



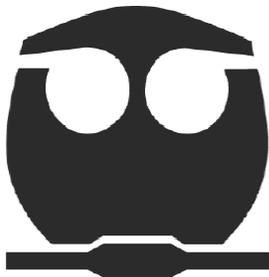
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

“OPTIMIZACIÓN DE UNA FORMULACIÓN
LIPOSOMAL DE CIS-DIAMINODICLOROPLATINO
(II) CON BASE EN LA MODIFICACIÓN DE LA
PROPORCIÓN FÁRMACO: FOSFOLÍPIDOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA
PRESENTA
KARLA PRISCILA ROCHA GUTIÉRREZ



MÉXICO, D.F.

AÑO 2011



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: **Andrés Navarrete Castro**
Vocal: **Alma Miriam Novelo Torres**
Secretario: **Luis Alberto Medina Velázquez**
Primer Suplente: **Isaura Luisa Carrera García**
Segundo Suplente: **Abraham Faustino Vega**

El lugar donde se desarrolló este trabajo experimental fue en el Laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM y en el Laboratorio de Farmacología de la Subdirección de Investigación Básica, Instituto Nacional de Cancerología, México D.F.

Asesor: **Dr. Luis Alberto Medina Velázquez**

Supervisor Técnico: **Dra. Patricia García López**

Sustentante: **Karla Priscila Rocha Gutiérrez**

DEDICADO A...

... mis padres por estar en todo momento conmigo al pendiente de mis luchas diarias, por sus sabios consejos, por su amor incondicional y porque sobre todas las cosas están apoyándome y orientándome sobre mis decisiones.

... a mi hermanito Ariel que siempre estuvo a mi lado incondicionalmente animándome con su música y sobre todo estoy muy orgullosa de ser tu hermana eres una gran inspiración para mí.

GRACIAS....

...a Dios por llenar de tantas bendiciones mi vida, por brindarme la fuerza y perseverancia en mis metas propuestas.

... a la Universidad Nacional Autónoma de México, por haberme formado como profesionista y dado la oportunidad de cumplir este gran sueño.

... al Dr. Medina por la oportunidad de estar en su equipo de trabajo, por sus enseñanzas y su paciencia en mi formación académica.

.... a la Dra.Paty por haber compartido sus conocimientos y tiempo para que yo aprendiera.

...a mis padres que son una gran bendición en mi vida, estoy muy agradecida por tenerlos a mi lado.

....a la Dra. Jazmín y Rafa por sus enseñanzas, por su tiempo y paciencia para que yo aprendiera.

...a mi hermanito Ariel que es una gran inspiración para mí, por enseñarme que el éxito está en lo que a uno le gusta hacer.

....a Viri, Coral, Salguero y Adri (lacrás!!!!) por su compañía en todo momento, por crecer conmigo haciendo mis días más amenos y por su amistad.

....a mis amigos de la licenciatura (Ivan, Ana, Frida, Esteban, Juan, Toño, Alan, Giovanna, Itzia, Karla) y maestría (Angy y Hugo) que fueron compañeros de noches de desvelo y que hicieron mi estancia en la facultad más amena.

...mis compañeros del laboratorio Vane, Mari, Jose, Edith, Vicky, Poncho, Carlos (Carñangas), Beto, Pablo, Itzel, Héctor, Majo, Liz, Fabricio, Montse, Miriam, Irene por hacer mi estancia en el laboratorio más amena, por sus consejos y momentos agradables.

*Los grandes sucesos
dependen de incidentes
pequeños.
Demóstenes*

ÍNDICE

I. RESUMEN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
2.1 QUIMIOTERAPIA	2
2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS.....	2
2.2. CISPLATINO	4
2.2.1. MECANISMO DE HIDRÓLISIS DEL CISPLATINO	4
2.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO	5
2.2.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL CISPLATINO	7
2.3. LIPOSOMAS	8
2.3.1. COMPONENTES LIPOSOMALES.....	10
2.3.2. CLASIFICACIÓN LIPOSOMAS.....	13
2.3.3. MECANISMOS DE ENTREGA DEL FÁRMACO DE LIPOSOMAS EN EL TEJIDO	14
2.3.4. INTERACCIÓN LIPOSOMA-CÉLULA.....	15
2.3.5. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS	16
2.3.5.1. MÉTODO CONVENCIONAL	16
2.3.5.2. TÉCNICA DE EVAPORACIÓN FASE REVERSA.....	17
2.3.6. HOMOGENIZACIÓN TAMAÑO DE PARTÍCULA	17
2.3.6.1. MÉTODO DE SONICACIÓN.....	17
2.3.6.2. MÉTODO DE EXTRUSIÓN	17
2.3.7. PURIFICACIÓN DE LIPOSOMAS	18
2.3.8. CARACTERIZACIÓN LIPOSOMAS	18
2.3.8.1 CUANTIFICACIÓN FOSFOLÍPIDOS.....	19
2.3.8.2. CUANTIFICACIÓN COLESTEROL.....	19
2.3.8.3. ENCAPSULACIÓN DE CISPLATINO EN LIPOSOMAS	20
2.3.8.4. TAMAÑO DE PARTÍCULA.....	21
2.3.8.5. POTENCIAL Z.....	22
2.3.8.6. PERFIL DE LIBERACIÓN	23
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVOS.....	24
5.1 OBJETIVO GENERAL	24
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
VI. METODOLOGÍA	25

6.1 PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS CON CISPLATINO MEDIANTE LA FASE REVERSA.....	26
6.2 PURIFICACIÓN DE LIPOSOMAS MEDIANTE EL EQUILIBRIO DE MEMBRANAS	26
6.3 DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA	27
6.4 POTENCIAL Z.....	28
6.5 CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS	28
6.6 CUANTIFICACIÓN DE CISPLATINO ENCAPSULADO.....	29
6.7 PERFIL DE LIBERACIÓN DE SUSPENSIONES LIPOSOMALES DE CISPLATINO	31
6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
7.2 PARÁMETROS QUÍMICOS	37
7.2.1 CUANTIFICACIÓN FOSFOLÍPIDOS.....	37
7.2.3 CUANTIFICACIÓN CISPLATINO.....	39
7.3 PARÁMETRO DE ESTABILIDAD	41
7.3.1 POTENCIAL Z.....	41
7.3.2 PERFIL DE LIBERACIÓN.....	41
VIII. CONCLUSIÓN GENERAL.....	44
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	45

I. RESUMEN

Los agentes antineoplásicos son utilizados en el tratamiento del cáncer debido a que tienen la capacidad de actuar sobre las células que tienen una mitosis acelerada, incluyendo las células sanas, lo cual es una desventaja. Como consecuencia de la inespecificidad que caracteriza a los agentes antineoplásicos los efectos adversos asociados son altamente tóxicos con lo que se limita su eficacia terapéutica. El desarrollo de vectores de transporte de agentes antineoplásicos que permita una reducción considerable de su acción citotóxica en células sanas es de gran importancia para la implementación de terapias más eficientes en el tratamiento del cáncer.

En el Laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan-UNAM y el Laboratorio de Farmacología de la Subdirección de Investigación Básica del INCan, se ha trabajado en el desarrollo de una formulación liposomal de Cisplatino. El Cisplatino es utilizado para el tratamiento del cáncer de ovario, testículo, vejiga, cabeza y cuello, pero el efecto adverso es altamente nefrotóxico por lo que el empleo de un vector de transporte, como los liposomas, hace que este efecto tóxico del antineoplásico disminuya considerablemente.

En esta tesis se trabajó en la optimización de encapsulación de cis-diaminodicloroplatino (II) (Cisplatino) en la formulación liposomal, modificando la relación de la proporción en cantidad de fármaco: fosfolípidos.

Los resultados del trabajo mostraron que la encapsulación de Cisplatino es directamente proporcional a la cantidad de fármaco y de fosfolípidos. La concentración de Cisplatino de la formulación con proporción en cantidad de fármaco: fosfolípidos de 1:6 se acerca al valor de 1mg/mL de Cisplatino liofilizado aprobado por la FDA, además de tener un tamaño de partícula menor a 250nm.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia es la principal forma de tratamiento de neoplasias diseminadas y tiene un papel muy importante en el tratamiento de determinados tumores clínicamente localizados. La quimioterapia consiste en la aplicación de uno (monoterapia) o varios agentes antineoplásicos (quimioterapia de combinación) que actúan alterando fases importantes del crecimiento y división celular de aquellas células que tienen una mitosis acelerada, incluyendo células sanas, siendo esto una desventaja para el paciente.^{1, 2, 3}

2.1.1 CLASIFICACIÓN DE LOS AGENTES QUIMIOTERAPÉUTICOS

Los agentes antineoplásicos se clasifican de acuerdo al mecanismo de acción y toxicidad, aunque esta última puede ser mayor en unos compuestos que en otros. Se clasifican de la siguiente manera:

- Antimetabolitos

Estos agentes presentan especificidad por el ciclo celular (mayor actividad durante la fase S) y alteran la síntesis normal del ADN, ARN y proteínas. Algunos antimetabolitos son análogos estructurales de metabolitos normales esenciales para el crecimiento y la división celular, lo que les permite incorporarse en la estructura del ADN y ARN. Otros antimetabolitos inhiben enzimas que son necesarias para la síntesis de moléculas esenciales como ácidos nucleicos (Figura 1).^{3, 4}

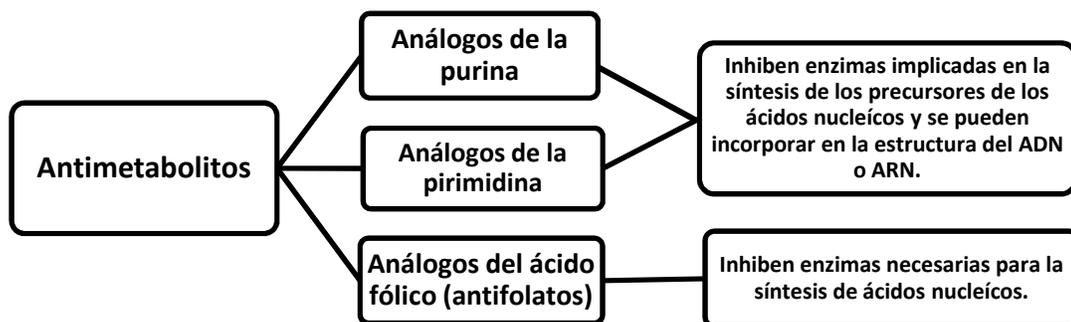


Figura 1. Principales clases de antimetabolitos.

- Alquilantes

Son compuestos altamente reactivos que atacan fácilmente al ADN y proteínas celulares. El principal mecanismo de acción de muchos agentes alquilantes consiste en la formación de enlaces covalentes con las bases puricas y pirimidicas del ADN y ARN, impidiendo la replicación del ADN y transcripción del ARN (Figura 2).^{3,4}

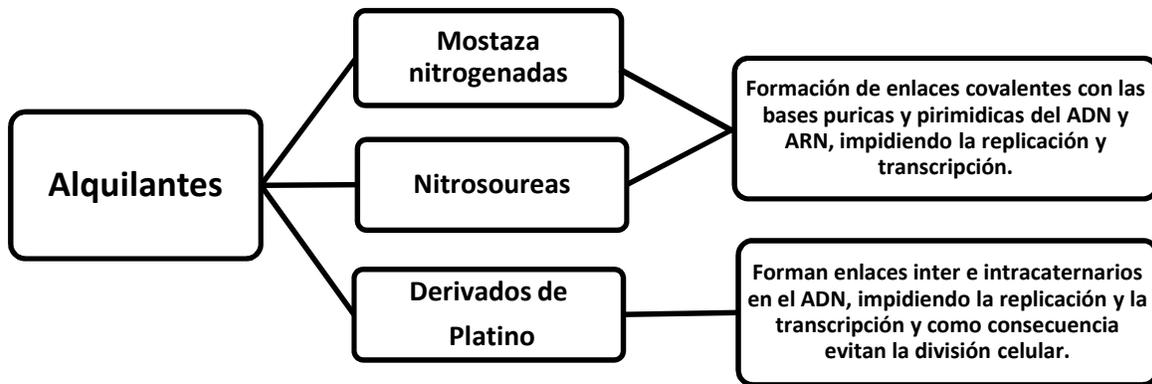


Figura 2. Clasificación de los agentes alquilantes.

- Alcaloides de las plantas y otros productos naturales/antibióticos citotóxicos y sustancias relacionadas.

Pueden ser o no específicos del ciclo celular. Interfieren con la síntesis del ADN. Originalmente derivaron de recursos naturales, pero en la actualidad se utilizan derivados sintéticos o semisintéticos (Figura 3).^{2,3,4}

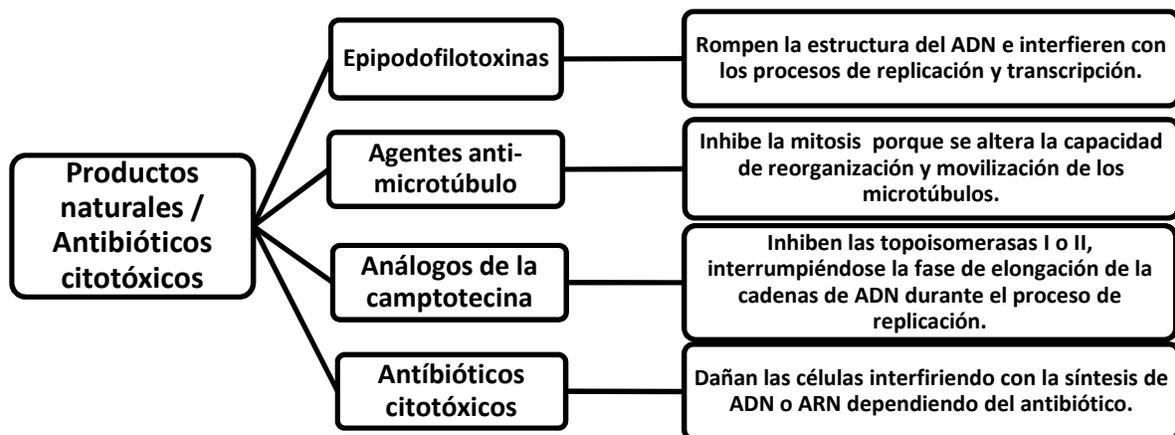


Figura 3. Clasificación de Productos naturales y Antibióticos citotóxicos.

2.2. CISPLATINO

El cis-diaminodicloroplatino [II] (Cisplatino) es un agente antineoplásico utilizado para el tratamiento clínico de distintos tipos de cáncer, incluidos los de ovario, testículo, cabeza, cuello y vejiga.^{5,6}

El Cisplatino es un compuesto de coordinación inorgánico, mostrado en la **Figura 4** junto con su isómero Transplatino el cual no tiene un efecto antineoplásico.^{5,6} El Cisplatino fue sintetizado por primera vez por Peroné en 1845, a partir del $K_2 [PtCl_4]$ (tetracloroplatinato de potasio [II]) y amoníaco. Sin embargo, fue hasta 1965 que se descubre su actividad biológica, cuando se demostró su efecto inhibidor en la división celular de cepas de *E. coli*.⁶ Muchos agentes antineoplásicos son conocidos por ser citotóxicos, mutagénicos y teratogénicos. No obstante, la IARC (International Agency for Research on Cancer) incluye al Cisplatino en el grupo 2 A, en el que se encuentran aquellos medicamentos que, aunque no han sido totalmente confirmado, son probablemente carcinogénicos en humanos.^{6,7,8}

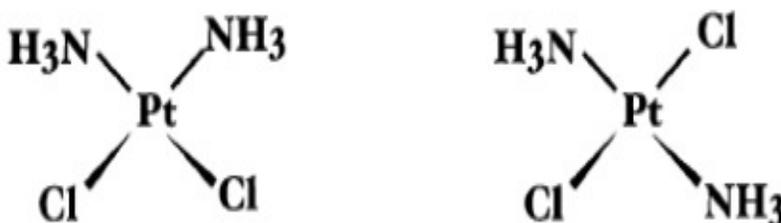


Figura 4. Estructura del Cisplatino (izquierda) y del Transplatino (derecha)

2.2.1. MECANISMO DE HIDRÓLISIS DEL CISPLATINO

El Cisplatino es estable durante 24h en solución salina isotónica a 25°C. Sin embargo, en disolución acuosa como se muestra en la **Figura 5** se hidroliza fácilmente estableciendo un equilibrio entre aproximadamente el 30% del Cisplatino inicial y los productos *cis*- $[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$ (monoacu cisplatino), *cis*- $[Pt(H_2O)_2(NH_3)_2]^{2+}$ (diacu cisplatino) y los complejos hidroxilo *cis*- $[PtCl(OH)(NH_3)_2]$ (monohidroxilo cisplatino), *cis*- $[Pt(OH)(H_2O)(NH_3)_2]^+$ (monohidroxilo monoacu cisplatino) y *cis*- $[Pt(OH)_2(NH_3)_2]$ (dihidroxilo cisplatino). Este equilibrio depende tanto de la concentración de iones Cl^- como del pH del medio.⁸

De todos los productos de hidrólisis del cisplatino, los mayores efectos citotóxicos se le atribuyen al complejo *cis*- $[PtCl(H_2O)(NH_3)_2]^+$.⁸

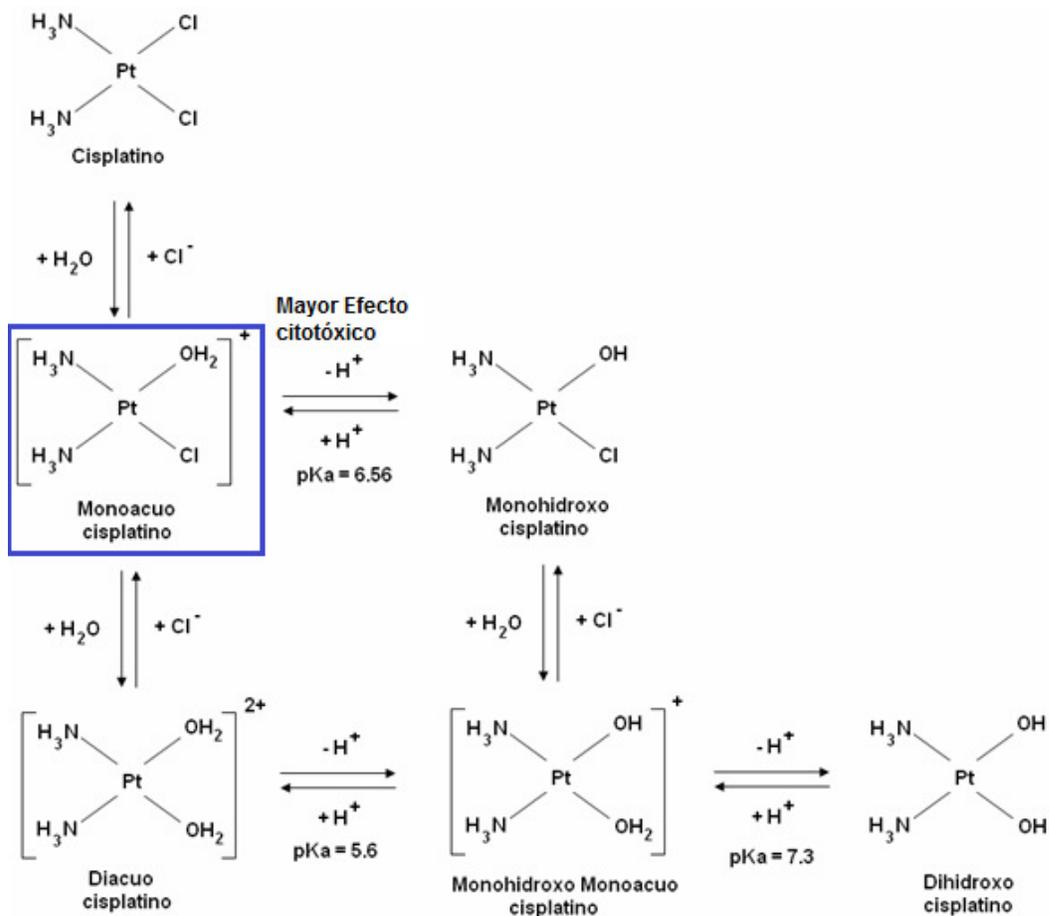


Figura 5. Mecanismo de Hidrólisis del Cisplatino

2.2.2. MECANISMO DE ACCIÓN DEL CISPLATINO

El mecanismo de acción se muestra en la **Figura 6**, en donde el Cisplatino entra a la célula por difusión pasiva o mediante los transportadores de cobre (CTR1)¹⁰. Una vez dentro de la célula, el grupo Cl⁻ del Cisplatino es sustituido por moléculas de agua (hidrólisis) confiriéndole una carga positiva a la molécula del Cisplatino.^{5, 6, 9, 10}

La molécula activa del Cisplatino, producto de la hidrólisis, reacciona principalmente con el glutatión del citoplasma y el ADN inhibiendo la replicación, transcripción y otras funciones nucleares, arrojando la proliferación celular del cáncer.^{5, 6, 9}

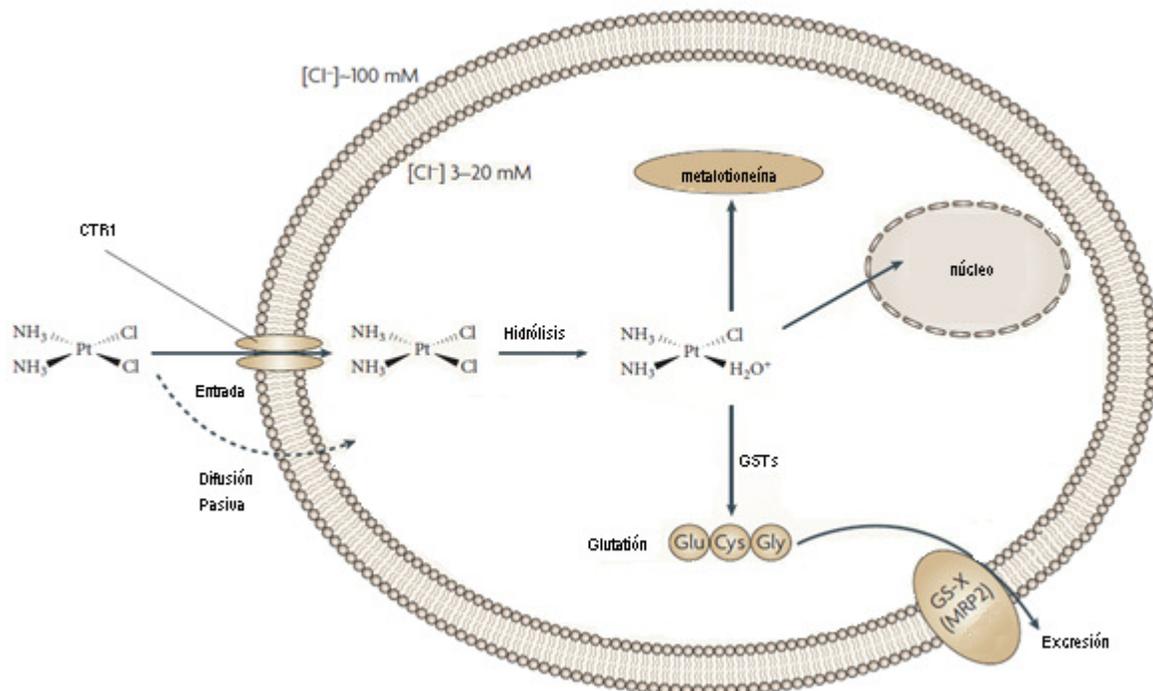


Figura 6. Mecanismo de acción del Cisplatino.

La molécula activa del Cisplatino reacciona con sitios nucleofílicos del ADN, preferentemente se une covalentemente con el nitrógeno de la posición 7 de la guanina, el cual da la formación de aductos intracatenarios e intercatenarios. En general, el Cisplatino atraviesa enlaces que puede ser en la misma hebra de la cadena de ADN (aducto intracatenario), o sobre dos puntos adyacentes entre las dos hebras (aducto intercatenario), como se muestran en la **Figura 7**.^{5, 6,9}

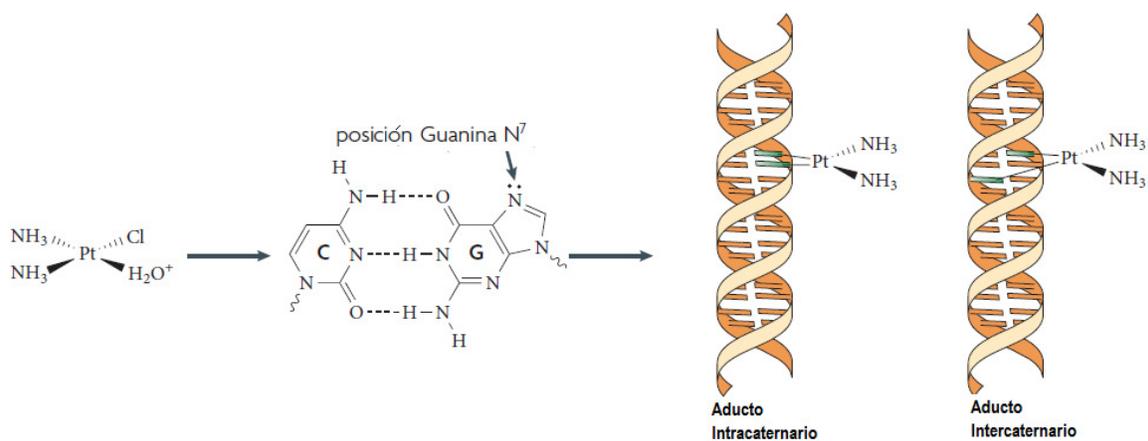


Figura 7. Interacciones del cisplatino con el DNA

Sin embargo, el Cisplatino también puede formar aductos sobre el ADN con otros grupos reactivos como tiol, amino e hidroxil, (**Figura 8**), además, también puede formar aductos a través grupos reactivos ligados de una proteína voluminosa o de moléculas pequeñas como el glutatión (**Figura 9**).⁶

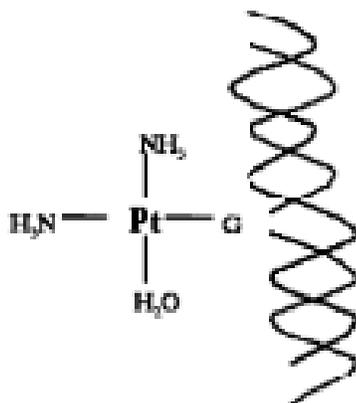


Figura 8. Monoadductos con un grupo reactivo como tiol, amino, o hidroxil

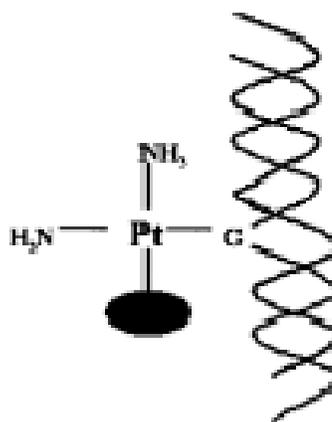


Figura 9. Monoadductos con otro grupo reactivo unidos a una molécula pequeña (glutatión) o a una proteína nuclear

El Cisplatino se une al grupo tiol del glutatión para dar la formación de un complejo el cual es desechado de la célula (desintoxicación).^{5, 6, 9}

Las células cancerosas tienen diferentes niveles de glutatión y metalotioneína que pueden desintoxicar el contenido del platino intracelularmente o extracelularmente por interacción de sus grupos tioles previniendo la unión al ADN.^{5, 6, 9} Sin embargo, en el plasma hay enzimas gamma-glutamil transpeptidasa (GGT) que juegan un papel crucial en el catabolismo extracelular e intracelular del glutatión. La GGT es a menudo expresada en tumores malignos, incluyendo melanomas, aunque sus niveles pueden variar entre diferentes tipos de tumores o células del mismo tumor. Las células con una alta actividad de GGT tienen un bajo nivel de glutatión intracelular y por lo tanto son más sensibles a compuestos de platino.^{5, 6}

2.2.3. VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL CISPLATINO

El Cisplatino es utilizado como antineoplásico por la capacidad de inhibir la proliferación celular actuando sobre el ADN de las células inhibiendo su replicación, transcripción y otras funciones nucleares.^{5, 6} Sin embargo es altamente nefrotóxico, produciendo principalmente necrosis en los túbulos proximales y apoptosis en los túbulos distales, lo cual lleva a una pérdida de la función renal. Por consiguiente, en la clínica se lleva a cabo una hidratación sistémica con solución salina isotónica (SSI) para disminuir la forma activa en el riñón y reducir el riesgo de nefrotoxicidad. Con el Cisplatino también se presenta neurotoxicidad y ototoxicidad.^{9, 11, 12, 13}

Debido a este patrón citotóxico, el uso de sistemas liposomales como vehículos de transporte del Cisplatino es una gran alternativa para disminuir su efecto nefrotóxico y demás efectos adversos.

2.3. LIPOSOMAS

Los liposomas son estructuras esféricas como se muestra en la **Figura 10** conformadas por fosfolípidos o compuestos anfipáticos organizados de manera similar a la de una membrana celular. Los liposomas tienen una parte hidrofílica (interior del liposoma) y una parte hidrófoba (interfase de la bicapa lipídica).^{14, 15}

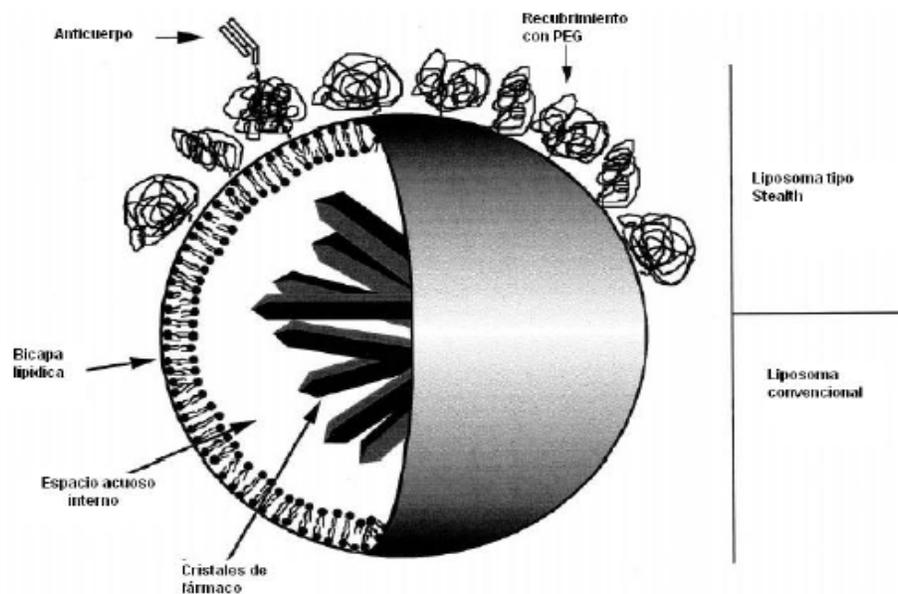


Figura 10. Estructura de un liposoma

Los fosfolípidos y compuestos anfipáticos son estructuras moleculares con una cabeza polar que se une covalentemente con una o dos cadenas de hidrocarburos hidrofóbicos como se muestra en la **Figura 11**, no obstante la diferencia que hay entre un fosfolípido y un compuesto anfipático consiste en que sólo puede haber en su parte polar un grupo fosfato en los fosfolípidos y en el compuesto anfipático hay grupos polares distintos al fosfato.

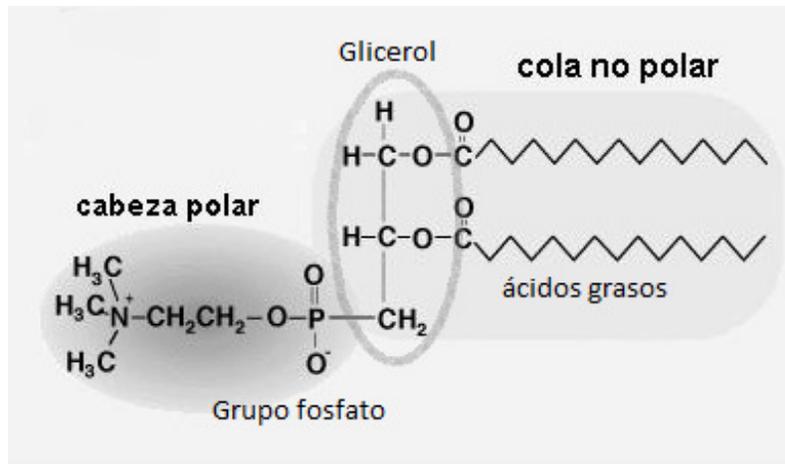


Figura 11. Estructura química de un fosfolípido.

Los liposomas son utilizados como vectores no tóxicos para el transporte de fármacos poco solubles, además una de sus ventajas es que pueden trasportar fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos en sus compartimentos de acuerdo a sus características fisicoquímicas (**Tabla 1**).^{14, 16}

Tabla 1. Compatibilidad de los Fármacos a en capsular en la estructura liposomal de acuerdo a su solubilidad.

Agentes	Compartimento
Hidrosolubles	En el núcleo acuoso
Liposolubles	Membrana
Péptidos y proteínas de tamaño pequeño	Interfase

De acuerdo a su estructura y tamaño los liposomas son clasificados como se muestra en la **Figura 12**.^{14, 15}

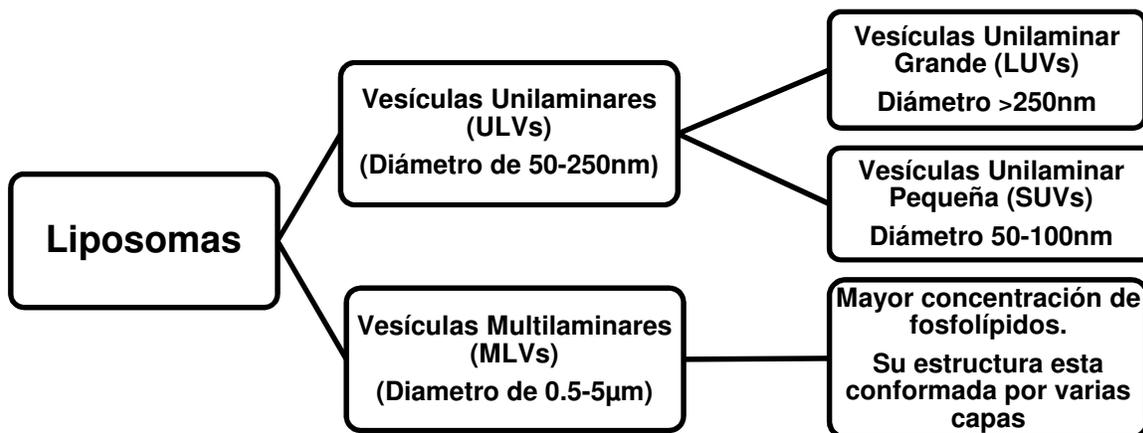


Figura 12. Clasificación de liposomas de acuerdo a su tamaño.

Ventajas de encapsular en liposomas

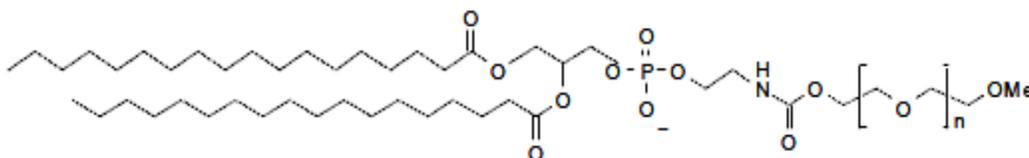
- La encapsulación del antineoplásico evita su metabolismo e inactivación antes de llegar al sitio blanco.^{14,15}
- Debido a su tamaño, éste puede atravesar fácilmente el endotelio.^{14,15,16,17}
- Si son cubiertos con polímeros inertes y biocompatibles como polietilenglicol (PEG) pueden prolongar el tiempo en el sistema sanguíneo.^{19,20,26}
- Presenta una reducción considerable de los efectos adversos asociados a las dosis administradas.¹⁴

2.3.1. COMPONENTES LIPOSOMALES

Generalmente los componentes de los liposomas son: el lípido que le dará la carga neta (potencial Z), el colesterol que modifica la fluidez de la vesícula, moléculas poliméricas hidrofílicas (polietilenglicol) que forman una barrera estérica en la superficie que le permite evadir el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) por mucho más tiempo, y un antioxidante para evitar la oxidación de las dobles cadenas hidrófobas de los fosfolípidos.

La estructura de los liposomas está basada en la composición de las membranas celulares; generalmente los liposomas están compuestos por lípidos neutrales, aniónicos o catiónicos. Los lípidos neutrales naturales más usados son fosfatidilcolinas, esfingomielinas y fosfatidiletanolamina. Los lípidos con cargas negativas naturales son fosfatidilserina, fosfatidilglicerol y fosfatidilinositol. Los lípidos sintéticos más utilizados son dimiristoil, dipalmitoil, distearoil, dioleoil y palmitoil-oleoil.¹⁵ El N-(1, 2,3-dioleiloxi-propil)-N, N, N- trimetilamonio (DOTMA) y 2,3 dioleoxi N-(2-(espermin carboxiamido) etil)-N, N-dimetil-1-propanamino (DOSPA) son ejemplos de lípidos catiónicos. En la **Figura 13** se muestra la estructura de cada uno de los distintos tipos de lípidos.¹⁶

Las moléculas poliméricas hidrofílicas como el polietilenglicol (PEG) (**Figura 15**) promueven que el liposoma sea estéricamente estable, reduciendo la interacción de proteínas plasmáticas que forman parte del complemento del Sistema Inmune y sean eliminados por el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM).^{19, 20, 21} Por lo que es utilizado para incrementar el tiempo de circulación en el sistema sanguíneo. En general al tener un tamaño óptimo (menor a 200nm)^{14,19} y una estabilidad estérica que le da el PEG, los liposomas permanecen por mucho más tiempo en el sistema sanguíneo.^{19, 20, 21, 22}



DSPE-PEG

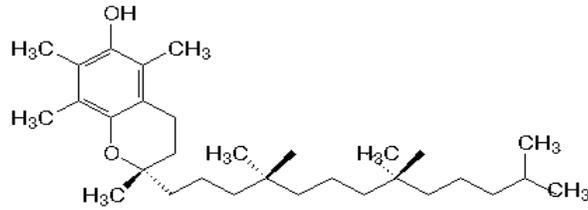
Figura 15. Estructura química del 1, 2 Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol) 2000]), molécula que le da estabilidad estérica al liposoma.

En la **Figura 15** se muestra la estructura química de una molécula polimérica hidrofílica, y en la **Figura 16** la representación esquemática de la formación del liposoma con moléculas poliméricas hidrofílicas.



Figura 16. Incorporación del PEG en la estructura liposomal.

La oxidación de fosfolípidos insaturados empleados en las formulaciones liposomales puede reducirse mediante la inclusión de un antioxidante como el α -tocoferol (**Figura 17**), provocando una mayor estabilidad en el liposoma asegurando que el fármaco encapsulado dure por mucho más tiempo en el interior.



α -tocopherol

Figura 17. Estructura química del α -tocoferol que es utilizado como antioxidante de las cadenas insaturadas de los fosfolípidos que forman parte del liposoma.

2.3.2. CLASIFICACIÓN LIPOSOMAS

Los liposomas se pueden clasificar de acuerdo a su funcionalidad (**Figura 18**).

- Liposomas Convencionales. Están formados por fosfolípidos (neutros o negativos) y colesterol. Pueden variar en sus propiedades como tamaño, composición lipídica, carga superficial y fluidez de la bicapa. Una grave limitante es que estos liposomas son reconocidos rápidamente por el sistema inmune y son retirados de la circulación sanguínea por el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM).^{15,24,25,26,28}
- Liposomas Stealth. La superficie liposomal contiene polímeros hidrofílicos como polioxazolina, polietilenglicol (PEG), metoxipolietilenglicol (mPEG) o polivinilalcohol. El polímero hidrofílico sirve como escudo estérico en la superficie del liposoma, el cual prolonga por mucho más tiempo su circulación evadiendo el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM).^{19,20,26,28}
- Liposomas activados. Contienen en su superficie anticuerpos específicos, fragmentos de anticuerpos, receptores de folato, receptores a transferrinas, antígenos, carbohidratos, etc. y de esta manera promueven una acción específica.^{21,22,24,26,28}
- Liposomas pH sensibles. Liposomas que tienen lípidos o mezcla de lípidos con tensoactivos, lípidos asociados con polímeros biodegradables y lípidos asociados a péptidos. Estos liposomas, una vez dentro del macrófago en el fagolisosoma, se colapsan por el cambio del pH y sufren una desestabilización, liberando el contenido del liposoma en el citoplasma.^{23,24}

- Liposomas Catiónicos. Estos liposomas están elaborados por fosfolípidos catiónicos y “zwiterion”. Los componentes catiónicos de la parte exterior del liposoma interactúan con moléculas cargadas negativamente, como el ADN, por lo que se aplica en la terapia génica.^{13,14,24}
- Liposomas Termosensibles. Están formados por fosfolípidos que son estables a 37°C, aunque presentan temperaturas de transición en torno a los 40°C. Esta temperatura puede existir en el interior de tumores o es generado por algún equipo que produce calor en una zona específica del cuerpo (ultrasonido) para la liberación del fármaco encapsulado.²⁷

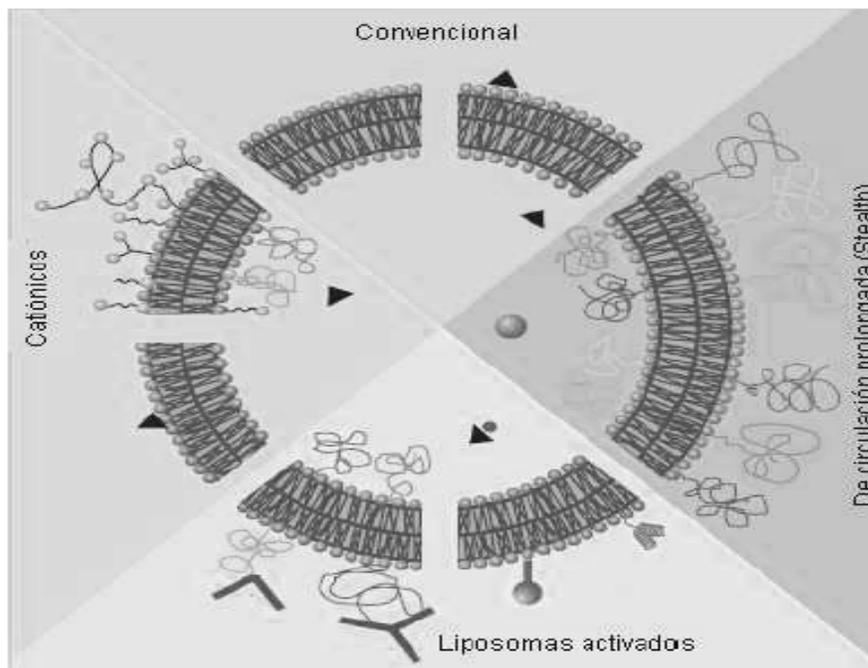


Figura 18. Los principales tipos de liposomas

2.3.3. MECANISMOS DE ENTREGA DEL FÁRMACO DE LIPOSOMAS EN EL TEJIDO

Entrega Pasiva. Se da por la formación de la angiogénesis a medida que el tejido tumoral va creciendo.²⁴ El fármaco llega de manera fácil a vasos tumorales porque estos presentan una distribución mucho más heterogénea, son más grandes y más permeables.^{24, 25}

La mayoría de nanopartículas utilizan el efecto de aumento de la permeabilidad y retención (EPR: enhanced permeation and retention effect) que proporciona la acumulación del principio activo en el tejido tumoral. El efecto EPR se debe a la presencia de una vasculatura tumoral fenestrada donde se presentan poros de tamaño de 100-780nm que permiten una extravasación constante de moléculas grandes y pequeñas (**Figura 19 (a y b)**). Esta acumulación es facilitada por la falta de sistema linfático, responsable de eliminar a las macromoléculas en los tejidos normales.^{21, 24, 25, 26}

Entrega Específica. Liposomas con una molécula de orientación (anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, receptores de folatos, etc.) son guiados a un blanco celular para permitir la acumulación del principio activo en el tejido tumoral, dentro de las células cancerosas, o en organelos intracelulares (**Figura 19 (c)**).^{21, 24, 25, 26}

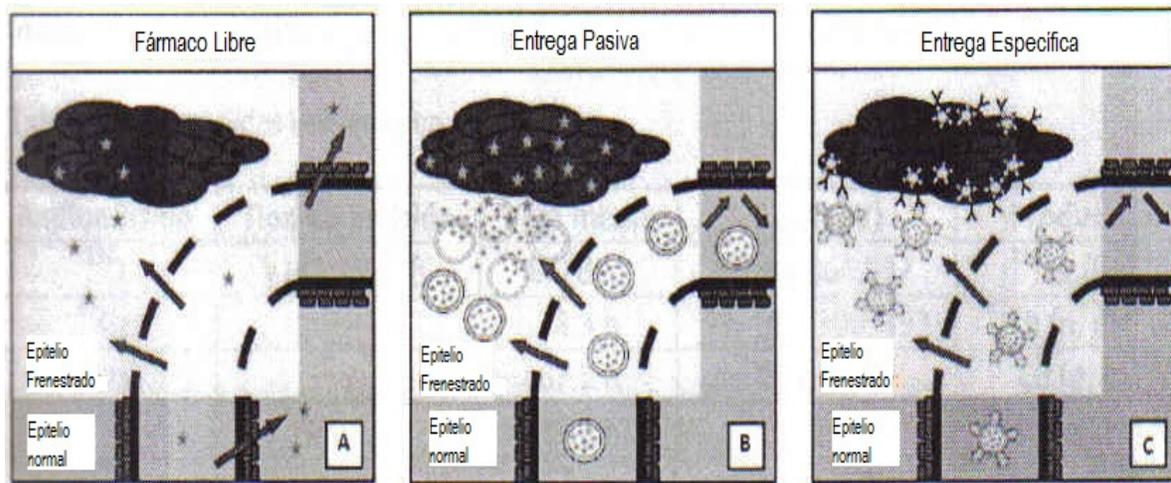


Figura 19. Mecanismos de entrega del principio activo encapsulado en liposomas.

2.3.4. INTERACCIÓN LIPOSOMA-CÉLULA

Se han reportado 4 posibles mecanismos de interacción entre los liposomas y las células (**Figura 20**).

1) Endocitosis. El Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) endocita los liposomas formando un fagosoma, después el arsenal enzimático contenido en el lisosoma es liberado cuando se fusiona con el fagosoma formando un fagolisosoma y de esta manera el fármaco encapsulado es liberado en el citoplasma por el rompimiento del liposoma dentro del fagolisosoma.^{29, 30}

2) Fusión directa. La membrana del liposoma con la membrana plasmática celular se fusionan ocasionando la liberación simultánea del contenido liposómico dentro del citoplasma.^{29,30}

3) Cambio Lipídico. Transferencia de lípidos de la bicapa liposomal a las membranas celulares o subcelulares, sin adsorción previa ni asociación del contenido liposomal.^{29, 30}

4) Adsorción. El principio activo contenido en liposomas se adsorbe a la superficie celular mediante fuerzas hidrófobas o electrostáticas débiles o mediante interacciones inespecíficas con componentes de la superficie celular.^{29, 30}

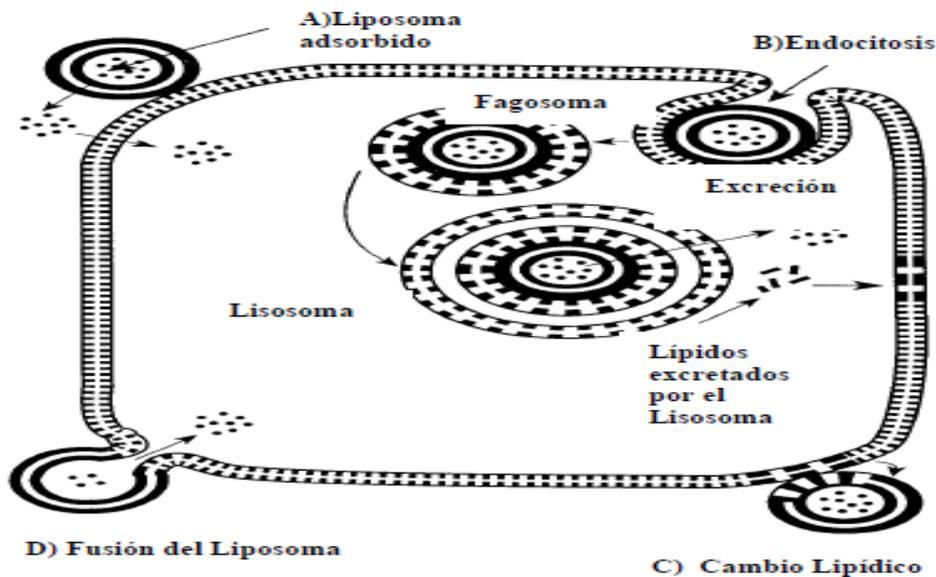


Figura 20. Diferentes mecanismos de interacción de liposomas con células.

2.3.5. TÉCNICAS DE PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS

2.3.5.1. MÉTODO CONVENCIONAL

Los fosfolípidos son disueltos en un solvente orgánico (cloroformo/metanol o la mezcla) y colocados en un rotavapor con vacío hasta que aparezca una capa de lípidos. La formación espontánea de MLVs se presenta cuando un exceso de volumen del buffer acuoso que contiene el fármaco es adicionado a la capa de lípidos. La separación de los liposomas con el fármaco integrado del fármaco no encapsulado se realiza mediante centrifugación, filtración o diálisis. Los puntos críticos en esta preparación es la hidratación de la capa lipídica y las condiciones de agitación cuando se le coloca la solución buffer acuoso (solución con el fármaco) para que el fármaco pueda llegar a ser encapsulado en los compartimentos internos del MLVs.³¹

2.3.5.2. TÉCNICA DE EVAPORACIÓN FASE REVERSA

Esta técnica se implementó en el laboratorio de Física Médica de la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer INCan, la cual consiste en el goteo de una solución de fosfolípidos disueltos en un solvente orgánico volátil, en una solución acuosa que contiene el fármaco (Cisplatino) y se encuentra a la temperatura de transición del fosfolípido; durante el goteo se agita la fase acuosa y se sónica esta mezcla para propiciar la formación de liposomas LUV; posteriormente se evapora completamente todo el solvente orgánico en el rotavapor, sonicando al mismo tiempo para dar la formación de un gel.

2.3.6. HOMOGENIZACIÓN TAMAÑO DE PARTÍCULA

2.3.6.1. MÉTODO DE SONICACIÓN

Se utiliza para la elaboración de LUVs a partir de MLVs. La sonicación consiste en el uso de pulsos de alta frecuencia de sonido que agitan la suspensión de MLVs, produciendo el rompimiento de MLVs para producir LUVs en un rango de 250-50nm.³¹ El propósito de la sonicación es reducir el tamaño de las vesículas con el fin de aumentar la penetración en el tejido.³¹

Para lograr disminuir el tamaño de partícula, en el laboratorio de Física Médica se utiliza un tiempo de 150 minutos de sonicación, lográndose un tamaño de partícula en un rango de 50-400nm a una frecuencia de sonicación de 40kHz y un potencial de 100W.

Los inconvenientes de sonicar son:

Oxidación de las cadenas insaturadas de los ácidos grasos que forman parte de los fosfolípidos y la hidrólisis de ácidos grasos.

Desnaturalización o inactivación de algunas sustancias termolábil que fueron encapsuladas.³¹

2.3.6.2. MÉTODO DE EXTRUSIÓN

Este método también se utiliza para preparar SUVs a partir de MLVs, y consiste en pasar la solución con MLVs por filtros de policarbonato (0.1 -0.05 μ m) a una presión moderada de 100-800psi manteniendo la temperatura de transición del fosfolípido. El objetivo del método de extrusión es disminuir el tamaño de partícula y de este modo obtener una distribución de tamaño homogénea.³¹

Inconvenientes al extruir:

Hay una pérdida considerable de fármaco encapsulado por lo que la eficiencia de encapsulación disminuye.³¹

2.3.7. PURIFICACIÓN DE LIPOSOMAS

Se emplean distintos métodos para la separación del fármaco no encapsulado de liposomas, ver la **Figura 21**.^{17, 28, 31}

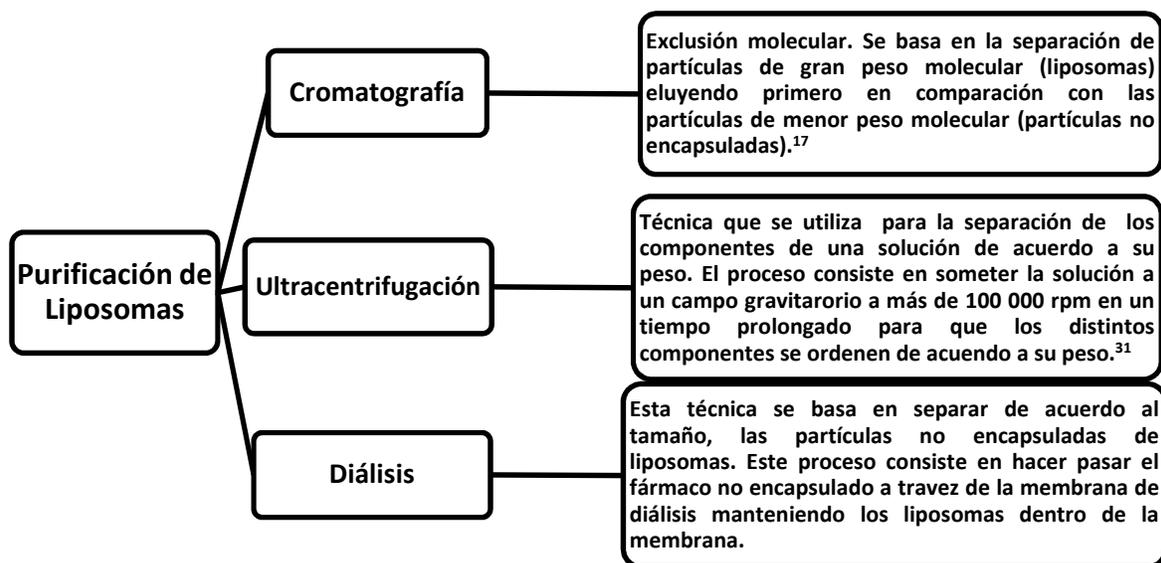


Figura 21. Métodos de separación de fármaco no encapsulado.

2.3.8. CARACTERIZACIÓN LIPOSOMAS

Las pruebas de la caracterización de suspensiones liposomales se utilizan para determinar la estabilidad (potencial Z, perfil de liberación, peroxidación de fosfolípidos), el fármaco encapsulado (eficiencia de encapsulación), la composición química (fosfolípido, colesterol, fármaco encapsulado), el tamaño de partícula, la homogeneidad del tamaño de partícula y el rendimiento final de la técnica de elaboración de manera precisa.

En la **Tabla 2** muestra algunas pruebas que se realizan para la caracterización para formulaciones liposomales.¹⁵

Tabla 2. Pruebas de caracterización de formulaciones liposomales.¹³

Pruebas de Caracterización	Metodología
pH	Potenciómetro
Conductividad	Conductivímetro
Concentración de fosfolípidos	Ensayo Bartlett Método Stewart
Concentración colesterol	Ensayo de colesterol oxidasa, HPLC fase normal y reversa
Concentración de agente encapsulado	Espectrofotometría, HPLC
<i>Caracterización física</i>	
Apariencia	Inspección visual
Distribución y tamaño de partícula	Dispersión dinámica de luz, dispersión de luz estática, cromatografía de exclusión de tamaño, Microscopía Electrónica de Barrido
Potencial Z	Electroforesis
Porcentaje de Fármaco libre	Depende del principio activo
<i>Estabilidad Química</i>	
Oxidación de fosfolípidos	Determinación de peroxidación lipídica
Hidrólisis de fosfolípidos	Composición lipídica
Degradación de fármaco	Depende del principio activo
<i>Pruebas biológicas</i>	
Esterilidad	De acuerdo a los Protocolos Farmacopeicos (FEUM)
Pirogenicidad (nivel endotoxinas)	De acuerdo a los Protocolos Farmacopeicos (FEUM)

2.3.8.1 CUANTIFICACIÓN FOSFOLÍPIDOS

El método de Stewart es un método colorimétrico que es utilizado para la cuantificación de fosfolípidos al formar complejos con el ferrotiocianato de amonio en una solución orgánica (cloroformo). Este método tiene como ventaja que el fósforo inorgánico no interfiere con la cuantificación por ser insoluble en la solución orgánica. El cromóforo es detectado a una densidad óptica de 488nm.³²

2.3.8.2. CUANTIFICACIÓN COLESTEROL

El colesterol contenido en las formulaciones se puede determinar mediante un ensayo enzimático. El colesterol esterificado es hidrolizado por el colesterol esterasa a colesterol libre; el cual es oxidado mediante el colesterol oxidasa a peróxido y colestona: el peróxido reacciona con 4-aminoantipirina y fenol en presencia de la enzima peroxidasa dando la formación de quinonaimina que es un compuesto que se detecta en el espectrómetro a una densidad óptica de 500nm.¹⁸ La reacción que se lleva a cabo para la formación del cromóforo se muestra en la **Figura 22**.

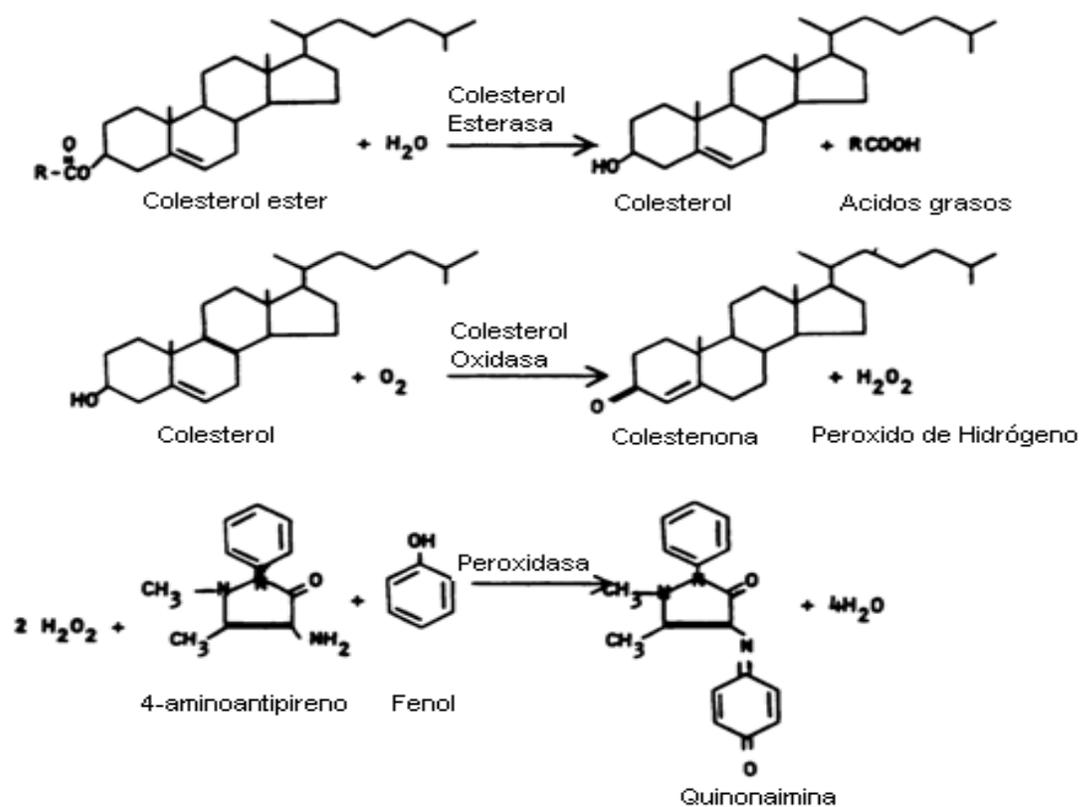


Figura 22. El colesterol esterasa hidroliza los ésteres del colesterol a colesterol libre. El colesterol oxidasa oxida el colesterol en colestenoona y en peróxido. El peróxido reacciona con el 4-Aminoantipirina y fenol en presencia de la enzima peroxidasa dando la formación de Quinonaimina.

2.3.8.3. ENCAPSULACIÓN DE CISPLATINO EN LIPOSOMAS

El método para la cuantificación de Cisplatino puede ser mediante Espectrometría Infraroja o por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).⁴⁵

En el HPLC se utiliza el mecanismo de partición que consiste en la separación por el reparto de los solutos entre la fase móvil (polar) y la fase estacionaria (columna no polar). Debido a que la interacción de los componentes de la mezcla es distinta con la fase móvil y la fase estacionaria, los componentes atraviesan la fase estacionaria a distintas velocidades lo cual es detectado mediante un espectrómetro de acuerdo al orden en que salen de la fase estacionaria.⁴⁵

Para la cuantificación de Cisplatino el soluto que se analiza es el complejo formado por el Dietilcarbonato sódico (DDTC) y Cisplatino, que es detectado a una densidad óptica de 254nm en un espectrómetro UV-Visible (**Figura 23**).^{44, 45}

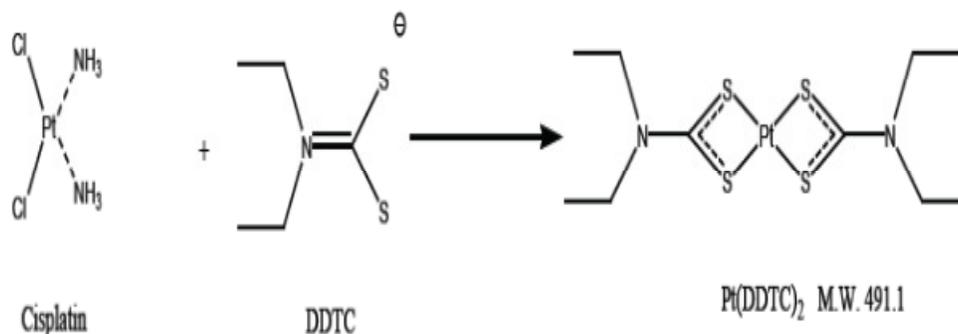


Figura 23. Formación del complejo entre el Cisplatino y el Dietilcarbonato sódico.

Los tiempos de retención de este complejo dependen de las proporciones y los componentes polares de la fase móvil.

2.3.8.4. TAMAÑO DE PARTÍCULA

La medición del tamaño de partícula puede efectuarse mediante dispersión dinámica de luz (DLS) (**Figura 24**), que mide el tamaño de partícula de suspensiones que presentan un estado de movimiento aleatorio debido al movimiento Browniano.^{34,35} El tamaño de partícula es determinada por iluminación incidente de partículas con un laser y analizando la intensidad de fluctuaciones en la dispersión de luz.^{33, 34,35}

Si una partícula pequeña es iluminada por una fuente de luz como un láser, la partícula dispersará la luz en todas direcciones, entonces es posible observar fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad dispersada usando un fotomultiplicador capaz de operar en modo de contador de fotones.^{34, 35}

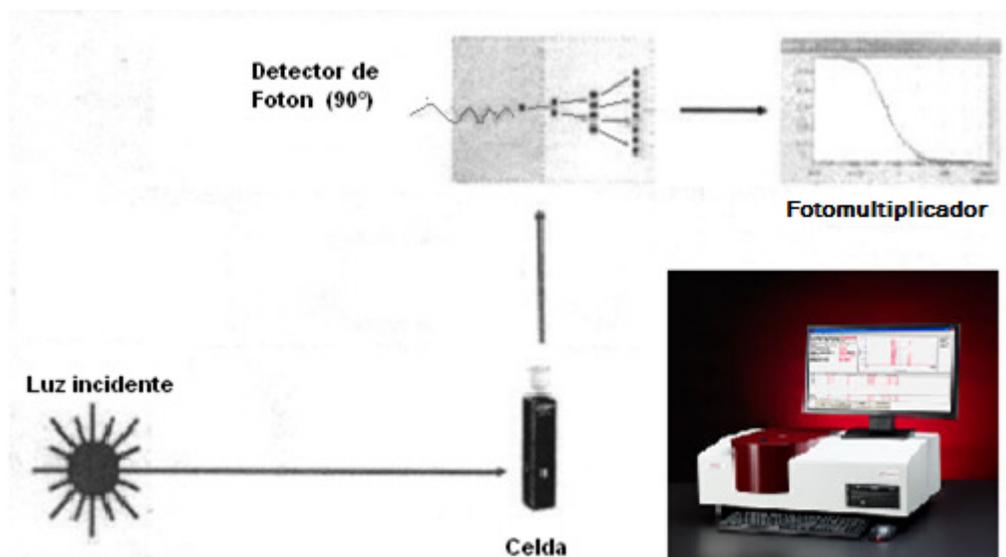


Figura 24. Esquema de un equipo de Dispersión Dinámica de Luz.

2.3.8.5. POTENCIAL Z

La evaluación del potencial Z permite determinar la estabilidad de una suspensión coloidal, en general, una suspensión es estable cuando la fuerza de repulsión electrostática es más grande que las fuerzas atractivas de van del Waals. La composición iónica del medio dispersor contribuye en la disminución de las fuerzas repulsivas entre partículas favoreciendo su acercamiento y la consecuente aparición de precipitación o floculación.³⁶ Cualquier partícula coloidal cargada es capaz de generar una diferencia de potencial entre la doble capa de Stern y la capa difusa conocida como potencial Z. Si el valor del Potencial Z es muy grande indica que hay una mayor repulsión entre las partículas coloidales y mayor será la estabilidad de la suspensión, el potencial Z puede incrementar o disminuir si se añaden los iones adecuados al medio.^{36, 37,38}

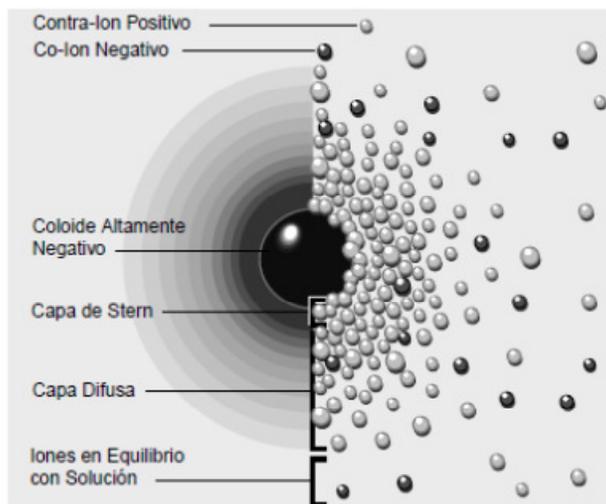


Figura 25. Distribución de cargas de una partícula de un sistema coloidal la cual representa el Potencial zeta que se forma a partir de la diferencia de potenciales entre la capa de Stern y de la capa difusa.

En la **Tabla 3** muestra la relación entre la estabilidad del sistema coloidal y el potencial Z:^{37,38}

Tabla 3. Estabilidad de un sistema coloidal en relación al Potencial Z

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

La determinación de este parámetro se realiza mediante un electrodo de Pd con soporte acrílico y la aplicación de un campo eléctrico en el líquido que contienen las partículas cargadas lo que hará que las partículas cargadas migren al polo positivo o negativo de acuerdo a su naturaleza. La velocidad con la cual se trasladan es proporcional a la magnitud de carga. Determinando dirección y velocidad, bajo la influencia de un campo eléctrico conocido, es posible calcular la movilidad y el potencial zeta.³⁹

2.3.8.6. PERFIL DE LIBERACIÓN

El perfil de liberación es una técnica que se emplea para evaluar la liberación *in vitro* de la entidad contenida en los sistemas nanoparticulados.

Tiene como fundamento evaluar la velocidad de liberación de fármaco tomando en cuenta el mecanismo de liberación, la velocidad de biodegradación y el medio biológico.^{40, 41}

Una formulación liposomal es estable si es liberado un pequeño porcentaje de fármaco en condiciones determinadas, de esta manera se asegura que una gran cantidad de fármaco sigue contenido en liposomas y ejercerá su efecto cuando llegue al tejido u órgano blanco.^{40,41}

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La formulación liposomal desarrollada en el laboratorio de Física Médica conteniendo Cisplatino como principio activo mostró una concentración de fosfolípidos mayor a la aprobada por la Food & Drug Administration (FDA) en Estados Unidos de Norteamérica (USA) para algunas formulaciones liposomales, por lo que se planteó la optimización de dicha formulación realizando modificaciones en la relación fármaco-fosfolípidos.

IV. HIPÓTESIS

La modificación de la proporción fármaco: fosfolípido en una formulación liposomal de Cisplatino no afectará la eficiencia de encapsulación.

V. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

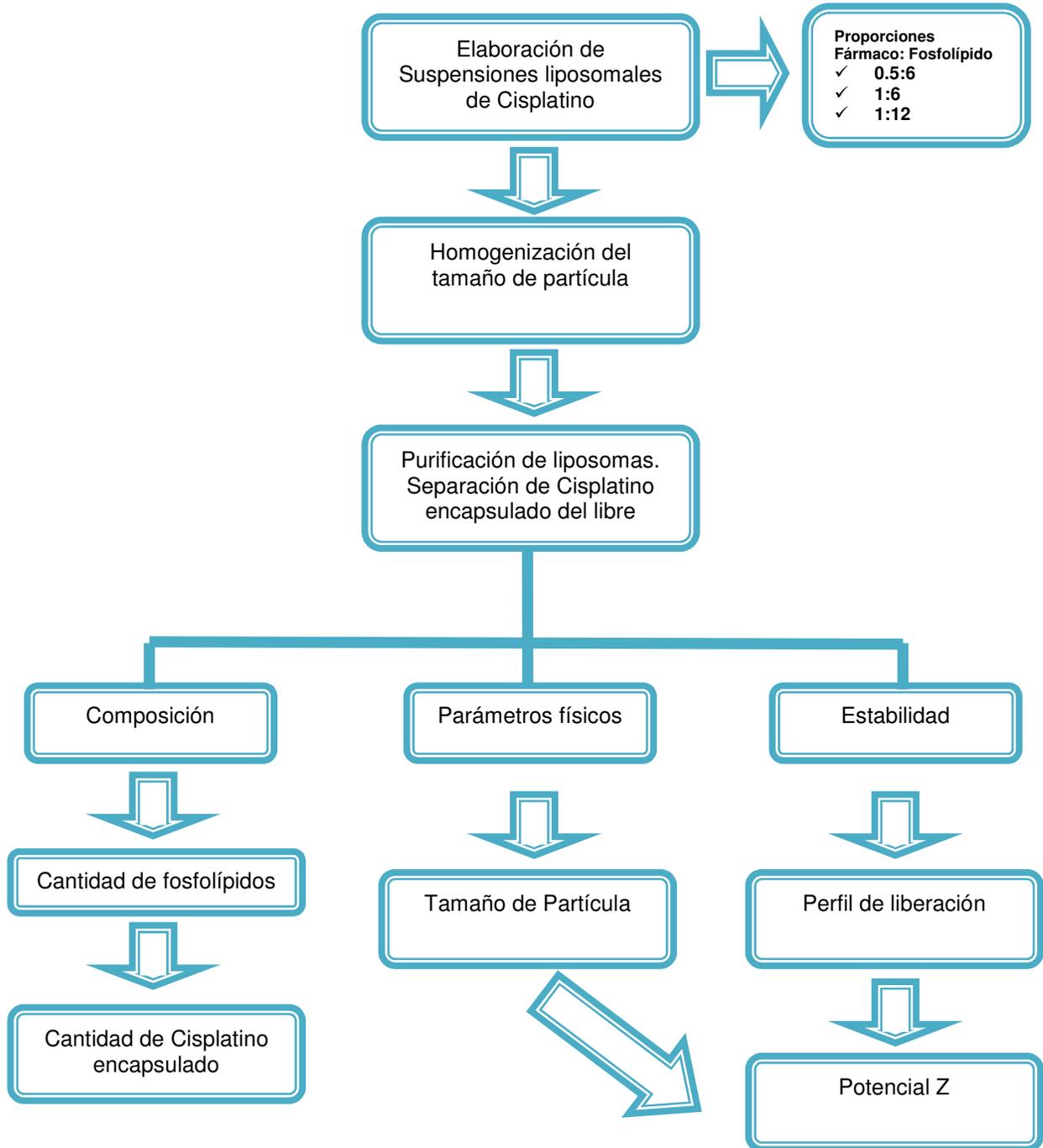
Evaluar la eficiencia de encapsulación de cis-diaminodicloroplatino (II) en una formulación liposomal en función de la proporción fármaco: fosfolípidos.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Elaboración y caracterización fisicoquímica de una formulación liposomal de cis-diaminodicloroplatino (II) en función de la proporción fármaco: fosfolípidos.
- Determinar la eficiencia de encapsulación de cis-diaminodicloroplatino (II) en función de las distintas proporciones fármaco: fosfolípido.
- Evaluar el perfil de liberación de cis-diaminodicloroplatino (II) de una de las formulaciones liposomales como una medida de la estabilidad de la formulación.

VI. METODOLOGÍA

El siguiente esquema representa las etapas de la metodología realizada en el trabajo de tesis.



6.1 PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS CON CISPLATINO MEDIANTE LA FASE REVERSA

Se elaboraron 3 diferentes formulaciones liposomales de acuerdo a las siguientes proporciones en masa de fármaco: fosfolípidos: 0.5:6, 1:6 y 1:12, todas las formulaciones fueron preparadas a un volumen de 2.5mL (**Tabla 4**). Cabe resaltar que la proporción 1:12 es el doble en masa que la proporción de 0.5:6.

Tabla 4. Componentes de las distintas formulaciones liposomales realizadas.

Componentes/ Formulación	0.5:6	1:6	1:12
Concentración fosfolípido (stock 1)	50mg/mL	50mg/mL	100mg/mL
Concentración Cisplatino	4.1mg/mL	8.2mg/mL	8.2mg/mL

Estas formulaciones liposomales se realizaron mediante la técnica de fase reversa, utilizando como componentes HSPC (Fosfatidil Colina de Soya Hidrogenada) (Avanti, USA), Colesterol (Avanti, USA) y DSPE- mPEG2000 (1, 2 Distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[metoxi (polietilenglicol) 2000]) (Avanti, USA), en proporciones de 60:35:5 respectivamente disueltos en una mezcla de cloroformo: metanol (1:2) (Sigma, USA).

Para la elaboración, se goteó la fase orgánica en una la disolución de Cisplatino en agua a temperatura de 65°C. La fase orgánica se evapora al contacto con la fase acuosa formando de inmediato liposomas multilaminares (MLVs). Para disminuir el tamaño de partícula durante el proceso de elaboración, la solución se mantuvo en sonicación (Bransonic 2510, EUA), con una frecuencia de 40kHz, una potencia de 100W y 65°C de temperatura.

Posteriormente la suspensión liposomal se transfirió al rotavapor (Laborota 400 Heidolph, Alemania) para evaporar por completo la disolución orgánica, a presión reducida con una agitación de 150 rpm y sonicando al mismo tiempo. Para remover restos del disolvente orgánico se colocó la suspensión liposomal en un desecador al vacío durante 24 horas.

6.2 PURIFICACIÓN DE LIPOSOMAS MEDIANTE EL EQUILIBRIO DE MEMBRANAS

Para eliminar el Cisplatino libre (no encapsulado) del que se encuentra en los liposomas, se colocó la suspensión liposomal en equilibrio Donnan de membrana empleando una membrana de 12000-14000 mwco (peso molecular de corte) (Spectra/Por®, USA) y como medio receptor solución salina isotónica, utilizando una proporción de 1:20 de suspensión liposomal y SSI.

La diálisis se mantuvo en agitación durante 4 horas, cambiando el medio receptor cada 2 horas.

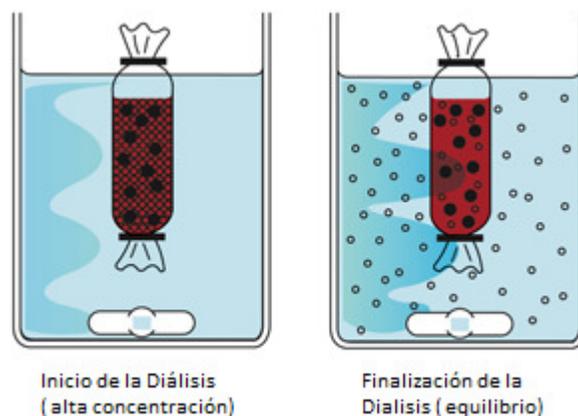


Figura 26. Esquema de una diálisis

En la **Figura 26** muestra un esquema en el cual representa el inicio de la diálisis, donde la concentración de Cisplatino no encapsulado está en mayor concentración dentro de la membrana en comparación con la concentración del medio receptor, una vez que inicia la agitación, el sistema llega al equilibrio (misma concentración de Cisplatino libre dentro y fuera de la membrana). En la purificación de las formulaciones liposomales elaboradas se cambió de medio receptor cada 2 horas hasta llegar a un punto en que la difusión del Cisplatino no encapsulado entre la membrana de diálisis sea nula.

6.3 DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

La determinación del tamaño de partícula se realizó mediante la dispersión dinámica de luz a 90° en el equipo 90PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments, USA), una temperatura de 25°C y utilizando como medio de suspensión KNO_3 10mM.

Para garantizar que las celdas estuvieran libre de polvo y no interfirieran en la medición de este parámetro, estas se lavaron tres veces con la disolución KNO_3 10mM filtrada a través de un poro de $0.22\mu\text{m}$ (Corning, Alemania).

Para la calibración interna del equipo se preparó el Estándar de Referencia que tiene un intervalo de $92 \pm 3\text{nm}$ indicando que funciona correctamente si el valor del estándar se encuentra en estos intervalos.

- Preparación de la disolución KNO_3 10 mM

Para preparar 500mL de solución se disolvieron 0.505g de KNO_3 (Sigma Aldrich, USA) en agua desionizada, posteriormente se filtró la disolución por un poro de $0.22\mu\text{m}$ Corning Syringe Filter (Corning, Alemania).

- Preparación de la muestra

Se agregaron 2mL de la disolución de KNO_3 10mM previamente filtrada en la celda de plástico, después se agregó 5uL de la muestra y se agitó suavemente para ser analizada con el equipo 90PLUS/BI-MAS (Brookhaven Instruments, USA).

6.4 POTENCIAL Z

La determinación de potencial Z se realizó mediante el sistema Zetaplus (Brookhaven Instruments, USA) utilizando como medio de suspensión KNO_3 1mM.

Para confirmar que el equipo funciona correctamente se hace la estandarización interna del equipo asegurándonos el valor del potencial Z del Estándar de Referencia estuviera entre el intervalo de -53 ± 4 mV.

- Preparación del medio de suspensión KNO_3 1mM.

Se pesaron 50.5 mg de KNO_3 (Sigma Aldrich, USA) para diluir en 500 mL de agua desionizada y después se filtró a través de una membrana con un poro de 0.22um (Corning, Alemania).

- Preparación de la muestra

En la celda de plástico se depositaron 1.7 mL de KNO_3 1mM, se agregaron 10uL de la muestra, se agitó suavemente y se insertaron los electrodos previamente lavados con KNO_3 1mM evitando la formación de burbujas, después fue conectado al equipo 90 PLUS/BI-MAS.

6.5 CUANTIFICACIÓN DE FOSFOLÍPIDOS

Se realizó la cuantificación de fosfolípidos mediante la formación de un cromóforo que se lee a una longitud de onda de 488nm. La formación de este cromóforo se da por el método colorimétrico conocido como reacción de Stewart.³²

- Preparación de la curva Patrón

Se realizó un Stock de HSPC con una concentración de 0.2 mg/mL en cloroformo. A partir de esta solución se preparó la curva patrón de 0.00-0.08mg/mL.

Se agitó cada una de las concentraciones de la curva patrón durante un minuto, se agregó 750uL de ferrotiocianato de amonio (NH_4FeSCN), agitó y se centrifugó a 1000rpm durante 3 minutos.

Para leer en el espectrofotómetro se removió la fase del ferrocianato de amonio (NH_4FeSCN) de la fase orgánica y ésta se leyó a una densidad óptica de 488nm en un espectrofotómetro UV-Vis (DU 500 Beckman, USA), empleando como blanco cloroformo.

- Preparación de la muestra

Se realizó una disolución 1:20 de la suspensión de liposomas y de esta dilución se tomaron 20uL los cuales se deshidrataron (secaron) utilizando un concentrador SpeedVac (DNA120, Thermo Electron Corporation, USA) durante 90min sin calentamiento. Posteriormente se resuspendió la muestra con 15uL de agua desionizada, se agitó y nuevamente se deshidrató durante 90min. Finalmente se resuspendió el botón con 750uL de cloroformo y se agitó por 2 minutos; después se agregaron 750uL de ferrocianato de amonio (NH_4FeSCN) para posteriormente agitarla durante 2 minutos y centrifugarla por 3 min a 1000rpm a 4°C.

Al final se retiró la fase acuosa (NH_4FeSCN) y se leyó la fase orgánica a una densidad óptica de 488nm en un espectrofotómetro (DU 500 Beckman, USA). Este método se realizó en hielo para evitar la evaporación del cloroformo.

6.6 CUANTIFICACIÓN DE CISPLATINO ENCAPSULADO

La cantidad de Cisplatino encapsulado se determinó mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) utilizando un equipo Waters – Alliance 2695 acoplado a un detector Visible-UV Waters 2489. Las condiciones que se utilizaron para determinar este parámetro de muestras en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Condiciones para cuantificar Cisplatino en el HPLC.

Velocidad de flujo	1.6mL/min
Temperatura	23°C
Fase estacionaria	Columna C_{18} 5.9x 150mm con un poro de 5 μm (Symetry®, USA)
Detector	UV-Vis. $\lambda = 254\text{nm}$
Fase móvil	Agua/Metanol/ Acetonitrilo 28:40:32
Volumen de inyección	20uL
Estándar Interno	NiCl_2

Se preparó una solución Stock de 1mg/mL de Cisplatino en solución salina. A partir de esta solución se preparó una curva patrón de 0-10u/mL para la cuantificación del Cisplatino en las muestras de la formulación liposomal.

- Preparación de NiCl_2 de 50ug/mL.

Se preparó una disolución con una concentración de 50ug/mL a partir de un Stock de 1mg/mL de NiCl_2 en agua desionizada. Esta disolución es almacenada a -20°C .

- Extracción de Cisplatino en liposomas

De las muestras liposomales se realizó una dilución 1:100 de la cual se tomó una alícuota de 100 μL , a esta muestra se le agregó 400 μL de acetonitrilo (Sigma grado HPLC, USA) y se agitó para romper los liposomas, se centrifugó por 10 minutos a 10000 rpm, se tomaron 400uL del sobrenadante, se depositaron en un tubo eppendorf, y se secaron en un baño de agua a 40°C utilizando nitrógeno gaseoso. Una vez secas las muestras se resuspendió el botón con 100 μL de la solución salina isotónica, se agitó, se agregaron 10 μL del estándar interno (50 $\mu\text{g/mL}$); 10 μL de DDTc, las muestras se agitaron y se incubaron por 30 minutos a 37°C con una agitación contante de 500 rpm (Thermomixer Compact, Eppendorf, USA).

Después de la incubación se agregaron 100uL de cloroformo, esta mezcla se agitó durante 3 minutos para posteriormente ser centrifugado a 10000rpm durante 10 minutos a 4°C . Por último, se inyectó la fase de cloroformo para cuantificar el Cisplatino encapsulado mediante la formación del complejo mostrado en la **Figura 23** de la **página 21** a una densidad óptica de 254nm en un detector de U.V- Vis. El cromatograma en donde se muestra el tiempo de retención del complejo y el estándar interno se muestra en la **Figura 27**.

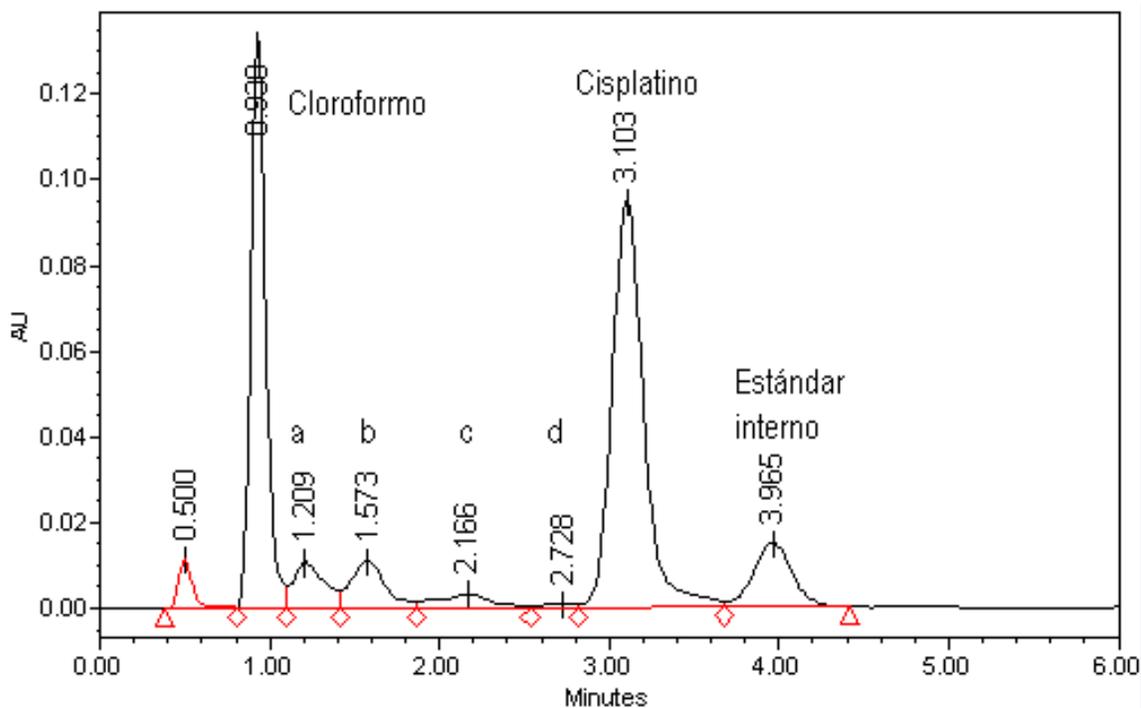


Figura 27. Cromatograma obtenido en la concentración de 10ug/mL, se muestra el tiempo de retención del cisplatino de 3.1 minutos y del NiCl_2 a los 4 minutos.

6.7 PERFIL DE LIBERACIÓN DE SUSPENSIONES LIPOSOMALES DE CISPLATINO

Para evaluar la estabilidad de las suspensiones liposomales se utilizaron las celdas de difusión vertical tipo Franz (PermeGear, USA) como se muestra en la **Figura 28**.

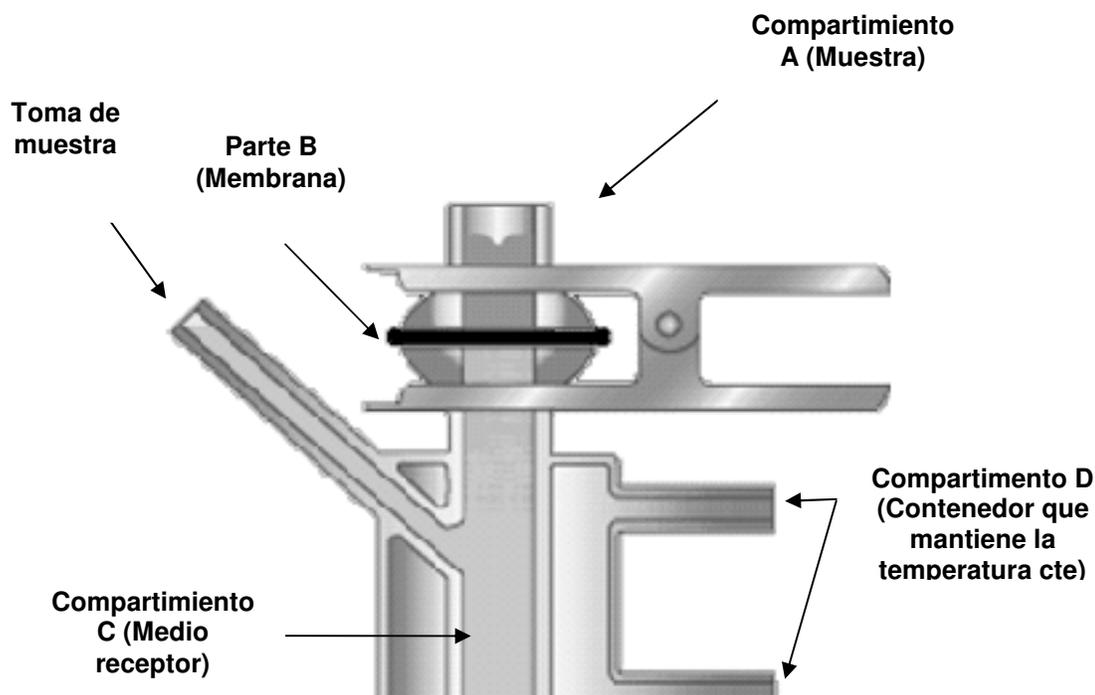


Figura 28. Esquema de una celda de Franz

Se colocó una membrana de policarbonato con un tamaño de poro de 0.050 μm (Whatman Nucleopore, Canadá) entre el compartimiento A y C, después se llenó con solución salina el compartimiento C hasta el aforo evitando la formación de burbujas, por último en el compartimiento A se colocó 1 mL de la muestra.

Una vez que se ensambló el dispositivo, éste se colocó en el sistema de agitación (PermeaGear, USA) conectado a un baño recirculador (Termo-circulador, LabTech) a temperatura ambiente.

- Preparación de la muestra

Se hizo una dilución 1:2 en agua destilada estéril la cual se colocó en el compartimiento A.

- Recolección de la muestra

Se recolectó el medio receptor del compartimiento C a los tiempos establecidos para la toma de muestra. Una vez retirado el medio receptor se vuelve a llenar la celda con solución salina hasta la marca de aforo y se muestrea hasta el tiempo siguiente.

Los tiempos que se establecieron para la toma de muestra fueron: 30 min, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h, 24h y 48h.

- Cuantificación de Cisplatino Liberado.

El Cisplatino se cuantificó utilizando un equipo HPLC siguiendo las condiciones mencionadas anteriormente.

6.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se reportaron los resultados como el promedio \pm la desviación estándar. Se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de un factor para comparar las medias de las distintas formulaciones liposomales realizadas, utilizando el programa EXCEL 2007. Aplicando un nivel de confiabilidad del 95% y se acepta que existe diferencia entre las medias estadísticamente significativa si $p < 0.05$.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 PARÁMETROS FÍSICOS

7.1.1 TAMAÑO DE PARTÍCULA

De acuerdo a la distribución poblacional de tamaño de partícula de formulaciones liposomales serán reconocidos o no inmediatamente por el Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM).^{24, 25,26} Para permanecer por mucho mayor tiempo en circulación y no ser reconocidos rápidamente, los liposomas deben de tener un tamaño menor a 200nm.^{21, 24, 25, 26}

La **Tabla 6** muestra el índice de polidispersidad de formulaciones liposomales elaboradas, lo cual indica que tienen una distribución de tamaño de partícula homogénea porque el valor de polidispersidad es muy lejano a 1 y entre más cercano esté el valor de polidispersidad de cero demuestra que hay homogeneidad del tamaño de partícula.

Tabla 6. Índice de Polidispersidad de Formulaciones Liposomales.

Suspensión liposomal	Índice de Polidispersidad
0.5:6	0.196±0.013
01:06	0.193±0.082
01:12	0.166±0.011

El valor representa le promedio ± D.E de n=2

En la **Figura 29** muestra los tamaños de partícula efectivos de formulaciones realizadas con las distintas cantidades fármaco: fosfolípidos. El tamaño de partícula efectivo representa el promedio que hay entre la distribución de los tamaños detectados y los tamaños de partícula. De acuerdo a la aplicación del ANOVA de un factor se comprueba que no hay diferencia significativa entre las diferentes formulaciones.

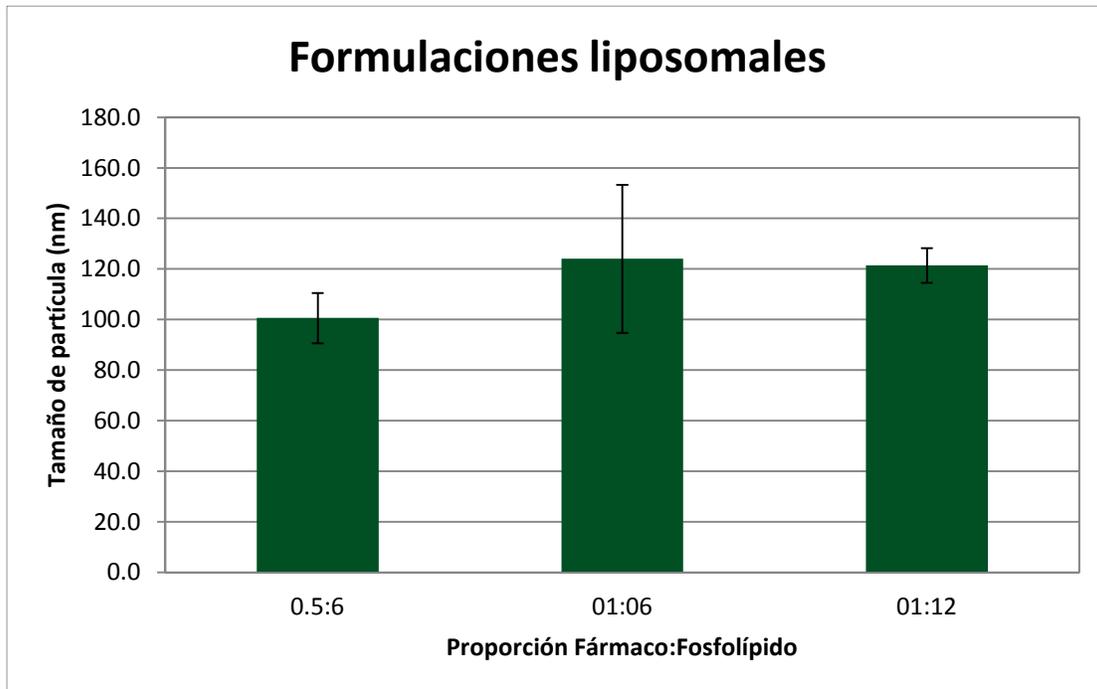


Figura 29. Tamaño de Partícula Efectivo de las diferentes proporciones en cantidad. Se reporta el valor promedio ± D.E de n=2

Aunque no haya diferencias significativas entre los tamaños de partícula efectivos de cada una de las formulaciones, sus distribuciones poblacionales son distintas (tamaño de partícula y población relativa) como se muestra en las **Figuras 30** y **Figura 31**.

En la **Figura 30** representa un histograma de tamaño de partícula contra la población relativa de dos lotes con proporción en cantidad de 0.5:6 fármaco: fosfolípidos, se observa que en cada lote hay dos poblaciones de tamaño de partícula (bimodal o bifásica) en el mismo intervalo de tamaños de partícula, sin embargo, la población relativa entre cada una de las distribuciones es distinta en el Lote 1 (0.5:6) del Lote 2 (0.5:6), es decir, hay un mayor número de liposomas de un tamaño de aproximadamente 81-86.1nm en el Lote 1 (0.5:6) y el Lote 2 (0.5:6) tiene dos poblaciones de liposomas en mayor proporción (60-64 nm y 237.5-295.1 nm).

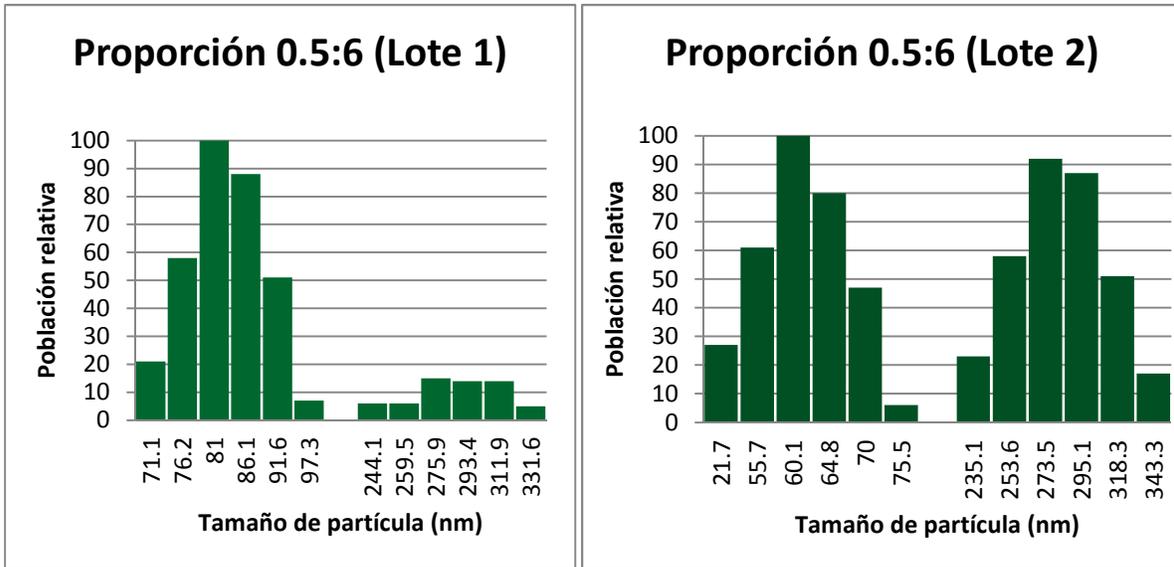


Figura 30. Histograma de tamaño de partícula contra la población relativa de dos lotes con proporción en cantidad de 0.5:6 fármaco: fosfolípidos, se observa que en cada lote hay un comportamiento bimodal en el mismo intervalo de tamaños de partícula, sin embargo la población relativa entre cada una de las distribuciones es distinta.

En la **Figura 31** muestra las distribuciones poblacionales de dos lotes con la proporción fármaco: fosfolípidos 1:12, cada lote tiene un comportamiento bimodal pero los intervalos de tamaño de partícula difieren de un lote a otro, habiendo un mayor número de liposomas de tamaño de 85.4 nm y de 205-214.8 nm en el lote 1 (1:12) y en el lote 2 (1:12) liposomas de tamaño de 163-171 nm en mayor proporción.

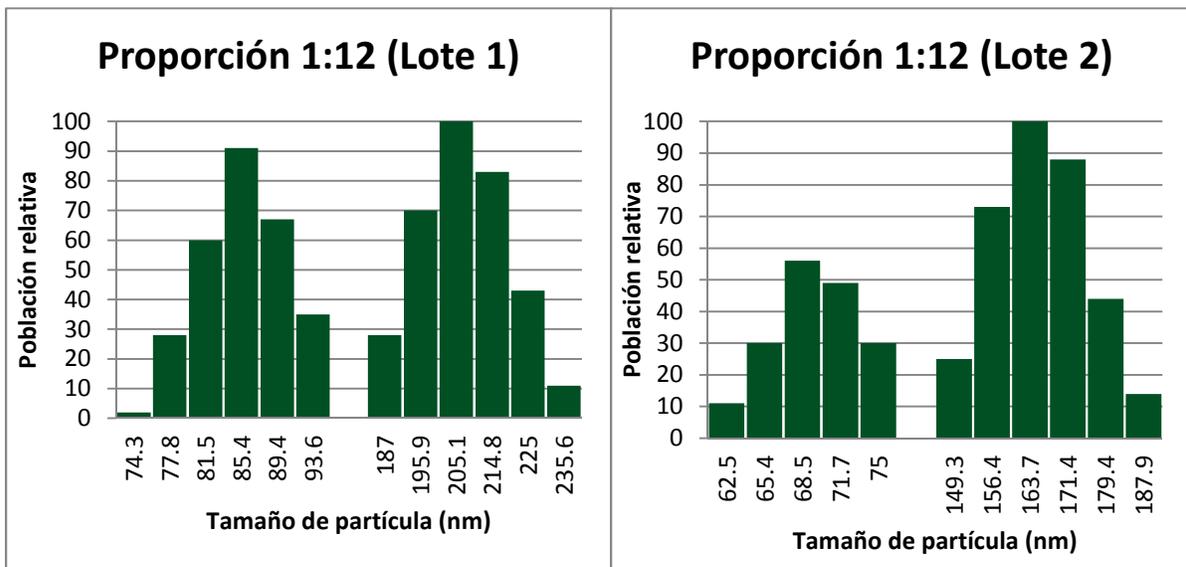


Figura 31. Distribución poblacional de tamaño de partícula de las formulaciones liposomales elaboradas la proporción en cantidad de 1:12 fármaco: fosfolípidos, cada lote tiene un comportamiento bimodal pero los intervalos de tamaño de partícula difieren de un lote a otro.

Aunque cada formulación liposomal se elaboró bajo las mismas condiciones de sonicación, temperatura y agitación, se comprueba que la sonicación es un método de homogenización no repetitivo esto queda demostrado en la interpretación de la **Figura 30** y **Figura 31**.

Como se ha comprobado hasta ahora el tamaño de partícula efectivo no es un buen estimador para comparar el tamaño de partícula de las distintas formulaciones liposomales realizadas, por ello es necesario analizar las distribuciones poblacionales de tamaño de partícula de cada una de las formulaciones.

En este estudio el tamaño de partícula se correlaciona con la cantidad de Cisplatino encapsulado. En la elaboración de liposomas, las poblaciones de tamaño de partícula muy grandes encapsulan mayor cantidad de Cisplatino en comparación con las de un tamaño menor.

El tamaño de partícula óptimo que deben tener los liposomas es de 100-200nm para no ser reconocido inmediatamente por el Sistema Fagocítico Mononuclear.¹⁴ En la **Figura 32** muestra un ejemplo de las distribuciones liposomales de un lote de cada una de las proporciones fármaco: fosfolípidos. Puede observarse que hay una pequeña población de liposomas mayores a 200nm de diámetro por lo que se podría proponer la aplicación de una cromatografía de exclusión molecular para eliminar a estos liposomas, como es una pequeña proporción de liposomas que se encuentran fuera del principio de inclusión no habría una pérdida considerable de liposomas y a su vez de Cisplatino encapsulado.

La razón para que el liposoma tenga un tamaño de partícula óptimo es porque los pueden llegar al tejido tumoral mediante el aumento de la permeabilidad y retención (EPR) que presentan estos tejidos acumulándose y liberando el fármaco encapsulado mediante la interacción del liposoma con la célula (endocitosis, fusión directa, intercambio de lípidos o adsorción).^{21, 24, 25, 26, 29, 30} La llegada de estos liposomas al tejido tumoral se debe a la estabilidad estérica que le da el metoxipolietilenglicol (mPEG), evitando la unión a proteínas del complemento y las inmunoglobulinas que se encargan de eliminar cualquier objeto que reconocen como extraño.^{19, 20, 26, 28}

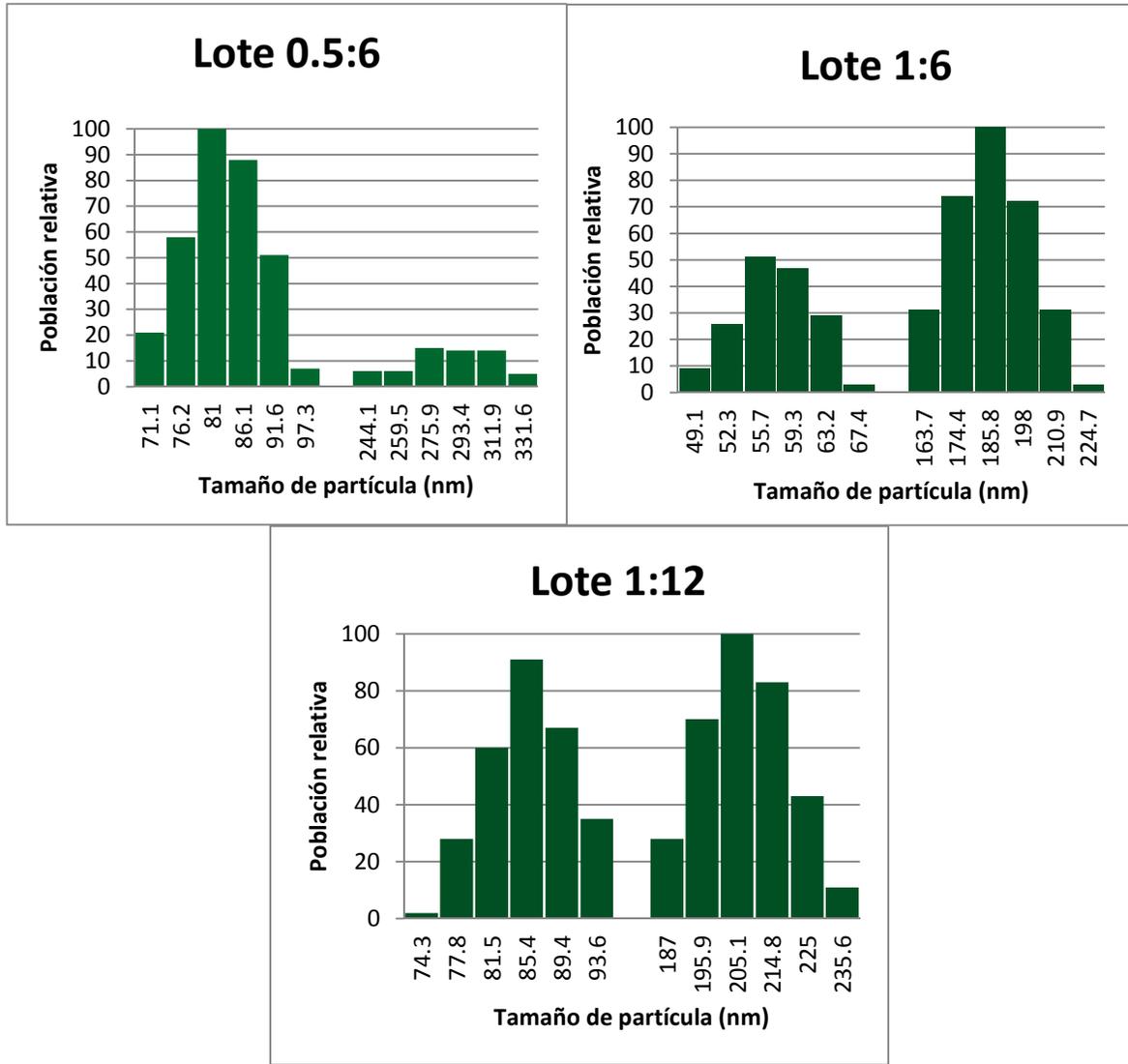


Figura 32. Distribución poblacional de las formulaciones liposomales las proporciones en cantidad de fármaco: fosfolípidos de 0.5:6, 1:6 y 1:12. Todas las formulaciones tienen una distribución bimodal de tamaño de partícula, en diferentes intervalos de tamaño de partícula.

7.2 PARÁMETROS QUÍMICOS

7.2.1 CUANTIFICACIÓN FOSFOLÍPIDOS

El contenido de fosfolípido (HSPC) en cada formulación liposomal fue determinada por un método colorimétrico denominado reacción de Stewart, los resultados obtenidos se presentan en la **Figura 33**.

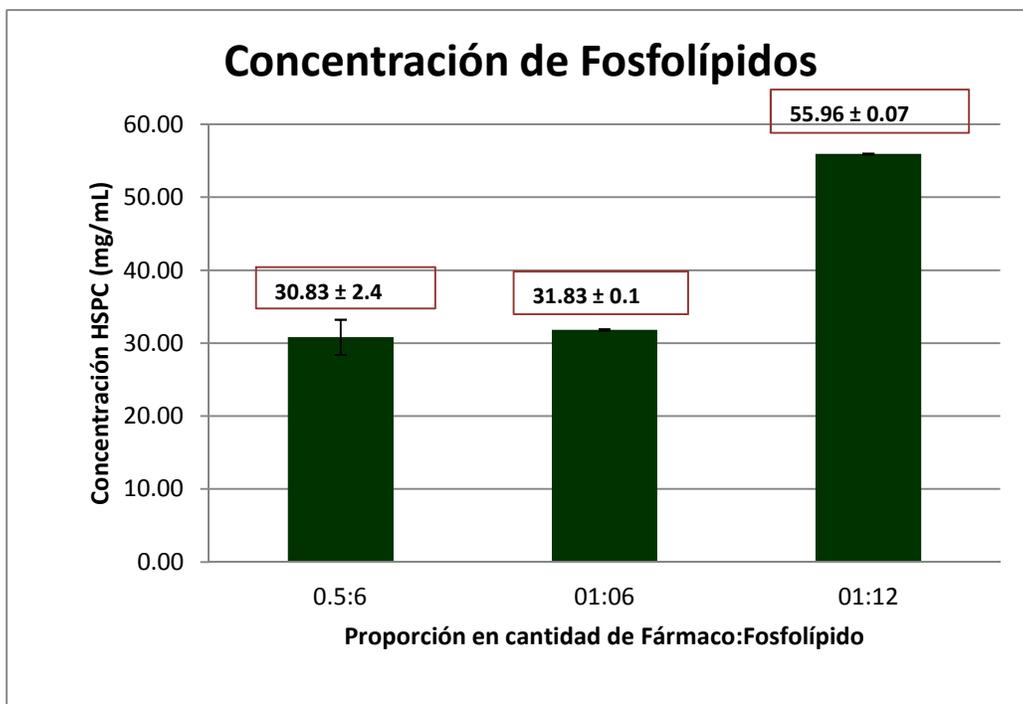


Figura 33. Cantidad obtenida de las distintas formulaciones liposomales realizadas. Se reporta el valor promedio ± D.E de n=2

La concentración de fosfolípidos de las distintas formulaciones elaboradas fue comparada con la concentración de suspensiones liposomales que están aprobadas por la FDA y son comercializadas. Formulaciones liposomales como Caelyx y Doxopeg que tienen como principio activo Doxorubicina, tienen una concentración de HSPC de 9.2 ± 0.57 mg/mL y 10.6 ± 0.77 mg/mL respectivamente, estas determinaciones se realizaron anteriormente en el Laboratorio de Física Médica.⁴³

La concentración de fosfolípido de las proporciones 0.5:6 y 1:6 no muestra diferencia estadística entre ellas, sin embargo, en la proporción 1:12 es estadísticamente variable en comparación con cualquiera de estas dos formulaciones liposomales. Además es de esperarse que el valor de concentración de HSPC en la proporción 1:12 sea aproximadamente el doble que las otras dos proporciones (0.5:6 y 1:6). Asimismo las formulaciones liposomales realizadas no se acercan al valor reportado de formulaciones liposomales Caelyx y Doxopeg⁴³, por lo que se propone evaluar formulaciones de liposomales blanco (sin fármaco encapsulado) con estas concentraciones de HSPC en líneas celulares y en modelos animales para evaluar si en estas concentraciones de fosfolípidos ocasiona un efecto tóxico.

7.2.3 CUANTIFICACIÓN CISPLATINO

La concentración de Cisplatino encapsulado de las distintas formulaciones liposomales se muestra en la **Figura 34**.

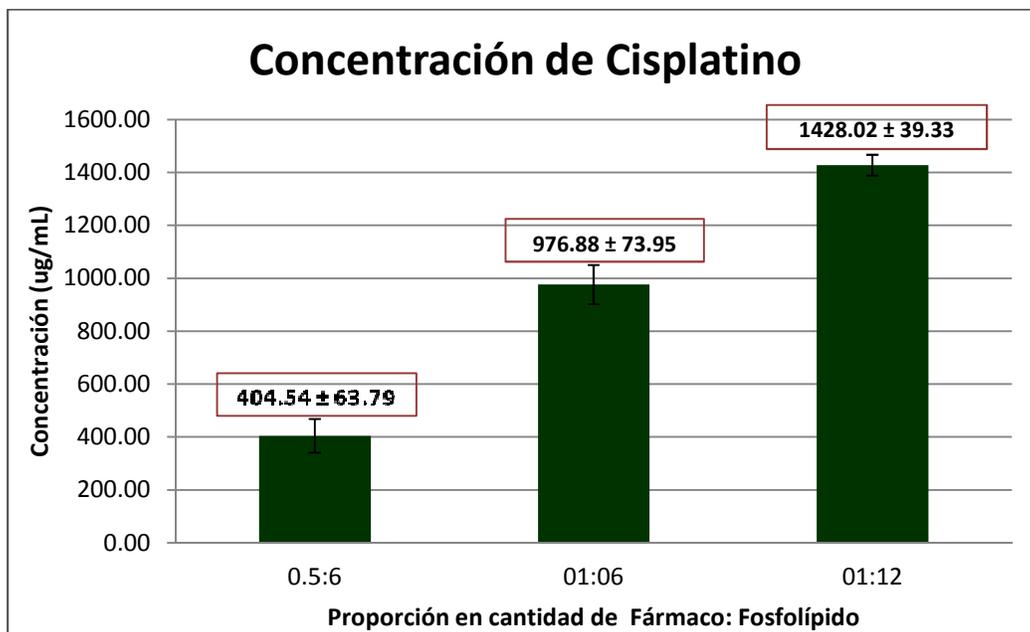


Figura 34. Concentración de Cisplatino encapsulado de las distintas formulaciones liposomales realizadas. Se reporta el valor promedio \pm D.E de n=2

La quimioterapia con Cisplatino se administra a partir de una concentración de 1mg/mL. El Cisplatino aprobado por la FDA viene liofilizado 10mg de este fármaco el cual debe disolverse en 10mL de solución salina isotónica, la duración de este agente antineoplásico en solución salina es de 24h.

En la **Figura 34** muestra que la formulación con la proporción fármaco: fosfolípidos 1:6 se acercan la concentración aprobada por la FDA, además de que la encapsulación de este fármaco por liposomas logrará que los efectos adversos del Cisplatino disminuyan considerablemente y llegue intacto al órgano o tejido blanco. Se recomienda que esta formulación liposomal sea liofilizada para que pueda permanecer estable por más tiempo.

En la **Tabla 9** muestra los resultados obtenidos de la concentración y cantidad encapsulada, y la eficiencia de encapsulación.

Hay variación estadística en la concentración encapsulada, cantidad encapsulada y eficiencia de encapsulación de Cisplatino en las diferentes formulaciones liposomales, esto quiere decir que las proporciones fármaco: fosfolípidos influyen en la concentración de Cisplatino encapsulado y a su vez la eficiencia de encapsulación. Entre mayor sea la proporción de fármaco a encapsular, se obtendrá una concentración de encapsulación más grande en comparación con los lotes que tienen una proporción de fármaco menor.

Tabla 9. Concentración de Cisplatino y porcentaje de encapsulación de Cisplatino en las diferentes formulaciones liposomales.

Proporción en cantidad de Fármaco: Fosfolípido	Concentración de Cisplatino encapsulado (ug/mL)	Cantidad de Cisplatino encapsulado (mg)	% Encapsulación
0.5:6	404.54±63.79	1.01±0.160	9.13±0.57
01:06	976.88±73.95	2.44±0.185	11.12±1.13
01:12	1428.02±39.33	3.57±0.098	15.81±0.55

En la **Figura 35** se compara la eficiencia de encapsulación del cisplatino de cada una de las proporciones fármaco fosfolípido. Se observa que la eficiencia de encapsulación es baja en las tres formulaciones liposomales por lo que es necesario implementar nuevas técnicas para poder mejorar la eficiencia de la encapsulación del Cisplatino y obtener mejores rendimientos.

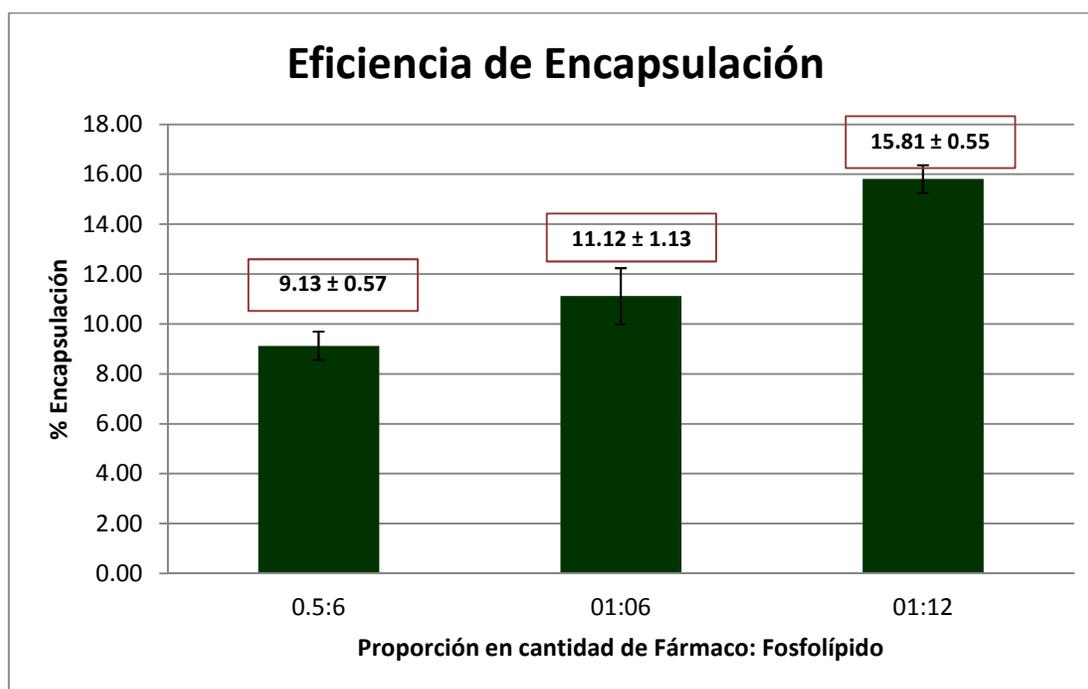


Figura 35. Eficiencia de encapsulación de las distintas formulaciones liposomales realizadas. Se reporta el valor promedio ± D.E de n=2

7.3 PARÁMETRO DE ESTABILIDAD

7.3.1 POTENCIAL Z

Mediante el Potencial Z se determina la estabilidad de formulación liposomal analizando las fuerzas de repulsión electrostáticas entre las partículas.^{36, 37,38} Si el valor del potencial Z es mayor de -40mV indica que la suspensión tiene una estabilidad buena, por lo tanto las fuerzas de repulsión electrostáticas entre las partículas son mucho mayores que las fuerzas de atracción de Van der Waals. Sin embargo si el valor del potencial Z se encuentra entre los -30 mV y -40 mV la estabilidad de la suspensión es moderada.³³

En la Tabla 8 representa el valor del potencial Z de las distintas formulaciones liposomales realizadas.

Tabla 8. Potencial Z de las formulaciones con las diferentes proporciones en cantidad de Fármaco: Fosfolípido.

Muestra	Promedio (mV)
BI-ZR3	-53.65 ± 2.30
0.5:6	-37.48 ± 2.70
01:06	-35.50 ± 2.67
01:12	-38.30 ± 1.16

Se reporta el valor promedio ± D.E de n=2

El Estándar de Referencia BI-ZR3 cae dentro del intervalo de aceptación (-53±4mV) indicando que el equipo funciona correctamente y los valores obtenidos en este equipo son confiables.

De acuerdo a la literatura reportada, la estabilidad de todas las formulaciones liposomales es moderada, esto quiere decir, que las repulsiones electrostáticas entre las partículas es lo suficientemente fuertes y es poco probable la formación de aglomeraciones.

Los valores de estas suspensiones no varían significativamente de acuerdo a la ANOVA aplicada de un factor, lo cual indica que las repulsiones electrostáticas de los liposomas de las diferentes formulaciones son similares.

7.3.2 PERFIL DE LIBERACIÓN

Como una medida de evaluación de la estabilidad de una suspensión liposomal debe de tomarse en cuenta el perfil de liberación para analizar la cantidad liberada de en un determinado tiempo y evaluar la velocidad de fármaco liberado.

La **Figura 36** muestra la concentración de Cisplatino liberado de la formulación liposomal con una proporción fármaco: fosfolípidos de 0.5:6.

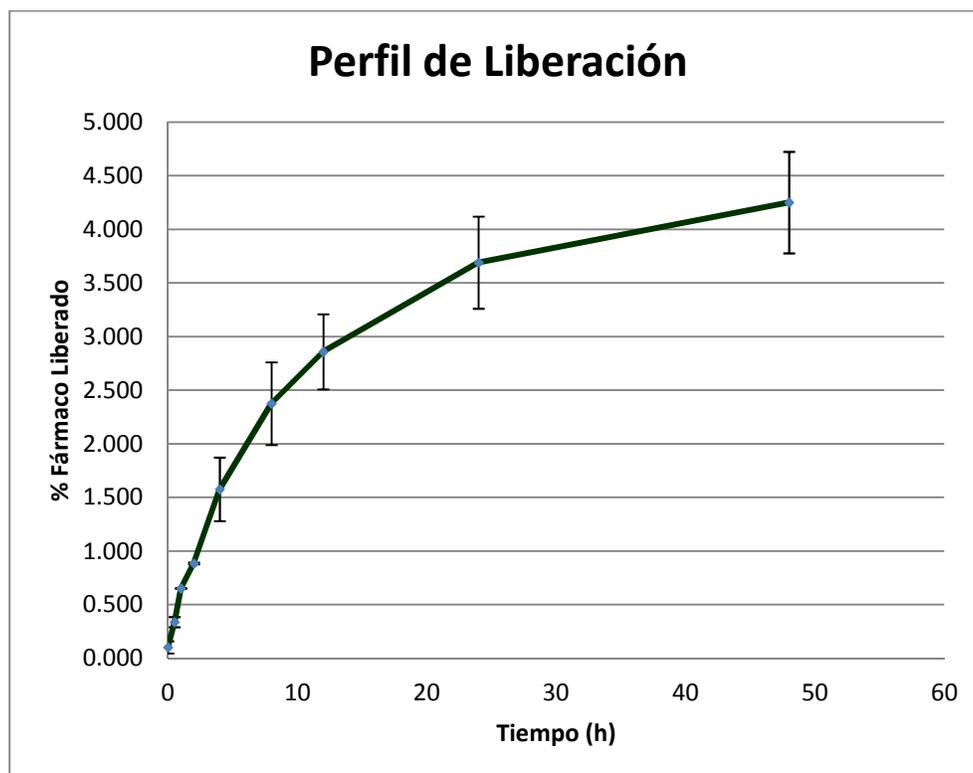


Figura 36. Perfil de liberación Liposomas con Cisplatino. Se reporta el valor promedio \pm E.E de n=2.

Durante un periodo de 48 horas se liberó 0.068 mg de Cisplatino que es aproximadamente el 4.25 % de Cisplatino encapsulado (**Figura 36**), por lo que se demuestra que un porcentaje pequeño de fármaco queda libre a las 48h y se considera que la suspensión liposomal es estable a temperatura ambiente cuando su medio receptor es solución salina isotónica. Este resultado indica que durante el almacenamiento o el tiempo previo a su administración se mantenga estable la encapsulación del fármaco.

Resumen de Resultados:

Parámetros físicos

Se logra obtener tamaños de partícula menores de 350nm en la formulación liposomal con proporción fármaco: fosfolípidos de 0.5:6, y menores de 250nm en las formulaciones liposomales con proporciones fármaco: fosfolípidos de 1:6 y 1:12, lo que se sugiere aplicar cromatografía de exclusión molecular para obtener solamente tamaños de partícula menores a 200nm. Ya que la cantidad de liposomas que tienen un tamaño mayor a 200nm es despreciable y no habría pérdidas considerables de Cisplatino ni de liposomas.

Pruebas de composición

La cantidad de fosfolípidos aún es mayor que lo reportado en formulaciones liposomales comerciales como: Caelyx y Doxopeg aprobadas por la FDA, sin embargo se propone la evaluación de la toxicidad de las concentraciones de fosfolípidos obtenidas (liposomas blanco) en células y modelos animales.

Hay diferencia significativa en la encapsulación de Cisplatino de las diferentes proporciones fármaco: fosfolípidos de 0.5:6, 1:6 y 1:12, por lo que la proporción fármaco: fosfolípidos influye en la encapsulación de Cisplatino. Entre más grande sea la cantidad de Cisplatino y fosfolípidos, hay mayor concentración de fármaco encapsulado.

En la proporción fármaco: fosfolípido 1:6 se obtiene una concentración de 0.977 ± 0.74 mg/mL, similar a la aprobada por la FDA en Cisplatino liofilizado.

Indicadores de estabilidad

Las fuerzas electrostáticas de las suspensiones liposomales son lo suficientemente fuertes para mantener las partículas alejadas entre ellas y evitar la floculación o agregación de estas, indicando que las formulaciones elaboradas son estables.

Se obtuvo un porcentaje pequeño de liberación de Cisplatino del 4.25% durante 48 horas de una suspensión liposomal con una proporción 0.5:6 fármaco: fosfolípido, lo cual se considera que la formulación liposomal es estable a temperatura ambiente.

VIII. CONCLUSIÓN GENERAL

La encapsulación de Cisplatino es directamente proporcional a la cantidad de fármaco y de fosfolípidos. La concentración de Cisplatino de la formulación con proporción fármaco: fosfolípidos de 1:6 se acerca al valor de 1mg/ml de Cisplatino liofilizado aprobado por la FDA, además de tener un tamaño de partícula menor a 250nm (LUVs).

Las distintas formulaciones liposomales tienen un potencial Z moderado (entre -35.50mV y -38.30mV), por lo que son estables.

Es liberado el 4.25% de Cisplatino encapsulado a las 48h a temperatura ambiente lo que indica que es estable a esa temperatura y se garantiza que durante la manipulación de esta formulación durante las primeras 48 h sigue siendo estable la encapsulación del fármaco.

IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Rubin Philip, Oncología Clínica. "Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes", Elsevier, 2003, España, pp.99-146.
2. Díaz R. E., García C. J., "Oncología clínica Básica", Arán, 2000, España, pp.179-185.
3. Bruton L., Chabner B., Knollman B., "Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics", Mc Graw Hill Professional, 12 Ed., 2011, pp.1667-1767.
4. Koda-Kimble M.A et al., "Applied Therapeutics: The clinical use of drugs", Lippincott Williams and Wilkins, 9a Ed., 2009
5. Kelland L., "The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy". Nature. 2007; 7: 573-584.
6. Boulikas T., Vougiouka M., Review: "Cisplatin and Paltinum drugs at the molecular level". Oncology Reports. 2003; 10:1663-1682.
7. "IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Man. Overall Evaluations of carcinogenicity", Vol.7, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 60, 1987.
8. Ramos R.Y., Hernández C.C., "Avances recientes de la determinación analítica de cisplatino y sus productos de hidrólisis". CENIC Ciencias Químicas. 2009; 40:1-10.
9. Matysiak W., Gustaw-Rothenberg K., Review: "Pharmacological profile and clinical features of Cisplatin". Journal of pre-clinical and clinical research.2009; 1: 020-023.
10. Alison K. Holzer, Gerald H. Manorek, and Stephen B. Howell. "Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of Cisplatin, carboplatin and oxiplatin". Molecular Pharmacology. 2006; 4:1390-1394.
11. Awasthi V.D., Goins B., Klipper R., Phillips W.T., "Dual radiolabeled liposomes: Biodistribution studies and localization of focal sites of infection en rats". Nuclear Medicine and Biology. 1998; 25: 155-160.

12. López R.V., "Estudio de la biodistribución y farmacocinética de nanoesferas lipídicas cargadas con cis-diaminodicloroplatino (II) y marcadas con núcleos radioactivos de Indio-111 en un modelo tumoral de cáncer cervicouterino en roedores". Tesis de licenciatura. Facultad de química. UNAM, México 2008.
13. Page C.P., Curtis M.J., Sutter M.C., Walker M.J.A., Hoffman B.B., "Farmacología Integrada", Elsevier, 1998, pp. 511.
14. Drummond D.C., Meyer O., Hong K., Kirpotin D.B. and Papahadjopoulos D., "Optimizing Liposomes for Delivery of Chemotherapeutic Agents to Solid Tumors". *Pharmacological Reviews*. 1999; 51:691-744.
15. Torchilin P.V. "Multifunctional Pharmaceutical nanocarriers". Springer Science, 2008; 1-32.
16. Castro E.A., "Las Drogas Liposomales". *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas*. 1999; 89:625-634.
17. Devlin T M. "Bioquímica: Parte I. Estructura de las macromoléculas", Ed. Reverté, 2004, España, pp. 505-510.
18. Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S., Richmond W., Fu P.C., "Enzymatic Determination of Total Serum Cholesterol". *Clinical Chemistry*. 1974; 20: 470-475.
19. Romberg B., Hennink W.E., and Storm G., "Sheddable Coatings for Long-Circulating Nanoparticles". *Pharmaceutical Research*. 2008; 1: 55-71.
20. Immordino M.L., Dosio F., Cattel L., "Stealth Liposomes: Review of the Basic Science, Rationale, and Clinical Applications, Existing and Potential". *International Journal of Nanomedicine*. 2006; 3:297-315.
21. Torchilin V.P., "Targed Pharmaceutical Nanocarriers for Cancer Therapy and Imaging". *The AAPS Journal*. 2007; 2: E128-E147.
22. Crommelin D.J.A., Bos G. W., Storm G., "Liposomes. Successful Carrier System for Target Delivery of Drugs". *Business Briefing: Pharmatec*. 2003, 209-213.
23. Reddy J.A., Low P.S., "Enhanced folate receptor mediated gene therapy using a novel pH-sensitive lipid formulation". *Journal Control Release*. 2000; 1-3:27-37.
24. Edward K. A., Baeumner A. J., "Review. Analysis of liposomes". *Talanta*. 2008; 68: 1432-1441.

25. Medina C., Santos-Martínez M.J., Radomski A., Corrigan O.I., Radomski M.W., "Nanoparticles: Pharmacological and Toxicological Significance". *British Journal of Pharmacology*. 2007; 5:552-558.
26. Sinha R., Kim G.J., Nie S., Shin D.M., "Nanotechnology in cancer therapeutics: bioconjugated nanoparticles for drug delivery". *Molecular Cancer Therapeutics*. 2006; 8; 1909-1917.
27. Pradhan P., Giri J., Rieken F., Koch C., Mykhaylyk O., Döblinger M., Banerjee R., Bahadur D., Plank C., "Target temperature sensitive magnetic liposomes for thermo-chemotherapy". *Journal of Control Release*. 2010; 1:108-121.
28. Jang S.H., Wientjes M.G., Lu D., "Review: Drug delivery and transport to solid Tumors". *Pharmaceutical Research*. 2003; 20:1337-1350.
29. Clares N. B., "Sistemas de Transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: Liposomas multilaminares portadores de Acetonido de Triamcinolona, Tesis Doctoral, España .2003.
30. Malam Y., Loizidou M., Seifalian A.M., "Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer". *Trends in Pharmacological Sciences*. 2009; 30: 592-599.
31. Uhumwangho M.U., Okor R.S., "Current trends in the production and biomedical application of liposomes: a review". *Journal of Biomedical Sciences*. 2005; 4: 9-21.
32. Stewart J., "Colorimetric Determination of Phospholipids with Ammonium Ferrothiocyanate". *Analytical Biochemistry*. 1980; 1:10-14.
33. Manual de operación: "Multi angle Particle sizing option. 90Plus/BI-MAS", Brookhaven Instruments Corporation 2007.
34. Clark N.A., Lunacek J.H., Benedek G.B., "A study on Brownian Motion Using Light Scattering". *American Journal of Physics*. 1970; 38: 575-585.
35. Englitz, Bernhard; "Dynamic light scattering", *Biophysical Measurement (Physics 172)- UCSD- Spring ,2002*
36. Juárez Osornio C. "Elaboración y caracterización de nanoesferas lipídicas cargadas con cis-diaminodicloroplatino (II) y marcadas con núcleos radioactivos de In-111 con potencial como sistema de quimiorradiación en tratamiento de cáncer". Tesis de Licenciatura, Facultad de química, UNAM, México, 2006.

37. NBTC. 2102 .Zeta potential Theory. Cornell University.
<http://www.nbtc.cornell.edu/facilities/downloads/Zetasizer%20Chapter%2016.pdf>
38. Muller R.H., Mäders K., Gohla S., "Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery- a review of the state of the art". European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. 2000; 1: 161-177.
39. Manual de operación: "Zeta potential Analyzer".90Plus/BI-MAS, Brookhaven Instruments Corporation 2007.
40. Lewis W.K., Squires L., Broughton G., "Industrial Chemistry of Colloidal and Amorphous Materials", Macmillan, 1942, pp. 164-177
41. 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; 4: 349-356.
42. Szoka F., Papahadjoulo D., "Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation". Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1978; 5:4194-4198
43. Martínez A. L., "Evaluación Fisicoquímica de formulaciones Liposomales de Doxorubicina", Facultad de química. UNAM, México 2010.
44. Meng M, Kuntz R, Fontanet A, Bennett P.K., "A novel Approach to quantify unbond Cisplatin, Carboplatin and Oxaliplatin in human plasma ultrafiltrate by measuring platinum-DDTC Complex using LC/MS/MS.", Tandem Labs, Utah, Presentado en la conferencia ASMS 2006.
45. Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, 8ª ed, México: Secretaría de Salud, Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. 2004. pp.939, 374-382,417-422.