



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN Y EL
PROCESO DE ELABORACIÓN DE LIPOSOMAS DE
SIROLIMUS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

LUIS ANGEL TONIX ABURTO

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2017





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: MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD
VOCAL: VERÓNICA ZAMORA SALAZAR
SECRETARIO: JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERON
1er. SUPLENTE: ANDREA SAORI MAJLUF TREJO
2º SUPLENTE: LUZ ANTONIA BORJA CALDERON

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LOS LABORATORIOS 001-003 DEL EDIFICIO F DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA Y EN EL LABORATORIO 100 DE LA UNIDAD DE POSGRADO DEL DEPARTAMENTO DE QUÍMICA INORGÁNICA Y NUCLEAR, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARIA JOSEFA BERNAD BERNAD
SUPERVISOR TÉCNICO:

M. EN C PEDRO JAVIER SALAS AMBROSIO
SUSTENTANTE:

LUIS ANGEL TONIX ABURTO

ÍNDICE

1.- Resumen.....	1
2.- Antecedentes.....	3
2.1 Medicamentos.....	3
2.1.1 Medicamentos de Liberación Convencional.	4
2.1.2 Sistemas de Liberación Modificada	5
2.2 Liposomas.....	11
2.2.1 Características y Clasificación.....	12
2.2.2 Preparación de liposomas.	15
2.3 El síndrome de Sjögren (SS)	17
2.4 Sirolimus.....	18
2.4.1 Actividad Farmacológica del Sirolimus.	20
2.4.2 Farmacocinética	22
2.4.3 Efectos Adversos.....	23
2.5 Liposomas de Sirolimus.....	23
2.6 Diseño de Experimentos	25
2.6.1 Clasificación y Selección de los Diseños Experimentales.	27
2.7 Diseño Robusto (Taguchi).....	29
2.7.1 Arreglos Ortogonales	31
2.8 Uso del Diseño de Experimentos Taguchi en la Elaboración de liposomas	31
2.9 Análisis del Efecto de Modo de Fallo (EFEMA).....	32
3.- Hipótesis.....	35
4.- Objetivo.....	35
4.1 Objetivos Particulares	35
5.- Metodología.....	36
5.1. Materiales	36
5.2 Elaboración de Liposomas.....	36
5.3 Caracterización de liposomas	39
5.4 Optimización.....	43
5.4.1. Análisis del Efecto de Modo de Fallo (EFEMA).....	43

5.4.2. Diseño de Experimentos Taguchi	43
6.- Resultados y Discusión	46
7.- Conclusiones.....	73
8. Perspectivas	74
9. Bibliografía	75

ÍNDICE ABREVIATURAS

°C: grados Centígrados

µm: micrómetros

FRA: ferrotiocianato de amonio

CMC: Concentración Micelar Crítica

D: Clasificación de Detección

DLS: Difusión de Luz Dinámica

DOE: Design of Experiment

DOET: Design of Experiment Taguchi

DOET 1 L18: Design of Experiment Taguchi 1 whit 18 Experiment

DOET 2 L9: Design of Experiment Taguchi 2 whit 9 Experiment

DOET 3 L9: Design of Experiment Taguchi 3 whit 9 Experiment

EFEMA: Análisis de Efecto de Modo de Falla

EP: etil parabeno

EPFE: etil parabeno-fenoxietanol

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos

FE: fenoxietanol

g: gramos

GUV: Vesículas Unilaminares Gigantes

h: horas

HPLC: Cromatógrafo Líquido de Alta Presión

kDa: kilodaltons

L: litro

LUV: Vesículas Unilaminares Grandes

M: molaridad

Mani: manitol

mbar: milibar

mg: miligramos

min: minutos

mL: mililitros

MLV: Vesícula Multilaminar

mm: milímetros

mM: milimolar

mol: moles

mTOR: mechanistic target of rapamycin

mV: milivoltio

MVV: Vesícula Multivesicular

ng: nanogramos

nm: nanómetro

O: ocurrencia

OLV: Vesícula Oligolaminar

p: peso

pH: potencial de Hidrógeno

rpm: revoluciones por minuto

RPN: Número de Prioridad de Riesgo

S: Gravedad del Efecto

saca: sacarosa

SDS: Dodecilsulfato sódico

SMicro: lecitina grado microbiológico

SS: síndrome de Sjögren

SUV: Vesículas Unilaminares Pequeñas

TEM: Microscopia Electrónica de Transmisión

Trea: trehalosa

UV: ultravioleta

V: volumen

λ_{\max} : longitud de onda máxima

μL : microlitro

μm : micrometro

1.- Resumen

El síndrome de Sjögren (SS) es una enfermedad crónica-degenerativa que se debe a un problema autoinmune que causa una insuficiente producción del componente acuoso de las lágrimas, debido a un ataque linfocitario sobre las glándulas lacrimales, generando una disminución en la lubricación del ojo, y como consecuencia se presenta disminución visual e inestabilidad de la capa lacrimal. El tratamiento consiste en utilizar fármacos inmunosupresores, uno de ellos es sirolimus (rapamicina), el cual inhibe la activación de mTOR evitando la producción y ataque de linfocitos T sobre las glándulas lacrimales, sin embargo, el fármaco podría ser irritante debido a su baja solubilidad que le hace requerir disolventes orgánicos para su administración, además presenta baja permeabilidad ocular y es fotosensible. En el mercado existen formulaciones con sirolimus, destinadas al tratamiento en trasplantes y también para padecimientos tumorales, sin embargo, para el tratamiento mencionado actualmente no hay medicamentos en México. Una alternativa es emplear liposomas, ya que éstos han demostrado su capacidad de encapsular moléculas hidrofílicas e hidrofóbicas, la posibilidad de incrementar el tiempo de permanencia, la capacidad de vectorización y el aumento de la penetración intracelular si se producen en un tamaño menor a 200 nm. Debido a su naturaleza pueden presentar la capacidad de proteger al fármaco y permitir una liberación sostenida del mismo. Uno de los métodos para la obtención de liposomas es mediante calentamiento, sin embargo, la fabricación involucra diferentes etapas por lo que es preciso controlar las variables de proceso y determinar que parámetros afectan de manera significativa las variables de respuesta como son: tamaño de partícula y potencial Z. Para poder realizar una formulación con propiedades adecuadas, se puede recurrir al diseño de experimentos

como el Diseño Experimental Taguchi (DOET), el cual permite determinar los factores de mayor impacto en el proceso para un resultado óptimo utilizando un reducido número de experimentos. En la literatura podemos encontrar información relevante sobre la elaboración de formas farmacéuticas como microesferas, aerosoles, nanopartículas, nanofibras, hidrogeles y en particular liposomas basadas en este tipo de diseño.

Por lo tanto, en este trabajo se realizó la optimización de la formulación y el proceso de elaboración de liposomas de sirolimus utilizando un diseño experimental Taguchi, evaluando sus propiedades fisicoquímicas a través de diferentes técnicas.

2.- Antecedentes

2.1 Medicamentos

Los medicamentos son sistemas de administración de fármacos los cuales tienen como objetivo llegar al sitio de acción de una forma segura, eficaz, reproducible y conveniente, rara vez se encuentran el fármaco puro como forma de administración, ya que habitualmente son acompañados de otros excipientes para construir las formas farmacéuticas. [1]

Los medicamentos se clasifican por su vía de administración en:

- Formas Líquidas Orales
- Formas Sólidas Orales
- Inyectables
- Rectal y Vaginal
- Aerosoles Farmacéuticos
- Formas de Administración sobre la Piel y las Mucosas
- Oftálmicos
- Entre otros

La mejor vía de administración y forma farmacéutica para un fármaco dependerá del sitio de acción y de las propiedades fisicoquímicas del mismo. Algunas de estas propiedades son:

- Tamaño de la partícula.
- pKa
- Forma cristalina:
Polimorfismo, Solido amorfo o cristalinos
- hidrofiliidad o hidrofobicidad
- Estabilidad química:
fotosensibilidad, capacidad de oxidarse o de hidrolizarse

Es por ello que en la actualidad existen gran variedad de medicamentos, que van desde aquellos de liberación convencional, en donde el principio activo a partir de la forma de administración se libera generalmente de

una manera brusca y rápida, y los sistemas de liberación controlada que tiene por objeto la eficiencia terapéutica y la seguridad, disminuyendo la dosis y el número de administraciones. Así mismo mediante estos sistemas es posible transportar y liberar proteínas, así como dirigir los fármacos a lugares específicos reduciendo su toxicidad.[1-3]

2.1.1 Medicamentos de Liberación Convencional.

Son aquellos medicamentos que en general su objetivo es alcanzar rápidamente y mantener una concentración del fármaco en el lugar o lugares de acción durante toda la duración del tratamiento, además de ser eficaces y seguros (mantenerse dentro de la ventana terapéutica). La interacción entre el fármaco, su formulación y su vía de administración determina qué cantidad de fármaco llega a la circulación sistémica y a qué velocidad. Salvo en la vía intravenosa, en la cual el fármaco se introduce de manera directa a torrente sanguíneo. [1, 3]

Para lograr proporcionar una liberación rápida y además mantener la concentración de fármaco dentro del intervalo terapéutico es necesario administrar varias veces al día, lo que puede traer riesgos de toxicidad. [1, 3]. Así también puede ocasionar fluctuaciones en las concentraciones del fármaco en el plasma (Imagen 1), pueden hacer que las cifras de C_{max} y C_{min} aumentan o disminuyen por encima o por debajo de la ventana terapéutica haciendo que el paciente este sobremedicado o submedicado.

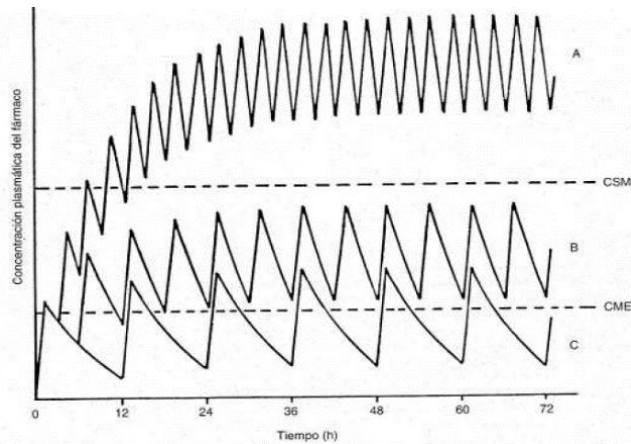


Imagen 1. Administración de dosis de igual tamaño de un fármaco dado. Curva A, intervalo de dosificación de 3 horas. Curva B, intervalo de dosificación de 6 horas. Curva C, tiempo de dosificación 12 horas

[Michael E. Aulton, K.M.G.T., Aulton's *Pharmaceutics The design and manufacture of medicines*, . 4th Edition 2013, pag. 283 fig.19.7]

2.1.2 Sistemas de Liberación Modificada

Durante muchos años se han dedicado grandes esfuerzos al diseño de sistemas que eliminen o reduzcan las oscilaciones (imagen 2) de las concentraciones plasmáticas observadas con los sistemas de liberación convencional y con los regímenes posológicos habituales.

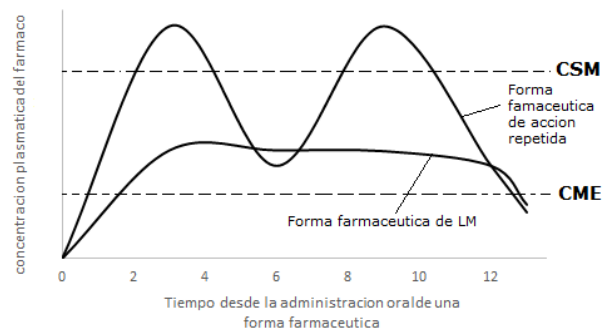


Imagen 2. Comparación de sistema de liberación modificada y convencional
[Chien, Y.W., *Novel Drug Delivery Systems*, J. Swaebrick, Editor. 1992, Taylor & Francis Group: University of north Carolina. Pag 248 fig 12]

En la actualidad existe gran variedad de productos de liberación sostenida. Todos estos sistemas de administración intentan evitar las oscilaciones de las concentraciones plasmáticas observadas con los

sistemas de liberación convencionales. Para poder describir los diferentes sistemas se pueden clasificar en:[2]

1. Velocidad de liberación preprogramada: En donde la liberación se controla por difusión molecular del fármaco a través de una barrera. Se describe mediante la segunda Ley de difusión de Fick. Existen tres tipos:

a) Permeación a través de una membrana polimérica (Imagen 3): El fármaco se encapsula con una membrana de permeabilidad específica para formar un reservorio el cual puede ser sólido, una suspensión o una solución.

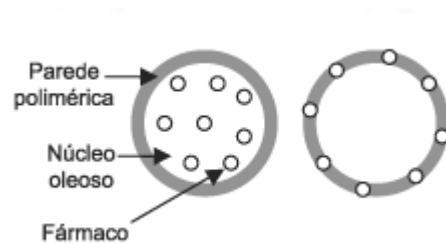


Imagen 3. Modelo de permeación a través de una membrana polimérica

[Chien, Y.W., *Novel Drug Delivery Systems*, J. Swaebrick, Editor. 1992, Taylor & Francis Group: University of north Carolina. Pag 156 fig. 18]

b) Difusión a través de una matriz polimérica: El contenedor es preparado como una dispersión del fármaco en el polímero (hidrofílico o lipofílico), esta dispersión puede lograrse mediante diferentes técnicas como la de difusión del disolvente o por fusión del polímero (Imagen 4).

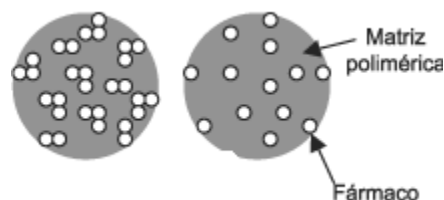


Imagen 4. Modelo de difusión a través de matriz polimérica

[Chien, Y.W., *Novel Drug Delivery Systems*, J. Swaebrick, Editor. 1992, Taylor & Francis Group: University of north Carolina. Pag 156 fig 18]

c) Microreservorio: Implica la microdispersión de una suspensión acuosa del fármaco con un polímero mediante un proceso mecánico de dispersión (homogenización).

2. *Liberación modulada por activación*: La liberación del fármaco desde un reservorio o matriz puede ser facilitada por el suministro de energía mediante diferentes medios.

Dependiendo del tipo de energía usada, estos sistemas se clasifican como físicos, químicos o bioquímicos.

2.1.2a Mecanismos físicos

Presión osmótica: como se observa en la imagen 5 la liberación se rige mediante un gradiente de presión osmótica entre el reservorio del fármaco y el medio que lo cubre. Depende de la permeabilidad al agua y del área superficial efectiva de la membrana semipermeable utilizada. La diferencia de presión provoca la reducción de volumen en el reservorio liberando el fármaco de manera controlada.

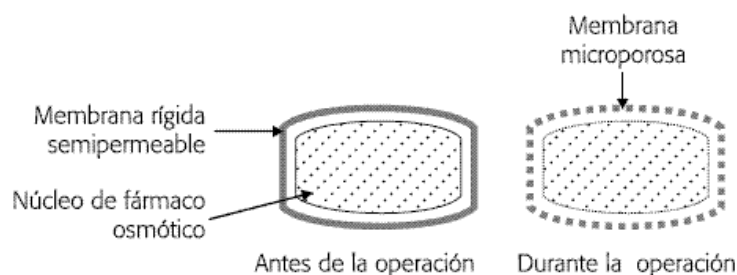


Imagen 5. Ejemplo de presión osmótica

[Chien, Y.W., *Novel Drug Delivery Systems*, J. Swaebrick, Editor. 1992, Taylor & Francis Group: University of North Carolina. Pag 21 fig 18]

- Presión hidrodinámica (Imagen 6): Está constituido por un contenedor en el que se encuentra el reservorio de fármaco, entre estos

compartimientos se encuentra una capa absorbente de un polímero hidrofílico, la cual genera una diferencial de presión hidrodinámica que reduce el volumen del reservorio forzando al fármaco a salir por un orificio de manera controlada.

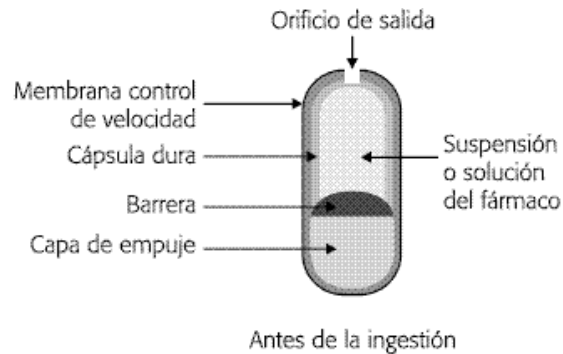


Imagen 6. Ejemplo de presión hidrodinámica

[Sistemas osmóticos de administración oral, Osmotically controlled oral drug delivery systems, Yolima Baena, et al, Rev. colomb. cienc. quim. farm. vol.35 no.2 Bogotá July/Dec. 2006 figure 5]

Activación mecánica: El reservorio de fármaco es contenido en un equipo con un sistema mecánico de bombeo que libera el fármaco en una cavidad específica como la nariz, el volumen liberado es dependiente de la fuerza aplicada y la duración de la activación.

- **Activación magnética:** El reservorio es una dispersión del fármaco en una matriz polimérica. La liberación es lenta por la incorporación de un mecanismo electromagnético (anillos magnéticos) que es activado por vibración.
- **Sonoforesis:** Utiliza energía ultrasónica para abrir los poros de una membrana que contiene el reservorio del fármaco para que este pueda ser liberado.
- **Ionotoforesis:** utiliza corriente eléctrica para activar y modular la difusión pasiva del fármaco a través de una membrana biológica como la piel facilitando su permeación.

- **Hidratación:** El reservorio es homogéneamente dispersado en una matriz de un polímero hidrofílico que se hincha por hidratación.

2.1.2b Mecanismos Químicos

- **Activación por pH:** Como se observa en la imagen 7 este sistema permite dirigir la liberación en una región con un intervalo de pH específico. El reservorio es una dispersión del fármaco con un polímero sensible a cambios de pH que se encapsula con una membrana polimérica como de etilcelulosa. El fármaco es liberado por difusión y controlado por la solubilidad de la membrana y la permeabilidad.

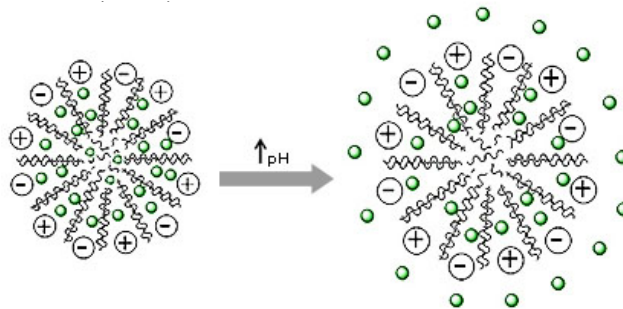


Imagen 7. Ejemplo de activación por pH

[pH-sensitive hydrogels as an improved alternative treatment for inflammatory bowel diseases, Lisette Agüero Luztonó, et al, Rev Cubana Invest Bioméd vol.35 no.3 Ciudad de la Habana jul.-set. 2016, figure 2]

Activación iónica: Es utilizada para fármacos iónicos. Se forma un complejo entre el fármaco y una resina de intercambio iónico con un contraión adecuado, este complejo se recubre con un polímero como el polietilenglicol 400 y se encapsula con una membrana de etilcelulosa (permeable al agua) que regula la liberación por difusión del fármaco en un medio electrolítico con el que intercambia iones hidrólisis: El reservorio del fármaco es dispersado homogéneamente con un polímero en sistemas particulados. La liberación del fármaco es regulada por la hidrólisis que es capaz de degradar el polímero del que se constituyen las partículas.

2.1.2c Mecanismos Bioquímicos

- Activación enzimática: El fármaco se dispersa junto con un polímero biodegradable. La liberación es activada por la hidrólisis enzimática del polímero mediante una enzima específica en un cierto tejido.

3. Regulación por retroalimentación: La regulación se realiza por la concentración de una sustancia química presente en el organismo, la cual es detectada por un receptor que se encuentra dentro del sistema de liberación. Existen varios tipos

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

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

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

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

selectivamente a una célula o tejido blanco de tal manera que el fármaco contenido en el sistema donador pueda ser depositado en ese lugar y ejerza su efecto. Algunos sistemas también incluyen un agente solubilizante que facilite la disponibilidad del fármaco.

2.2 Liposomas

Los liposomas (Imagen 8) son vesículas (esferas huecas) microscópicas que consisten en bicapas lipídicas (generalmente fosfolípidos) rodeando un medio acuoso; similares a las membranas celulares en donde además de fosfolípidos se encuentran proteínas y carbohidratos.[4]

Este sistema se encuentra dentro de los que más contribuyen a diferentes áreas tales como el suministro de fármacos, los cosméticos, la estructura y función de las membranas biológicas. Esto se debe a varias características ventajosas de los liposomas, tales como la capacidad de incorporar no sólo agentes solubles en agua, sino también solubles en lípidos, orientación específica al sitio requerido en el cuerpo y versatilidad en términos de fluidez, tamaño, carga y número de láminas.

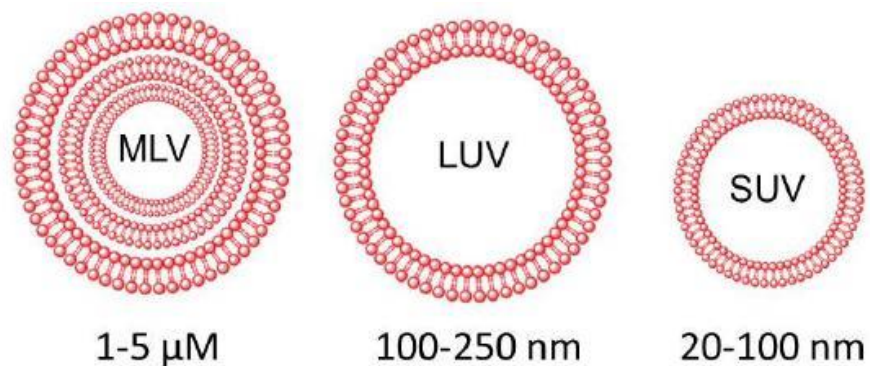


Imagen 8. Liposomas de diferente laminaridad.

[Liposome and Their Applications in Cancer Therapy ,Himanshu Pandey, et al, Braz. arch. biol. technol. vol.59 Curitiba 2016 Epub Mar 08, 2016 figure 1]

2.2.1 Características y Clasificación

En la formación de liposomas, las moléculas lipídicas disueltas, formadas por una cabeza hidrófila y una cola hidrófoba, se autoensamblan al disminuir su solubilidad en el medio. Las moléculas anfipáticas ordinarias tienen una concentración micelar crítica (CMC) de alrededor de 10^{-2} - 10^{-4} M, la CMC de los lípidos formadores de bicapa es de cuatro a cinco órdenes de magnitud menor (Imagen 9), lo que significa que la solubilidad en agua de estos materiales es extremadamente baja. Los grupos que se encuentran en la cabeza del lípido están expuestos a la fase acuosa y los restos hidrocarbonados son forzados a enfrentarse entre sí en la bicapa. [5]

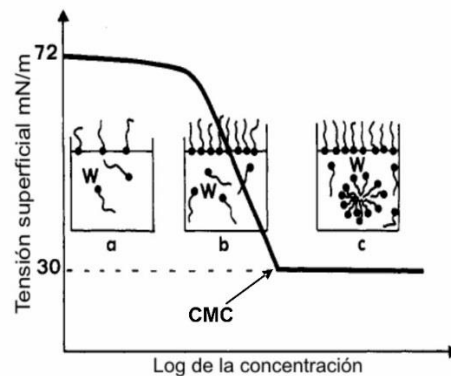


Imagen 9. Diagrama de formación de micelas.

[*Liposome Technology :Liposome Preparation and Related Techniques*, in *Liposome Technology*, G. Gredoriadis, Editor. 2007, Informa Helathcare USA: London, pag 6 fig 2]

Las vesículas de ácidos grasos son termodinámicamente estables por encima de la temperatura de fusión de las mezclas de cadenas de ácidos grasos sólo dentro de un estrecho rango de pH. Si el pH es demasiado alto, se produce la transformación de vesículas en micelas. Si el pH es demasiado bajo, se forman gotas de aceite. Existen regiones de pH de coexistencia de vesículas (bicapas) y micelas, así como vesículas (bicapas) y gotas de aceite (Imagen 10).[6]

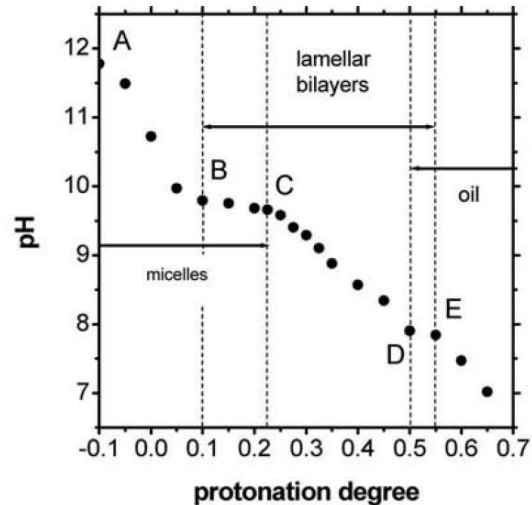


Imagen 10. Formación de micelas, sistemas laminales y separación de fases con el cambio de pH.

[*Liposome Technology :Liposome Preparation and Related Techniques*, in *Liposome Technology*, G. Gredoriadis, Editor. 2007, Informa Helathcare USA: London, pag 8 fig 3]

La presencia del número de carbonos contenidos en un ácido graso puede ser o no despreciable. Esto es, especialmente, en el caso de si la cadena de hidrocarburos es relativamente corta la solubilidad es más grande que los ácidos grasos con altas cantidades de carbonos y como consecuencias directas afectan en las estrategias de preparación de los liposomas (tales como concentración micelar crítica) y como para la estabilidad. Debido a que por debajo de una concentración crítica, no se observa formación de bicapa.[6, 7]

Dependiendo del tipo de liposoma que se pretenda generar, los fosfolípidos más comúnmente utilizados son los fosfolípidos (imagen 11), en particular la fosfatidilcolina de carga neutra y el ácido fosfátídico cargado negativamente, fosfatidilglicerol, fosfatidilserina, y fosfatidiletanolamina, cada uno de los cuales tiene una cabeza polar distinta y puede tener una combinación diferente de cadenas de ácidos grasos en la región hidrofóbica de la molécula. La estearilamina puede emplearse cuando se necesitan liposomas catiónicos. [7]

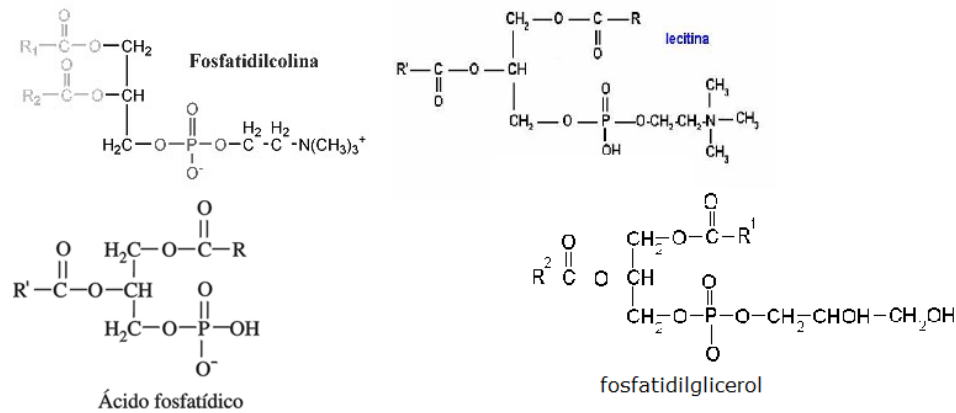


Imagen 11. Estructura de diferentes tipos de fosfolípidos.

Los liposomas, desde una perspectiva morfológica, son más frecuentemente clasificados por su tamaño y número de bicapas lipídicas (imagen 12).

En el caso de ser una sola bicapa la que separa el interior del disolvente externo, según, las estructuras se clasifican en función de su tamaño como vesículas unilaminares pequeñas (SUV) cuyo tamaño puede ser desde 40 hasta 100 nm, grandes (LUV) cuyo tamaño puede ser hasta de 500 nm o gigantes (GUV) con un tamaño mayor a 1 μm. También se ha encontrado que varias estructuras unilaminares están formando parte de una bicapa laminar mayor, a este tipo se denomina multivesicular (MVV) con tamaño mayor a 1 μm. Los liposomas con varias bicapas que atrapan en su interior parte del disolvente se les llama multilaminares (MLV) y su tamaño será mayor a 500 nm. Las vesículas multilaminares cuyo tamaño está en el intervalo de 100 nm hasta 1 μm se denominan oligolaminares (OLV). [6, 8]

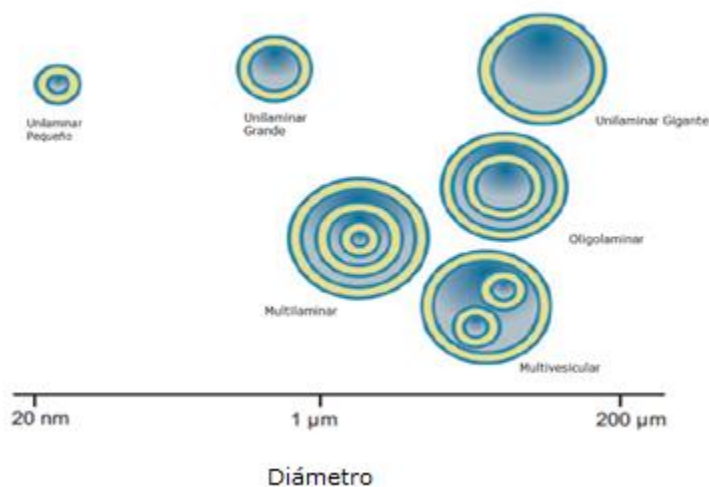


Imagen 12. Clasificación de liposomas.

[Jesorka, A. and O. Orwar, *Liposomes: Technologies and Analytical Applications*. Annual Review of Analytical Chemistry, 2008. **1**(1): p. 804, fig. 2]

2.2.2 Preparación de liposomas.

En la actualidad los liposomas se pueden formar a partir de varios estados iniciales, incluyendo soluciones de monómero, micelas, y bicapas laminares. Existen diferentes métodos para la preparación de liposomas de diferente tamaño y laminaridad (imagen 13). Uno de los métodos más simples (y más populares) es la hidratación de fosfolípido (y / o jabón) donde las moléculas se ponen en contacto con una solución buffer adecuada y dispersar la bicapa laminar formada mecánicamente (en una escala de laboratorio, por lo general sólo agitación) y una temperatura superior a la temperatura de transición de fusión en cadena de las mezclas de fosfolípidos o jabones hidratados [6, 8-11]. Alternativamente, los liposomas se han preparado mediante el ajuste del pH de soluciones de jabón acuosas alcalinas o mediante la inyección de una solución concentrada de fosfolípidos o jabones en una solución buffer [6, 8]. Así como también la formación de lípidos disolviéndose en algún solvente organico (etanol o éter), y la disolución se inyecta rápidamente en una

disolución buffer con la que se quiere trabajar, dando lugar a la formación espontánea de vesículas. [6, 8] Cualquiera de estas técnicas de preparación generalmente resulta en vesículas multilamelares con una distribución de tamaño polidispersa. Por lo tanto, un procedimiento de encolado hacia abajo es generalmente necesario para obtener vesículas que son homogéneas con respecto a la distribución de tamaño y lamellaridad. Como en el caso de vesículas de fosfolípidos convencionales, grandes vesículas unilamelares (LUV con diámetros superiores a 100 nm) y vesículas unilamelares pequeñas (con diámetros inferiores a 100 nm) se obtienen en la mayoría de los casos por extrusión a través de membranas de policarbonato o por sonicación[12, 13] [6, 8].

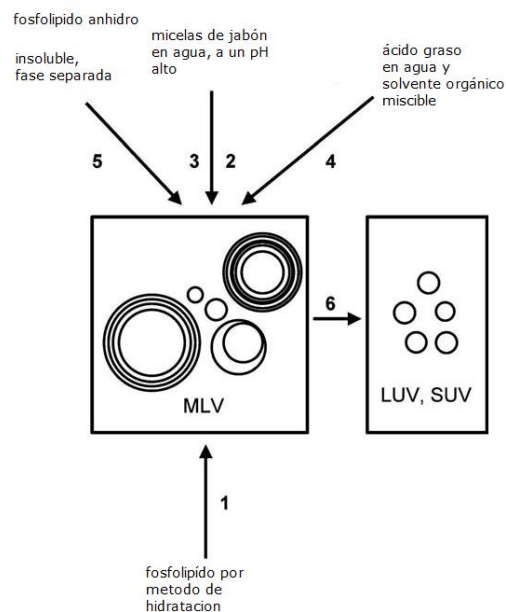


Imagen 13. Hidratación con una solución buffer de pH intermedio. 2. Adición de ácido fuerte (HCl) a una solución alcalina de jabón micelar. 3. Adición de micelas de jabón en una solución tampón de pH intermedio. 4. Adición de monómeros de ácidos grasos a una solución tampón de pH intermedio. 5. Hidrólisis de anhídridos grasos insolubles en agua, que no forman una bicapa, por una base fuerte (NaOH) o por una solución buffer concentrada apropiada de pH intermedio. 6. Extrusión o sonicación.

[Liposome Technology :Liposome Preparation and Related Techniques, in Liposome Technology, G. Gredoriadis, Editor. 2007, Informa Helathcare USA: London, pag 11 fig 4]

2.3 El síndrome de Sjögren (SS)

Es una enfermedad sistémica autoinmunitaria. Actualmente, está bien aceptada la teoría que explica la infiltración de glándulas salivales y lagrimales por células linfoplasmocitarias. Ésta destruye de manera progresiva las glándulas exocrinas, hecho que se traduce en sequedad ocular (queratoconjuntivitis seca) y sequedad bucal (xerostomía). Además, hay infiltración de las glándulas exocrinas por linfocitos T, junto con una hiperestimulación de linfocitos B. Sin embargo, la heterogeneidad de la enfermedad no puede ser explicada por un solo mecanismo desencadenante.[14, 15] Se han planteado diferentes teorías que justifican una alteración de la respuesta autoinmunitaria. Por una parte, se producen:

a) alteración del reconocimiento inmunitario, ya sea por la presencia de factores intrínsecos (autoantígenos) o extrínsecos (infecciones virales). [16]

b) alteración de la respuesta inmunitaria adquirida, : por alteración del repertorio de TCR y linfocitos T o por disfunción de los linfocitos B, ya sea por incremento de células plasmáticas circulantes, retención de células B de memoria CD27, selección anormal de receptores o pérdida de selección de los mecanismos de hipermutación.[14]

c) Alteración de la regulación de la respuesta inmunitaria, por alteración en la actividad de citosinas: incremento de expresión en sangre periférica de Th2, predominio de respuesta glandular Th1, haplotipo GCC del gen de interleucina (IL) 10; por alteración de quimiocinas, incremento del factor estimulador de células B (BAFF/Blys), incremento de expresión de quimiocinas de linfocitos B y linfocitos T.

d) Factores genéticos, el SS es una enfermedad poligénica, pero entre los genes implicados destacan los haplotipos DRw52, DR2, DR3, B8 en pacientes que presentan anticuerpos anti-Ro y anti-La.

Las manifestaciones clínicas del SS son muy heterogéneas. Sin duda, ante manifestaciones como queratoconjuntivitis seca y xerostomía, se deben buscar otras manifestaciones extraglandulares como púrpura cutánea, parotidomegalia, artritis no erosiva, fenómeno de Raynaud, fibrosis pulmonar, enfermedad periodontal, polineuropatía mixta, candidiasis oral o incluso fiebre de origen desconocido, entre otras, con el fin de diagnosticar precozmente un SS. A menudo, la sintomatología glandular no es el motivo de consulta, lo que motiva retrasos en el diagnóstico y, consecuentemente peor pronóstico. Por otro lado, el SS secundario se debe sospechar en pacientes con afección glandular que sufren algún otro proceso autoinmunitario como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico o esclerosis sistémica.[15]

El tratamiento de la afección glandular del SS es básicamente sintomático: alimentos ácidos no azucarados que incrementan la secreción salival, higiene oral, lágrimas artificiales, pomadas nocturnas y evitar infecciones, entre otras.[15]

2.4 Sirolimus

La rapamicina (Imagen 14) es un antibiótico trieno macrocíclico producido por el actinomiceto *Streptomyces hygroscopicus*. Demostró ser particularmente potente contra *Candida albicans*, también contra varios modelos de tumores, y se encontró que tenía actividad inmunosupresora en modelos de ratas con eventos autoinmunes mediados por células T. No fue hasta que la potencia inmunosupresora de un agente estructuralmente similar, tacrolimus, que la investigación sobre la

actividad de la rapamicina para prevenir el rechazo de órganos comenzó en serio, posteriormente se iniciaron estudios en formulaciones oftálmicas para edema macular diabético, así como también en la enfermedad de Sjögren .[11, 17-21] En 1995, el agente recibió el nombre sirolimus y la marca comercial Rapamune. La dilucidación de su potente actividad inmunosupresora y su poderoso sinergismo farmacológico con otros agentes inmunosupresores, especialmente la ciclosporina, llevó a su aprobación por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en septiembre de 1999 para uso en receptores de transplantes renales en los Estados Unidos.[22]

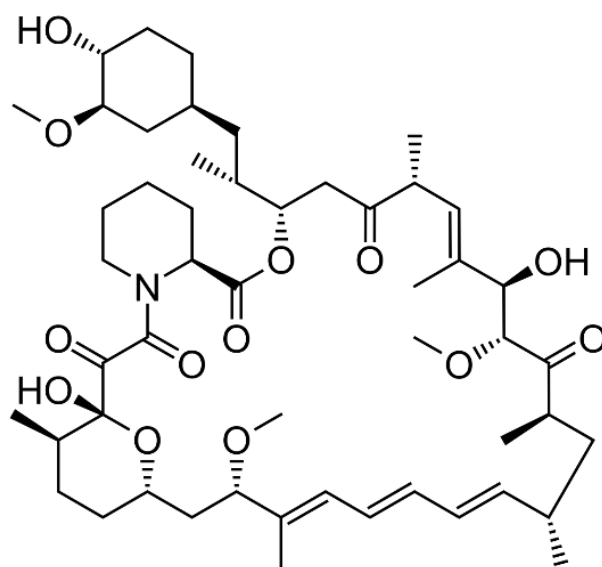


Imagen 14. Estructura del sirolimus (rapamicina)

La rapamicina es un compuesto que se degrada fácilmente, en la Tabla 1 se muestran algunas de sus propiedades. [22, 23]

Propiedad	Especificación
Formula Química	$C_{51}H_{79}NO_{13}$
Peso molecular	914.2 g/mol
Punto de fusión	183-185 °C
h_{max}	255, 279 y 290 nm
Solubilidad	<ul style="list-style-type: none"> • Fácilmente soluble en metanol, etanol, acetona, cloroformo, diclorometano, tricloroetano, dimetilformaldehído, dimetil sulfóxido • Prácticamente insoluble en agua
Condiciones de Almacenamiento	<ul style="list-style-type: none"> • Almacenamiento del polvo de -25 °C a -10 °C, protegiendo de la luz • Almacenamiento en metanol o etanol a una temperatura menor a -40 °C • Estable en sangre a 4 °C por 14 d, -40 °C por 3 meses
Precauciones	<ul style="list-style-type: none"> • Sensibilidad a la luz • Adherencia a Cristal

Tabla 1. Especificaciones Físicoquímicas de la rapamicina

2.4.1 Actividad Farmacológica del Sirolimus.

Farmacodinamia

El sirolimus inhibe la proliferación celular mediada por una gran variedad de citoquinas y factores de crecimiento: IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-12, factores estimulantes de colonias, factor de crecimiento derivado de plaquetas, insulina, factor de crecimiento de fibroblastos, factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Vía de inhibición mTOR

Esta detención del crecimiento se produce entre las fases G1 y S del ciclo celular (imagen 15) donde el sirolimus se une a receptores citosólicos denominados inmunofilinas que reciben el nombre de FKBP-12 (FK Binding Protein-12), al unirse a dicha inmunofilina se desencadena una cascada de reacciones, que da lugar a la detención del ciclo celular. Una

de las vías de inhibición es a través de una proteína denominada mTOR (mammalian Target of Rapamycin). Esta proteína se ha revelado como un importante centro de regulación de la síntesis de proteínas necesarias para la progresión del ciclo celular.

La proteína mTOR, en respuesta a diferentes estímulos como los de citoquinas y otros factores de crecimiento, es capaz de fosforilar la p70S6K. Esta enzima, a su vez, es capaz de fosforilar la S6, la cual es una proteína ribosómica 40S. Estas modificaciones favorecen el reclutamiento de la subunidad 40S de los ribosomas, resultando en un incremento en la síntesis de proteínas. La proteína mTOR también fosforila la PHAS-I, dando lugar a la disociación de PHAS-I de un factor de iniciación (eIF4E), el cual unirá a otro factor de iniciación (eIF4G), formando un complejo indispensable para el posicionamiento y la unión de la subunidad ribosómica 40S al RNA mensajero. El sirolimus y su inmunofilina forman un complejo con mTOR que detiene estos procesos.[24, 25]

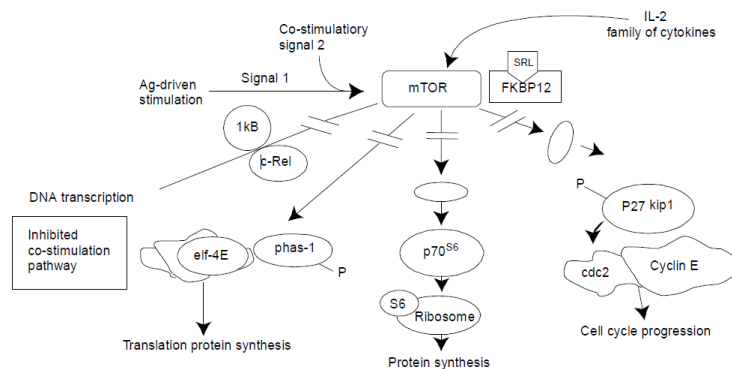


Imagen 15. Mecanismo de acción en mTOR

[Kahan, B.D., *Sirolimus: a comprehensive review*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2001. **2**(11): p. 1906 figure 3]

Complejo Sirolimus/ciclina

El sirolimus también actúa inhibiendo la actividad de un complejo de proteínas ciclinas (cdk4/ciclina D y cdk2/ciclina E), esenciales para el paso

de la fase G1 a la fase S(imagen 16). La IL-2 activa la cdk2/ciclina E, provocando la disociación de esta ciclina de una proteína inhibidora, p27kip1. El sirolimus actúa manteniendo la unión del p27kip1 a la cdk2/ciclina E (11). El resultado es una inhibición de la proliferación de los linfocitos T y B entre las fases G1 y S. [24]

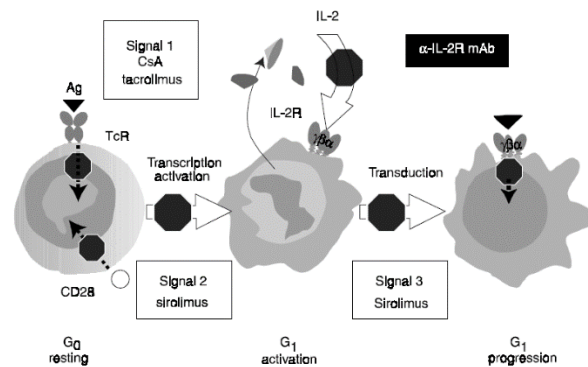


Imagen 16. Mecanismo de acción del Complejo Sirolimus/ciclina

[Kahan, B.D., *Sirolimus: a comprehensive review*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2001. **2**(11): p. 1906 figure 4]

2.4.2 Farmacocinética

Absorción y distribución

El sirolimus se absorbe poco en el tracto gastrointestinal. Su biodisponibilidad vía oral se estima que es un 15% [12]. Una dieta rica en grasa influye en la absorción de sirolimus. El tiempo que tarda en alcanzar el pico de concentración máxima oscila entre 0, 7 y 3 horas.

Se distribuye ampliamente en los tejidos debido a su alta lipofilia, y su volumen de distribución es alto y variable. En sangre presenta una alta afinidad a los hematíes (95%), mientras que un 3% está en el plasma un 1% en los linfocitos y un 1% en los granulocitos. En plasma, se une mayoritariamente a las proteínas plasmáticas (92%), presentando una

mayor afinidad por la albúmina (97%), y uniéndose también a la α 1-glicoproteína ácida y a las lipoproteínas.[9]

Metabolismo y Eliminación

El sirolimus es mayoritariamente metabolizado por el citocromo P450 3A4. Experimenta mayoritariamente desmetilación e hidroxilación, y los metabolitos formados se excretan en gran parte por la bilis y las heces. Sólo el 2,2% del sirolimus y de sus metabolitos son eliminados vía renal. Se han identificado hasta siete metabolitos en humanos, que presentan menos del 10% de la actividad inmunosupresora del sirolimus. Su tiempo de eliminación promedio es de 57 y 62 horas. [9]

2.4.3 Efectos Adversos

Los efectos adversos más frecuentes asociados al tratamiento con estos fármacos, por encima del 35% de los pacientes, son hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia y mielosupresión (leucopenia, trombocitopenia, anemia). Las alteraciones metabólicas pueden contrarrestar el efecto beneficioso sobre la reducción de la placa fibrosa ateromatosa que producen los inhibidores de la mTOR.

Pueden producir alteraciones gastrointestinales, en forma de diarrea, y con menor frecuencia hepatotoxicidad, ototoxicidad, pancreatitis o reacciones psicóticas, los cuales son efectos dosis dependientes, observados sobre todo con las dosis mayores a los 15 ng/mL. [26]

2.5 Liposomas de Sirolimus

En la actualidad los liposomas son un sistema muy recurrido para el disminuir los efectos secundarios de los fármacos, en especial, de los antineoplásicos; además por su capacidad para no ser reconocidos como

nocivos para el organismo y permitiendo gracias a su carácter hidrófobo, el acceso al lugar de acción.

Pocos estudios han sido llevado a cabo respecto a la formación de liposomas con sirolimus, entre estos cabe mencionar el trabajo de Linares-Alba, M.A., et al. [21] quienes realizaron una investigación sobre Liposomas que contienen sirolimus para ser administrados subconjuntivalmente para el tratamiento de la queratoconjuntivitis seca (KCS) no reactiva o del ojo seco. Utilizando un método de inyección de etanol y una adaptación del método de calentamiento de acuerdo con la metodología.

También, este fármaco en liposomado se ha investigado por Haeri, A., et al, [27] en Restenosis vascular con la formación de Liposomas recubiertos con quitosan preparados mediante liofilización, posterior hidratación de película, extrusión y recubiertas posteriormente a la fabricación de liposomas utilizando quitosan a baja temperatura.

Además, existe información sobre liposomas con rapamicina sensibles al pH por investigación de Saeed Ghanbarzadeh, et al [28] mostrando un aumento de su efecto antiproliferativo sobre la línea celular de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). Elaborados por el método de inyección de etanol modificado, utilizando colesterol y dipalmitoilfosfatidilcolina.

De igual manera, hay trabajos por Eloy, J.O., et al. [29] que informan sobre Liposomas con paclitaxel y rapamicina que actúan sinérgicamente con paclitaxel, demostrado aumentar la eficacia y reducir los efectos secundarios de los fármacos quimioterapéuticos. En este contexto, la funcionalización de liposomas con anticuerpos para receptores

sobreexpresados sobre la superficie del tumor es una estrategia potencial para aumentar la especificidad y reducir los efectos secundarios.

Finalmente, merece la pena hacer mención del trabajo llevado a cabo Ono, K., et al [30] sobre liposomas de rapamicina con anticuerpo CD9 el cual tiene como objetivo el de inducir la muerte celular a linfomas de Burkitt al ser dirigido por la sobreexpresión de receptores CD9 en dichas células. Su elaboración fue por medio de una liofilización los cuales posteriormente se hidrataron y por último hubo una sonicación para reducir el tamaño del liposoma. Al finalizar se agregó el anticuerpo de CD9 volviendo hidrófoba la capa externa del liposoma.

2.6 Diseño de Experimentos

En el área química es frecuente hacer experimentos con la intención de resolver un problema o comprobar una idea, sin embargo, es común que estas pruebas o experimentos se hagan con base en el ensayo y error, tomando como base a la experiencia y a la intuición, en lugar de seguir un plan experimental adecuado que garantice una buena respuesta a las interrogantes planteadas. Es tal el poder de la experimentación que, en ocasiones, se logran mejoras a pesar de que el experimento se hizo con base en el ensayo y error. Sin embargo, en situaciones de cierta complejidad no es suficiente aplicar este tipo de experimentación, por lo que es mejor proceder siempre en una forma eficaz que garantice la obtención de las respuestas a las hipótesis planteadas en un lapso corto de tiempo y utilizando pocos recursos. El diseño estadístico de experimentos es precisamente la forma más eficaz de hacer pruebas.[31, 32]

Definición

El diseño de experimentos (DOE) consiste en determinar cuáles pruebas se deben realizar y de qué manera, para obtener datos que, al ser analizados estadísticamente, proporcionen evidencias objetivas que permitan responder las interrogantes planteadas, y de esa manera clarificar los aspectos inciertos de un proceso, resolver un problema o lograr mejoras.[33]

Para poder entender cuál es el método por el cual el diseño de experimento funciona se tienen que tomar en cuenta varios conceptos como:

Variable(s) de respuesta. A través de esta(s) variable(s) se conoce el efecto o los resultados de cada prueba experimental, por lo que pueden ser características de la calidad de un producto y/o variables que miden el desempeño de un proceso. El objetivo de muchos estudios experimentales es encontrar la forma de mejorar la(s) variable(s) de respuesta. Por lo general, estas variables se denotan con la letra *y*. [33]

Factores controlables. Son variables de proceso o características de los materiales experimentales que se pueden fijar en un nivel dado. Algunos de éstos son los que usualmente se controlan durante la operación normal del proceso.

Factores no controlables o de ruido. Son variables o características de materiales y métodos que no se pueden controlar durante el experimento o la operación normal del proceso.

Factores estudiados. Son las variables que se investigan en el experimento, respecto de cómo influyen o afectan a la(s) variable(s) de respuesta. Los factores estudiados pueden ser controlables o no

controlables, deben seleccionarse los factores que se consideran, por conocimiento del objeto de estudio, que pueden tener efecto sobre la respuesta de interés.

Niveles y tratamientos. Los diferentes valores que se asignan a cada factor estudiado en un diseño experimental se llaman niveles. Una combinación de niveles de todos los factores estudiados se llama tratamiento o punto de diseño (Imagen 17).

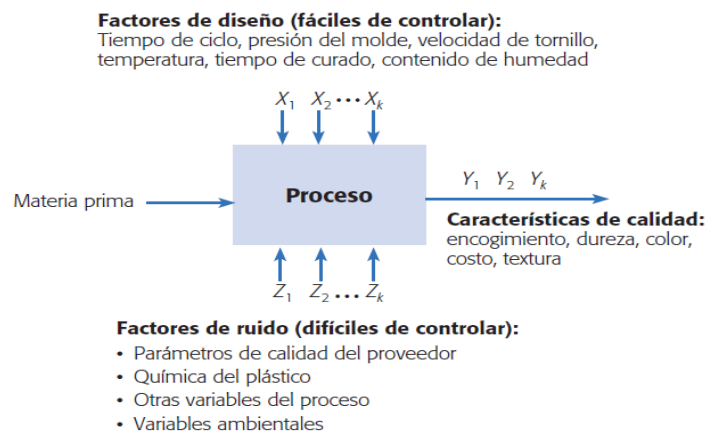


Imagen17. Factores y variables de proceso de fabricación de envases de plástico.

[Pullido, H.G. and R.d.I.V. Salazar, *Análisis y diseño de experimentos*. 2008, McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.: Mexico DF. pag. 9 fig. 1.4]

2.6.1 Clasificación y Selección de los Diseños Experimentales.

Existen muchos diseños experimentales para estudiar la gran diversidad de problemas. Esta cantidad de diseños hace necesario saber cómo elegir el más adecuado, por ello, es preciso conocer cómo es que se clasifican los diseños de acuerdo con su objetivo.

Los cinco aspectos que más influyen en la selección de un diseño experimental son:

1. El objetivo del experimento: se utiliza como un criterio general de clasificación de los diseños experimentales, mientras que los otros cuatro puntos son útiles para subclasificarlos.
2. El número de factores a estudiar.
3. El número de niveles que se prueban en cada factor.
4. Los efectos que interesa investigar (relación factores-respuesta).
5. El costo del experimento, tiempo y precisión deseada. [33]

La clasificación general de los diseños experimentales de acuerdo con su objetivo se observa en la imagen 18. Dentro de cada rama se pueden clasificar de acuerdo al número de factores, al tipo de efectos que se pretende estudiar y según las restricciones existentes. [33]

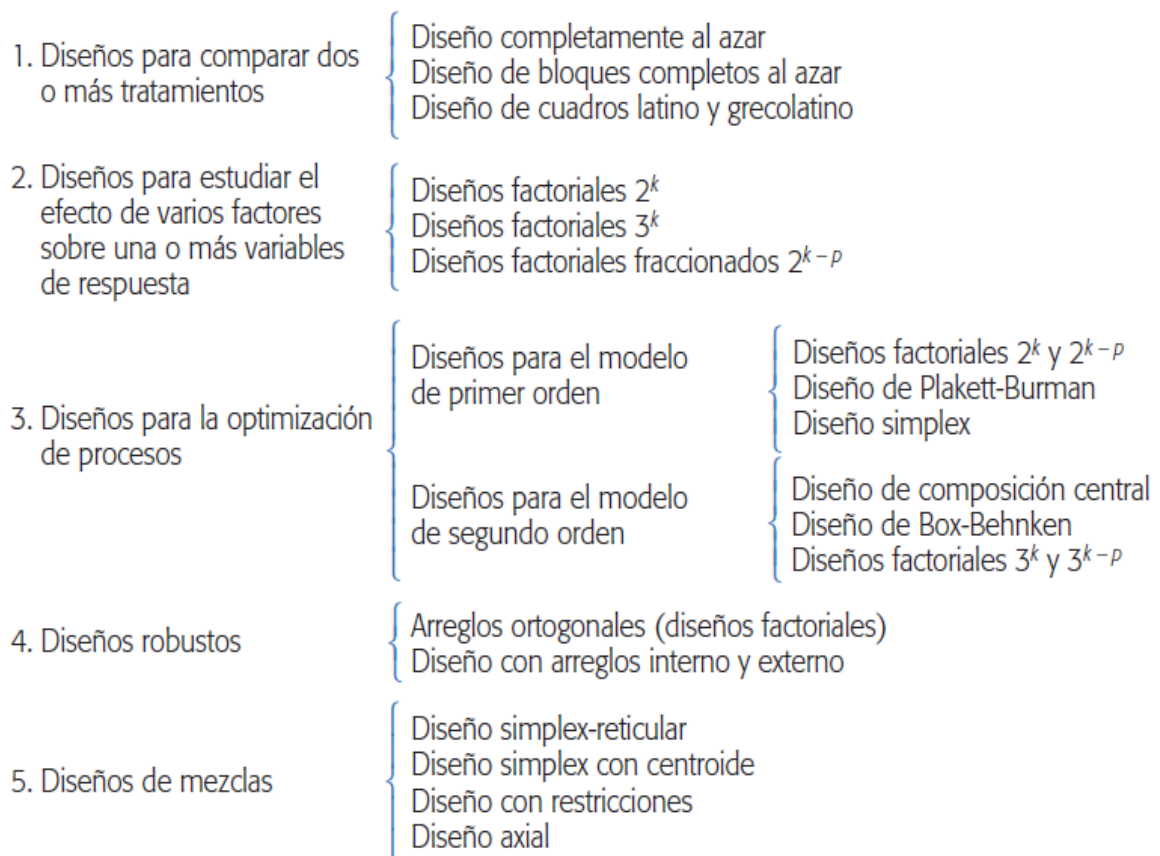


Imagen 18. Clasificación de los diferentes tipos de diseño de experimentos

[Pullido, H.G. and R.d.l.V. Salazar, *Análisis y diseño de experimentos*. 2008, McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.: Mexico DF. pag. 15 fig. 1.5]

2.7 Diseño Robusto (Taguchi)

Taguchi establece que la calidad de un producto debe ser medida en términos de abatir al mínimo las pérdidas que ese producto le trae a la sociedad, desde que inicia su fabricación hasta que concluye su ciclo de vida; estas pérdidas sociales se traducen en pérdidas de la empresa en el mediano y largo plazos. Taguchi retoma el concepto del control de calidad fuera de línea (off line QC), planteando que la inspección y el control del proceso no son suficientes para alcanzar una calidad competitiva, y que los niveles elevados de calidad sólo pueden lograrse, en términos económicos, en las fases de diseño (producto y proceso).

El objetivo del diseño de Taguchi es lograr productos y procesos robustos frente a las causas de la variabilidad (ruidos), que hacen que las características funcionales de los productos se desvíen de sus valores óptimos provocando costos de calidad. Decimos que un producto o proceso es robusto cuando su funcionamiento es consistente al exponerse a las condiciones cambiantes del medio.

La metodología Taguchi establece tres metas:

1. Diseños robustos (insensibles) ante el medio ambiente para productos y procesos.
2. Diseño y desarrollo de productos, de modo que sean robustos a la variación de componentes.
3. Minimización de las variaciones con respecto a un valor objetivo.

Factores de control, de ruido y de señal

Como se mencionó previamente, en un proceso existen básicamente dos tipos de factores: controlables y no controlables (o de ruido). Por lo regular, los factores de estudio son controlables. Sin embargo, en un

diseño robusto es conveniente tener una clasificación más detallada del tipo de factores controlables que pueden influenciar el proceso, en cuanto a su efecto sobre la media y la variabilidad de la respuesta de interés. Se distinguen cuatro tipos de factores, a saber (Imagen 19):

- i. Afectan la media y la variabilidad.
- ii. Afectan sólo la variabilidad.
- iii. Afectan sólo la media.
- iv. No afectan la media ni la variabilidad.

Cuando en el diseño clásico se afirma que un factor tiene efecto sobre la respuesta, por lo general se quiere decir que el factor tiene efecto sobre la media de la característica de calidad. En cambio, en el diseño robusto se tiene más presente que el efecto de un factor también puede ser sobre la variabilidad, o sobre la media y la variabilidad de manera simultánea.

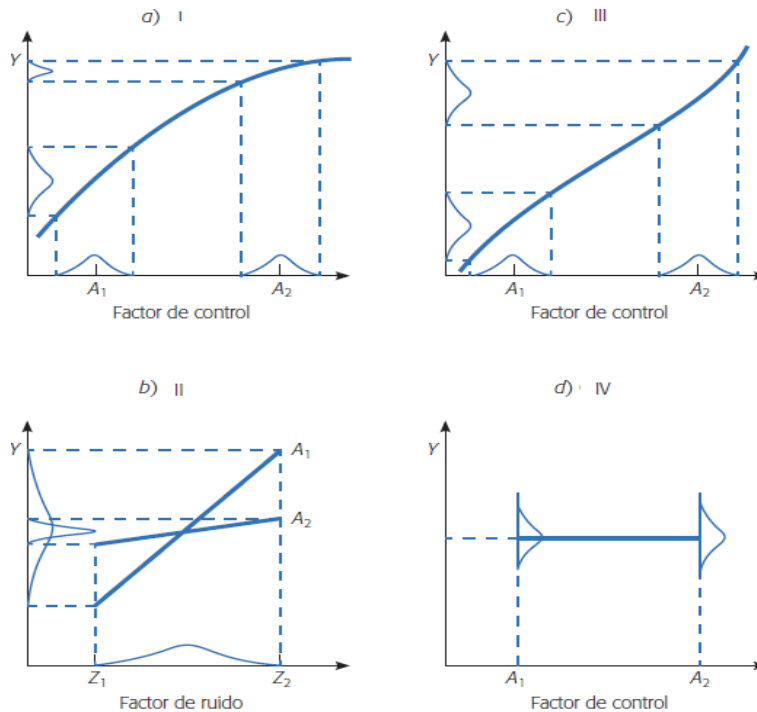


Imagen 19. Factores de control, de ruido y de señal

[Pullido, H.G. and R.d.I.V. Salazar, *Análisis y diseño de experimentos*. 2008, McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.: Mexico DF. pag. 300 fig. 9.3]

2.7.1 Arreglos Ortogonales

Los *arreglos ortogonales* (Imagen 20) son diseños propuestos por Taguchi que, como su nombre lo indica, tienen la propiedad de ortogonalidad (sus columnas son linealmente independientes, mismas que también poseen los diseños factoriales clásicos).[31, 33, 34]

Núm. de corrida	Núm. de columna						
	1	2	3	4	5	6	7
1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	2	2	2	2
3	1	2	2	1	1	2	2
4	1	2	2	2	2	1	1
5	2	1	2	1	2	1	2
6	2	1	2	2	1	2	1
7	2	2	1	1	2	2	1
8	2	2	1	2	1	1	2

2 factores: columnas 1, 2.
 3 factores: columnas 1, 2, 4.
 4 factores: columnas 1, 2, 4, 7.
 5 factores: columnas 1, 2, 4, 7, 6.
 6 factores: columnas 1, 2, 4, 7, 6, 5.
 7 factores: las siete columnas.

Imagen 20. Ejemplos de diseños ortogonales (sistemas que al multiplicar dos columnas cualesquiera el resultado es 0)

[Pullido, H.G. and R.d.I.V. Salazar, *Análisis y diseño de experimentos*. 2008, McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.: Mexico DF. pag. 305 fig. 9.6]

2.8 Uso del Diseño de Experimentos Taguchi en la Elaboración de liposomas

En la actualidad existen varios artículos en lo que se implementa este diseño para evaluar las condiciones de optimización, éstos se comentan en la tabla 2.

Artículo	Descripción de la experimentación
Formulación y evaluación de liposomas que contienen fármacos antituberculo por el diseño de la matriz ortogonal de Taguchi. [35]	El objetivo de este estudio fue lograr el atrapamiento deseado de fármacos antituberculosos (rifampicina e isoniazida) en el liposoma. Los liposomas se produjeron mediante una técnica de evaporación de película fina utilizando fosfatidilcolina de soja. Los estudios de evaluación de diferentes variables de procesamiento como la relación de fármaco a lípido, relación de fosfatidil colina y colesterol, temperatura y tiempo de hidratación fueron evaluados por el diseño de Taguchi sobre porcentaje de atrapamiento de fármaco (PDE), distribución de tamaño, velocidad de liberación y tamaño de partícula.
Preparación de un sistema de liposomal y su liberación in vitro de rapamicina. [36]	El objetivo de este estudio fue preparar un sistema de suministro liposomal para la rapamicina y estudiar sus características de liberación in vitro. La formulación se optimiza mediante el diseño ortogonal, y el grado de liberación de la rapamicina por los liposomas se midió por el método de diálisis inversa.
Las interacciones celulares y los efectos fotoprotectores de los portadores de lípidos nanoestructurados cargados con idebenona estabilizados usando surfactante libre de PEG [37]	La estrategia de preformulación utilizando un diseño de tres niveles, de tres variables, L9 Taguchi fue importante en la mejora BID-CEN aspectos fisicoquímicas clave, tales como, la eficacia de captura, la liberación del fármaco (sostenido), la oclusión, la deposición en piel y la estabilidad física. Espetrometro UV, microscopía confocal y citometría de flujo técnicas que se utilizaron para median el estrés oxidativo en las células HaCaT, estudiar una captación celular cualitativa, medir especies reactivas de oxígeno intracelulares, y el potencial de membrana mitocondrial, respectivamente.
The optimum process conditions for liposome production using an orthogonal array experimentation [38]	Un diseño experimental fue empleado en este trabajo para determinar la condición óptima para la preparación de liposomas que contienen Hb. De una serie de experimentaciones, se obtuvo una combinación óptima de factores. Tal combinación de factores y condiciones de procesamiento permitieron producir liposomas Hb que contienen con buena distribución de tamaño de partícula y alta eficiencia de encapsulación.

Tabla 2. Uso del DOET en la elaboración de liposomas

2.9 Análisis del Efecto de Modo de Fallo (EFEMA)

es un conjunto de directrices, un método y una forma de identificar problemas potenciales (errores) y sus posibles efectos en un sistema para priorizarlos y poder concentrar los recursos en planes de prevención, supervisión y respuesta. [39]

Los EFEMAs fueron formalmente introducidos a finales de los 40's mediante el estándar militar 1629. Utilizados por la industria aeroespacial en el desarrollo de cohetes, los EFEMAs fueron de mucha ayuda en evitar errores sobre tamaños de muestra pequeños en la costosa tecnología de cohetes.

El principal empuje para la prevención de fallas vino durante los 60's mientras se desarrollaba la tecnología para enviar un hombre a la luna en la misión Apolo. Ford Motor Company motivados por los altos costos de demandas de responsabilidad civil introdujo los EFEMAs en la industria automotriz a finales de los 70's para consideraciones de seguridad y requisitos regulatorios

En 1993 Chrysler, Ford y GM crearon el documento (Potencial Failure Mode And Effects Analysis) que cubría los tipos vigentes de EFEMA. El documento formo parte de la norma QS 9000 (Hoy conocida como ISO 16949).

Los Beneficios de implantación de EFEMA en un sistema son:

- Identifica fallas o defectos antes de que estos ocurran
- Reducir los costos de garantías
- Incrementar la confiabilidad de los productos/servicios (reduce los tiempos de desperdicios y re-trabajos)
- Procesos de desarrollo más cortos
- Documenta los conocimientos sobre los procesos

Tipos de AMEF

EFEMA de diseño (D-EFEMA)

- Se usa para analizar componentes de diseños. Se enfoca hacia los Modos de Falla asociados con la funcionalidad de un componente, causados por el diseño
- Evalúa subsistemas del producto o servicio.

EFEMA de proceso (P-EFEMA)

- No debe utilizar controles en el proceso para superar debilidades del diseño.
- Se usa para analizar los procesos de manufactura, ensamble o instalación. Se enfoca en la incapacidad para producir el requerimiento que se pretende.
- Los Modos de Falla pueden derivar de causas identificadas en el AMEF de Diseño.
- Asume que el producto según el diseño cumplirá su intención final.
- Evalúa cada proceso y sus respectivos elementos.
- Usado en el análisis de proceso y transiciones.

EFEMA de proceso (P-EFEMA)

- Se usa para analizar los procesos de manufactura, ensamble o instalación. Se enfoca en la incapacidad para producir el requerimiento que se pretende.
- Los Modos de Falla pueden derivar de causas identificadas en el AMEF de Diseño.
- Asume que el producto según el diseño cumplirá su intención final.
- Evalúa cada proceso y sus respectivos elementos.
- Usado en el análisis de proceso y transiciones.

3.- Hipótesis

La implementación del diseño de experimentos Taguchi en la fabricación de liposomas de sirolimus, permitirá determinar los factores de mayor impacto, lo cual determinara cuales son las mejores condiciones para obtener un mejor tamaño y potencial Z promoviendo una posible reducción de costos y tiempo.

4.- Objetivo

Optimizar la fabricación de liposomas de rapamicina con base en el diseño de experimentos Taguchi.

4.1 Objetivos Particulares

1. Determinar las variables de proceso y de respuesta utilizando el sistema de análisis de modo de fallos.
2. Diseñar y fabricar liposomas ajustándose al DOET
3. Caracterizar los liposomas mediante diferentes técnicas
4. Determinar las condiciones óptimas de trabajo analizando las variables de respuesta: tamaño, potencial Z, y % de sirolimus recuperado.
5. Ejecutar y comprobar la optimización de liposomas con rapamicina mediante la determinación de tamaño, potencial Z, % de sirolimus recuperado, cantidad de fosfolípido total, así como Microscopia Electrónica de Transmisión(TEM).

5.- Metodología

5.1. Materiales

El sirolimus, Sinbiotik International, fue donado amablemente por el laboratorio Santgar. El colesterol, grado técnico, fue comprado en química Meyer, el fosfato dibásico de sodio anhidro se compró en distribuidora Química Mexiquense, el fosfato de sodio monobásico anhidro y el manitol fueron comprados en Química USP de México, el hidróxido de sodio en Droguería Cosmopolita, la lecitina de soya (Metarin) de Ampher foods y la sacarosa de PCCA. El etil 4-hidroxibenzoato, la trehalosa dihidratada, la L- α -fosfatidilcolina tipo iv-s $\geq 30\%$ (enzimático), la L- α -fosfatidilcolina grado microbiológico, el 2-fenoxietanol, el tiocianato de amonio y el cloruro de hierro (III) fueron comprados en Sigma Aldrich. El metanol grado HPLC, la acetona R.A., el acetonitrilo R.A., el acetonitrilo HPLC y el diclorometano grado R.A. fueron J. T Baker. Finalmente, el sulfato de zinc heptahidratado fue de HYCEL de México. Todos fueron utilizados como se compraron, sin anterior purificación. El agua se obtuvo con un sistema de deionización de agua con el equipo NANOpure DIamond Life Science (UV/UF)

5.2 Elaboración de Liposomas

5.2.1 Elaboración de liposomas Iniciales (método de calentamiento)

Se pesó en una balanza analítica Adventurer OHAUS el fosfolípido (23.3mg) y el colesterol (7.73) en relación 7:3 mol:mol, manteniendo variación no mayor a 0.1 mg. Se vertieron en un matraz bola de 25 mL, posteriormente se adicionaron 4 mL de buffer de fosfatos a pH 7.4 a una concentración de 0.01 M y glicerol hasta una concentración total de 3% v/v; dicha mezcla se dispersó durante 1 hora en una parrilla de agitación a temperatura ambiente y con una velocidad de 750 rpm. Posteriormente

se pesaron que cantidad de sacarosa y 10 mg de rapamicina (igualmente cuidando que la variación del peso no exceda los 0.1 mg); se adicionaron a la mezcla que se encuentra en el matraz bola y se aforó a un volumen de 10 mL con buffer de fosfatos, se selló con un tapón de hule y se saturó con nitrógeno para eliminar el oxígeno. Posteriormente se colocó en calentamiento a una temperatura de 70 °C durante 20 min y agitación 750 rpm, controlando con una parrilla con termopar IKA. Finalmente se filtró utilizando un filtro de Nylon con tamaño de poro 0.45 µm.

5.2.2 Elaboración de Liposomas por Sonicación y Exclusión

Se pesó en una balanza analítica Adventurer OHAUS el fosfolípido (27 mg o 23.3 mg) y el colesterol (5.7 mg o 7.7 mg), con una proporción 7:3 o 6:4 mol:mol, y manteniendo una variación no mayor a 0.1 mg, se vertieron en un matraz bola de 25 mL, posteriormente se añadieron 4 mL de buffer de fosfatos a pH 7.4 a una concentración de 0.01 M; dicha mezcla se dispersó durante 1 hora en una parrilla de agitación a temperatura ambiente y con una velocidad que puede ser de 750, 850 o 950 rpm. Posteriormente se pesó el crioprotector correspondiente (Sacarosa 171.1 mg, manitol 77.3 mg, Trehalosa 160 mg) y 10 mg de rapamicina que (igualmente cuidando que la variación del peso no exceda los 0.1 mg), se adicionaron a la mezcla que se encuentra en el matraz bola. Se añadieron 5 mL de buffer con conservador (fenoxietanol) que se encuentra en una concentración de 0.06% v/v y se aforó a un volumen de 10 mL con buffer de fosfatos y se tapó con tapón de hule y se saturó con nitrógeno, para tenerlo en un ambiente inerte. Posteriormente se colocó en calentamiento que podía ser de 60, 70 u 80 °C durante un tiempo determinado el cual puede ser de 20, 35 o 50 minutos y agitación similar a la utilizada durante la dispersión de fosfolípido y colesterol, controlando con una parrilla con termopar IKA. Al término del tiempo de

calentamiento se sónico el producto en Sonicador Cole-parmer con una frecuencia alrededor de 47 kHz y posteriormente se filtró a través de filtros nylon de Jeringa Millex de 0.45 μm y 0.22 μm consecutivamente.

5.2.3 Liposomas por adición de metanol, sonicados y liofilizados.

Se pesó en una balanza analítica Adventurer OHAUS el fosfolípido (27mg) y el colesterol (7.7 mg) en una relación 6:4 mol:mol, manteniendo una variación no mayor a 0.1 mg, se vertieron en un matraz bola de 25 mL. Posteriormente, se añadieron 4 mL de buffer de fosfatos a pH 7.4 a una concentración de 0.01 M; dicha mezcla se dispersó durante 1 hora en una parrilla de agitación a temperatura ambiente y con una velocidad de 950 rpm. Posteriormente se pesaron 873mg de sacarosa y 10 mg de Rapamicina (igualmente cuidando que la variación del peso no exceda los 0.1 mg); la rapamicina se disuelve en 600 μL de metanol para posteriormente adicionarlo junto con la sacarosa a la mezcla que se encuentra en el matraz bola. Se agregaron 5 mL de buffer con fenoxietanol que se encuentra en una concentración de 0.06% y se aforó a un volumen de 10 mL con buffer de fosfatos, se tapó con tapón de hule y se saturó con nitrógeno. Posteriormente se colocó en calentamiento a 70 °C durante 20 min y agitación 950 rpm, controlando con una parrilla con termopar IKA. Al término del tiempo de calentamiento se sónico el producto en Sonicador Cole-parmer con una frecuencia alrededor de 47 kHz durante tiempos que van desde los 20 a los 50 min y temperaturas de 20 a 50 °C. Al terminar la fabricación el producto se trasvasó a recipientes tipo ámbar para protegerlos de la luz, posteriormente se programó la liofilizadora Labconco en modo automático con una presión de 0.021 mbar con las siguientes condiciones:

- Condiciones del Segmento 1: -55°C 24 horas

- Condiciones del Segmento 2: velocidad 1.04 °C/min, -10 °C, 12 horas
- Condiciones del Segmento 3: velocidad 0.5 °C/min, 0 °C, 20 horas
- Condiciones del Segmento 4: velocidad 1.0 °C/min, 5 °C, 4 horas

5.3 Caracterización de liposomas

5.3.1 Tamaño de Partícula

Se determinó en un equipo Malvern Zetasizer nano zs ZEN 3600, el cual es un equipo de dispersión dinámica de luz, que cuenta con láser rojo a 633 nm y mide a un ángulo de 173°.

5.3.2. Potencial Z

Se realizó en un equipo Malvern Zetasizer nano zs ZEN 3600, que cuenta con láser rojo a 633 nm y mide a un ángulo de 173°.

5.3.3 Determinación de Fosfolípido

El análisis se realizó por medio de un método espectrofotométrico UV-visible en donde se cuantifico un complejo colorido formado entre fosfolípidos y ferrotiocianoato de amonio [21]. El análisis se realizó en un espectrómetro Ocean Optics S2000 utilizando una fuente de luz de tungsteno DT-1000CE-BT, una interfaz de puerto serie SAD500 (Ocean Optics, Inc.) y una celda de vidrio de longitud de trayectoria de 10 mm. Las mediciones se realizaron a la λ_{\max} de 492.23 nm.

5.3.3.1. Preparación del Reactivo de Ferrotiocianato de Amonio(AFR)

Se preparó una solución estándar de ferrotiocianoato de amonio disolviendo 27.03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ y 30.4 g de $\text{NH}_4 \cdot \text{SCN}$ en 1 L de agua destilada.

5.3.3.2. Curva de Calibración de Lecitina.

Se preparó una disolución stock de lecitina (0.1 mg/mL) usando cloroformo como disolvente. Tomando alícuotas del stock se prepararon soluciones estándar en un intervalo de concentración de 0.2 a 0.01 mg/mL, y se añadió suficiente cloroformo para obtener el volumen final de 2.0 mL. Posteriormente, se añadieron 2.0 mL de reactivo de ferrotiocianoato de amonio (AFR). El sistema que se obtuvo es bifásico el cual se agitó en vórtex durante 2 min. La fase de cloroformo absorbe el complejo que se forma al hacer reaccionar el ferrotiocianoato de amonio con la lecitina el cual se midió en el intervalo de 400-700 nm con un blanco de cloroformo, manteniendo esta solución en un baño de hielo.

5.3.3.3 Preparación de la Muestra.

Se tomó una muestra de 100 μ L con una concentración de lecitina de alrededor de 0.135 mg/mL adicionándole 2 mL de Ferrotiocianoato de Amonio agitando manualmente. Se añadieron 2 mL de cloroformo y el sistema bifásico se agitó en vórtex durante 2 min en tubos de ensayo tapados. Se midió la absorbancia de la fase orgánica a $\lambda_{\text{máx}}$ del complejo colorido. La concentración de fosfolípidos en las muestras se determinó por interpolación en la curva de calibración media.

5.3.4 Medición del pH

Con un promedio de 3 muestras se midió el pH en el potenciómetro ORION 3 STAR pH benchted, colocando 100 μ L de muestra, aforándolo a 10 mL.

5.3.5 Valoración

El análisis, determinación de rapamicina en la formulación liposomal, se realizó por medio de un método de cromatografía líquida de alta presión

acoplado a un detector de Arreglo de diodos (HPLC-UV) en donde se cuantificó el sirolimus (rapamicina). El análisis se realizó en un HPLC Waters con bomba binaria, inyector manual mediante válvula Rheodyne, con una columna Hypersil Gold C18 (4.6 x 150 mm, tamaño de partícula de 5 μm) a 50 °C. Tomando una pequeña muestra de 20 μL se realizó el cromatograma con fase móvil Acetonitrilo-Agua, a un gradiente de elución de 7 minutos de 40% a 100% de acetonitrilo, con un flujo 0.8 mL/min, midiendo a un máximo de longitud de onda de 279 nm.

5.3.5.1 Preparación de la Curva de calibración de Sirolimus.

Se preparó una disolución stock de sirolimus (0.04 mg/mL) usando metanol HPLC como disolvente. Tomando alícuotas del stock se prepararon soluciones estándar en un intervalo de concentración de 0,0004 a 0.0104 mg/mL, y se añadió suficiente acetonitrilo para obtener el volumen final de 2 mL por cada concentración.

5.3.5.2 Preparación de las Muestras

Consistió en colocar 250 μL de muestra en un matraz aforado de 2 mL, se adicionaron 100 μL de metanol HPLC y se agitaron en vórtex 30 segundos. Se agregaron 50 μL de solución de sulfato de zinc 2% p/v en metanol (60:40) (para que precipitara la lecitina y no saturar la columna del HPLC) y se agita por 30 segundos en vórtex. Se llevó al aforo con acetonitrilo. La muestra se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos. Del sobrenadante se tomó una muestra de 100 μL y se llevó a un volumen de 2 mL, esta solución se filtró en un filtro de nylon de 0.45 μm .

5.3.6 Microscopia Electrónica de Transmisión.

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtuvieron utilizando el microscopio JEM-2010 (JEOL) a un voltaje de aceleración de 200kV, con una resolución de 0.19nm.

Preparación de la muestra: para poder tener una mejor imagen de los liposomas se realizó la adición de 10 μ L de la muestra en una rejilla de cobre revestido por formvar durante 20 minutos permitiendo un secado al aire, posteriormente se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo. La rejilla TEM se expuso a una gotita de 10 μ L de una solución de acetato de uranilo al 2% en p/v durante 3 minutos.

5.3.7 Estudio de Liberación *in vitro*

Para realizar esta prueba se optó por utilizar la membrana "Dialysis tubing, Spectra/Por" de poro de 12 a 14 kDa, la cual siguiendo las instrucciones del proveedor se cortó y se hidrató durante 24 horas. Al término de la hidratación se añadió una cantidad de 3 mL de la formulación (equivalente a 2.4 mg de sirolimus) y 3 mL del medio el cual es Acetonitrilo al 20% en agua; esta bolsa se cerró con hilo nylon. Posteriormente se colocaron dentro de un vaso de precipitados con 130 mL de medio a una temperatura de 37 ± 2 °C y a una agitación de 450 rpm tomando muestra de 1 mL con reposición de medio desde las 2 hasta las 36 horas.

5.4 Optimización

5.4.1. Análisis del Efecto de Modo de Fallo (EFEMA)

Para poder realizar el diseño de experimentos se realizó este análisis, el cual describe la gravedad de cada efecto (S) clasificándolo en una escala donde 1 es insignificante y 5 es catastrófica.

Para cada causa, se determina la clasificación de ocurrencia (O). Esta clasificación evalúa la probabilidad de que se produzca un fallo por ese motivo durante la vida útil de su alcance. La ocurrencia se clasifica generalmente en una escala de 1 a 5, donde 1 es extremadamente improbable y 5 es inevitable.

Para cada control, se determina la clasificación de detección (D). Esta clasificación evalúa cuán bien los controles pueden detectar la causa o su modo de fallo. La detección suele clasificarse en una escala de 1 a 5, donde 1 significa que el control es absolutamente seguro para detectar el problema y 5 significa que el control está seguro de no detectar el problema.

Para poder determinar una guía para clasificar los posibles fallos en el orden en que deben ser abordados, se calcula el número de prioridad de riesgo, o RPN, que es igual a $S \times O \times D$. [39]

5.4.2. Diseño de Experimentos Taguchi

Para realizar la optimización del sistema se realizaron 3 diferentes diseños de experimentos.

El primer diseño DOET 1 L18 se llevó a cabo con la ayuda del sistema AMEF tomando así los factores que podrían ser relevantes en la

formulación. Posteriormente, tomando datos del Taguchi inicial, así como también cambios que eran necesarios se realizaron dos diseños más DOET 2 L9 y DOET 3 L9.

5.4.2.1 Asignación de Factores y Niveles

A continuación (tablas 3, 4 y 5), se muestran los diseños que se realizaron durante toda la optimización.

	Proporción Lecitina-Colesterol (mM)	Conservador	Fosfolípido	Crioprotector	Temperatura (°C)	Agitación (rpm)	Tiempo de calentamiento (min)
L1	(7:3)	FE	M	Trea (160 mg)	60	750	20
L2	(7:3)	FE	S	Saca (171mg)	70	850	35
L3	(7:3)	FE	SMicro	Mani ,(77.5)	80	950	50
L4	(7:3)	EP	M	Trea (160 mg)	70	850	50
L5	(7:3)	EP	S	Saca (171 mg)	80	950	20
L6	(7:3)	EP	SMicro	Mani (77.5 mg)	60	750	35
L7	(7:3)	EPFE	M	Saca (171 mg)	60	950	35
L8	(7:3)	EPFE	S	Mani (77.5 mg)	70	750	50
L9	(7:3)	EPFE	SMicro	Trea (160 mg)	80	850	20
L10	(6:4)	FE	M	Mani (77.5 mg)	80	850	35
L11	(6:4)	FE	S	Trea (160 mg)	60	950	50
L12	(6:4)	FE	SMicro	Saca (171 mg)	70	750	20
L13	(6:4)	EP	M	Saca (171 mg)	80	750	50
L14	(6:4)	EP	S	Mani (77.5 mg)	60	850	20
L15	(6:4)	EP	SMicro	Trea (160 mg)	70	950	35
L16	(6:4)	EPFE	M	Mani (77.5 mg)	70	950	20
L17	(6:4)	EPFE	S	Trea (160 mg)	80	750	35
L18	(6:4)	EPFE	SMicro	Saca (171 mg)	60	850	50

Tabla 3. DOET 1 L18(FE=fenoxietanol, EP=etil parabeno, EPFE=etil parabeno-fenoxietanol [1:1], M=lecitina Metarin, SMicro= lecitina grado microbiológica Aldrich, S=lecitina Aldrich, Mani=manitol, saca=sacarosa, Trea=Trehalosa.)

	Fosfolípido	Crioprotector	Tiempo de Sonicación (min)
L1	M	Trea (2422 mg)	20
L2	M	Mani (1163.3 mg)	35
L3	M	Saca (2183 mg)	50
L4	S	Trea (2422 mg)	35
L5	S	Mani (1163.3 mg)	50
L6	S	Saca (2183 mg)	20
L7	SMicro	Trea (2422 mg)	50
L8	SMicro	Mani (1163.3 mg)	20
L9	SMicro	Saca (2183 mg)	35

Tabla 4. DOET 2 L9 (M=lecitina Metarin, SMicro= lecitina grado microbiológica Aldrich, S=lecitina Aldrich, Mani=manitol, saca=sacarosa, Trea=Trehalosa)

	Fosfolípido	Temperatura de sonicación (°C)	Tiempo de sonicación (min)
L1	M	<10	20
L2	M	25	35
L3	M	50	50
L4	S	<10	35
L5	S	25	50
L6	S	50	20
L7	SMicro	<10	50
L8	SMicro	25	20
L9	SMicro	50	35

Tabla 5. DOET 3 L9. (M=lecitina Metarin, SMicro= lecitina grado microbiológica Aldrich, S=lecitina Aldrich)

6.- Resultados y Discusión

La especificación necesarias de los liposomas para permitir el ingreso al interior de las células es que el tamaño de partícula sea menor a los 300 nm [40] y contar con una diferencia de potencial alta < -30 mV o $> +30$ mV para ser considerados como formulaciones estables [21, 36].

6.1 Prueba Previa de Colesterol y Lecitina

El desarrollo se llevó a cabo basado en la metodología de Linares Alba *et al.*[21]. Se realizó un diseño de experimentos para la fabricación de liposomas vacíos con 2 factores. Un factor para evaluar el efecto de las diferentes combinaciones de lecitina y colesterol a 4 niveles y el segundo factor con 3 niveles de las diferentes lecitinas. Con el fin de delimitar la concentración de colesterol y lecitina a emplear en el diseño de experimentos Taguchi.

Proporción Lecitina-Colesterol	Lecitina	Tamaño (nm)	Potencial Z(mV)
1:0	M	450±73	-57±2.8
	S	53.17±23	-55.3±3
	SMicro	401.8±42	-47.8±3
9:1	M	560.7±39	-51.3±3
	S	463.1±13	-58.6±2.5
	SMicro	311.7±38.04	-46.3±2.1
7:3	M	541.2±91	-53.7±3.3
	S	298.8±75	-50.7±2.8
	SMicro	350.5±51	-44.6±2.5
6:4	M	395.2±80	-49.3±3.3
	S	338.1±45	-48.6±3.2
	SMicro	343.2±29	-51.5±2.8

Tabla 6. DOE para determinar proporción lecitina colesterol reportando promedio de tres muestras.

En todos los casos las dispersiones resultaron ser estables con un potencial Z inferior a -30 mV (Tabla 6), esta carga negativa que se muestra es causada por los grupos fosfato desprotonados.[41] Por parte del colesterol no se reflejó un cambio significativo ya que con todas las proporciones el potencial Z se mantuvo arriba de la magnitud deseada.

Por otro lado, se notó una amplia variabilidad en cuanto a los resultados de tamaño de partícula. En general el tamaño se modificó cuando la proporción de colesterol aumenta, esto se puede deber a que el colesterol al ser una molécula hidrófoba puede generar interacciones entre las capas y fungir como anclaje para multicapas y con esto un probable crecimiento de tamaño.[42] para las 4 proporciones se encontraron valores tanto grandes como pequeños, sin embargo, los valores tanto para una relación Lecitina-Colesterol 7:3 y 6:4 fueron ligeramente más similares, lo cual indica al acercarse a una proporción de igualdad estos se complementan haciendo que tenga más estabilidad así mismo es posible que bajo estas condiciones es posible obtener liposomas sin sirolimus de menor tamaño.

6.2 Diseño de Experimentos L18

En busca de evaluar las variables que mayor impactan en la fabricación de liposomas vacíos (sin sirolimus), se realizó el diseño Taguchi L18 (tabla 7), el cual se determinó al seleccionar las variables que podrían tener un mayor riesgo de acuerdo a la Tabla 3.

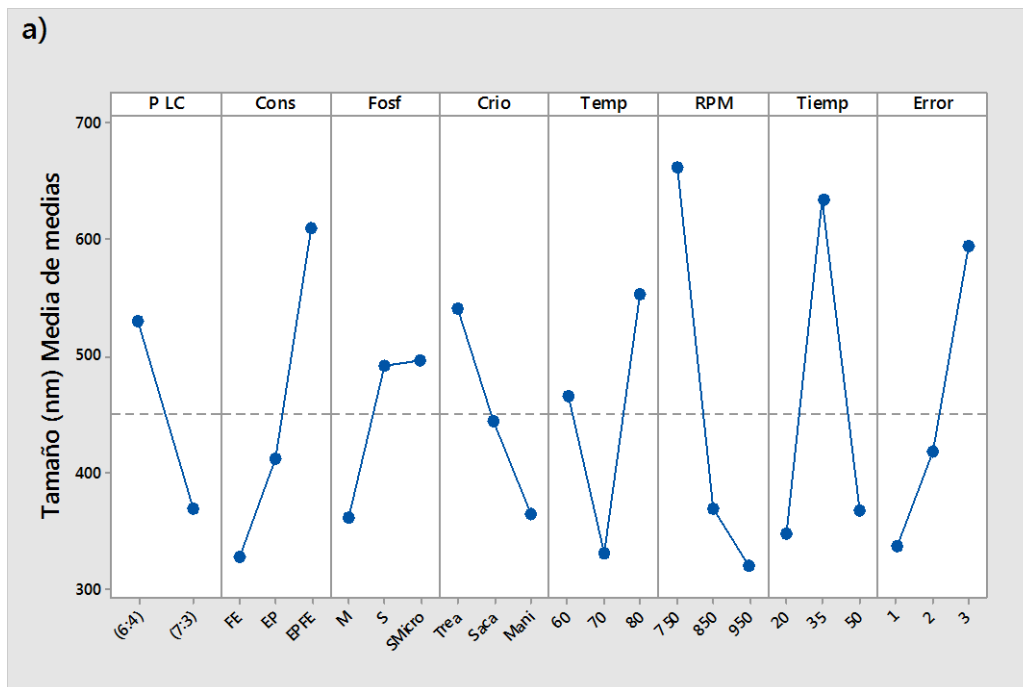
	Modo potencial de falla	Efecto local de falla	Causa(s) potenciales /mecanismo	Proceso de control	S	O	D	RON
Marca comercial de lecitina	Selección de proveedor	Modificación del tamaño de partícula Entrampe de fármaco Cinética de liberación	Costo	Elegir y mantener el proveedor adecuado	5	1	3	15
Proporción colesterol-lecitina	Ponderación	Modificación del tamaño de partícula Entrampe de fármaco Cinética de liberación	Mala ponderación Organización molecular diferente	Control estricto de la ponderación	3	1	3	9
Conservador	Contaminación por microorganismos	Disminución de la estabilidad Riesgo de infección del paciente	Mala ponderación Materias primas contaminadas	Añadir cantidades adecuadas	5	1	1	5
Estabilidad de la rapamicina	Liposomas suspendidos por mucho tiempo Contenedor inadecuado	Perdida de la actividad.	Exposición a la luz	Empaque de vidrio ámbar	5	3	1	15
Velocidad y tiempo de agitación	Selección de una adecuada agitación	Tamaño de partícula y potencial z mala homogenización	Falla del sistema de agitación	Control de velocidad	4	3	1	12
Temperatura durante la agitación	Selección de una adecuada temperatura	Tamaño de partícula y potencial z malo	Falla del termostato	Controlar la temperatura	4	3	1	12

Tabla 7. EFEMA para determinar los factores del diseño de experimentos.

Se observó que las variables a estudiar fueron las cantidades de lecitina colesterol en una proporción 7:3 y 6:4. Ya que existe riesgo de contaminación por ser una solución que será multidosis se pensó en conservadores como etil parabeno (EP) y fenoxietanol (FE). La calidad de

producto se ve afectada por los distintos proveedores y se deseó investigar las tres lecitinas disponibles. Como forma de conservación debido a la degradación en medio acuoso de sirolimus, se decidió utilizar tres crioprotectores ampliamente estudiados en la literatura: trehalosa, sacarosa y sorbitol [43-48]. Y por último las variables de proceso temperatura, agitación y tiempo de calentamiento a tres niveles de acuerdo con la tabla 7.

El análisis de los resultados con respecto al tamaño de partículas se hizo con ayuda del programa minitab 17 statistical con el que se obtuvo la gráfica 1 de efecto para los 7 factores, en donde se observa que los tamaños oscilan desde 350 hasta 750 nm, así mismo tomando en cuenta también el ANOVA (Tabla 8) indica que todos los factores son significativos y que pueden cambiar el sistema con excepción de la marca de fosfolípido.

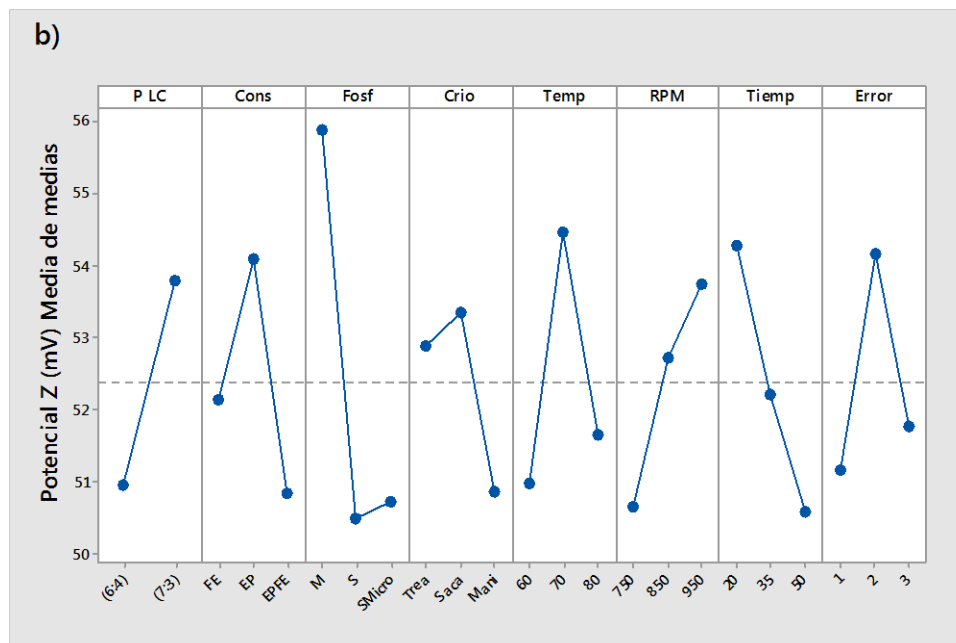


Gráfica 1. Gráfica de efectos DOET 1 L18 del tamaño de partícula.

Efecto	SC	gl	V	F exp	F ($\alpha=0.05$, 5, 2)	tab
P LC	722.51	1.00	722.51	6.38	4.451	
Cons	2310.52	2.00	1155.26	10.20	3.592	
Fosf	652.25	2.00	326.12	2.88	3.592	
Crio	867.78	2.00	433.89	3.83	3.592	
Temp	1398.86	2.00	699.43	6.17	3.592	
RPM	3778.55	2.00	1889.28	16.68	3.592	
Tiemp	2854.38	2.00	1427.19	12.60	3.592	
Error	1925.62	17.00	113.27	1.00		

Tabla 8. ANOVA tamaño de partícula del DOET 1 L18

De la misma manera, el tratamiento para potencial Z, indica que todos los factores son capaces de modificar significativamente a los liposomas como se muestra en la gráfica 2 y tabla 9. Sin embargo, el potencial Z se encuentra por debajo de -30 mV en todos los experimentos realizados.



Gráfica 2. Gráfica de efectos del potencial Z del DOET 1 L18 (Los valores de potencial Z son negativos y están representados como valor absoluto)

Efecto	SC	GI	V	F exp	F tab ($\alpha=0.05, 10$ 2, 17)
P LC	0.22	1.00	0.22	13.43	4.451
Cons	0.30	2.00	0.15	9.03	3.592
Fosf	1.02	2.00	0.51	31.04	3.592
Crio	0.19	2.00	0.10	5.88	3.592
Temp	0.38	2.00	0.19	11.53	3.592
RPM	0.27	2.00	0.14	8.33	3.592
Tiemp	0.38	2.00	0.19	11.50	3.592
Error	0.28	17.00	0.02	1.00	

Tabla 9. ANOVA potencial Z DOET 1 L18

En cuanto al objetivo fue necesario trabajar bajo condiciones donde se presente un tamaño de partícula más pequeño y las condiciones propuestas fueron:

- Proporción Lecitina-colesterol: 7:3
- Conservador: Fenoxietanol
- Fosfolípidos: Proveedor Meterin
- Crioprotector: sacarosa
- Temperatura de agitación: 70 °C
- Velocidad de agitación rpm: 950
- Tiempo de agitación: 20 min

6.2.1 Evaluación de las Condiciones Óptimas con Respecto al Diseño de Experimentos 1 L18

Se prepararon 3 muestras con las condiciones óptimas del DOET 1 L18, se observó que el tamaño óptimo se encuentra en 321.42 ± 18.56 nm, Tabla 10. Este resultado demostró que bajo las condiciones óptimas es posible reducir el tamaño de partícula, sin embargo, este tamaño se

encontró por arriba de los 300 nm es por ello que se necesitó de alternativas para la reducción de tamaño.

		Nm
Tamaño de partícula	de	321.42±18.56
Potencial Z		-50.23±5.17

Tabla 10. Resultados de la optimización

6.2.2 Pruebas de Reducción de Tamaño

De acuerdo a la literatura, la sonicación es una alternativa para reducción de tamaño de partícula [12, 13]. Además, y con el propósito de observar el comportamiento de la estabilidad sin glicerol, se prepararon muestras con y sin glicerol a las condiciones óptimas descritas anteriormente en el DOET 1 L18 y se sonicaron en el equipo Cole-Parmer® 8890 a 42 kHz, durante 20,30 y 50 minutos, a 25°C y se mantuvieron a temperatura ambiente durante un periodo de 7 días. Los resultados (tablas 11 y 12), mostraron que cuando se someten a una sonicación de 30 min se obtiene un tamaño de 164 ± 39 nm con glicerol y 167 ± 67 sin glicerol además de que para que se mantiene constante durante 7 días. Gracias a este análisis se implementó la reducción de tamaño de partícula aplicando sonicación después de la etapa de calentamiento. Por otro lado, la presencia o no del glicerol no modifica significativamente el tamaño de partícula, así que este se eliminó de la fabricación y para compensar la eliminación del glicerol se incrementó la cantidad de crioprotector.

Tiempo de sonicación (minutos)	con glicerol	sin glicerol
0	443±158	451±82
20	356±35	431±53
30	164±39	167±67
50	248±134	403±21

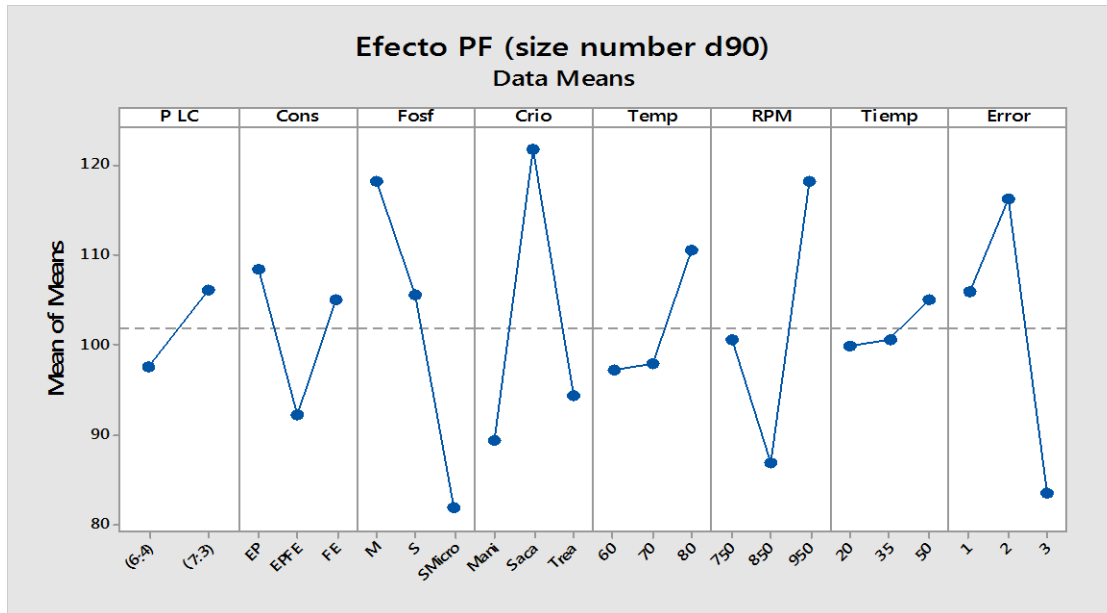
Tabla 11. Prueba de reducción de tamaño con sonicación

Tiempo (días)	con glicerol	sin glicerol
0	164±51	167±40
1	107±45	169±51
2	104±24	124±8
6	119±67	159±51
7	113±7	148±57

Tabla 12. Prueba de estabilidad de tamaño con sonicación de 30 min

Para evaluar la nueva etapa de proceso, sonicación, se realizó nuevamente el DOET 1 L18, sonicando durante 30 min a temperatura ambiente.

Los resultados se analizaron utilizando una distribución del 90% de tamaño de partícula, debido a que el equipo muestra dos poblaciones una de menor tamaño y otra mucho más grande. Esto puede deberse a la aglomeración de los liposomas.[49]



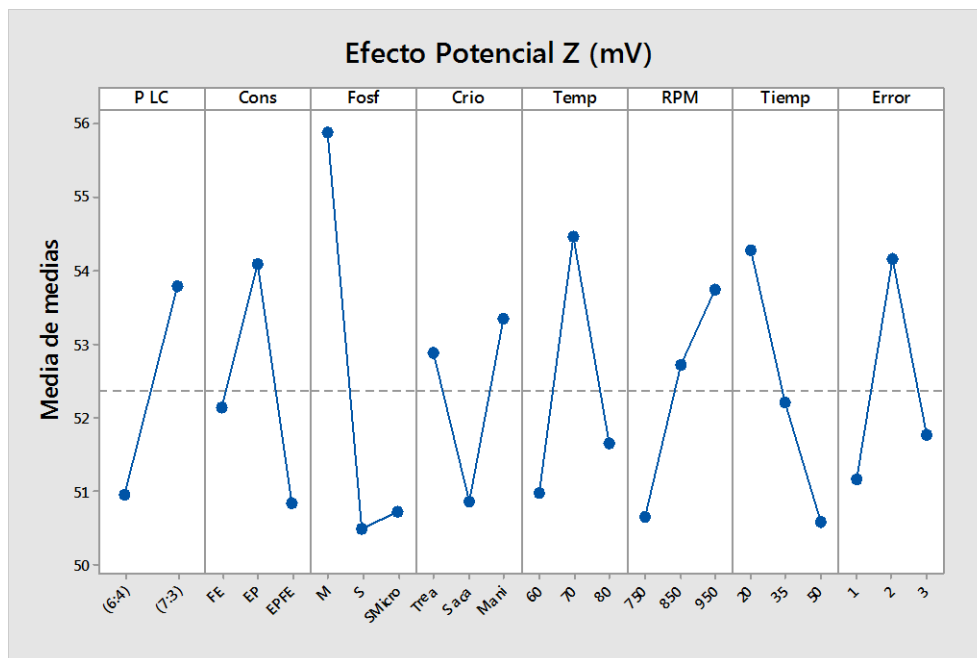
Gráfica 3. Efectos de la D90 del tamaño de partícula del DOET 1 L18

Efecto	SC	GI	V	F exp	F tab ($\alpha=0.05, 10$ 2, 16)
P LC	13.72	1.00	13.72	0.65	4.494
Cons	24.42	2.00	12.21	0.58	3.634
Fosf	1547.94	2.00	773.97	36.71	3.634
Crio	424.53	2.00	212.27	10.07	3.634
Temp	60.75	2.00	30.38	1.44	3.634
RPM	492.65	2.00	246.33	11.68	3.634
Tiemp	545.71	2.00	272.85	12.94	3.634
Error	358.44	17.00	21.08	1.00	
Total	3468.17	12.00	289.01		

Tabla 13. ANOVA tamaño de partícula DOET 1 L18

Los factores significativos fueron el fosfolípido, el crioprotector y la agitación para el tamaño de partícula (Gráfica 3 y Tabla 13), oscilando el tamaño entre 80 y 150 nm. Para el potencial Z (Gráfica 4 y Tabla 14) todos los factores son significativos en la fabricación con un intervalo de

potencial de -52 a -56 mV. Se observó que de acuerdo con los criterios de aceptación los resultados se encontraron dentro, y así, se propusieron las condiciones óptimas: Proporción Lecitina-colesterol 7:3, ya que aunque el tamaño que se indica es mayor a la media aunque más cercana a este lo que lo que haría que el producto se desempeñaría con variación mínima, el potencial Z es menor (o mayor en valor absoluto); Fenoxietanol, ya que con este conservador tanto el tamaño como el potencial Z se encuentran más cerca de la media de 101.2 nm y -52.4 mV respectivamente; Temperatura de agitación 70 °C, porque el tamaño de partícula se acerca a la media y el potencial Z es menor; Velocidad de agitación 950 rpm, este nivel se toma por que el potencial Z se encuentra menor a este punto; Tiempo de agitación 20 minutos, ya que se alcanza el potencial Z máximo y el tamaño se encuentra cerca de la media.



Gráfica 4. Diagrama de efectos del diseño L18 (Los valores de potencial Z son negativos y están representados como valor absoluto).

Efecto	SC	Gl	V	F exp	F tab ($\alpha=0.05$, 1 o 2, 16)
P LC	0.22	1.00	0.22	13.43	4.494
Cons	0.30	2.00	0.15	9.03	3.634
Fosf	1.02	2.00	0.51	31.04	3.634
Crio	0.19	2.00	0.10	5.88	3.634
Temp	0.38	2.00	0.19	11.53	3.634
RPM	0.27	2.00	0.14	8.33	3.634
Tiemp	0.38	2.00	0.19	11.50	3.634
Error	0.28	17.00	0.02		
Total	3.05	12.00	0.25		

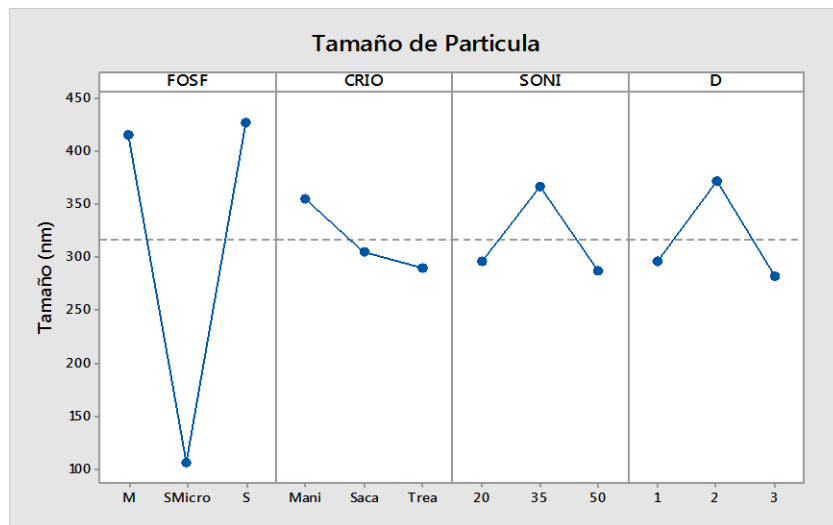
Tabla 14. ANOVA del potencial Z L18

6.3 Diseño de Experimentos 2 L9

El paso de sonicación para reducir el tamaño del liposoma se realizó de manera empírica, así que para determinar cuáles son las mejores condiciones se decidió realizar un segundo diseño de experimentos, el cual, se muestra en la gráfica 5 en donde además de eliminar la adición de glicerol y aumentar la cantidad de crioprotector para compensar la falta de glicerol en la isotonicidad, se añadió al diseño dos de los factores que afectaban en gran medida al tamaño de partícula los cuales son el tipo de crioprotector y el tipo de fosfolípido.

Los resultados de este tratamiento se muestran en las Gráficas 5 y 6, así como también los ANOVAs de las tablas 15 y 16 donde se observa que para el tamaño de partícula los tres factores son significativos y para el potencial Z el tiempo de sonicación es el único factor que no afecta, esto es congruente ya que no se adiciona algún reactivo que cambie la fuerza iónica de las partículas. Aunque el efecto de mayor impacto para el tamaño de partícula es el fosfolípido, y para el potencial Z es tanto el

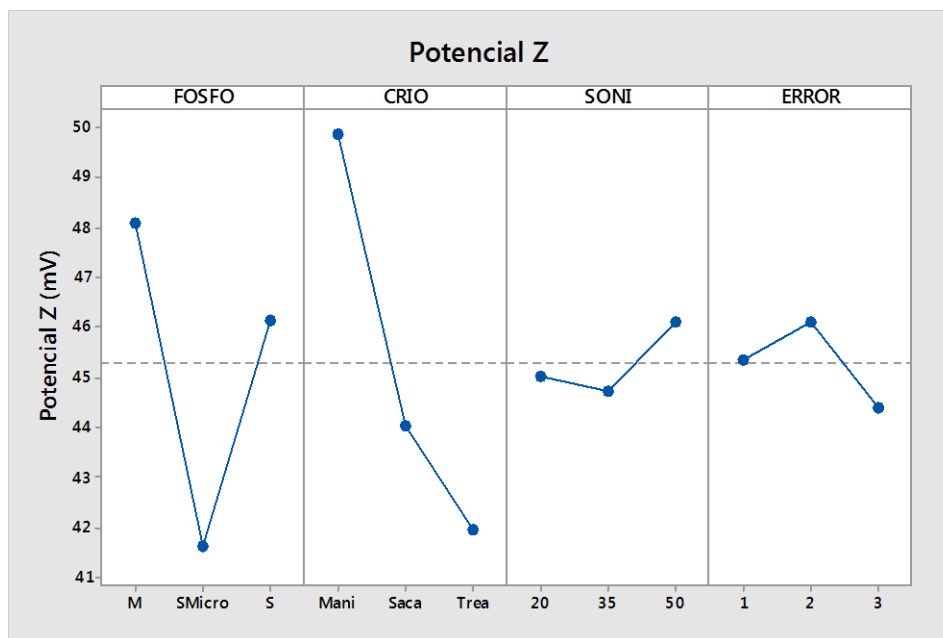
fosfolípido como el crioprotector. Para determinar cuál es el crioprotector más indicado se analizó el comportamiento tanto del potencial Z como del tamaño de partícula, concluyendo que es la sacarosa la más adecuada, debido a que se los datos con este reactivo se encuentran cerca de la media, disminuyendo su efecto con respecto a su variabilidad. Para el fosfolípido se observó que se obtiene un tamaño más pequeño con el grado microbiológico, pero el potencial que se tiene es menor, así que se optó por Metarin (lecitina de soya), ya que tendría una mayor estabilidad y un costo menor. Para determinar el tiempo de sonicación, se observó que tiene el mismo efecto 20 min o 50 min sobre el tamaño de partícula, pero en el potencial Z tiene un mejor efecto cuando se somete durante 50 min.



Gráfica 5. Diagrama de efectos del tamaño de partícula del DOET 2 L9

Efecto	SC	Gl	V	F exp	F tab ($\alpha=0.05$, 5, 2)
fosfolípido	2386.382	2	1193.191	34.654	4.737
crioprotector	519.276	2	259.638	7.540	4.737
t sonicación	728.288	2	364.144	10.575	4.737
error	275.449	8	34.431		

Tabla 15. ANOVA del tamaño de partícula del DOET 2 L9



Gráfica 6. Diagrama de efectos del Potencial Z del DOET 2 L9 (Los valores de potencial Z son negativos y están representados como valor absoluto)

Efecto	SC	Gl	V	F exp	F tab ($\alpha=0.05$, 5, 2)
Fosfolípido	2.446	2	1.223	58.899	4.737
Crioprotector	3.751	2	1.875	90.342	4.737
t sonicacion	0.114	2	0.057	2.763	4.737
Error	0.166	8	0.020		

Tabla 16. ANOVA del tamaño de partícula del diseño de DOET 2 L9

Gracias a este análisis se determinaron propiedades que hasta el momento ayudarían con el proceso de optimización como son: Proporción Lecitina-colesterol (7:3), Conservador (Fenoxietanol), Fosfolípidos (Proveedor Metarin), Crioprotector (Manitol), aunque debido al costo se decidió optar por la sacarosa además de que es más fácil manipularla. temperatura de agitación (70 °C), velocidad de agitación rpm (950), tiempo de agitación (20 min).

6.3.1 Evaluación de las condiciones óptimas con respecto al diseño de experimentos 2 L9

Se prepararon 3 repeticiones de las muestras con las condiciones óptimas del DOET 2 L9 (Tabla 17), donde se encontró que el tamaño de la formulación con las mejores condiciones se encuentra en un tamaño de 267 ± 9.9 nm; en comparación con el DOET 1 L18 se observa que al aumentar la cantidad de carbohidrato, aumenta el tamaño esto a causa de mayor aglomeración de las partículas, aunque se mantuvo en los intervalos de aceptación; con respecto al potencial Z de -46.7 ± 0.9 mV, se encuentra por debajo del valor de aceptación.

A esta formulación se le determinó la cantidad de sirolimus recuperada total (Tabla 17) la cual resultó ser muy baja de 227.7 ± 5.65 $\mu\text{g/ml}$ de la cual se esperaba que fuera de 1000 $\mu\text{g/ml}$, por lo cual se pensó en la

posibilidad de que la pérdida de este fármaco fue debida a la adsorción en las paredes del material donde fue envasado o al momento de filtrar.

	Tamaño Partícula (nm)	Potencial Z (mV)	Sirolimos total en la formulación (µg /mL)
M1	270.0	-47.1	293.4
M2	254.9	-45.4	155.5
M3	279.0	-47.7	234.4
Promedio	267.9	-46.7	227.7
CV	9.9	0.9	5.65

Tabla 17. Evaluación de la formulación optimizada con el DOET 2 L9

6.3.2 Pruebas de adsorción de sirolimus en el envase primario

De acuerdo con la bibliografía el sirolimus puede adsorberse dependiendo del material con el cual se encuentra en contacto, presentando una mayor afinidad con el vidrio de silicatos [50], por ello se realizó una cinética de adsorción con liposomas vacíos adicionando 10 mg sirolimus y se realizó la valoración de la solución a 1, 14 y 24 horas, Tabla 16. Se observa que la cantidad adsorbida por parte del material fue de alrededor de 10%.

Tiempo (h)	% Sirolimus
inicio	52.6
1	59.1
14	42.5
24	44.1

Tabla 18. Resultados de adsorción de sirolimus en el envase primario

6.3.2.1 Seguimiento de Perdida de sirolimus

Debido a estos resultados de adsorción de sirolimus se realizaron pruebas para determinar donde se encontraba el sirolimus restante así que se realizaron lavados en el matraz bola y el filtro con 200 μ L de metanol al término de una fabricación de liposomas, se encontró un área en el HPLC de 2627566 equivalente a 7.2 mg de sirolimus y al igual que el filtrado que se encontró un área en el HPLC de 437927 equivalente a 1.2 mg de sirolimus. Lo cual representa una pérdida importante por lo cual se planeó la modificación del método de fabricación.

6.3.3 Modificación del Método de Fabricación

Al encontrar que la cantidad total de fármaco es baja, se realizaron pruebas para aumentar la cantidad de fármaco en la formulación, ya que dicha cantidad representa más del 70% de pérdida de fármaco en el proceso de fabricación. Se prepararon muestras simulando lotes de 10 mL, en donde se evaluó la alternativa de que, el sirolimus se solubilizara en 1 mL de metanol y así adicionarse al matraz con la mezcla de lecitina, colesterol, sacarosa y fenoxietanol.

Los resultados de tamaño y potencial Z se muestran en la Tabla 19 donde se aprecia que el tamaño no se compromete utilizando metanol como medio de disolución de sirolimus ya que los valores se encuentran por debajo de los tamaños con el sistema optimizado del DOET 2 L9, aunque para el potencial Z si hubo un cambio ya que este aumenta en 10 mV. Este incremento pudo deberse a que el metanol ayudó a una mayor suspensión de sirolimus y de esta manera la superficie del liposoma interaccionó más con éste, además del efecto del disolvente al contribuir con sus grupos -OH, a interaccionar con mayor facilidad con el agua [51,

52]. A pesar de lo anterior los liposomas cumplieron con el criterio de aceptación de <300 nm y <-30 mV.

Tamaño d90 (nm)	Potencial Z (mV)	Cantidad de Sirolimus $\mu\text{g/ml}$
220.2	-34.9	702

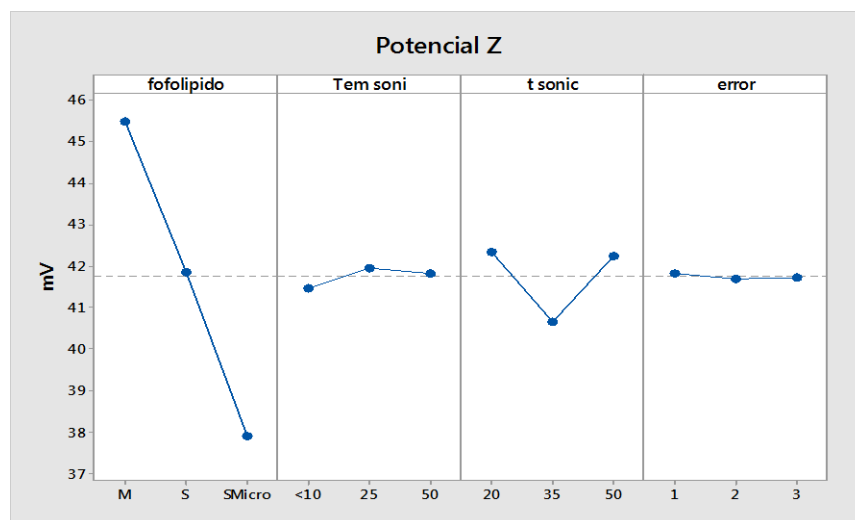
Tabla 19. Resultados con adición de metanol

6.4 Diseño de Experimentos 3 L9

Teniendo en cuenta que la cantidad que se adsorbe del fosfolípido es un factor importante, así como también el ajuste del tiempo y temperatura de sonicación y adición de metanol, se planteó un tercer diseño que se muestra en la tabla 6 donde se describe un diseño L9 tomando como factores el tipo de fosfolípido con 3 niveles para saber cuál de estos es mejor en la adsorción del sirolimus, la temperatura de sonicación a 3 niveles y el tiempo de sonicación a 3 niveles. La adición de metanol no se toma en cuenta en el diseño ya que es esencial, sin embargo, se disminuye la cantidad de metanol a $400 \mu\text{L}$ ya que es suficiente para solubilizar a la rapamicina, además se adicionó la etapa de liofilización para eliminar el metanol.

A partir de las siguientes gráficas 7, 8, 9 y tablas 20, 21 y 22 se observó que para el potencial Z todos los factores son significativamente diferentes al error, por lo que cualquier cambio en alguno de estos factores repercutiría en la fabricación, a diferencia de la cantidad de sirolimus adsorbida que de todos los factores ninguno repercute en cambiarla y en el tamaño solo el fosfolípido es significativo. Tomando en cuenta los comportamientos con respecto a las gráficas de efecto 9, 10 y 11 se toma como fosfolípido a Metarin ya que además de ser económico

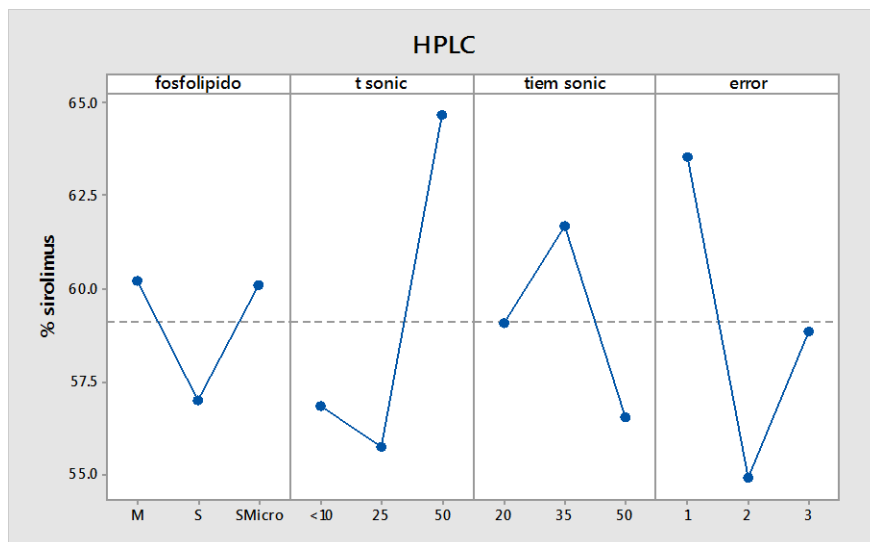
proporciona mayor estabilidad, así como también una mayor inclusión en la cantidad de sirolimus, y con respecto al tamaño proporciona el mayor diámetro, pero por debajo de lo deseado. Para la determinación de la temperatura de sonicación se decide la de 50 °C ya que a esta temperatura la absorción de rapamicina es mayor, así como también el tamaño es menor y con respecto al tiempo de sonicación se toman 20 minutos ya que a este tiempo la absorción es mayor, así como el potencial Z es menor y el tamaño es el menor.



Gráfica 7. Diagrama de efectos del Potencial Z del DOET 3 L9 (Los valores de potencial Z son negativos y están representados como valor absoluto)

Efecto	SC	gl	V	F exp	F tab ($\alpha=0.05,$ 2, 8)
fosfolípido	3.191	2	1.595	14428.403	4.737
temperatura de sonicación	0.015	2	0.007	70.170	4.737
tiempo de sonicación	0.194	2	0.097	879.007	4.737
Error	0.0008	8	0.0001		
Total	3.401	6	0.566		

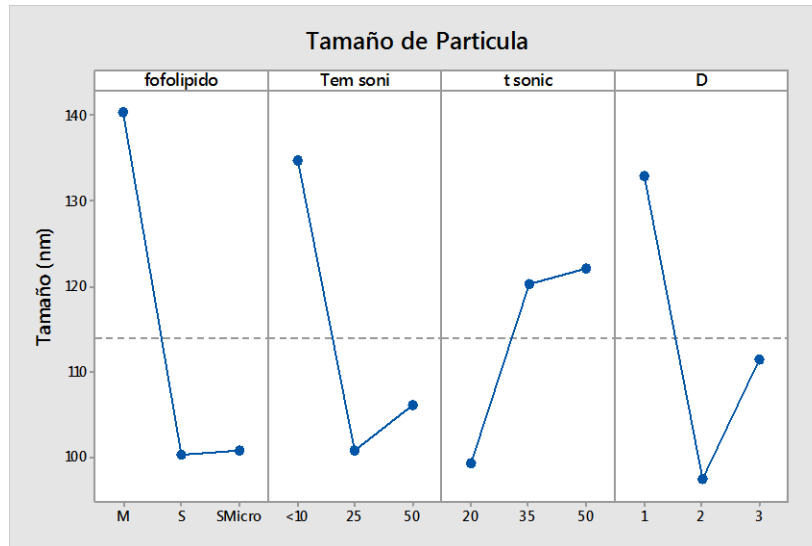
Tabla 20. ANOVA del potencial Z del DOET 3 L9



Gráfica 8. Diagrama de efectos del % de sirolimus recuperado del DOET 3 L9

Efecto	SC	Gl	V	F exp	F tab ($\alpha=0.05,$ 5, 2)
Fosfolípido	4.845	2	2.422	0.562	4.737
temperatura de sonicación	3.350	2	1.675	0.389	4.737
tiempo de sonicación	4.035	2	2.017	0.468	4.737
Error	34.445	8	4.305		
Total	12.231	6	2.038		

Tabla 21. ANOVA del % de sirolimus recuperado del DOET 3 L9



Gráfica 9. Diagrama de efectos del Tamaño de partícula del DOET 3 L9

Efecto	SC	gl	V	F exp	F tab (a=0.05, 5, 2)
Fosfolípido	117.171	2	58.585	6.613	4.737
temperatura de sonicación	74.135	2	37.067	4.184	4.737
tiempo de sonicación	35.134	2	17.567	1.983	4.737
Error	70.864	8	8.858		
Total	226.441	6	37.740		

Tabla 22. ANOVA del tamaño de partícula del DOET 3 L9

6.4.1 Caracterización y Comparación del Sistema Optimizado con el Inicial

Se prepararon muestras por triplicado con las condiciones óptimas del DOET 3 L9 bajo las siguientes condiciones: Proporción Lecitina-colesterol (7:3), Conservador (Fenoxietanol), Fosfolípidos (Proveedor Metarin), Crioprotector (sacarosa), temperatura de agitación (70 °C), velocidad de agitación rpm (950), tiempo de agitación (20 min), tiempo de sonicación

20 minutos y temperatura de sonicación 50°C, así como también la fabricación de liposomas con condiciones iniciales como el artículo de Linares Alba *et al*[21]

Descripción de cada uno de los sistemas: el inicial se aprecia como una solución opaca blanquecina más turbia en la formulación optimizada que la inicial esto debido a que al momento de filtrar hay pérdida de fosfolípidos en la formulación lo que en la optimizada no sucede, como puede observarse en la tabla 24 el pH aparente para el inicial se encuentra en 6.66 ± 0.04 mientras que para el optimizado se encuentra 6.41 ± 0.3 esto indica que no hay cambio significativo entre ambas fabricaciones. Para el tamaño de partícula (tabla 23) se redujo en gran medida de 326 ± 48 nm a 154 ± 17.7 nm disminuyendo también la variación y esto es normal ya que con la sonicación se obtuvo el cometido de disminuir el tamaño. Con respecto al potencial Z, los resultados son similares entre -40.6 ± 7.6 y optimizado a -40.0 ± 3.3 mV. Por otro lado, el porcentaje de sirolimus recuperado en la formulación optimizada es notoriamente superior ya que en la formulación inicial no se alcanzó ni un 10% mientras que la formulación optimizada es de 89.4 ± 17.9 %, esto debido a la baja solubilidad del sirolimus en donde en la inicial no se logró la inclusión en los liposomas lo que en la formulación optimizada se realizó gracias al metanol.

	Tamaño de Partícula		Potencial Z	
	Formulación Inicial (nm)	Formulación Optimizada (nm)	Formulación Inicial (mV)	Formulación Optimizada (mV)
M1	377.0	140.9	-32.4	-42.1
M2	319.5	147.5	-42.1	-41.7
M3	281.6	174.3	-47.4	-36.3
promedio	326.0	154.2	-40.6	-40.0
DE	48.0	17.7	7.6	3.3

Tabla 23. Comparación de fabricación inicial y optimizada tamaño y potencial z.

	% Sirolimus recuperado		pH	
	Formulación Inicial	Formulación Optimizada	Formulación Inicial	Formulación Optimizada
M1	8.5	69.6	6.63	6.41
M2	0.3	104.3	6.65	6.71
M3	0.6	94.2	6.71	6.12
promedio	3.1	89.4	6.66	6.41
DE	4.6	17.9	0.04	0.30

Tabla 24. Comparación de fabricación inicial y optimizado de % de sirolimus recuperado y pH

Con respecto a la cantidad de fosfolípido total al final de la elaboración de liposomas, se observó que la cantidad en la fabricación inicial es muy baja de un promedio del 27 ± 0.7 % (tabla 22), esto debido a que la mayor cantidad se perdía en el filtro, por ello la cantidad de rapamicina final es menor y la otra fracción en el matraz bola donde se hace la fabricación, en cambio la cantidad de fosfolípido en la formulación optimizada llega a ser del $74.6 \pm 9.5\%$ esto indica que al eliminar el proceso de filtración y al solubilizar con metanol se impide la pérdida de fosfolípido.

	% de Fosfolípido final en la formulación inicial	% de Fosfolípido final en la formulación optimizada
M1	26.96	71.57
M2	28.08	67.03
M3	28.29	85.37
Promedio	27.77	74.66
DE	0.71	9.55

Tabla 25. Resultados de % de fosfolípido final en la formulación

La caracterización usando tinción negativa para TEM (imágenes 21 y 22) mostró que para la elaboración tanto inicial como optimizada se obtienen estructuras esféricas. utilizando el programa GATAN DigitalMicrograph se

realizó la medición de los diferentes tamaños ($n=100$) determinando que en la fabricación inicial se observó un de diámetro de 435 ± 187 nm en tanto para el sistema optimizado su tamaño fue mucho menor ya que éste fue de 100 ± 30 nm. Así mismo se aprecia menor polidispersión en el lote optimizado.

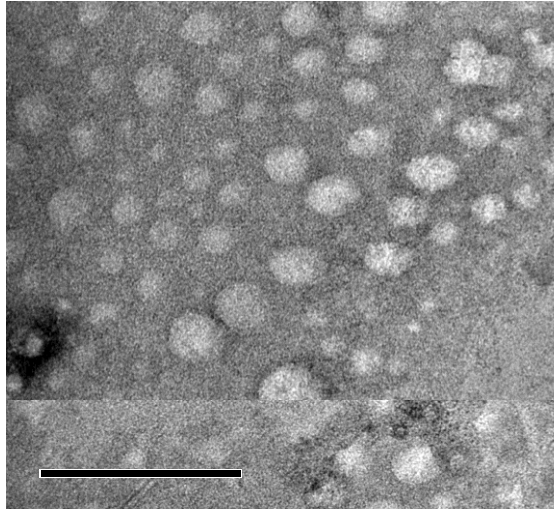


Imagen 21. Microscopia electrónica de transmisión sistema optimizado

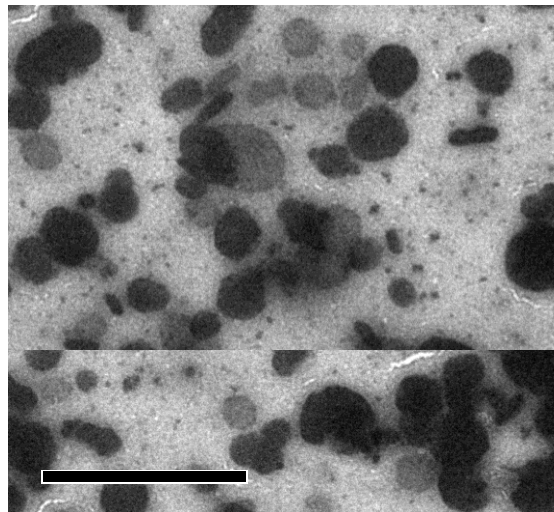


Imagen 22 Microscopia electrónica de transmisión sistema inicial

6.4.2 Estudio de Liberación in vitro

El estudio de la liberación in vitro se realizó con membrana de diálisis, utilizando membranas de celulosa regenerada de tamaño de poro de 12 a 14 kDa, para permitir la difusión del principio activo manteniendo a las partículas separadas del medio de liberación. Una de las desventajas más importante de este tipo de membrana es que puede limitar el paso del fármaco y controlar la velocidad de liberación, lo que hace necesario evaluar la membrana antes de su aplicación.

Para fármacos con poca solubilidad, cuando se lleva a cabo un estudio de características de liberación, se usa típicamente un tensioactivo o un disolvente orgánico para mejorar la solubilidad del fármaco en el medio de liberación para satisfacer las condiciones de disipación, es por ello que se determinó la solubilidad máxima del sirolimus en diferentes medios para establecer cuál es el mejor para llevar a cabo el estudio de liberación.

Nombre del medio	Composición	Solubilidad máxima
SDS	Agua + 0.4% SDS	35 µg/mL
Brij	0.9% NaCl + 0.05% Brij + 0.0003% BHT	8 µg/mL
Propanol	Solución salina + 2-propanol (9:1 v/v)	5 µg/mL
Pluronic	PBS pH 4 + 0.1% Pluronic	13.5 µg/mL
Acetonitrilo	Acetonitrilo 20%	65.57 µg/mL

Tabla 26. Resultados del estudio de solubilidad máxima

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 23. Se consideró que el medio más adecuado para llevar a cabo las pruebas de liberación es el acetonitrilo debido a la alta solubilidad del sirolimus.

Finalmente, para conocer el impacto del medio en la estabilidad de los liposomas, 500 μ L de una suspensión de liposomas se incubaron en 5 mL de acetonitrilo al 20% a 37 °C, con agitación continua. Se analizó el tamaño de partícula de las muestras tras 48 y 120 horas (estimados como el tiempo mínimo y máximo para desarrollar el estudio de liberación) por el método de dispersión dinámica de luz y estos resultados se compararon con los de una muestra de liposomas sin tratamiento, a un nivel de dilución adecuado (tabla 24).

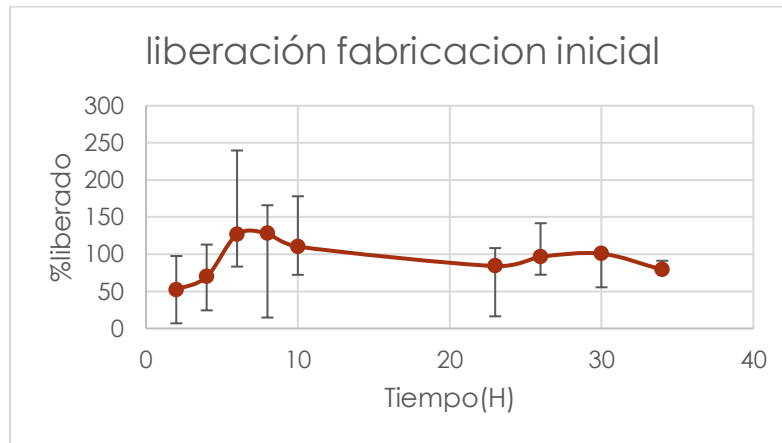
Muestra (h)	Tamaño de partícula del sistema optimizado (nm)
Sin acetonitrilo	185.6 \pm 70.62
0	172.8 \pm 82.64
48	152.5 \pm 66.04
120	167.3 \pm 90.65

Tabla 27. Estabilidad de los liposomas en acetonitrilo

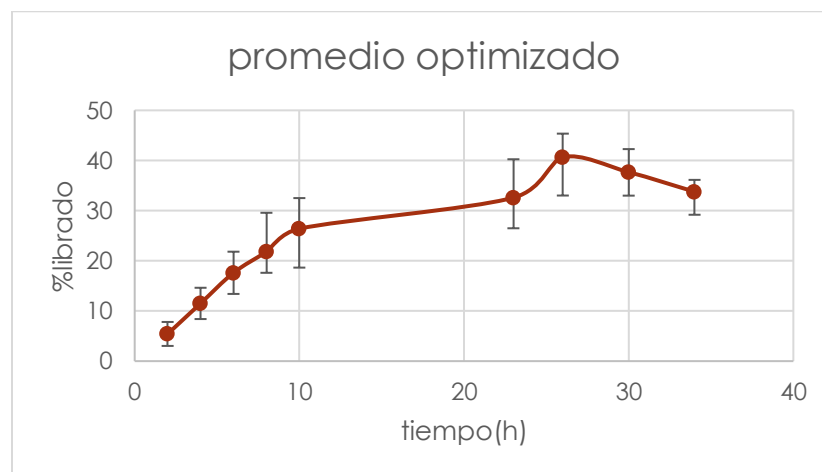
Observando los resultados descritos en la tabla 24, podemos inferir que el tratamiento con acetonitrilo no propicia la pérdida de estabilidad de los liposomas, lo que se traduce en que el tamaño de partícula no cambia de forma significativa después de la incubación, por lo que este medio se utilizó para realizar el ensayo de liberación.

Este estudio se realizó tanto para la formulación inicial como para la formulación optimizada. En las gráficas 12 y 13 se puede apreciar que para la fabricación inicial la liberación del fármaco es rápida ya que a la hora se libera más del 50% del contenido de rapamicina lo que puede ser causado por la baja concentración de la misma. Para la liberación del sistema optimizado se observa que hay un incremento lineal hasta un periodo de 10 h, posteriormente llega a una liberación sostenida y vuelve

a liberarse, esto es causado por que se adsorbe y se libera de las paredes del material donde se está llevando la liberación, así como también puede ser causado por el comportamiento de liberación-absorción de los mismos liposomas.



Gráfica 10. Perfil de liberación de la formulación inicial.



Gráfica 13. Perfil de liberación de la formulación optimizada.

Para entender el comportamiento cinético de liberación, se realizaron ajustes no lineales con distintos modelos matemáticos de cinéticas de liberación (Tabla 25), entre los que se encuentra los modelos de orden 0, Higuchi y Korsmeyer-Peppas.

	Higuchi		Korsmeyer y Peppas			orden 0	
	K	R ²	K	n	R ²	K	R ²
formulación inicial	0.009	0.167	0.851	0.029	0.287	0.001	0.076
formulación optimizada	0.070	0.946	0.048	0.628	0.952	0.009	0.901

Tabla 25. Comparación de ajustes no lineales

La liberación de la formulación inicial no se ajusta a ninguno de los modelos ya que se da de manera rápida alcanzando el 100% a las 5 horas de iniciada la liberación. En cambio, para el sistema de la formulación optimizada, la cinética se ajusta mejor al modelo de Korsmeyer-Peppas dando un valor de "n" de 0.628 lo que indica que tiene un comportamiento de liberación anómalo o de hinchamiento, en donde principalmente se lleva a cabo una absorción del medio y posteriormente difusión tipo Fick.[53, 54]. Esto mostró que el sirolimus se encuentra distribuido en gran parte en la bicapa, además el que se ajuste a Korsmeyer indica que el liposoma no se destruye rápidamente debido a las condiciones del medio. El comportamiento observado coincide con el informado por Zhi-Lin Miao *et al*.[55] el cual utilizó el mismo método de liberación pero utilizando con disolvente metanol y observó que la liberación del 80% de una solución de sirolimus se lleva a cabo en un periodo de 10 h, posteriormente disminuye, reduciendo hasta un 40% a las 28h, indicando, también, un proceso de reabsorción.

Con estos resultados se puede hacer constar que el liposoma optimizado cumplirá con la función de liberar fármaco en un lapso prolongado de tiempo, sin embargo, es preciso realizar pruebas in vivo para mayor información.

7.- Conclusiones

- Se logró diseñar y fabricar liposomas por medio de diferentes diseños de experimentos determinando para cada uno de estos diseños variables como: tipo de fosfolípido, proporción Lecitina-colesterol, tipo crioprotector, tiempo de calentamiento, temperatura de calentamiento, tiempo de sonicación y temperatura de sonicación. Así mismo se midieron como factores de respuesta el potencial z, tamaño de partícula y cantidad de sirolimus en solución.
- Con los DOET 1 L18, DOET 2 L9 y DOET 3 L9 se determinaron las condiciones de la formulación óptima, las cuales fueron: Proporción Lecitina-colesterol (7:3), Conservador (Fenoxietanol), Fosfolípidos (Proveedor Metarin), Crioprotector (sacarosa), temperatura de agitación (70 °C), velocidad de agitación rpm (950), tiempo de agitación (20 min), tiempo de sonicación 20 minutos y temperatura de sonicación 50°C.
- Los liposomas optimizados presentaron las siguientes características; tamaño de partícula de 154 ± 17.7 nm, potencial Z de -40.0 ± 3.3 mV y un rendimiento de sirolimus en la formulación de 894 ± 179 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), además de lograr mejorar el perfil de liberación, el cual nos indica que tiene un comportamiento de liberación por hinchamiento y posterior difusión. Lo cual permite una liberación sostenida mayor, en comparación con otros liposomas previamente desarrollados.
- Se logró la optimización de la formulación el proceso de fabricación de liposomas con sirolimus, mediante la implementación DOET, con un número reducido de experimentos, dando como resultado el

intercambio de etapas en la fabricación como, la filtración y adición de glicerol, por la sonicación, liofilización y la adición de metanol.

8. Perspectivas

Probar su eficiencia y seguridad en un modelo in vivo, así como también probar el tratamiento para diferentes enfermedades autoinmunes, no solo para la enfermedad de Sjögren, como la enfermedad renal crónica, tratamiento para la tuberculosis.

Adicionar un fármaco hidrofílico el cual puede ayudar a incrementar la potencia del sirolimus como es la ciclosporina y de este modo disminuir la dosis necesaria para una inmunosupresión efectiva.

9. Bibliografía

1. Renedo Omaechevarria, M.J., et al., *Formas farmacéuticas*, in *Tecnología Farmacéutica- Formas Farmacéuticas*, J.L.V. Jato, Editor. 2008, SINTESIS, S.A.: Madrid. p. 13-25.
2. Chien, Y.W., *Novel Drug Delivery Systems*, J. Swaebrick, Editor. 1992, Taylor & Francis Group: University of North Carolina. p. 2-38.
3. Michael E. Aulton, K.M.G.T., *Aulton's Pharmaceutics The design and manufacture of medicines*, . 4th Edition 2013. .
4. AGARWAL, S., et al., *Effect of Cholesterol on Size Distribution of Freeze-thaw Extrude*. Indian Journal Of Pharmaceutical Sciences July 2004. **66**(4): p. 450-452.
5. Shimomura, M. and T. Sawadaishi, *Bottom-up strategy of materials fabrication: a new trend in nanotechnology of soft materials*. Current Opinion in Colloid & Interface Science, 2001. **6**(1): p. 11-16.
6. *Liposome Technology :Liposome Preparation and Related Techniques*, in *Liposome Technology*, G. Gredoriadis, Editor. 2007, Informa Healthcare USA: London
7. Gurr, M.I., J.L. Harwood, and K.N. Frayn, *Fatty Acid Structure and Metabolism*, in *Lipid Biochemistry*. 2008, Blackwell Science Ltd. p. 13-92.
8. Jesorka, A. and O. Orwar, *Liposomes: Technologies and Analytical Applications*. Annual Review of Analytical Chemistry, 2008. **1**(1): p. 801-832.
9. A. NOGUERA, et al., *Sirolimus: una nueva alternativa en el tratamiento inmunosupresor*. FARMACIA HOSPITALARIA, 2002. **26**. (2): p. 96-105,.
10. Albetran, H., Y. Dong, and I.M. Low, *Characterization and optimization of electrospun TiO₂/PVP nanofibers using Taguchi design of experiment method*. Journal of Asian Ceramic Societies, 2015. **3**(3): p. 292-300.
11. Buech, G., et al., *Formulation of Sirolimus Eye Drops and Corneal Permeation Studies*. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics, 2007. **23**(3): p. 292-303.

12. Bartos, C., et al., *Comparison of static and dynamic sonication as process intensification for particle size reduction using a factorial design*. Chemical Engineering and Processing: Process Intensification, 2015. **87**: p. 26-34.
13. Maulucci, G., et al., *Particle Size Distribution in DMPC Vesicles Solutions Undergoing Different Sonication Times*. Biophysical Journal, 2005. **88**(5): p. 3545-3550.
14. Ambrus, J.L., *Sjogren's syndrome: New paradigms and areas for future research*. Clinical Immunology, 2017.
15. Garcia-Carrasco, M., et al., *Vitamin D and Sjögren syndrome*. Autoimmunity Reviews, 2017. **16**(6): p. 587-593.
16. Fayyaz, A., B.T. Kurien, and R.H. Scofield, *Autoantibodies in Sjögren's Syndrome*. Rheumatic Disease Clinics of North America, 2016. **42**(3): p. 419-434.
17. Dugel, P.U., et al., *A Randomized, Dose-Escalation Study of Subconjunctival and Intravitreal Injections of Sirolimus in Patients with Diabetic Macular Edema*. Ophthalmology, 2012. **119**(1): p. 124-131.
18. Nguyen, Q.D., et al., *Ocular tolerability and efficacy of intravitreal and subconjunctival injections of sirolimus in patients with non-infectious uveitis: primary 6-month results of the SAVE Study*. Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection, 2013. **3**(1): p. 32.
19. Nguyen, Q.D., et al., *Intravitreal Sirolimus for Noninfectious Uveitis: A Phase III Sirolimus Study Assessing Double-masked Uveitis TReAtment (SAKURA)*. Ophthalmology, 2016. **123**(11): p. 2413-2423.
20. Shah, M., et al., *A rapamycin-binding protein polymer nanoparticle shows potent therapeutic activity in suppressing autoimmune dacryoadenitis in a mouse model of Sjögren's syndrome*. Journal of Controlled Release, 2013. **171**(3): p. 269-279.
21. Linares-Alba, M.A., et al., *Preformulation Studies of a Liposomal Formulation Containing Sirolimus for the Treatment of Dry Eye Disease*. J Ocul Pharmacol Ther, 2016. **32**(1): p. 11-22.

22. Napoli, K.L. and P.J. Taylor, *From Beach to Bedside: History of the Development of Sirolimus*. Therapeutic Drug Monitoring, 2001. **23**(5): p. 559-586.
23. Simamora, P., J.M. Alvarez, and S.H. Yalkowsky, *Solubilization of rapamycin*. International Journal of Pharmaceutics, 2001. **213**(1-2): p. 25-29.
24. Kahan, B.D., *Sirolimus: a comprehensive review*. Expert Opinion on Pharmacotherapy, 2001. **2**(11): p. 1903-1917.
25. Neuhaus, P., J. Klupp, and J.M. Langrehr, *mTOR inhibitors: An overview*. Liver Transplantation, 2001. **7**(6): p. 473-484.
26. Sádaba, B., *Monitorización y efectos secundarios de los inmunosupresores en el trasplante*. Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 2006. **29**: p. 207-218.
27. Haeri, A., et al., *Effective attenuation of vascular restenosis following local delivery of chitosan decorated sirolimus liposomes*. Carbohydrate Polymers, 2017. **157**: p. 1461-1469.
28. Saeed Ghanbarzadeh, A.K., Leila Mohamed Khosroshahi & Sanam Arami, *Fusogenic pH sensitive liposomal formulation for rapamycin: Improvement of antiproliferative effect*. Pharmaceutical Biology, 2014. **52**(7): p. 848-854.
29. Eloy, J.O., et al., *Anti-HER2 immunoliposomes for co-delivery of paclitaxel and rapamycin for breast cancer therapy*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2017. **115**: p. 159-167.
30. Ono, K., et al. *A novel strategy inducing autophagic cell death in Burkitt's lymphoma cells with anti-CD19-targeted liposomal rapamycin*. Blood cancer journal, 2014. **4**, e180 DOI: 10.1038/bcj.2014.2.
31. ASQ. *What Is Design of Experiments (DOE)?* 2014 [cited 2014 Noviembre 05]; Available from: <http://asq.org/learn-about-quality/data-collection-analysis-tools/overview/design-of-experiments.html>.
32. Kuehl, R.O., *Diseño de experimentos: Principios estadísticos de diseño y análisis de investigación*. 2da ed, ed. T. Learning. 2001, Mexico: The University of Arizona.

33. Pullido, H.G. and R.d.I.V. Salazar, *Analisis y diseño de experimentos*. 2008, McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V.: Mexico DF.
34. Goh, T.N., *Taguchi Methods: Some Technical, Cultural and Pedagogical Perspectives*, in *Six Sigma: Advanced Tools for Black Belts and Master Black Belts*. 2006. p. 267-295.
35. Suresh, S., et al., *Formulation and evaluation of liposomes containing antitubercular drugs by Taguchi's orthogonal array design*. *Acta Pharmaceutica Scientia*, 2010. **52**(1): p. 79-88.
36. Miao, Z.-L., et al., *Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin*. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2015. **9**(3): p. 941-946.
37. Kyadarkunte, A.Y., M.S. Patole, and V.B. Pokharkar, *Cellular interactions and photoprotective effects of idebenone-loaded nanostructured lipid carriers stabilized using PEG-free surfactant*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015. **479**(1): p. 77-87.
38. Chen, W.K., C.H. Wang, and C.J. Lee, *The optimum process conditions for liposome production using an orthogonal array experimentation*. *Journal of the Chinese Institute of Engineers, Transactions of the Chinese Institute of Engineers, Series A/Chung-kuo Kung Ch'eng Hsuch K'an*, 1994. **17**(4): p. 513-520.
39. Tague's, N.R., *The Quality Toolbox*,. Second Edition ed. 2004: ASQ Quality Press.
40. Xu, X., et al., *Formulation and process factors influencing product quality and in vitro performance of ophthalmic ointments*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2015. **493**(1): p. 412-425.
41. Her, C., et al., *The Charge Properties of Phospholipid Nanodiscs*. *Biophysical Journal*, 2016. **111**(5): p. 989-998.
42. Liu, W., et al., *Kinetic stability and membrane structure of liposomes during in vitro infant intestinal digestion: Effect of cholesterol and lactoferrin*. *Food Chemistry*, 2017. **230**: p. 6-13.
43. Christensen, D., et al., *Trehalose preserves DDA/TDB liposomes and their adjuvant effect during freeze-drying*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 2007. **1768**(9): p. 2120-2129.

44. De Loecker, R., et al., *The prevention of erythrocyte swelling upon dilution after freezing and thawing*. *Cryobiology*, 1991. **28**(3): p. 237-245.
45. De Loecker, R., et al., *Osmotic Effects of Dilution on Erythrocytes after Freezing and Thawing in Glycerol-Containing Buffer*. *Cryobiology*, 1993. **30**(3): p. 279-285.
46. Schwarz, C. and W. Mehnert, *Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN)*. *International Journal of Pharmaceutics*, 1997. **157**(2): p. 171-179.
47. Shirakashi, R., et al., *Effects of physiological isotonic cryoprotectants on living cells during the freezing–thawing process and effects of their uptake by electroporation: Sp2 cells in alginate–trehalose solutions*. *Heat Transfer—Asian Research*, 2003. **32**(6): p. 511-523.
48. Soares, S., et al., *Effect of freeze-drying, cryoprotectants and storage conditions on the stability of secondary structure of insulin-loaded solid lipid nanoparticles*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. **456**(2): p. 370-381.
49. William Mendenhall, R.J.B., Barbara M. Beaver, *Introducción a la probabilidad y estadística*. 13° ed. 2006, Estados Unidos: Cengage Learning Editores, . 780.
50. Joseph Herman, D.A., Sarah Fair; Thermo Fisher Scientific, Franklin, *The Investigation of Factors Contributing to Immunosuppressant Drugs Response Variability in LC-MS/MS Analysis* THERMOCIENTIFIC, 2004: p. 1-5.
51. John M. Prausnitz, R.N.L., Edmundo Gomes de Azevedo, *Termodinámica molecular de los equilibrios de fases*. TERCERA ed. 2000, Madrid: PRENTICE HALL IBERIA. 657.
52. Kim, M.-S., et al., *Supersaturatable formulations for the enhanced oral absorption of sirolimus*. *International Journal of Pharmaceutics*, 2013. **445**(1): p. 108-116.
53. Andreetta, H.A. and *Fármacos de acción prolongada: mecanismos de liberación*. *Lat. Am. J. Pharm.*, 2003. **22**(4): p. 355-64.
54. Herran, D.H., *Difusión anómala: fundamentos y aplicaciones*. *Miscelánea Matemática*, 2014. **58**: p. 37-51.

55. Miao, Z.-L., et al., *Preparation of a liposomal delivery system and its in vitro release of rapamycin*. *Experimental and therapeutic medicine*, 2015. **9**(3): p. 941-946.