Esquema general de trabajo



Las pruebas de evaluación fisicoquímica fueron realizadas en dos formulaciones liposomales de doxorubicina existentes en el mercado para establecer las pruebas mínimas de control de calidad que deben cumplir las formulaciones liposomales, y ser aplicadas a formulaciones en desarrollo por el propio laboratorio.

- **CAELYX[®]** en Europa y México y **DOXIL[®]** en Estados Unidos. .Clorhidrato de doxorubicina encapsulado en liposomas tipo STEALTH[®] para administración intravenosa. Distribuido por Shering –Plough. Lote 0823690.
- **DOXOPEG.** Liposomas de clorhidrato de doxorubicina para administración intravenosa. Distribuido por Asofarma. Lote 46309.

5.1 Pruebas de composición

5.1.1 Cuantificación de fosfolípidos.

La concentración de fosfolípidos se determinó por el método colorimétrico de Stewart, el cual permite medir concentraciones en un rango de 0.01 a 0.1 mg. Es un método basado en la formación de un complejo colorimétrico entre los fosfolípidos que forman los liposomas y el ferrotiocianato de amonio, complejo soluble en cloroformo. En este método la presencia de fosfatos inorgánicos del medio no interfiere con la cuantificación, pero la señal es dependiente de los grupos polares de los lípidos presentes, es útil para muestras de liposomas compuestos por fosfatidilcolina [31,41].

➤ Preparación de Ferrotiocianato de amonio (NH_4FeSCN).

Se disolvieron 27.03 g de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Sigma-Aldrich, Alemania) y 30.4 g de tiocianato de amonio (NH_4SCN) (Sigma-Aldrich, Alemania) en 1 L de agua desionizada. La disolución fue guardada en un frasco ámbar y es estable a temperatura ambiente [41].

➤ Preparación de la curva patrón.

Se preparó una solución stock A de 2 mg/mL de fosfatidilcolina de soya hidrogenada (HSPC) (Northern lipids, Canadá) en cloroformo (CHCl_3) (Hycel, México).

Se tomó una alícuota de 0.5 mL del Stock A para diluirla hasta 5 mL con cloroformo (1:10), solución stock B de 0.2 mg/mL de HSPC. De esta solución se tomaron los siguientes volúmenes para preparar la curva patrón en tubos Eppendorf de 2 mL (Tabla 5) para un volumen final de 750 μL .

Tabla 5. Curva patrón de HSPC para la cuantificación de fosfolípidos.

Volumen de Stock B 0.2 mg/mL (μL)	Volumen de CHCl_3 (μL)	Volumen de NH_4FeSCN (μL)	Concentración de HSPC (mg/mL)
0	750	750	0
75	675	750	0.02
150	600	750	0.04
225	525	750	0.06
300	450	750	0.08

Una vez agregado el ferrotiocianato de amonio, cada muestra fue agitada por 1 minuto para llevar a cabo la formación del complejo colorido soluble en

cloroformo; posteriormente se centrifugó a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C (Centrifuge 5702 R, Eppendorf USA).

La fase acuosa fue removida y se leyó la absorbancia de la fase clorofórmica a una longitud de onda de 488 nm en un espectrofotómetro (DU 530 Beckman Coulter, USA).

➤ Preparación de las muestras

Debido a que DOXO presenta una absorbancia a una longitud de onda de 480 nm, muy cercana a la longitud de onda empleada para la cuantificación de fosfolípidos, fue necesario remover el fármaco de la muestra antes de emplear el método de Stewart, para ello:

Se preparó una dilución 1:100 de las formulaciones liposomales de DOXO con respecto a la concentración teórica de aproximadamente 10 mg/mL de fosfolípidos, de esta dilución se depositaron 200 µL de cada muestra de DOXO liposomal en un tubo Eppendorf de 2 mL.

Se adicionaron 1000 µL de acetonitrilo (J.T. Baker) a cada tubo, se agitaron durante 3 minutos en vortex para inducir la ruptura de los nanosistemas y la salida del fármaco encapsulado.

Las muestras se centrifugaron a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C (Zentrifugen Mikro 22R Hettich, USA) para provocar la separación del fármaco y los fosfolípidos; se retiró todo el sobrenadante teniendo cuidado de no tocar las paredes del tubo, dado que la muestra queda adherida a las paredes. Una vez retirado el sobrenadante, el residuo que contiene aproximadamente 0.02 mg de fosfolípidos, se redisuelve con 750 µL de cloroformo (Hycel, México) y se agita por 2 minutos en vortex. Se adicionaron 750 µL de ferrotiocianato de

amonio, se agitaron a 3000 rpm por 1 minuto para llevar a cabo la reacción entre los fosfolípidos de la muestra y el ferrotiocianato de amonio, y se centrifugaron a 3000 rpm por 3 minutos a 4°C (Centrifuge 5702 R, Eppendorf USA) para separar la fase acuosa que contiene el ferrotiocianato sin reaccionar y la fase clorofórmica con el complejo formado.

Terminado el tiempo de centrifugado, se desechó la fase acuosa, se depositaron aproximadamente 700 µL de fase clorofórmica en una celda de cuarzo de 1 cm³ y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 488 nm en un espectrofotómetro (DU 530 Beckman Coulter, USA) empleando como blanco cloroformo. La concentración de fosfolípidos que componen las formulaciones liposomales de DOXO se calculó con la ecuación obtenida de la curva patrón.

5.1.2 Cuantificación de DOXO encapsulada.

La cuantificación de DOXO se realizó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) en un equipo WATERS-ALLIANCE 2695 acoplado a un detector de Fluorescencia WATERS 2475.

➤ Preparación de la curva patrón de DOXO

La solución Stock A de DOXO fue preparada por la reconstitución con agua inyectable del polvo liofilizado (Doxotec[®] Laboratorios Columbia, México) a una concentración final de 2000 µg/mL, polvo empleado como materia prima. A partir de esta solución, se preparó una solución Stock B de 100 µg/mL de

DOXO en agua inyectable, de esta se prepararon 2 mL de cada estándar tomando los siguientes volúmenes (Tabla 6).

Tabla 6. Curva patrón para la cuantificación de DOXO por HPLC.

Volumen de Stock de 100 µg/mL (µL)	Volumen de agua (µL)	Concentración de DOXO (µg/mL)
0	2000	0
50	1950	2.5
100	1900	5
200	1800	10
400	1600	20

Para preparar cada estándar de la curva (por triplicado) se tomaron 20 µL del estándar (cada una de las cuatro soluciones antes mencionadas) y 180 µL de liposomas blanco para un volumen final de 200 µL: concentración final 0, 0.25, 1.0 y 2.0 µg/mL. Los 180 µL de liposomas blanco fueron liposomas preparados sin estar cargados con algún fármaco, se adicionaron 20 µL del estándar interno Daunorrubicina (DAUNO) de concentración 10 µg/mL. Para la extracción del principio activo se agregaron 200 µL de acetonitrilo (Alfa Aesar, USA). La mezcla se agitó (vortex) por 3 min a 3000 rpm para inducir la ruptura de los liposomas y la salida del fármaco, los tubos se centrifugaron por 10 min a 15000 rpm a 4°C (Mikro 22R Hettich Zentrifugen) para separar los fosfolípidos y la DOXO disuelta en el sobrenadante.

Se inyectó en el equipo de HPLC el sobrenadante de acuerdo a las condiciones que se mencionan:

Condiciones para la Cuantificación de DOXO por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).

Columna:	μBondaPack C-18, 3.9 x 150 mm
Fase móvil:	55 % Formiato de amonio pH 3 45 % Acetonitrilo
Flujo:	2.0 mL/min
Presión:	1500-1600
Temperatura:	20 °C
Tiempo de corrida:	3 min
Tiempo de retención para DOXO	1.0 min
Tiempo de retención para DAUNO	1.3 min
Detector de Fluorescencia	Xλ= 480 nm Eλ= 580 nm

➤ Extracción del fármaco encapsulado.

Para la cuantificación de DOXO encapsulada es necesario extraer el fármaco del liposoma para la cual se realizó la dilución 1:1000 de cada suspensión liposomal de 2 mg/mL con agua inyectable, se tomaron 200 μL de la dilución de 0.002 mg/mL y se colocó en un tubo Eppendorf de 0.5 mL. Se adicionaron 20 μL del estándar interno Daunorrubicina (DAUNO) de concentración 10 μg/mL y se agregaron 200 μL de acetonitrilo (Alfa Aesar, USA), para provocar la ruptura de los liposomas y la salida de fármaco. La mezcla se homogenizó con ayuda de un vortex a 3000 rpm por un periodo de 3 min, la muestra se centrifugó a 15000 rpm, 4°C por un 10 min (Mikro 22R Hettich Zentrifugen), quedando los fosfolípidos precipitados y la DOXO disuelta en acetonitrilo. Se inyectó en el equipo de HPLC el sobrenadante y la

concentración de fármaco de las formulaciones liposomales se calculó con la ecuación obtenida de la curva patrón.

➤ Preparación de formiato de amonio pH 3 (Fase móvil)

En 1 L de agua desionizada se adicionó 1 mL de solución amoniacal al 25 % y se agregó ácido fórmico (Mallinckrodt, USA) para llevar a cabo la formación del formiato de amonio. Se midió el pH y se ajustó a 3, la solución permaneció en agitación continua por 15 minutos. Pasado el tiempo se mide de nuevo el pH y se ajusta de ser necesario.

La solución de formiato de amonio se filtra en un sistema Millipore de tamaño de poro 0.45 μm .

5.2 Parámetros físicos.

5.2.1 Tamaño de partícula

El tamaño de partícula se midió en un equipo 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments, USA) utilizando como medio de suspensión cloruro de potasio 10 mM.

➤ Preparación de cloruro de potasio (KCl) 10 mM

Se pesaron 0.1864 g de cloruro de potasio (Sigma-Aldrich, Alemania) y se disolvieron en 250 mL de agua desionizada, agitando continuamente por 15 minutos y luego se filtró en un sistema *Corning* CA (Cellulose Acetate) de acetato de Celulosa con tamaño de poro de 0.22 μm .

➤ Preparación del estándar de microesferas.

Se depositaron 2 mL de solución de KCl 10 mM, previamente filtrada a través de un filtro de 0.025 μm (Millipore, Irlanda), en una celda de plástico y se depositaron 5 μL del estándar de microesferas (Duke Scientific, USA) la suspensión se agitó suavemente varias veces y se leyó en el equipo Particle Size Analyzer (90 PLUS/BI-MAS) por duplicado. Valor del estándar 92 ± 3.7 nm.

➤ Preparación de la muestra.

Se depositaron 2 mL de solución de KCl 10 mM, previamente filtrada a través de un filtro de 0.02 μm (Millipore, USA), en una celda de plástico y se depositaron 5 μL de la muestra, la suspensión, se agitó suavemente varias veces y se leyó en el equipo Particle Size Analyzer (90 PLUS/BI-MAS) por triplicado. Para la lectura se emplearon los siguientes parámetros:

Temperatura=25°C

Viscosidad=0.890 cP

Índice de refracción= 1.330

Ángulo=90°

λ =657.0 nm.

5.2.2 Potencial zeta

El potencial zeta se midió en el equipo 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments, USA), utilizando como medio de suspensión cloruro de potasio 1 mM.

➤ Preparación de cloruro de potasio (KCl) 1mM.

De la solución de KCl 10 mM preparada para la medición del tamaño de partícula se tomó una alícuota para la dilución (1:10) y se filtró por un sistema *Corning* CA (Cellulose Acetate) de acetato de Celulosa con tamaño de poro de 0.22 μm .

➤ Preparación del estándar BIZR3

Se deposita una cantidad pequeña del polvo BIZR3 (Brookhaven Instruments, USA), en un tubo para centrifuga de 50 mL y se disuelve en KCl 1 mM hasta observar una coloración tenue. El estándar BIZR3 fue empleado para verificar la función correcta del instrumento.

De esta disolución se colocan 1700 μL en una celda de plástico y se insertan los electrodos, previamente lavados con KCl 1 mM, teniendo cuidado de no formar burbujas de aire. Una vez colocados los electrodos se conecta la celda al equipo 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments, USA) y se hace la medición a 25 °C, pH=7.40, una concentración de 1mg/mL, un valor de la constante dieléctrica de 78.54 y un tamaño de partícula de 300 nm. Valor del estándar de referencia -53 ± 4 mV.

➤ Preparación de la muestra

Se colocan 1700 μL de KCl 1 mM en una celda de plástico y se agregan 5 μL de muestra, se agita la suspensión suavemente, se insertan los electrodos, previamente lavados con KCl 1 mM, teniendo cuidado de no formar burbujas de aire. Una vez colocados los electrodos se conecta la celda al equipo 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments, USA) y se hace la medición a 25 °C,

pH de 7.40, una concentración de 1mg/mL, un valor de la constante dieléctrica de 78.54 y un tamaño de partícula medido previamente.

5.3 Pruebas de estabilidad

5.3.1 Productos de degradación de fosfolípidos.

Para la cuantificación de los productos de degradación de fosfolípidos se empleó un método para determinar Malondialdehído (MDA) y 4-Hidroxinonenal (4HNE) basado en la reacción de 1-metil-2-fenilindol (1M2F) con malondialdehído y 4-hidroxinonenales en condiciones ácidas y calor [42,43].

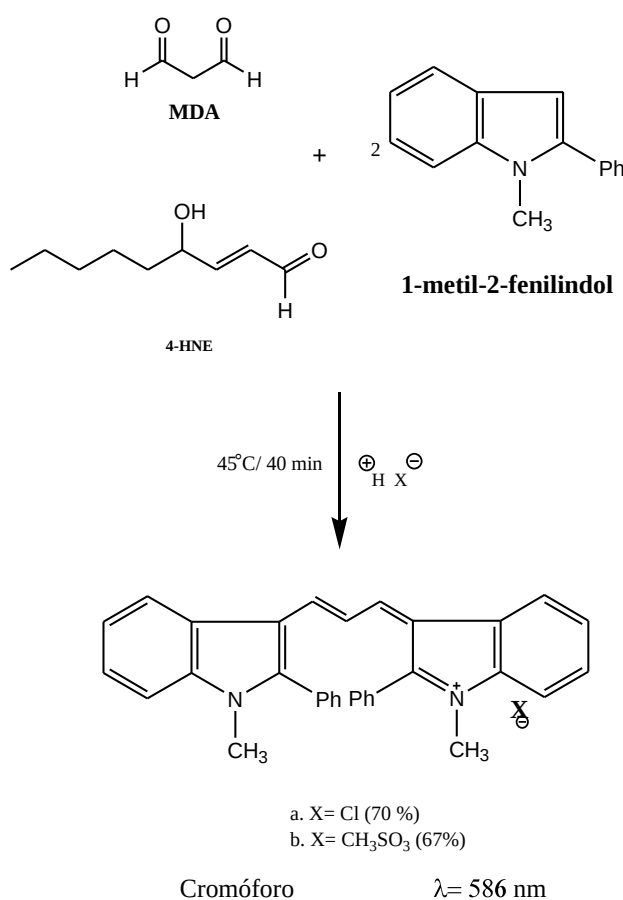


Figura 7. Reacción colorimétrica del MDA y 4-HNE con 1-metil-2-fenilindol.

Tomado y adaptado de Erdelmeier I., et al. *Chem. Res. Toxicol.* 1998.

La preparación de reactivos se realizó en mismo día de la cuantificación:

➤ Preparación del reactivo 1-metil-2-fenilindol (1M2F) 15.4 mM

Se pesaron 0.0798 g de 1-metil-2-fenilindol (1M2F) (Sigma Aldrich, Alemania) y se disolvieron en 20 mL de la mezcla acetonitrilo: metanol (3:1), para preparar la mezcla se agregaron 18.75 mL de acetonitrilo (J.T. Baker) y 6.25 mL de metanol absoluto (Fermont, USA).

➤ Preparación de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4

Se pesaron 0.3402 g de fosfato de potasio (K_2HPO_4) (Sigma-Aldrich, Alemania) y 0.3549 g de fosfato de sodio (Na_2HPO_4) (Sigma- Aldrich, Alemania) y se disolvieron en 100 mL de agua desionizada. Para el ajuste de pH se empleó ácido clorhídrico 10 N (HCl).

➤ Preparación de los estándares de tetrametoxipropano (TMPO)

En un tubo Eppendorf de 1.5 mL se tomaron 10 μ L de de tetrametoxipropano (TMPO) (MM 164.2, densidad 0.997 g/mL) (Sigma Aldrich, Alemania) y se agregaron 812 μ L de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4 para la preparación de la solución Stock A de TMPO, se mezcló en vortex y se guardó a 4°C en frasco ámbar. Concentración del Stock A de 73.86 mM.

Para la preparación de la solución Stock B de TMPO se tomaron 10 μ L del Stock A de TMPO y se agregaron 9.9 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, se mezcló en vortex y se guardó a 4°C en frasco ámbar. Concentración del Stock B de 73.86 μ M.

De esta solución se preparó 1 mL de cada estándar tomando los siguientes volúmenes para la curva patrón (Tabla 7).

Tabla 7. Curva patrón de TMPO.

TMPO (μM)	nmoles TMPO/0.2 mL	nmoles TMPO/mL	Volumen Stock B 73.86 μM (μL)	Volumen A. de fosfatos 50 mM pH 7.4
0.00	0.00	0.00	0	1000
0.74	0.15	0.74	10	990
1.48	0.30	1.48	20	980
2.95	0.59	2.95	40	960
5.91	1.18	5.91	80	920
11.82	2.36	11.82	160	840
23.64	4.73	23.64	320	680

Se usaron 0.2 mL de cada estándar para la curva en cada ensayo de MDA y 4HNE.

5.3.1.1 Determinación de MDA

Cuando se usa ácido clorhídrico (HCl) (J.T. Baker) para proporcionar las condiciones ácidas de la reacción se tiene una formación selectiva de MDA.

En tubos Eppendorf de 1.5 ml se mezclaron los reactivos mostrados en la tabla (8):

Tabla 8. Reactivos para la determinación de MDA.

	Blanco	Tubo estándares	Tubo muestra	Blanco de muestra
A. fosfatos 50 mM pH 7.4	0.2 mL	--	--	--
Estándares de MDA	--	0.2 mL **	--	--
* Muestra (1 mg de fosfolípidos)	--	--	0.2 mL	0.2 mL
Sol. de 1M2F (en acetonitrilo:metanol)	0.65 mL	0.65 mL	0.65 mL	--
HCl concentrado	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL
Sol. acetonitrilo:metanol (3:1)	--	--	--	0.65 mL

* Para las muestras se tomó el volumen equivalente a 1 mg de fosfolípidos + volumen de A. fosfatos 50 mM pH 7.4 necesario para un volumen final de 0.2 mL. Por tanto es necesario conocer la concentración de fosfolípidos de la muestra.

** 0.2 mL de cada una de las diluciones de la tabla 7.

Una vez preparadas las muestras y los estándares, estos se incubaron a 45°C durante 40 min, y se centrifugaron a 3,000 g por 5 min a 4°C (Mikro 22R Hettich Zentrifugen).

Se leyó la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 586 nm en un espectrofotómetro (DU 530 Beckman Coulter, USA). La concentración de MDA presente en las formulaciones liposomales se calculó con la ecuación obtenida de la curva patrón.

5.3.1.2 Determinación de 4-HNE

- Preparación de ácido metanesulfónico ($\text{CH}_3\text{SO}_3\text{H}$) 15.077 M (J.T.

Baker):

El ácido metanesulfónico concentrado se mezcla en solución de cloruro férrico (FeCl_3) (Sigma Aldrich, Alemania) 34 μM , para 30 tubos se mezclan 4.83 mL de ácido metanesulfónico concentrado con 0.17 mL de FeCl_3 1 mM.

- Preparación de cloruro férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 1 mM

Se disolvieron 1.62 mg de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en 10 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.4, se agitó y se burbujeo con nitrógeno para evitar la oxidación del FeCl_3 .

En tubos Eppendorf de 1.5 mL se mezclaron los reactivos mostrados en la tabla (9):

Tabla 9. Reactivos para la determinación de 4-HNE

	Blanco	Tubo estándar	Tubo muestra	Blanco de muestra
A. fosfato 50 mM pH 7.4	0.2 mL	--	--	--
Estándares	--	0.2 mL**	--	--
* Muestra (1 mg de fosfolípidos)	--	--	0.2 mL	0.2 mL
Sol. de 1M2F:metanol (3:1)	0.65 mL	0.65 mL	0.65 mL	--
Ácido metanesulfónico con Fe (III)	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL	0.15 mL
Sol. acetonitrilo:metanol (3:1)	--	--	--	0.65 mL

* Para las muestras se tomó el volumen equivalente a 1 mg de fosfolípidos + volumen de A. fosfatos 50 mM pH 7.4 necesario para un volumen final de 0.2 mL. Por tanto es necesario conocer la concentración de fosfolípidos de la muestra.

** 0.2 mL de cada una de las diluciones de la tabla 7.

Una vez preparados los tubos con las muestras y los estándares se incubaron a 45°C durante 40 min y se centrifugaron a 3,000 g por 5 min a 4°C (Mikro 22R Hettich Zentrifugen).

Se leyó la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 586 nm en un espectrofotómetro (DU 530 Beckman Coulter, USA). La concentración de 4-HNE presente en la suspensión liposomal se calculó con la ecuación obtenida de la curva patrón.

5.3.2 Prueba de liberación del principio activo *in vitro*.

Para la prueba se emplearon las celdas de difusión verticales tipo Franz (PermeGear, USA) el esquema general es el siguiente:

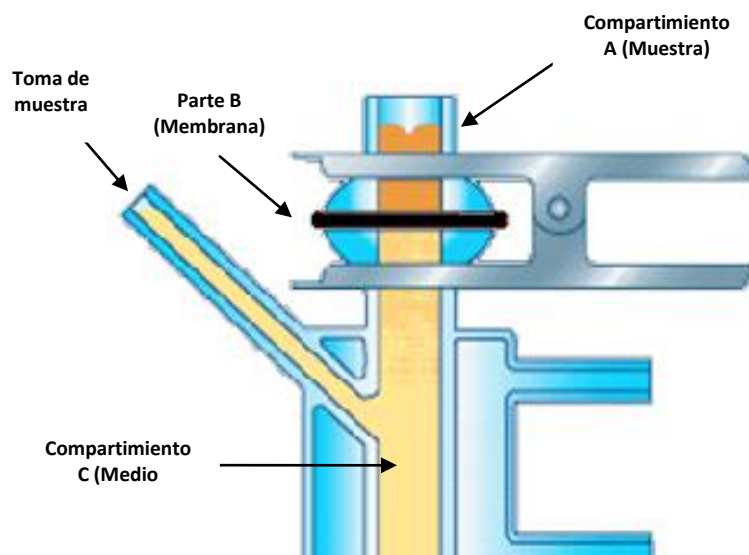


Figura 8. Celdas de difusión vertical tipo Franz.

Para armar las celdas de difusión de tipo Franz se toma una membrana de policarbonato de tamaño de poro de 0.05 μm (Millipore, Irlanda) y se coloca encima de compartimiento C (medio receptor), una vez puesta la membrana

se coloca la parte A (compartimiento de la muestra) y se fija el dispositivo con las pinzas.

Se procede a llenar con medio receptor el compartimiento C hasta la marca de aforo, cuyo volumen es de 5 mL, cuidando de no formar burbujas. En el compartimiento A se coloca 1 mL de muestra (formulación liposomal o fármaco libre) y se inicia el conteo de tiempo (T_0) para la posterior toma de muestra.

Una vez que se tiene armado el dispositivo se coloca en el sistema de agitación (PermeaGear, USA) conectado a un baño recirculador (Thermo Circulator Labtech, USA) a temperatura ambiente para el perfil de liberación en PBS.

➤ Preparación de las muestras liposomales de DOXO

Se preparó un volumen final de 1 mL tomando 100 μ L de suspensión liposomal de DOXO de concentración de 2 mg/mL, o 100 μ L de DOXO no encapsulada de concentración inicial de 2 mg/mL, y agregando 900 μ L de medio receptor (solución de PBS); se agita suavemente y se coloca en el compartimiento A, la concentración inicial de cada formulación liposomal de DOXO es de 200 μ g/mL.

➤ Preparación de medio receptor

Solución de PBS Sacarosa 300 mM pH 6.3.

Se disuelven 3 tabletas de PBS (Sigma- Aldrich, Alemania) en 600 mL de agua desionizada y se agregan 61.98 g de sacarosa (Sigma-Aldrich, Alemania), el pH se ajusta a 6.3 con HCl 10 N, la solución se agita constantemente por 15 min, y se esteriliza en autoclave.

➤ Toma de muestra

Se retira todo el medio receptor del compartimiento C a los tiempos establecidos para la toma de muestra (aproximadamente 5 mL), una vez retirado el líquido se vuelve a llenar la celda con 5 mL de medio receptor (solución de PBS) hasta la marca de aforo y se muestrea hasta el tiempo siguiente. Se mide el volumen de medio receptor retirado en cada tiempo.

Tiempos de muestreo: 1, 2, 4, 8, 16, 24 y 48 horas para cada formulación liposomal y DOXO libre.

Temperatura: Temperatura ambiente para perfil de liberación en PBS.

➤ Cuantificación de DOXO liberada.

Recolectadas las muestras de cada tiempo, se procede a cuantificarlas por HPLC por el método descrito para la cuantificación de DOXO encapsulada, tomando 200 µL del volumen total de 5 mL de cada muestra y agregando 20 µL de estándar interno (DAUNO), se agitan para mezclar y se toman 50 µL para la inyección en el equipo de HPLC (Waters Alliance 2695) a las condiciones de la cuantificación de DOXO (pág. 28)

La curva patrón fue preparada por duplicado tomando 20 µL de cada estándar (0, 2.5, 5, 10 y 20 µg/mL), se agregaron 180 µL de solución de PBS pH 6.3, medio receptor utilizado, y 20 µL de estándar interno (DAUNO), concentración final 0, 0.25, 1 y 2 µg/mL de DOXO.

Con la concentración de DOXO de cada tiempo muestreado se procede a graficar el porcentaje de fármaco liberado en función del tiempo para las dos formulaciones liposomales de DOXO.

➤ Cuantificación de DOXO no liberada.

Para preparar cada estándar de la curva (por duplicado) se tomaron 20 μ L de cada estándar (0, 2.5, 5, 10 y 20 μ g/mL), se agregaron 80 μ L de liposomas blanco, es decir, liposomas preparados sin estar cargados con fármaco alguno, se adicionaron 20 μ L del estándar interno (DAUNO) y 100 μ L de PBS. Se usaron 200 μ L de acetonitrilo (J.T Baker) para la extracción del principio activo, la mezcla se agitó por 3 min a 3000 rpm, los tubos se centrifugaron por 10 min a 15000 rpm a 4°C (Mikro 22R Hettich Zentrifugen).

Se tomaron 50 μ L para ser inyectados en el equipo de HPLC (Waters Alliance 2695) a las condiciones mencionadas en la cuantificación de DOXO encapsulada.

5.4 Análisis estadístico

Los valores se han reportado como el promedio $\pm$ la desviación estándar. Se empleo un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para comparar la diferencia entre las medias de los resultados usando el software SPSS Base 14.0 (SPSS, Inc. Chicago, IL). Se acepta que existe diferencia entre las medias estadísticamente significativa si $p < 0.05$.

6. Resultados y discusión

A continuación se muestran los resultados obtenidos para las pruebas de composición, parámetros físicos y pruebas de estabilidad:

6.1 Pruebas de composición

6.1.1 Fosfolípidos

Las pruebas de composición permiten evaluar cambios significativos que pueden afectar directamente la farmacología, toxicidad y calidad de la formulación. El estudio consistió en determinar la concentración de fosfolípidos, componente mayoritario de liposomas, y la cantidad de fármaco encapsulado dentro de los nanosistemas (DOXO).

En la Figura 9 se muestra la concentración de fosfolípidos equivalentes a fosfatidilcolina hidrogenada de soya (HSPC) para las dos formulaciones liposomales de DOXO.

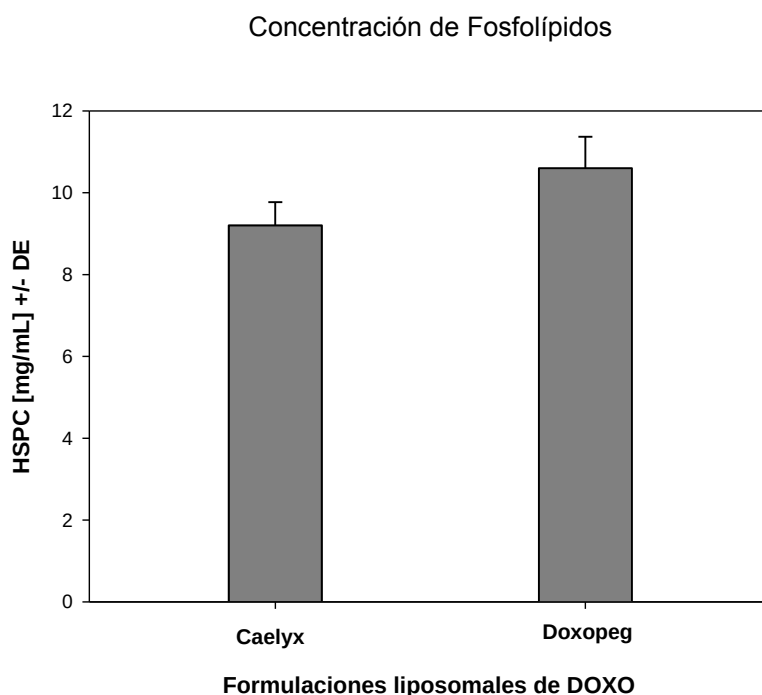


Figura 9. Concentración de fosfolípidos equivalentes a HSPC promedio de $n=3$ donde Caelyx tiene 9.2 ± 0.57 y Doxopeg 10.6 ± 0.77 mg/mL, el valor representa el promedio $\pm$ la desviación estándar.

El análisis ANOVA no mostro diferencia estadística en las concentraciones de fosfolípidos medidas en ambas formulaciones, se sabe que la concentración de fosfolípidos afecta directamente el tiempo de circulación de los liposomas en el torrente sanguíneo, y por tanto la farmacocinética de la formulación. El incremento en la concentración de fosfolípidos aumenta la estabilidad en plasma de la formulación [39], de tal manera que se esperaría que ambas formulaciones presentaran estabilidad similar en plasma.

Se ha reportado una concentración de fosfolípidos de 9.58 mg/mL para Caelyx [45], valor que corresponde a la concentración de HSPC determinada por nosotros.

6.1.2 Cuantificación de fármaco encapsulado.

La Tabla 10 muestra los resultados de cuantificación de DOXO encapsulada en liposomas, medidas por HPLC.

Tabla 10. Concentraciones de fármaco encapsulado en liposomas tipo Stealth,

Formulaciones liposomales de Doxo.	Doxo (mg/mL)	% Doxo* encapsulada
Caelyx	2.0 ± 0.04	100 ± 2.1
Doxopeg	2.1 ± 0.10	105 ± 5.2

El valor representa el promedio de $n=6 \pm$ la desviación estándar.

* El porcentaje de encapsulación fue calculado con respecto a la concentración registrada de 2.0 mg/mL de clorhidrato de Doxorubicina.

La concentración de fármaco encapsulado en liposomas no mostró diferencia estadística entre las dos formulaciones y el valor medido cae dentro del rango esperado de 2.0 mg/mL de clorhidrato de DOXO.

Con respecto al porcentaje de fármaco encapsulado, en la monografía oficial de clorhidrato de DOXO inyectable se establece un rango de aceptación de no menos del 90 % y no más del 115 % de la cantidad declarada de clorhidrato de DOXO [12]. Ambas formulaciones presentan un porcentaje de DOXO encapsulada de 100 y 105 %, para Caelyx y Doxopeg respectivamente, valores que caen dentro del intervalo establecido para DOXO inyectable, lo que demuestra la aceptación del lote evaluado.

6.2 Parámetros físicos

Los parámetros físicos evaluados fueron el tamaño de partícula de la suspensión liposomal y el potencial zeta, características específicas de cada lote fabricado.

6.2.1 Tamaño de partícula

En la Tabla 11 se muestran los valores de tamaño de partícula de la suspensión estándar de microesferas y de las formulaciones liposomales medidas en equipo 90 PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments, USA).

Tabla 11. Tamaño de partícula de formulaciones liposomales medidas por dispersión dinámica de luz.

Muestra	Diámetro efectivo (nm)	Índice de polidispersión	Tipo de distribución poblacional
Estándar *	92.3 ± 0.44 (n=4)	0.042 ± 0.013 (n=4)	Monomodal
Caelyx	79.4 ± 1.16 (n=6)	0.098 ± 0.021 (n=6)	Bimodal
Doxopeg	80.4 ± 1.74 (n=6)	0.123 ± 0.020 (n=6)	Bimodal

El Valor representa el promedio de n=6 mas la desviación estándar para Caelyx y Doxopeg

* Valor del estándar de microesferas **92 ± 3.7 nm** en solución de KCl 10 mM.

En el caso del tamaño de partícula, los valores medidos no muestran diferencia estadística entre ellos pero están por debajo del rango óptimo (100 nm) que asegura una acumulación del fármaco en tejido tumoral [5, 28]. Aun así, el tamaño de ambas formulaciones garantiza un tiempo de circulación sanguínea favorable, la barrera estérica e hidrofílica proporcionada por el PEG y el tamaño de partícula menor al esperado, ayudan a la evasión del sistema

fagocítico mononuclear, dándose la acumulación en sitios que presentan cambios de vascularidad y permeabilidad, como las masas tumorales por un tiempo de circulación sanguínea más largo.

En la Figura 10 se ejemplifica la distribución de partículas monomodal para el estándar de microesferas; la Figura 11 y 12 representan la distribución bimodal para ambas formulaciones.

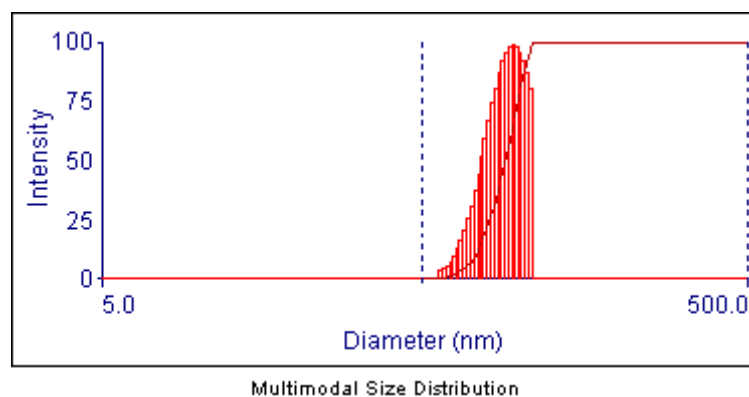


Figura 10. Distribución de partículas monomodal del estándar de microesferas.

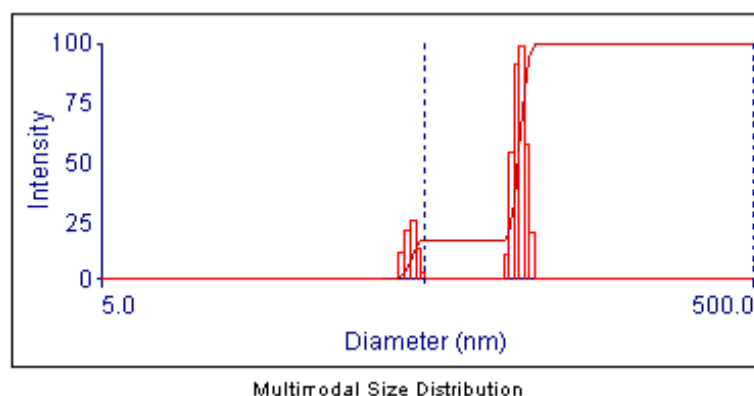


Figura 11. Distribución de partículas bimodal de Caelyx.

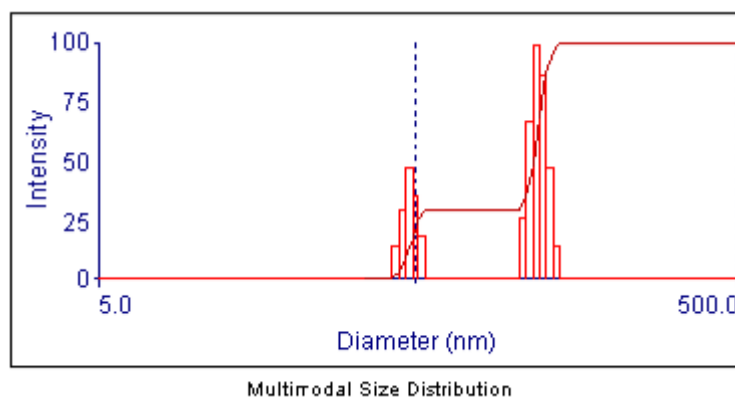


Figura 12. Distribución de partículas bimodal de Doxopeg.

Para la distribución bimodal se observan dos poblaciones de tamaños diferentes, la mayoría de las partículas concentradas en la población de mayor tamaño. Se puede concluir que la distribución de tamaños es homogénea por que solo existen dos poblaciones, aunque este hecho se puede comprobar con los valores de polidispersidad. Además los valores encontrados demuestran que se tienen liposomas unilaminares.

En la misma Tabla 11 se muestran los valores de polidispersidad que representan la homogeneidad de los tamaños de partícula, un valor cercano a 0 representa una distribución de tamaños de partícula homogénea, mientras que, si el valor de polidispersidad tiende a 1 la distribución de tamaños es heterogénea.

Los valores de ambas formulaciones se acercan a 0 de modo que la distribución de tamaños es homogénea, garantizando que la mayoría de partículas se encuentran alrededor del tamaño medido de 79.4 y 80.4 nm para Caelyx y Doxopeg respectivamente.

6.2.2 Potencial zeta.

La Tabla 12 representa los resultados del potencial zeta para las formulaciones liposomales.

Tabla 12. Potencial Zeta de las suspensiones liposomales de DOXO.

Muestra	Potencial Z (mV)	Estabilidad
Estándar BIZR3 *	-52.59 ± 1.25 (n=3)	Buena
Caelyx	-39.21 ± 1.15 (n=3)	Moderada
Doxopeg	-37.09 ± 3.25 (n=3)	Moderada

*Valor de estándar BIZR3 -53 ± 4 mV en solución de KCl 1 mM.

El potencial zeta es un indicador de estabilidad física de las suspensiones coloidales, de acuerdo con la tabla 4 (pag.18) mostrada en la introducción, los valores medidos en ambas formulaciones indican una estabilidad moderada, sin diferencia estadística entre ellas.

Una fuerza de repulsión electrostática mayor que las fuerzas de Van der Waals de las partículas hace que la suspensión sea estable durante el almacenamiento, de tal manera que la composición del medio es fundamental para mantener la fuerza iónica adecuada, siendo el sulfato de amonio e histidina los componentes que proveen esta propiedad en la formulación.

6.3 Pruebas de estabilidad

En las pruebas de estabilidad de los nanosistemas liposomales se cuantificaron los productos de degradación de fosfolípidos (MDA y 4HNE) y se establecieron los perfiles de liberación del fármaco *in vitro*.

6.3.1 Determinación de MDA y 4HNE

La Figura 13 muestra las concentraciones obtenidas para las suspensiones liposomales, donde se empleó el fármaco sin encapsular como control negativo (DOXO).

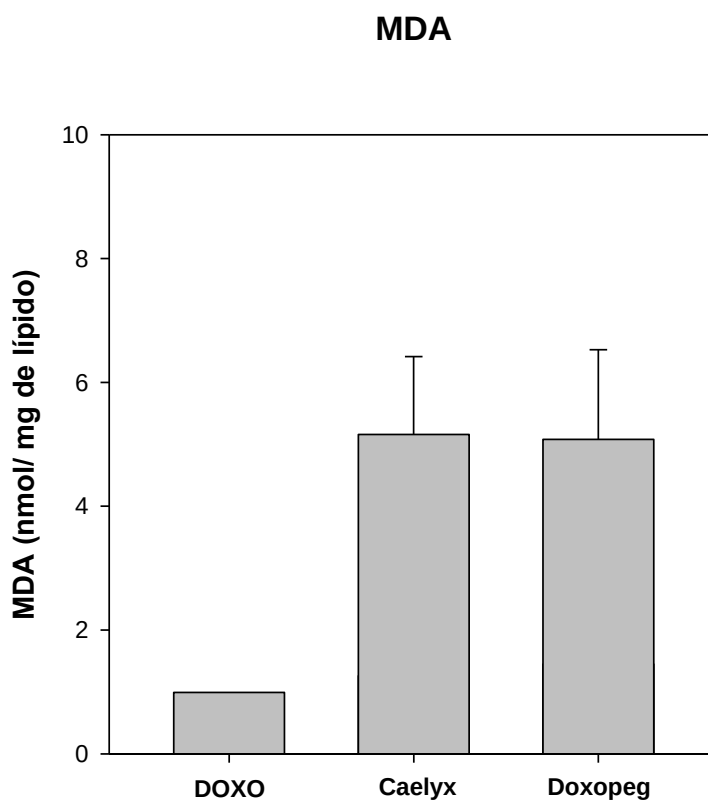


Figura 13. Concentración de MDA para las formulaciones liposomales de DOXO, los valores obtenidos fueron el promedio $\pm$ la desviación estándar de $n=3$: 5.2 ± 1.26 ; y 5.1 ± 1.45 nmol/mg de lípido para Caelyx y Doxopeg respectivamente. La concentración de MDA para DOXO no encapsulada fue de 1.0 nmol/mL.

Los valores medidos de MDA entre Caelyx y Doxopeg no mostraron diferencia estadística, estos valores representan uno de los productos finales de la peroxidación lipídica, mostrando valores mayores con respecto al control negativo (DOXO). Teniendo en cuenta que los fosfolípidos de ambas formulación presenta una degradación mínima por reacciones de oxidación, es posible el uso seguro del medicamento. Se garantiza que la concentración de MDA encontrada no afecta la permeabilidad de la membrana por lo que el fármaco permanecerá retenido dentro del liposoma.

El bajo grado de peroxidación se debe a la estructura propia de HSPC, solo posee una cadena insaturada, lo que la hace menos susceptible a la degradación por especies en la formulación que puedan oxidarla, además la incorporación de agentes oxidantes como el alfa tocoferol, previenen la degradación química de los liposomas.

Esta es una razón por la cual la mayoría de liposomas están constituidos de fosfatidilcolina y sus derivados.

La Figura 14 muestra las concentraciones de 4-HNE obtenidas para las suspensiones liposomales, donde se empleo el fármaco sin encapsular como control negativo.

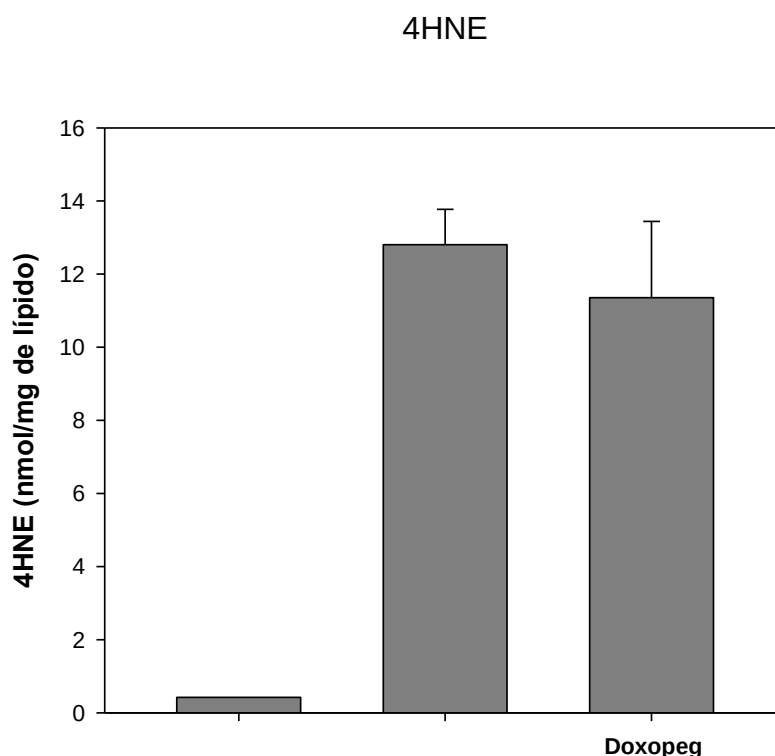


Figura 14. Concentración de 4-HNE para las formulaciones liposomales de DOXO, los valores obtenidos fueron el promedio $\pm$ desviación estándar de $n=3$: 12.8 ± 0.97 y 11.4 ± 2.08 nmol/mg de lípido para Caelyx y Doxopeg respectivamente. La concentración de 4HNE para DOXO no encapsulada fue de 0.4 nmol/mL.

Tanto el MDA como el 4-HNE representan los productos de degradación de fosfolípidos, los cuales son susceptibles a reacciones de oxidación e hidrólisis, dando como resultado la pérdida de la permeabilidad de la bicapa lipídica, seguida de una fuga del principio activo.

El nivel de peroxidación encontrado en ambas formulaciones es mayor comparado con el control negativo, debido a la oxidación de los fosfolípidos que componen la membrana y no a la oxidación del fármaco. En cuanto a la concentración de 4-HNE encontrada no se observó diferencia estadística en ambas formulaciones, entonces los fosfolípidos que componen los liposomas de las dos formulaciones comerciales presentan una degradación química

mínima, de tal manera que se garantiza un uso seguro de la formulación liposomal.

6.3.2 Perfil de liberación de DOXO *in vitro*.

Perfil de liberación de DOXO liposomal en PBS

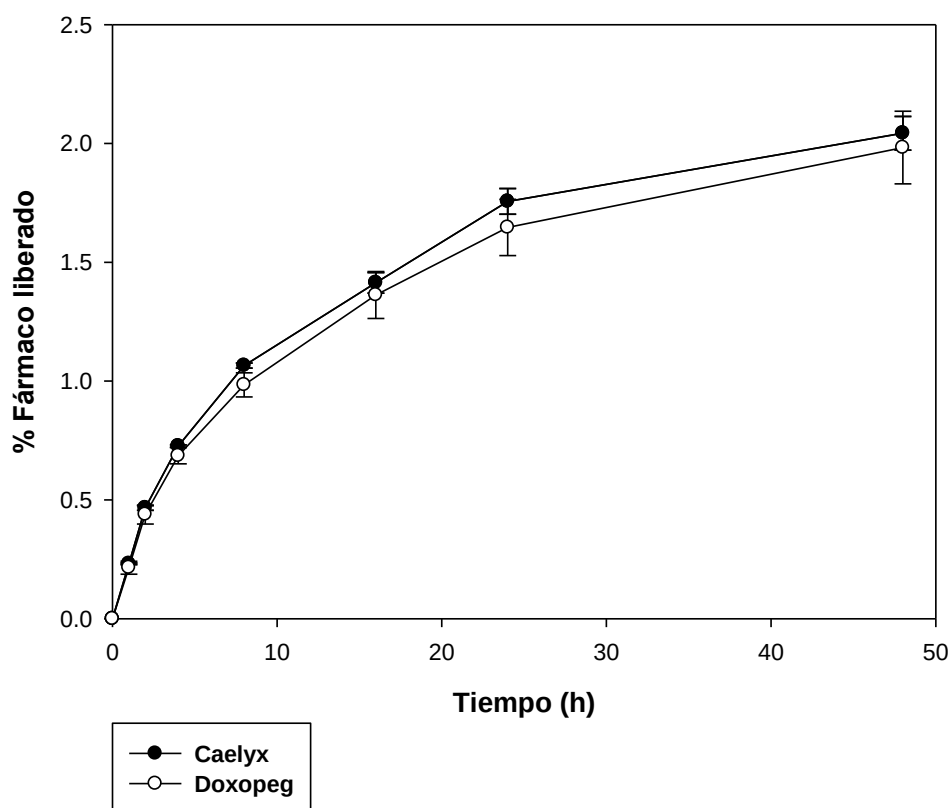


Figura 15. Porcentaje de fármaco liberado con respecto al tiempo de Caelyx y Doxopeg en PBS a temperatura ambiente. Se reporta el valor promedio $\pm$ desviación estándar de $n=3$.

En cuanto al perfil de liberación de DOXO en solución de PBS, se observan perfiles parecidos en ambas formulaciones encontrando una liberación de aproximadamente 2% hasta las 48 horas de duración del estudio a temperatura ambiente (Figura 15). El resultado confirma que tanto Caelyx como Doxopeg son estables a estas condiciones, garantizando que durante el almacenamiento o en el tiempo previo a su administración, no se tienen fugas del fármaco;

corroborado al medir una concentración de principio activo superior a 2 mg /mL a temperatura ambiente. Las indicaciones de almacenamiento de ambas formulaciones recomiendan almacenar el producto a temperaturas de 2 a 8°C.

Perfil de liberación de DOXO en PBS

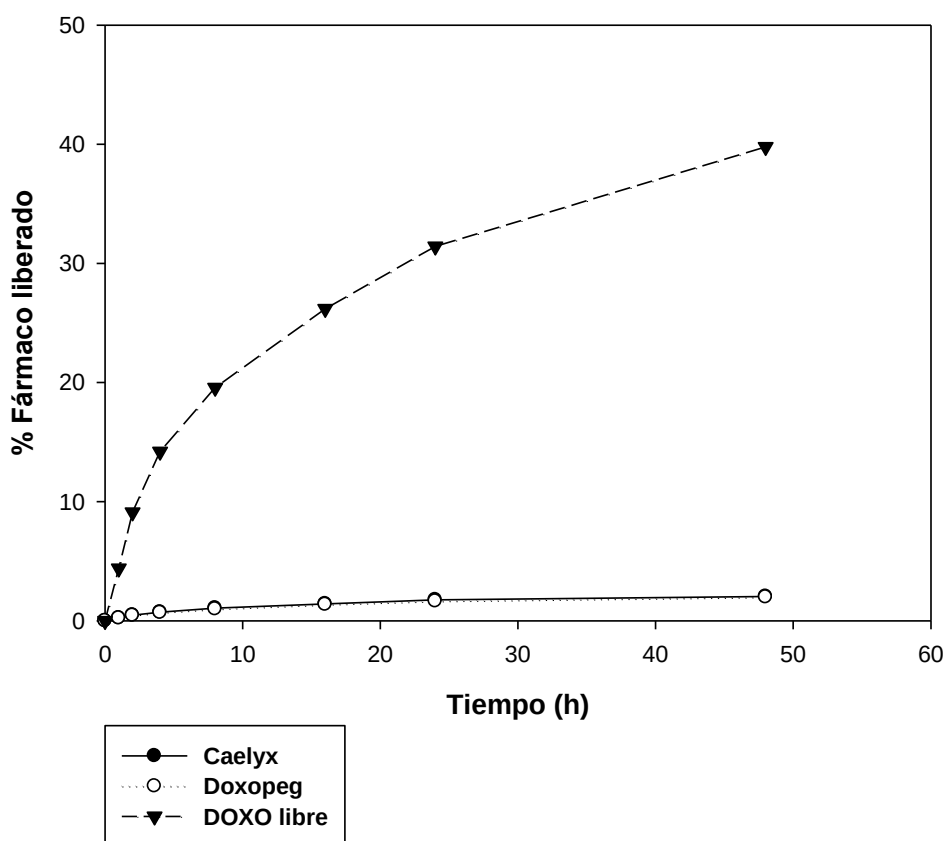


Figura 16. Comparación del porcentaje de fármaco liberado con respecto al tiempo de formulaciones liposomales de DOXO y DOXO convencional en PBS a temperatura ambiente.

La Figura 16 muestra la liberación de DOXO libre y DOXO encapsulada, la liberación de Doxo liposomal fue 2% para ambas formulaciones y de un 40% para DOXO libre, demostrando que los liposomas son un sistema eficaz para la retención del fármaco, al menos a estas condiciones.

Resumen:

- ❖ Las concentraciones de HSPC encontradas en Caelyx y Doxopeg no mostraron diferencia estadística, teniendo entonces una composición de fosfolípidos similar en ambas formulaciones.
- ❖ El porcentaje de fármaco encapsulado representa una eficiencia de encapsulación acorde al valor reportado para clorhidrato de DOXO inyectable de no menos del 90 % y no más de 115 % [12].
- ❖ Los tamaños de partícula encontrados están por debajo del valor indicado de 100 nm, se sugiere que podrían mantenerse en circulación sanguínea y llegar al tejido tumoral.
- ❖ El potencial zeta es un indicador de estabilidad física de los sistemas coloidales, el valor medido representa una estabilidad moderada para ambas formulaciones.
- ❖ No se encontró diferencia estadística para los productos de degradación lípidos (MDA y 4HNE), lo que indica que ambas formulaciones presentan el mismo grado de oxidación.
- ❖ En PBS las formulaciones liposomales presentaron un perfil de liberación similar siendo estables después de las 48 horas, liberándose 2% del fármaco encapsulado.

7. Conclusiones

Los procedimientos diseñados y realizados durante este trabajo permitieron proponer pruebas de caracterización fisicoquímica de formulaciones liposomales, cuyo comportamiento físico y químico no hace posible el empleo únicamente de los controles de calidad existentes para suspensiones inyectables.

La evaluación fisicoquímica desarrollada en este trabajo es una propuesta de las pruebas mínimas de control de calidad que deben evaluarse para garantizar la seguridad y eficacia terapéutica del medicamento, que puede ser extrapolado para otras formulaciones liposomales en desarrollo, en fases pre-clínicas o ya comercializadas (de las que no se tenga acceso a la información), siendo complementadas por los estudios farmacológicos correspondientes.

Con los resultados obtenidos se tiene una guía para el control de calidad de las formulaciones liposomales en desarrollo por el Laboratorio de Física Médica, de tal manera que se pueda llegar a establecer las especificaciones y los intervalos de tolerancia de la formulación.

8. Bibliografía.

1. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R: Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol* 2007, 2:751-760.
2. Pelengaris S, Khan M: The molecular biology of cancer. Blackwell Publishing. Reino Unido 2006, 5-6.
3. Hardam G, Limbirol E, Ruddon W, Gilman Goodman A. Las bases biológicas de la terapéutica. Mc Graw Hill. Interamericana. 9 ed. Vol II, 1996.
4. Lammers T, Hennink WE, Storm G: Tumour-targeted nanomedicines: principles and practice. *Br J Cancer* 2008, 99:392-397.
5. Drummond DC, Meyer O, Hong K, Kirpotin DB, Papahadjopoulos D: Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors. *Pharmacol Rev* 1999, 51:691-743.
6. Joshi M, Müller R: Lipid nanoparticles for parenteral delivery of actives: *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 2009, 71:161-172.
7. Bangham A, Standish M, Watkins J: Diffusion of univalent ions across lamellae of swollen phospholipids. *J. Mol. Biol* 1965, 13: 238-252.
8. Poznansky M, Juliano R: Biological approaches to the controlled delivery of drugs: A critical review. *Pharmacological Reviews* 1984, 36 (4): 277-336.
9. Guidance for Industry: Liposome Drug Products, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for

- Drug Evaluation and Research (CDER) 2002.
[\[http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070570.pdf\]](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070570.pdf)
10. Zhang L, Gu FX, Chan JM, Wang AZ, Langer RS, Farokhzad OC: Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin Pharmacol Ther* 2008, 83:761-769.
 11. Wilman D. The chemistry of antitumour agents. Champan and Hall.USA, 1990.
 12. Monografía Oficial de Clorhidrato de Doxorrubicina Inyectable. United States Pharmacopoeia USP 2008 (31), 2209-2211.
 13. Arnold R, Slack J, Straubinger R: Quantification of Doxorubicin and metabolites in rat plasma and small volume tissue samples by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectroscopy, *Journal of Chromatography B* 2004, 808: 141–152.
 14. Chin D, Lum B, Sikic B: Rapid determination of PEGylated liposomal doxorubicin and its major metabolite in human plasma by ultraviolet–visible high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B* 2002, 779: 259–269.
 15. Ficha técnica de Doxorrubicina
http://www.fda.gov/medwatch/SAFETY/2003/03May_PI/Doxorubicin_PI.pdf
 16. Arcamone F. Doxorubicin anticancer antibiotics. Academic Press. USA, 1981.

17. Minotti G, Mennae P, Salvatorelli E, Cairo G, Gianni L: Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev* 2004, 56:185–229.
18. Harivardhan R, Murthy RSR: Pharmacokinetics and biodistribution studies of doxorubicin loaded poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles synthesized by two different techniques. *Biomed. Papers* 2004, 148(2): 161–166.
19. Kalaria DR, Sharma G, Beniwal V, Ravi Kumar M: Design of biodegradable nanoparticles for oral delivery of doxorubicin: In vivo pharmacokinetics and toxicity studies in rats. *Pharmaceutical Research* 2008.
20. Wagner V, Dullaart A, Bock A, Zweck A: The emerging nanomedicine landscape. *Nature Biotechnology* 2006, 24(10): 1211-1217.
21. Hofheinz R, Gnad-Vogt S, Beyer U, Hochhaus A: Liposomal encapsulated anti-cancer drugs. *Anticancer Drugs* 2005, 16: 691-707.
22. Torchilin V, Weissig V. *Liposomes*. Oxford University Press. USA, 2003.
23. Voet D, Voet J. *Bioquímica*. Ediciones omega. España, 1990
24. Chapman D, García J. *Lípidos*. Alhambra. España, 1973.
25. López Rodríguez Victoria. Estudio de biodistribución y farmacocinética de nanoesferas lipídicas cargadas con cis-diaminodicloroplatino (II) y marcadas con núcleos radiactivos de indio-111 en un modelo tumoral de cáncer cérvico uterino en roedores. Tesis Facultad de Química, UNAM. México, 2008.
26. Lieberman H, Martin M, Rieger M, Banker G: *Pharmaceutical dosage forms--disperse systems*. Vol. 2. Marcel Decker. New York, 1996.

27. Moghimi SM, Szebeni J: Stealth liposomes and long circulating nanoparticles:critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. *Progress in Lipid Research* 2003.
28. Nagayasu A, Uchiyama K, Kiwada H: The size of liposomes: a factor wich affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1999, 40:75-8.
29. Malam Y, Loizidou M, Seifalian A: Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. *Trends in Pharmacological Sciences* 2009, 30 (11): 592-599.
30. Gittings M, Saville D: The determination of hydrodynamic size and zeta potential from electrophoretic mobility and light scattering measurements. *Colloids and Surfaces* 1998, 141: 111-117.
31. Edwards K, Baeumner A: Analysis of liposomes. *Talanta* 2006, 68:1432-1441.
32. Manual de operación: Multi angle particle sizing option. **90Plus/BI-MAS**, Brookhaven Instruments Corporation 2007.
33. Uhumwangho MU, Okor RS: Current trends in the production and biomedical applications of liposomes: a review. *Journal of Biomedical Sciences* 2005, 4 (1): 9-21.
34. Martin A, et al. *Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences*. Lea anda febider, 1993.
35. Operation manual: Zeta potential analyzer. **90Plus/BI-MAS**, Brookhaven Instruments Corporation 2007.

36. Baskin S, Salem H: Oxidants, antioxidants, and free radicals. Taylor & Francis, New York, 1997.
37. Sies H: Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. Academic Press, London, 1991.
38. Chávez F, Olvera B, Ganem A, Quintanar D: Liberación de sustancias lipofílicas a partir de nanocápsulas poliméricas. *Revista de la sociedad Química de México* 2002, 46 (4): 349-356.
39. Hunt A. Liposomes disposition in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta* 1982, 719: 450-463.
40. http://www.theoncologyinstitute.com/pdfs/chemotherapy_drugs/spanish/A_driamysin%20-%20Doxil%20-%20doxorubicin%20SPANISH.pdf
41. Stewart JC: Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem* 1980, 104:10-14.
42. Gerard-Monnier D, Erdelmeier I, Régnard K, Moze-Henry N, Yadan JC, Chaudière J. Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998, 11:1176-1183.
43. Erdelmeier I, Gerard-Monnier D, Yadan JC, Chaudière J: Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chem Res Toxicol* 1998, 11:1184-1194.
44. Immordino ML, Dosio F, Cattel L: Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. *International Journal of Nanomedicine* 2006, 1(3): 297–315.

45. Información de producto Doxil[®]
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/06p0209/06P-0209-EC15-Attach-1.pdf>
46. NBTC. 2010. *Zeta potential theory*. Cornell University.
<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20chapter%2016.pdf>