



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

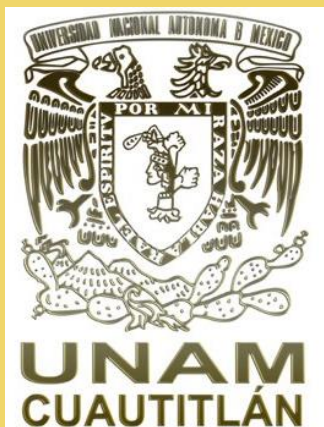
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

“Desarrollo de liposomas cargados con glutatión, un  
antioxidante de interés farmacéutico, para administración  
parenteral”

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICO INDUSTRIAL

PRESENTA:  
DANIELA MONTSERRAT GÓMEZ ROMERO

ASESOR:  
DR. ROBERTO DÍAZ TORRES



CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2022



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.





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

CUAUTITLÁN

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO;  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Desarrollo de liposomas cargados con glutatión, un antioxidante de interés farmacéutico, para administración parenteral.**

Que presenta la pasante: **Daniela Montserrat Gómez Romero**

Con número de cuenta: 313129678 para obtener el título de: Licenciada en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de febrero de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	
<b>VOCAL</b>	<u>Dr. José Juan Escobar Chávez</u>	
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Dra. Gabriela Rodríguez Patiño</u>	
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>M.C. Claudia Gabriela Islas Vargas</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**  
**SECRETARÍA GENERAL**  
**DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

CUAUTITLÁN

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO**  
**DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN**  
**PRESENTE**

**ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO**  
**Jefa del Departamento de Titulación**  
**de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Desarrollo de liposomas cargados con glutatión, un antioxidante de interés farmacéutico, para administración parenteral.**

Que presenta la pasante: **Daniela Montserrat Gómez Romero**  
Con número de cuenta: 313129678 para obtener el título de: Licenciada en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de febrero de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	<b>NOMBRE</b>	<b>FIRMA</b>
<b>PRESIDENTE</b>	<u>DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	<u></u>
<b>VOCAL</b>	<u>Dr. José Juan Escobar Chávez</u>	<u></u>
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	<u></u>
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Dra. Gabriela Rodríguez Patiño</u>	<u></u>
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>M.C. Claudia Gabriela Islas Vargas</u>	<u></u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO;  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Desarrollo de liposomas cargados con glutatión, un antioxidante de interés farmacéutico, para administración parenteral.**

Que presenta la pasante: **Daniela Montserrat Gómez Romero**

Con número de cuenta: 313129678 para obtener el título de: Licenciada en Química Industrial


Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de febrero de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	_____
<b>VOCAL</b>	<u>Dr. José Juan Escobar Chávez</u>	_____
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Dra. Gabriela Rodríguez Patiño</u>	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>M.C. Claudia Gabriela Islas Vargas</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional





UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO;  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Desarrollo de liposomas cargados con glutatión, un antioxidante de interés farmacéutico, para administración parenteral.**

Que presenta la pasante: **Daniela Montserrat Gómez Romero**  
Con número de cuenta: 313129678 para obtener el título de: Licenciada en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de febrero de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	_____
<b>VOCAL</b>	<u>Dr. José Juan Escobar Chávez</u>	_____
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Dra. Gabriela Rodríguez Patiño</u>	<u>Gaby R.P.</u>
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>M.C. Claudia Gabriela Islas Vargas</u>	_____

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN**

DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

**ASUNTO: VOTO APROBATORIO**



**DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO;  
Jefa del Departamento de Titulación  
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de tesis y examen profesional.**

**Desarrollo de liposomas cargados con glutatión, un antioxidante de interés farmacéutico, para administración parenteral.**

Que presenta la pasante: **Daniela Montserrat Gómez Romero**  
Con número de cuenta: 313129678 para obtener el título de: Licenciada en Química Industrial

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 11 de febrero de 2022.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	<u>DESS. Rodolfo Cruz Rodríguez</u>	_____
<b>VOCAL</b>	<u>Dr. José Juan Escobar Chávez</u>	_____
<b>SECRETARIO</b>	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	_____
<b>1er. SUPLENTE</b>	<u>Dra. Gabriela Rodríguez Patiño</u>	_____
<b>2do. SUPLENTE</b>	<u>M.C. Claudia Gabriela Islas Vargas</u>	<u>21/02/2022</u>

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional





*"Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: también es un niño interpretando fenómenos naturales que lo impresionan como un cuento de hadas".*

*Gracias al empoderamiento femenino de Marie Curie en la ciencia, quien por grandes acciones de lucha es por lo que soy la mujer científica de hoy.*

Para Karen, Cristina y Rodolfo.

En reconocimiento a todo el apoyo brindado a través de mis estudios y con la promesa de seguir siempre adelante, con cariño y admiración.  
Por la pandemia, el encierro y esta tesis, gracias Beni y Jacky quienes me acompañaron en todo momento.

Gracias Krista y Yahaira  
por estar y por siempre cuestionarme para lograr seguir adelante.

Gracias Doctor Roberto. Por ser guía, por la oportunidad de acercarme a un área un poco alejada de mí campo que, cambió mi perspectiva de la ciencia.

Antes de celebrar quiero agradecer a mi universidad por haberme permitido ser parte de esta gran casa de estudios y poder llevar con orgullo su nombre a todos lados. **¡Muchas gracias, Universidad Nacional Autónoma de México!**

¡GOYA! ¡GOYA!  
¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!  
¡CACHUN, CACHUN, RA, RA!  
¡GOYA!  
¡¡UNIVERSIDAD!!







# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Representación de nanoestructuras orgánicas e inorgánicas para el transporte y liberación de fármacos
- Figura 2. Representación esquemática de estructuras de los lípidos
- Figura 3. Representación de los fosfoglicéridos más comunes
- Figura 4. Representación esquemática de estructura de lípidos anfipáticos, fórmula estructural de fosfatidilcolina y modelo espacial de fosfatidilcolina
- Figura 5. Micela
- Figura 6. Bicapa lipídica plana
- Figura 7. Representación esquemática de colesterol: fórmula estructural y modelo espacial
- Figura 8. Estructura conformacional de un liposoma
- Figura 9. Fases del lípido en función de la temperatura
- Figura 10. Diagrama representativo de empaquetamiento fosfolipídico
- Figura 11. Mecanismo de gemación para la formación de liposoma
- Figura 12. Representación esquemática de la incorporación de un principio activo dependiendo del carácter polar en el liposoma
- Figura 13. Localización de colesterol en la bicapa lipídica
- Figura 14. Representación esquemática de diferentes tipos de vesículas: SUV, LUV y MLV
- Figura 15. Esquema de la formación de liposomas método Brangham
- Figura 16. Mecanismo de formación de liposomas por el método proliposomas
- Figura 17. Obtención de liposomas tipo LUV
- Figura 18. Procedimientos para la obtención de liposomas (MLV, LUV Y SUV)
- Figura 19. Método de atrapamiento pasivo
- Figura 20. Método de atrapamiento activo
- Figura 21. Estructura química del L-Glutatión reducido
- Figura 22. Espectro electromagnético
- Figura 23. Esquema de las partes de un espectrofotómetro
- Figura 24. Esquema de las partes de un equipo de DLS
- Figura 25. Estructura de 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine
- Figura 26. Estructura química de Tritón X-100
- Figura 27. Reacción de formación de color del reactivo de Ellman con grupos sulfhidrilo
- Figura 28. Sistema de rotavapor
- Figura 29. Sonicator
- Figura 30. Nanosizer
- Figura 31. Microcentrífuga
- Figura 32. Lector de placas
- Figura 33. Análisis de la distribución de tamaño por DLS respecto a porcentaje íntegro de colesterol en los sistemas liposomales sonicados
- Figura 34. Gráfica de interacción de PDI dependiente de concentración de colesterol
- Figura 35. Diagrama de Pareto estandarizado para medición de tamaño de partícula
- Figura 36. Diagrama de Pareto estandarizado para medición de índice de polidispersidad
- Figura 37. Diagrama de superficie de respuesta estimada
- Figura 38. Representación gráfica de la curva de calibración de Glutatión
- Figura 39. Análisis porcentaje de hemólisis para los sistemas vesiculares



## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Clasificación y nomenclatura de liposomas en función de lamelaridad
- Tabla 2. Métodos de preparación de liposomas y resultado del tamaño de liposoma
- Tabla 3. Técnicas para caracterización física de liposomas
- Tabla 4. Variación de los porcentajes para los ensayos
- Tabla 5. Porcentajes óptimos para realizar ensayos de liposomas
- Tabla 6. Cantidades utilizadas de lípidos
- Tabla 7. Preparación de curva de calibración
- Tabla 8. Medias experimentales de tamaño de partícula y PDI
- Tabla 9. Nivel de factor
- Tabla 10. Valor óptimo de la respuesta
- Tabla 11. Evaluación del grado de encapsulación de liposomas
- Tabla 12. Evaluación de ensayos de estabilidad estructural a partir de valoración de hemólisis
- Tabla 13. Concentración de GSH a partir de la recta de la curva

# ABREVIATURAS

Ac: acuoso

BRx: buffer de reacción

C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH: alcohol etílico

CH<sub>3</sub>OH: alcohol metílico

CK: células de Kupffer

Cl<sub>3</sub>CH: cloroformo

Col: colesterol

DLS: dispersión dinámica de la luz

DMPC: dimiristoilfosfatidilcolina

DMSO: dimetilsulfóxido

DPPC: dipalmitoilfosfatidilcolina

DSPC: diestearoilfosfatidilcolina

DTNB: ácido 5,5-ditiobis-(2-nitrobenzoico), Reactivo de Ellman

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

EE: eficiencia de encapsulación

FC: Fosfatidilcolina

g: gramos

GSH: glutatión

GSSG: disulfuro de glutatión

HDL: lipoproteína de alta densidad

KCl: cloruro de potasio

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: fosfato monopotásico

*L<sub>d</sub>*: fase líquida desordenada

LEH: hemoglobina encapsulada en liposomas

LDL: lipoproteínas de baja densidad

*L<sub>o</sub>*: fase líquida ordenada

LUV: vesículas unilamelares grandes

MLV: vesículas multilamelares

NaCl: cloruro de sodio

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: fosfato de sodio

NPs: nanopartículas

PBS: por sus siglas en inglés, phosphate buffered saline (tampón fosfato salino)

PDI: índice de polidispersidad

PG: fosfatidilglicerol

POPC: palmitoil oleil fosfatidilcolina

SFM: sistema fagocítico mononuclear

*S<sub>o</sub>*: fase sólida ordenada

SUV: vesículas unilamelares pequeñas

TF: temperatura de transición de fase

TX-100: tritón X-100





# ÍNDICE TEÓRICO

<b>I. RESUMEN</b> .....	1
<b>II. MARCO TEÓRICO</b> .....	3
2.1 INTRODUCCIÓN .....	3
2.2 NANOPARTÍCULAS .....	4
2.3 LÍPIDOS.....	7
2.3.1 FOSFOLÍPIDOS .....	9
2.3.1.1 FOSFATIDILCOLINA .....	10
2.3.1.2 AGREGADOS DE LIPÍDOS ANFIPÁTICOS.....	12
2.3.2 COLESTEROL .....	13
2.4 LIPOSOMAS.....	14
2.4.1 ESTRUCTURA .....	15
2.4.2 FORMACIÓN DEL LIPOSOMA .....	16
2.4.3 ESTABILIDAD .....	21
2.4.3.1 PRESENCIA DE COLESTEROL EN LIPOSOMAS .....	23
2.3.4 COMPONENTES .....	25
2.3.5 CLASIFICACIÓN .....	27
2.5 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS .....	30
2.5.1 TIPOS DE ATRAPAMIENTO DEL FÁRMACO .....	40
2.5.2 LIPOSOMAS PARA UNA ADMINISTRACIÓN SELECTIVA Y CONTROLADA.....	43
2.5.3 IMPORTANCIA DEL TAMAÑO DE LOS LIPOSOMAS .....	44
2.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS .....	44
2.7 USOS DE LOS LIPOSOMAS .....	46
2.8 VENTAJAS .....	48
2.9 LIPOSOMAS DE ADMINISTRACIÓN PARENTERAL.....	49
2.10 PRUEBA DE HEMÓLISIS .....	50
2.11 GLUTATIÓN .....	52
<b>III. TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA CARECTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS</b> .....	53
3.1 ESPECTROFOTOMETRÍA .....	53
3.1.1 FUNDAMENTOS.....	53
3.1.2 INSTRUMENTACIÓN.....	55
3.2 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ.....	56
3.2.1 FUNDAMENTOS.....	56
3.2.2 INSTRUMENTACIÓN.....	58
<b>IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	59

<b>V. HIPÓTESIS</b> .....	60
<b>VI. OBJETIVOS:</b> .....	60
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	61
7.1 MATERIALES .....	61
7.1.1 LÍPIDOS .....	61
7.1.2 ANTIOXIDANTE .....	62
7.1.3 OTROS MATERIALES .....	62
7.2 METODOLOGÍA .....	64
7.2.1 PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS Y ENCAPSULAMIENTO DE GSH .....	65
7.2.2 DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA .....	69
7.2.3 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN .....	70
7.2.4 DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE HEMÓLISIS .....	72
7.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	74
<b>VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	75
8.1 REACTIVIDAD ESTRUCTURAL DE MEMBRANAS LIPÍDICAS CONTENIENDO DOMINIOS ENRIQUECIDOS EN COLESTEROL (COMPOSICIÓN DEL LIPOSOMA) .....	75
8.2 ANÁLISIS DEL TAMAÑO Y DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE LIPOSOMAS POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ.....	77
8.3 ANÁLISIS DE OPTIMIZACIÓN PARA MÚLTIPLES RESPUESTAS.....	82
8.4 ANÁLISIS DE PODER DE EFICIENCIA DE ENCAPSULAMIENTO DE GSH .....	83
8.5 PRUEBA DE HEMÓLISIS .....	87
<b>IX. CONCLUSIONES</b> .....	90
<b>X. ANEXOS</b> .....	91
10.1 FORMACIÓN DE TRANSICIÓN VÍTREA (GLASS TRANSITION) A PARTIR DE LA ADICIÓN DE SACÁRIDOS .....	91
10.2 CONCENTRACIÓN DE GSH ( $\mu\text{M}$ ) EN CURVA DE CALIBRACIÓN.....	92
10.3 CÁLCULO PARA OBTENER CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL DE GSH.....	93
<b>XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	94

## I. RESUMEN

La administración parenteral constituye una de las formas de aplicación de fármacos más utilizada. Para aplicar un fármaco por vía parenteral será necesario atravesar la piel, de forma que la medicación pase al torrente sanguíneo directamente o a través de los diferentes tejidos donde se administra mediante una inyección.

Una de sus ventajas principales conlleva una absorción muy regular, en donde el fármaco se suministra de forma más directa y por lo tanto se consigue una mayor eficacia. De igual manera, las dosis administradas son más exactas (Botella C., 2015), garantizando un efecto terapéutico rápido y preciso.

La vía parenteral puede ser administrada ya sea a través de una vena (intravenosa), un músculo (intramuscular) o a través de la piel (subcutánea).

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas por una o varias bicapas paralelas de fosfolípidos, los cuales asemejan la composición de las membranas celulares. Las diversas propiedades de los liposomas permiten su aplicación potencial en diferentes campos. Una de estas adaptaciones puede ser en la medicina como una forma de administración de fármacos, en específico la parenteral.

Este trabajo presenta el diseño y caracterización de liposomas de tamaño nanométrico. Como componentes de la matriz lipídica se eligieron fosfolípidos y esteroides, en este caso fosfatidilcolina y colesterol respectivamente, con el fin de encapsular el antioxidante glutatión (GSH), mediante el método de agitación mecánica (vortex). Asimismo, con el objetivo de obtener vesículas estables, se elaboraron diferentes sistemas para determinar los porcentajes de lípidos idóneos.

Uno de los propósitos fundamentales en este trabajo, es demostrar la significativa función que representa la incorporación de colesterol en los sistemas liposomales. El cual condiciona la fluidez de las bicapas lipídicas al disminuir su permeabilidad, proporcionando mayor estabilidad en los sistemas.

La optimización para la distribución de tamaño liposomal se realizó por sonicación en baño de ultrasonido. Como resultado, se obtuvieron liposomas con tamaños en el orden entre 155 y 180 nm, la caracterización se llevó a cabo utilizando un analizador de tamaños de partícula. Con el fin de presentar la medición de glutatión encapsulado y de exhibir la idoneidad de los componentes utilizados para la elaboración de los sistemas, se evaluó la efectividad de encapsulamiento a partir de la cuantificación de GSH, revelado a través del porcentaje del producto entre el valor experimental y teórico del fármaco. La metodología se efectuó a partir de una curva patrón, resultando en promedio un valor de 99% de eficiencia de encapsulamiento.

Finalmente se realizó la prueba de hemólisis, con el fin de evaluar la isotonicidad de los liposomas sobre eritrocitos humanos. La mayoría de los sistemas no presentó hemólisis, mostrando a los liposomas como formas farmacéuticas biocompatibles con el cuerpo humano.



Como parte del desarrollo del conocimiento en la industria farmacéutica en México, se presenta como alternativa el incremento de formulaciones que permitan la entrega de ingredientes activos sin su degradación durante el proceso de adición. Es así que en este proyecto de investigación se busca utilizar la técnica optimizada de preparación de sistemas liposomales para la encapsulación de compuestos bioactivos, en específico moléculas hidrosolubles de baja biodisponibilidad como el glutatión.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 INTRODUCCIÓN

Encapsular sustancias para liberarlas de forma controlada es una de las más recientes estrategias desarrolladas en el ámbito farmacéutico. Con ello se persigue la idea de la "bala mágica", en donde el fin es poder transportar las sustancias terapéuticas al lugar concreto (órganos o células) donde se necesita.

La ciencia ha vivido en las últimas décadas una nueva revolución, el paradigma "nano", representado por dos nuevas disciplinas, denominadas nanociencia y nanotecnología (Ruano M., 2012). Las cuales están basadas en el desarrollo de métodos de fabricación precisos, reproducibles y de bajo costo para la obtención de estructuras cada vez más pequeñas, que abarcan desde la escala de la micra hasta la nanométrica.

En medicina y ciencias de la salud, en particular en el desarrollo de sistemas para terapia, la liberación de fármacos, ha sido objeto de interés, haciendo de esta manera que las investigaciones en este campo hayan crecido enormemente.

Cuando un fármaco, o molécula biológicamente activa, se administra en una forma convencional (comprimidos, cápsulas, etc.), el fármaco es liberado rápidamente al medio biológico y su comportamiento en el organismo es completamente dependiente de su estructura química. Particularmente, esta propiedad la determinan las propiedades fisicoquímicas de la molécula activa (lipofilia, hidrofilia, ionización, etcétera), las cuales condicionan su eventual absorción y su distribución en el organismo. Al momento de su distribución, las moléculas del fármaco son capaces de llegar al tejido enfermo, pero al mismo tiempo, alcanzar regiones o tejidos sanos induciendo efectos secundarios o indeseables.

Por el contrario, cuando la molécula activa se administra encapsulada bajo la forma de nanopartículas, son las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas (tamaño, características superficiales, hidrofilia, etcétera), las que condicionan la distribución del fármaco en el organismo y su concentración en el lugar de acción. Una vez alcanzada la región enferma, las nanopartículas transportadoras de fármaco controlan la liberación de su contenido.

El hecho de poder concentrar el fármaco en el lugar de acción ofrece la posibilidad de minimizar los efectos secundarios y aumentar el índice terapéutico de la molécula en cuestión (Irache J. M., 2008).

Como resultado se ha aplicado la nanotecnología a la biotecnología dando lugar a la nanobiotecnología, donde se engloba el estudio de biotransportadores para liberación controlada de fármacos. De esta manera se optimiza su biocompatibilidad cuando entran en contacto con tejido, por lo tanto, parte de su composición ha de tener algún componente celular. Como es el caso de los liposomas, que al igual que las membranas celulares, ambos están conformados por fosfolípidos.

Los liposomas se definen como estructuras vesiculares delimitadas por bicapas lipídicas, compuestos primordialmente por fosfolípidos como fosfatidilcolina, fosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina.

Su principal ventaja es el aumento en la estabilidad de fármacos por encapsulación. Así como también son biodegradables, deformables, atóxicos y permiten la liberación controlada de agentes terapéuticos. Los liposomas entre muchas otras cosas han sido empleados para la liberación de vacunas, enzimas y vitaminas en el cuerpo humano (Ruano M., 2012).

La fabricación de liposomas en el orden nanométrico y micrométrico permite una amplia aplicación, principalmente en los diversos campos científicos e industriales. Esta tecnología farmacéutica es una herramienta útil para la administración de diversos compuestos en sitios específicos, permitiendo el paso de fármacos con peso molecular grande y alta solubilidad en agua (Alcalá-Alcalá., 2014). Además, también pueden ser portadores de fármacos tradicionales de bajo peso molecular, proteínas terapéuticas y agentes de diagnóstico (Vemuri S., 1995).

En la industria cosmética, los liposomas, han sido utilizados como sistemas acarreadores de compuestos químicos para liberación tópica y controlada, para potenciar la humectación de la piel. En la industria alimenticia se ha explorado esta tecnología para incorporar componentes lipo e hidrofílicos entre las bicapas lipídicas, como medios encapsulantes de antioxidantes, vitaminas, sabores, y antimicrobianos.

## 2.2 NANOPARTÍCULAS

Las nanopartículas (NPs) son estructuras con dimensiones similares en tamaño a muchas moléculas biológicas, su manejo llevó al desarrollo de la nanomedicina. Las nanopartículas presentan un diámetro entre 10 y 1000 nm (Mayer C., 2005; Murthy S. K., 2007), en las que el principio activo o fármaco de interés es disuelto, atrapado, adsorbido, adherido o encapsulado por las nanopartículas (Kalpesh A., 2013).

Los sistemas están formados en primer lugar por el principio activo o molécula biológicamente activa y, en segundo, el propio sistema que permite una función especial relacionada con el diagnóstico, tratamiento, o prevención de una enfermedad (Irache J. M., 2008).

La nanomedicina, considerada como uno de los campos de la nanobiotecnología con aplicaciones directas en medicina, se puede definir como la ciencia y tecnología utilizada en la planeación y evaluación de sistemas complejos, a escala nanométrica. Se orienta a explorar, sintetizar y transformar nuevas propiedades en moléculas biológicas, a partir de nanomateriales, nanosistemas y/o nanoestructuras.

Más que el gusto por manipular la materia a escalas de tamaño reducidas, lo interesante de la nanotecnología es el estudio de las propiedades físicas y químicas únicas de las nanoestructuras. Bajo estas condiciones los materiales y sustancias presentan (Alcalá-Alcalá., 2014):

- a) Un aumento considerable en reactividad química, debido a su mayor área superficial. A medida que disminuye el tamaño de partícula, se encuentra una gran proporción de átomos en la superficie en comparación con el interior. Por ejemplo, el tamaño de partícula de 30 nm tiene 5% de sus átomos en la superficie, a 10 nm 20%, y a 3 nm 50% de los átomos se encuentran en la superficie. Por lo tanto, una NPs tiene un área de superficie mucho mayor por unidad de masa en comparación con partículas más grandes, lo que conduce a una mayor reactividad (Thassu D., 2007).
- b) Se manifiestan efectos cuánticos cuando la materia se encuentra a niveles nanométricos. El mundo nano, no está regido por las leyes de la física clásica, sino por las leyes de la física cuántica. A estos niveles, por ejemplo, los metales se convierten en colorantes y poseen propiedades magnéticas (Aguayo G., 2011).

Está ampliamente aceptado que es más probable que los efectos del área de superficie, así como los efectos cuánticos están asociadas con las dimensiones del orden de alrededor de los 100 nm, por lo tanto estos efectos pueden comenzar a dominar las propiedades de la materia a medida que el tamaño se reduce a la nanoescala, de tal manera que los efectos cuánticos y las propiedades de superficie adquieren significancia, haciendo posible la manipulación de los materiales a nivel atómico, molecular o supramolecular con diferentes intenciones u objetivos (Williams D., 2008). Estos factores pueden mejorar propiedades, como reactividad, fuerza, características eléctricas y su comportamiento *in vivo*.

Los métodos generales de trabajo, que están ligados a la complejidad nanométrica, son:

A. Método Bottom-up.

La fabricación bottom-up implica la construcción de nanoestructuras átomo por átomo o molécula por molécula (Thassu D., 2007).

Este tipo de metodología es el enfoque principal de la nanotecnología, ya que permite que la materia pueda controlarse de manera precisa.

B. Método Top-down.

Este enfoque se centra en el diseño y reducción del tamaño de estructuras para obtener a nanoescala sistemas funcionales. Utiliza técnicas como la fragmentación, corte o grabado, a través de procesos de mecanizado de película, de superficie o litografía (de rayos x, microelectro-sistemas, haz de electrones) para reducir la talla de los materiales en bulto hasta la escala nanométrica.

Dependiendo del método de preparación, se pueden obtener diferentes formas de nanopartículas (Mohanraj V., 2006) con diversas propiedades y características de liberación para el agente terapéutico encapsulado.

Existen técnicas específicas que se aplican hacia el ámbito de conocimiento, sector o dominio material de operación. Los materiales y las tecnologías que se han utilizado para la construcción de nanosistemas de liberación de fármacos son muy diversos, pero se pueden clasificar de manera muy general en 2 grupos (Torchilin., 2014), basándose en la Figura 1:

a) Nanoestructuras orgánicas.

En este grupo se encuentran los materiales poliméricos con los que se construyen nanoesferas, nanocápsulas, micelas, liposomas, dendrímeros y conjugados polímero-fármaco (Rojas-Aguirre., 2016).

b) Nanoestructuras inorgánicas.

Bajo esta clasificación están las nanopartículas de óxidos metálicos, nanopartículas de sílica mesoporosa y nanotubos de carbono.

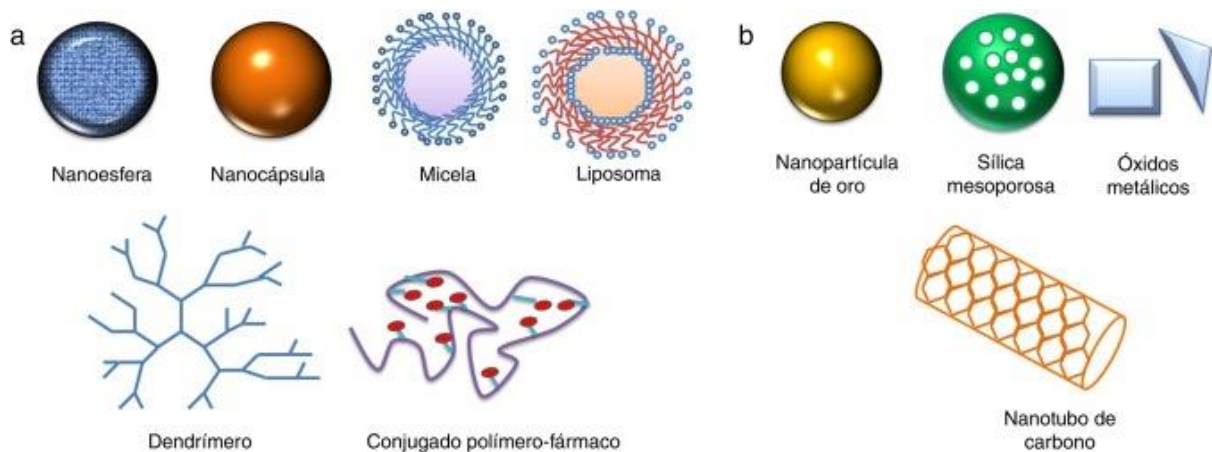


Figura 1. Representación de: a) nanoestructuras orgánicas y b) inorgánicas para el transporte y liberación de fármacos (Rojas-Aguirre., 2016).

Se han realizado una considerable cantidad de trabajos permitiendo que con ciertos tipos de nanopartículas se efectúen ensayos clínicos o incluso trabajos en donde estas hayan sido aprobadas para su aplicación en humanos. Todo ello ha sido posible por las probabilidades que ofrecen estos sistemas para mejorar la seguridad y eficacia de numerosos fármacos. Entre las ventajas que aportan estas nanopartículas se pueden citar:

1. Capacidad para proteger la molécula encapsulada frente a su eventual degradación desde el momento de la administración hasta que alcanza su lugar de acción o absorción.
2. Capacidad para atravesar las barreras biológicas como piel, mucosas gastrointestinal o respiratoria.
3. Capacidad para alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción.
4. Capacidad para alcanzar compartimentos intracelulares.
5. Capacidad para controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción.
6. El sistema se puede utilizar para varias rutas de administración incluyendo oral, nasal, parenteral, intraocular, etcétera (Kalpesh A., 2013).

### 2.3 LÍPIDOS

Los lípidos se describen como un grupo de moléculas biológicas, las cuales presentan las siguientes características (Lehninger., 2009):

- a) Son ácidos orgánicos de cadena larga. En los seres vivos abundan los átomos de carbono con número par, los más comunes son 16 y 18 carbonos.
- b) En su estructura se encuentra un solo grupo carboxilo y una “cola” no polar hidrocarbonada, como se muestra en la Figura 2.
- c) Pueden ser saturados (sólo enlaces simples) o insaturados (con dobles enlaces).



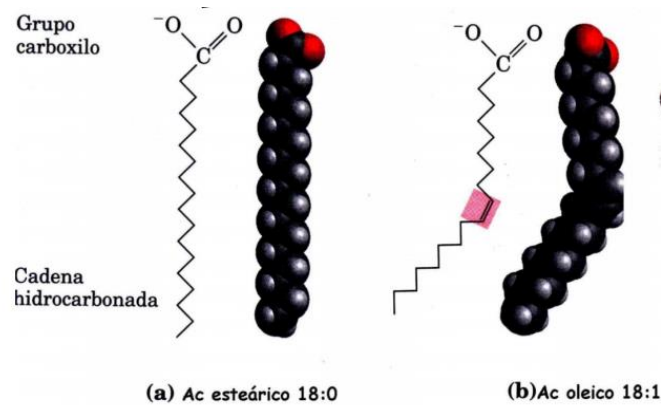


Figura 2. Representación esquemática de estructuras de los lípidos, en donde a) lípido saturado y b) lípido insaturado (una insaturación en carbono 18) (Lehninger., 2009)

En cuanto a su propósito en el cuerpo humano los lípidos son de crucial importancia para el almacenamiento de energía (grasas y aceites) y el desarrollo de la membrana celular (fosfolípidos, esfingolípidos, colesterol). También pueden tener otras funciones, como: producción de hormonas y vitaminas, mensajeros intracelulares (Dolores D., 2014), entre otras.

Las propiedades de los lípidos dependen de la longitud y grado de insaturación de sus cadenas:

- a. Cadenas de longitud corta e insaturadas favorece la fluidez de los ácidos grasos y de sus derivados.
- b. Cuanto más larga es la cadena y menor el número de dobles enlaces, menor es la solubilidad en agua.
- c. Las cadenas con múltiples dobles enlaces están retorcidas y rígidas, en comparación con las saturadas, las cuales son flexibles y alargadas.
- d. Los dobles enlaces con configuración *cis* producen una desviación rígida de la cadena.

Los lípidos pueden ser de dos tipos:

1. Saponificables.

Pueden ser hidrolizados por grupos –OH y dar lugar a jabones o sales de los ácidos grasos.

Ejemplos: triglicéridos, glicerofosfolípidos (fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina) y los esfingolípidos (esfingomielina); los cuales contienen cadenas largas de ácido carboxílico, o ácidos grasos que esterifican una molécula ya sea el glicerol o la esfingosina (García S., 2015).

2. No saponificable.

No se modifica la estructura, ni propiedades por tratamientos alcalinos. Generalmente se les llama lípidos derivados y/o asociados.

Algunos ejemplos de lípidos no saponificables son las vitaminas A y E, y el colesterol.

### 2.3.1 FOSFOLÍPIDOS

Los fosfolípidos pertenecen a la clasificación de lípidos saponificables. Su principal característica es que juegan un papel estructural muy importante en las células de los seres vivos.

Existen en la naturaleza moléculas que no se pueden clasificar estrictamente en moléculas polares o apolares, ya que poseen ambas cualidades a la vez. Son las llamadas moléculas anfifílicas o anfipáticas (del griego; *anfi*:ambos) (Sabín J., 2017).

Los fosfolípidos se caracterizan por ser de naturaleza anfipática, es decir, poseen una parte hidrófila formada por un grupo fosfato, y un segmento hidrófobo constituido por cadenas de ácidos grasos. Estas dos partes se encuentran enlazadas a una molécula que generalmente es glicerol, por enlaces tipo éster, todo ello conforma la estructura básica de un fosfoglicérido o fosfolípido básico (Villanueva A., 2019).

El grupo fosfato en muchos casos puede encontrarse unido a diferentes moléculas. La Figura 3a corresponde al fosfolípido más simple anteriormente descrito, que no posee ninguna molécula adicional enlazado al grupo fosfato, este es el llamado ácido fosfatídico, a partir del cual se pueden derivar múltiples tipos de fosfolípidos como: la fosfatidiletanolamina (PE), mostrada en la Figura 3b, o la fosfatidilcolina (PC), presentada en la Figura 3c; donde el grupo fosfato se ha enlazado a una molécula de etanolamina y colina, respectivamente.

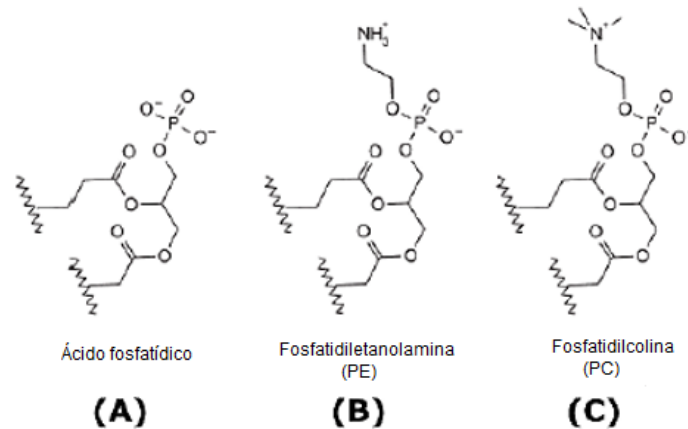


Figura 3. Representación de los fosfoglicéridos más comunes: a) ácido fosfatídico, b) fosfatidiletanolamina y c) fosfatidilcolina (Villanueva A., 2019)

En las membranas celulares, los fosfolípidos controlan la transferencia de sustancias hacia el interior o exterior de la célula, gracias a su carácter anfifílico hace posible que participen en el intercambio de sustancias entre un sistema acuoso y un sistema lipídico.

En medio acuoso las colas de los fosfolípidos tienden a disponerse de manera tal para formar un ambiente local hidrofóbico. Esto deja a los grupos fosfatos "de cara" al ambiente hidrofílico.

### 2.3.1.1 FOSFATIDILCOLINA

Una clasificación de los fosfolípidos son los glicerofosfolípidos, los cuales se presentan como derivados del ácido fosfatídico.

La fosfatidilcolina, pertenece al grupo de los glicerofosfolípidos (Dolores D., 2014), es uno de los principales constituyentes de las bicapas lipídicas de las membranas celulares.

A partir de la Figura 4, basándose en la polaridad de la molécula, se enuncia lo siguiente:

- A. La cabeza polar está formada por el sustituyente "colina" (Lehninger., 2009), conformado por un grupo nitrogenado unido a un grupo fosforilo. De manera que el nitrógeno de la colina posee carga positiva y el fosfato negativo. La cabeza está incorporada a un esqueleto de glicerol (Brandl M., 2001), en la posición correspondiente al carbono 3. Su comportamiento en solución, a casi todos los valores de pH, se encuentra como sal interna (zwitterion) (Ruano M., 2012). Por lo tanto, liposomas constituidos por fosfatidilcolina no tienen carga neta total (Brandl M., 2001). El nombre colina proviene de la palabra griega para *bilis* = colina (Li Z., 2008).

B. La cola apolar es conformada por dos cadenas de ácidos grasos esterificados (unidos por enlaces éster, como se muestra en la Figura 4a) a los carbonos de las posiciones 1 y 2 del esqueleto principal de glicerol, las cuales pueden diferir entre sí respecto a la presencia de insaturaciones.

Usualmente, el ácido graso en la posición 1 del glicerol es siempre un ácido graso saturado (por ejemplo, ácido palmítico), entretanto el de la posición 2 puede ser un ácido graso insaturado (por ejemplo, ácido oleico) u otro ácido graso saturado.

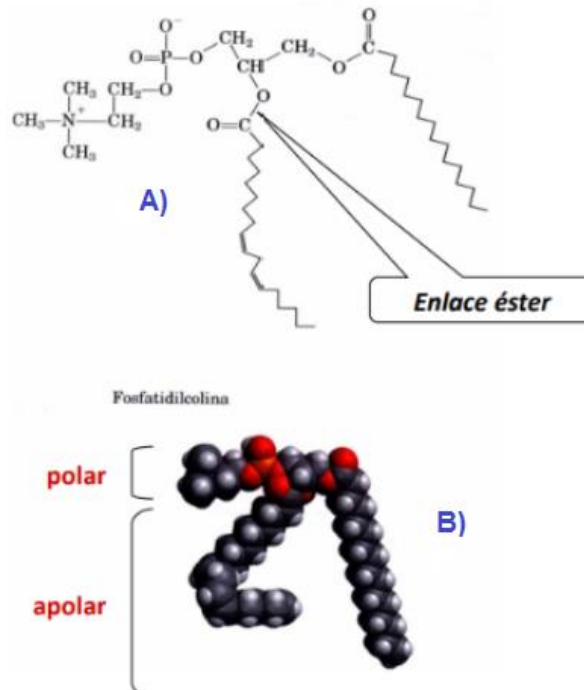


Figura 4. Representación esquemática de A) fórmula estructural de fosfatidilcolina y B) modelo espacial de fosfatidilcolina (Lehninger., 2009)

En los tejidos animales, la fosfatidilcolina normalmente contiene ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico y ácido araquidónico.

Puesto que diferentes tipos de ácidos grasos pueden esterificarse al esqueleto del glicerol, la fosfatidilcolina puede tener cientos de “formas” diferentes, esto implica hablar de una población de moléculas que comparten la misma “cabeza”, pero no la misma “cola”.

### 2.3.1.2 AGREGADOS DE LIPÍDOS ANFIPÁTICOS

Las moléculas anfifílicas no solamente son capaces de configurar membranas biológicas, sino también otro tipo de estructuras. Cuando los fosfolípidos entran en contacto con medios acuosos, su característica dual en cuanto a solubilidad hace que se puedan formar diferentes configuraciones.

Además de la forma del lípido, el tipo de estructura que éste adopta está modulada por otros factores como son el grado de insaturación de la región hidrofóbica, el tamaño de la cabeza polar, así como su grado de ionización. Propiedades extrínsecas como el pH, el grado de hidratación y ionización, la presencia de otros lípidos o de cationes en la mezcla, o la temperatura, también afectan al tipo de fase (Zaragoza A., 2012).

De manera que el efecto hidrofóbico es el responsable de que, en presencia de agua, los lípidos anfipáticos tengan la importante propiedad de autoestructuración.

Existen modelos teóricos que predicen la topología de los agregados, la forma que presentarán está determinada por el llamado “parámetro de empaquetamiento”, el cual se relaciona con la geometría de la molécula. Las estructuras básicas son las micelas y las membranas (Diz V., 2019).

Aquellos fosfolípidos que tienen un área de cabeza polar proporcionalmente mayor al área de sus cadenas hidrocarbonadas tendrán una geometría tipo cono invertido, este es el caso de los lisofosfolípidos, detergentes y fosfolípidos con gran repulsión entre grupos polares. (Zaragoza A., 2012). La asociación de moléculas de forma cónica invertida da lugar a un agregado con gran curvatura, como las micelas.

En la Figura 5 se esquematiza que, debido al carácter hidrofóbico del interior de la micela, las colas se dirigen hacia el interior, mientras que las cabezas polares están en la superficie en contacto con el medio acuoso, presentando el carácter hidrofílico.

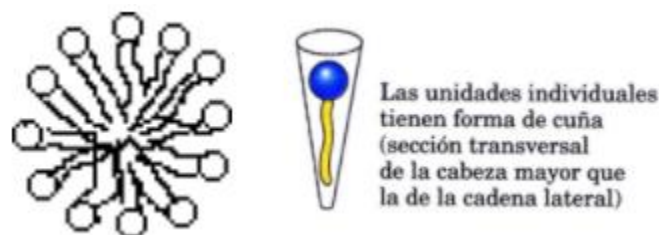


Figura 5. Micela (Raisman S., 2004)

Los lípidos con un área de cabeza polar similar a la de su región hidrocarbonada, tendrán una geometría cilíndrica (poca curvatura) y se acomodarán formando fases en bicapa. Por ejemplo, fosfatidilcolina, esfingomiélin, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol (Zaragoza A., 2012).

La teoría del parámetro de empaquetamiento predice que, los ácidos grasos con presencia de dos cadenas hidrocarbonadas, hacen a la estructura demasiado voluminosa como para lograr acomodarse en forma de micela. Por lo tanto, la forma de acomodo es en forma de monocapas lipídicas.

Las membranas biológicas se forman mediante la aposición de dos monocapas lipídicas (Figura 6), de manera que las colas hidrofóbicas quedan hacia el interior de la estructura, formando un interior hidrofóbico que actúa como barrera de permeabilidad (Berj J., 2008) y las cabezas polares hacia el exterior que interaccionan con los medios acuosos a cada lado de la bicapa, formando una estructura conocida como bicapa.

La formación de bicapas lipídicas es un proceso de auto-ensamblaje o autoasociación, en donde las interacciones hidrofóbicas son las principales fuerzas que determinan la formación de las bicapas.

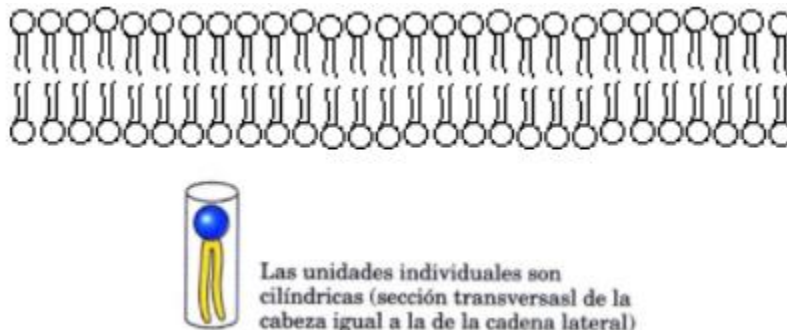


Figura 6. Bicapa lipídica plana (Raisman S., 2004)

La estructura más favorable para la mayoría de los fosfolípidos en medios acuosos es la de la bicapa lipídica en vez de la micela. Una micela es una estructura limitada, normalmente de diámetro menor a 20 nm. En contraposición, una bicapa lipídica puede tener dimensiones macroscópicas de hasta un milímetro (Berg J., 2008).

### 2.3.2 COLESTEROL

Se encuentra clasificado como lípido insaponificable. Está presente en las membranas de los tejidos corporales y en el plasma sanguíneo (Maldonado O. *et al.*, 2012), donde modula la fluidez y permeabilidad (Martínez-Seara H., 2010). Funciona como precursor de todas las hormonas esteroideas, ácidos biliares, y de la vitamina D (Dolores D., 2014).

La molécula de colesterol está conformada por una parte central de anillos bencénicos (uno de ellos con doble enlace (carbono 5 y 6)), mejor llamado como núcleo esterano. Una cadena hidrocarbonada ramificada de ocho carbonos unida al carbono 17 (situado en el anillo D), dos grupos metilo (carbonos 10 y 13) y un grupo -OH (carbono 3), como se observa en la Figura 7a.

Los cuatro anillos del esterano y la cadena hidrocarbonada sustituyente del anillo D, constituyen una estructura compacta y rígida, siendo estos responsables de la parte hidrofóbica de la molécula. Por otro lado, el hidroxilo posicionado en el carbono 3, le confiere el carácter hidrofílico, formando una molécula anfipática. Así, el colesterol es una molécula tan hidrofílica y, al igual que los otros lípidos, es bastante soluble en disolventes apolares como el cloroformo.



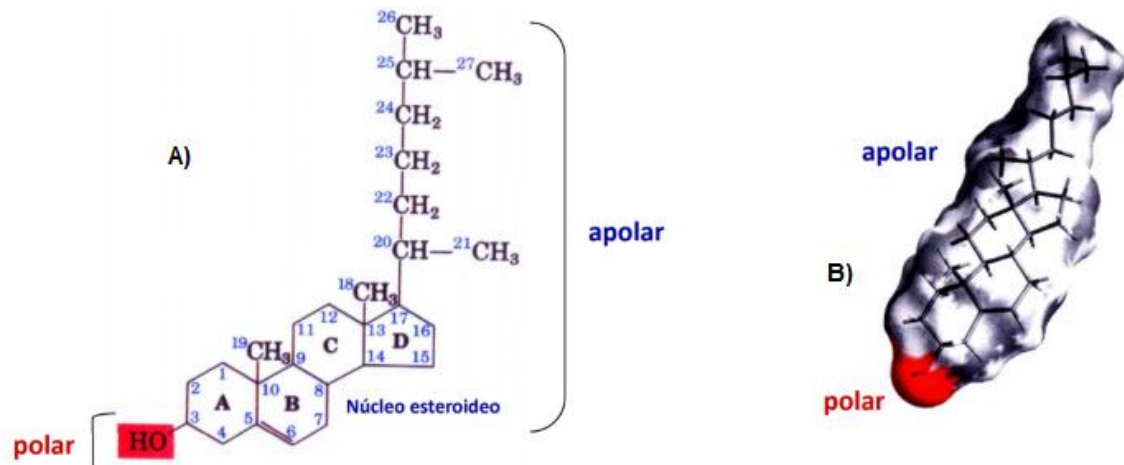


Figura 7. Representación esquemática de colesterol: A) fórmula estructural y B) modelo espacial (Lehninger., 2009)

## 2.4 LIPOSOMAS

El nombre “liposoma” proviene de dos palabras griegas: *Lipos*= grasa y *Soma*= cuerpo. La historia del éxito de los liposomas fue iniciada por Bangham y sus colegas a principios de la década de 1960 (Wagner A., 2010).

El descubrimiento se llevó a cabo cuando Bangham y R. W. Horne se encontraban probando un nuevo microscopio electrónico, en donde agregaron una tinción negativa a los fosfolípidos secos, en ese momento observaron que se formaba una multitud de vesículas espontáneamente. El parecido con la membrana plasmática fue muy evidente, las imágenes del microscopio sirvieron como primera evidencia real de que la membrana celular está conformada por una estructura con una bicapa lipídica (Suryakanta S., 2016).

Los liposomas son sistemas vesiculares, los cuales, debido a sus características anfipáticas llamaron la atención y se utilizaron principalmente como una estrategia para mejorar la administración de fármacos (Vázquez-González L., 2015). En los años siguientes, los liposomas se usaron esencialmente como modelos de membrana artificial que imitan sistemas celulares simples para la investigación de funciones y mecanismos de transporte, composición, estructura, selectividad, propiedades de permeación, entre otras.

Posteriormente, los liposomas se reconocieron como candidatos prometedores para los sistemas de administración de fármacos, y en este sentido se investigaron más y más formulaciones para ciertos fines, como aplicaciones médicas o cosméticas, pero también en la industria alimentaria y agrícola, no obstante, las actividades principales se centraron particularmente en aplicaciones biofarmacéuticas (Wagner A., 2010). En los años 70, Gregoriadis inició el estudio sobre el potencial que presentan estos como sistemas de liberación de fármacos o de otras moléculas bioactivas.

Los sistemas liposomales poseen una arquitectura molecular que les permite adaptar una variedad de agentes activos, a través de un mecanismo relativamente específico. Pueden ser modificados en su composición para ajustar su afinidad por determinado sitio blanco, a concentraciones adecuadas, con objeto de obtener la respuesta farmacológica deseada en condiciones de eficacia y seguridad, dado el carácter biodegradable y atóxico.

De este modo se aumenta la tasa de liberación del principio activo, disminuyendo los efectos secundarios ocasionados por la escasa liberación en otros tejidos, así como también restringe su área de difusión en el organismo, evitando una distribución innecesaria de los mismos (Gregoriadis., 1976).

El mecanismo de direccionamiento puede llevarse a cabo por el diseño de liposomas con características particulares, por ejemplo, sensibilidad al pH (Navarro G., 2008). De esta manera, el fármaco se aísla del medio durante su paso por el organismo, protegiéndolo de distintas acciones, como las enzimáticas. Igualmente, los liposomas desempeñan la misión de proteger al organismo frente a los efectos tóxicos derivados de la acción de ciertos agentes terapéuticos.

La capacidad relativa de la facilidad en la preparación y la degradación en bioproductos no tóxicos, la no toxicidad en general, no antigenicidad, y la fácil interacción con las células, junto con un buen poder de solubilización, hacen de los liposomas un sistema transportador de fármacos muy atractivo.

#### 2.4.1 ESTRUCTURA

Los liposomas son vesículas constituidas por bicapas fosfolipídicas, formados por una parte hidrofóbica (cadenas hidrocarbonadas) y una parte hidrofílica (cabeza del fosfolípido), pueden tener en su composición moléculas estructurales, como colesterol y funcionales, que incluyen aquellas que son sensibles al pH o lípidos polimórficos.

En las bicapas, los fosfolípidos se disponen orientados con las cadenas hidrófobas situadas paralelamente entre sí (lo cual constituye una capa) y enfrentadas a las cadenas hidrófobas de la otra capa (Cuerda-Correa., 2005). De esta forma se aísla una amplia zona hidrófoba, ya que todas las cabezas polares se hallan en ambos extremos, ocupándose de alternar compartimentos acuosos, en conjunto forman una estructura concéntrica.

En la Figura 8, se esquematiza desde la estructura de un fosfolípido, hasta la formación del liposoma a partir de las bicapas lipídicas.

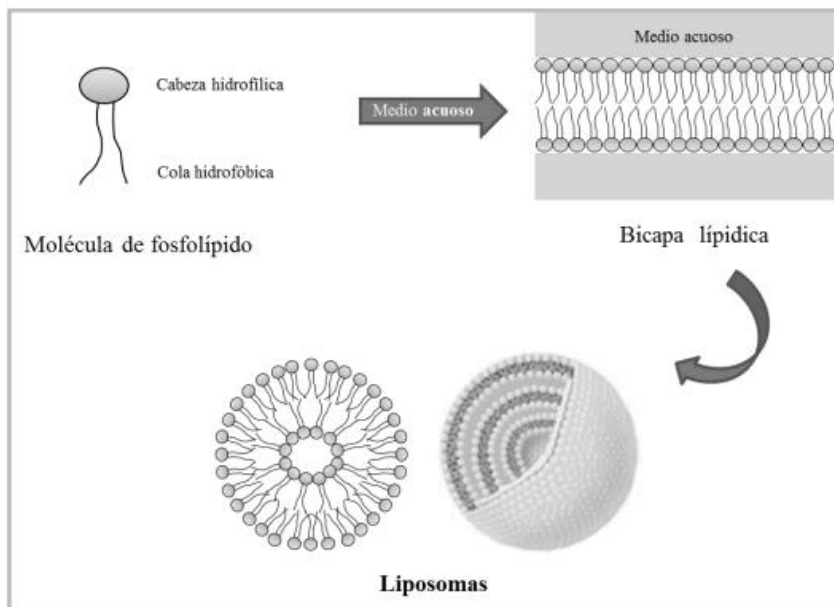


Figura 8. Estructura conformacional de un liposoma (Vázquez-González L., 2015)

## 2.4.2 FORMACIÓN DEL LIPOSOMA

Para comprender por qué se forman los liposomas cuando los fosfolípidos están hidratados, se requiere un entendimiento básico de las transiciones de fase de los fosfolípidos. En donde los lípidos poseen diferentes fases lipídicas cuya presencia dependerá de la estructura del lípido y de la temperatura de trabajo:

- a) A bajas temperaturas los fosfolípidos se organizan en lamelas cuyas cadenas hidrocarbonadas están principalmente en conformación elongada, presenta una estructura de red cristalina altamente organizada y rígida. Dicha fase se conoce como fase  $S_o$  (sólido-ordenada).
- b) Si a las suspensiones de fosfolípidos se les agrega temperatura ocurrirá un cambio de fase en las cadenas hidrocarbonadas, en las cuales las interacciones intermoleculares se debilitarán. Esta fase llamada fase fluida o  $L_d$  (líquido desordenado), caracterizada por un bajo orden conformacional en las cadenas de carbono (orden interno bajo) y un orden de empaquetamiento bajo. Las moléculas se quedan con movimientos más libres y desordenados (Boenny S., 2019).

La temperatura de transición de fase (TF) es una propiedad intrínseca de cada fosfolípido, en el que la bicapa experimenta el cambio de una fase gel, a una fase fluida.

Este comportamiento se esquematiza en la Figura 9. La organización molecular de los lípidos explica las diferencias entre las dos fases (Ijeoma F., 2013). Ambos estados son lamelares pero el estado fluido es más flexible y permeable (Brandl M., 2001).



- c) Composición: la presencia de compuestos mezclados con fosfolípidos confiere cambios en la organización e interacciones moleculares en la bicapa. Ciertos compuestos pueden formar altas energías de interacción con fosfolípidos que promueven un aumento en la TF.
- d) Fuerza iónica del medio: la presencia de iones en el medio de dispersión también puede actuar sobre grupos polares que aumentan o disminuyen las interacciones entre grupos y cambian entonces TF.

La formación de liposomas sólo tiene lugar a temperaturas superiores a la de transición de fase.

La alineación de bicapas a partir de fosfolípidos se da de manera rápida y espontánea en medio acuoso. Las fuerzas intermembrana importantes en la bicapa liposomal son, por un lado, interacciones de Van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas y, por otro lado, la interacción electrostática entre el grupo polar y el medio acuoso (Clares N., 2003).

El mecanismo de gemación es la ruta que siguen los fosfolípidos para la formación de los liposomas, en donde la continuidad e integridad de la bicapa se conserva hasta el desprendimiento final (Diz V., 2019). Las etapas de formación se muestran en la Figura 11. Los fosfolípidos se agregan para formar los liposomas, debido a la tendencia del medio acuoso circundante a adquirir el estado de máxima entropía en el que las moléculas lipídicas se disponen de forma que reducen al mínimo, el número de cadenas hidrocarbonadas expuestas al agua. De esta forma, las bicapas lipídicas tienden a cerrarse en sí mismas, evitando que existan extremos con cadenas expuestas a la parte polar, lo que da como resultado la formación de un compartimento central acuoso.

La cabeza polar del fosfolípido se orienta hacia la fase acuosa, en tanto que la región hidrófoba se sitúa fuera de contacto con el agua (Stryer., 1976). Una bicapa lipídica se cierra sobre sí misma formando una vesícula esférica que separa el espacio externo del compartimento acuoso interno.

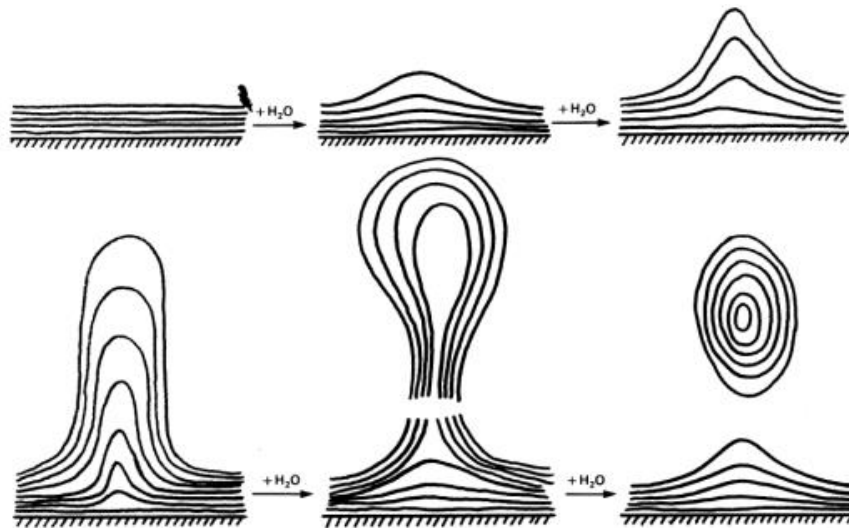


Figura 11. Mecanismo de gemación para la formación de liposomas (Diz V., 2019)

Una representación esquemática de la posible formación de MLV, es la hidratación de la película de fosfolípido seco. Las líneas indican bicapas de fosfolípidos. Las fibrillas tubulares hinchadas pueden ser muy largas (hasta 100  $\mu\text{m}$ ) y ocasionalmente tienen estructura ondulante. La geometría de estas estructuras puede estar correlacionada con la relación inicial de moléculas en las monocapas externas e internas.

Dado que las interacciones individuales lípido-lípido tienen bajas energías de activación (energía mínima que necesita un sistema antes de poder iniciar un determinado proceso), los lípidos de una bicapa poseen una movilidad limitada, pueden interrumpir y establecer interacciones en las moléculas circundantes, pero son incapaces de escapar fácilmente de la bicapa lipídica (Devlin M., 2006).

La estructura de los liposomas favorece la captación de una amplia gama de agentes activos (Cuerda-Correa., 2005) en donde se pueden incorporar solutos, tanto en la fase acuosa como en la lipídica, durante su formación. Entretanto, la cavidad interna de los liposomas sólo contiene agua o una solución acuosa de un principio activo (Gregoriadis., 1990).

Así, moléculas altamente polares son atrapadas en el compartimento acuoso, siempre y cuando su tamaño sea compatible con las dimensiones de los espacios acuosos entre los planos de las cabezas de los grupos hidrófilos (Gregoriadis., 1976).

Las moléculas no polares son intercaladas entre las bicapas, mientras que las anfífilas se fijan a la vesícula por su resto lipófilo, como se muestra en la Figura 12. La extensión y lugar de unión dependen fundamentalmente de las interacciones electrostáticas e hidrofóbicas.



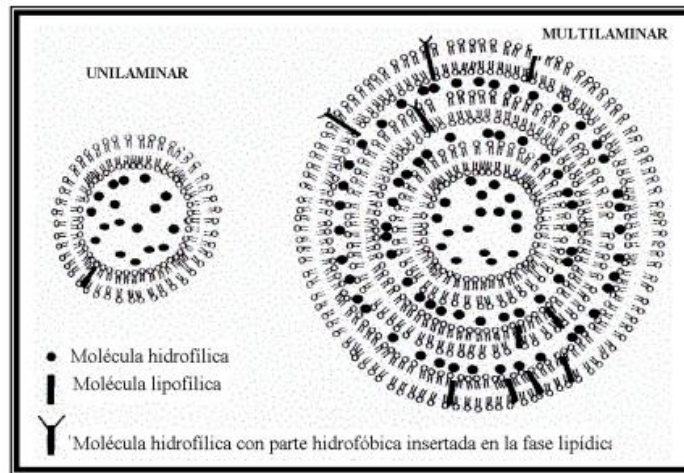


Figura 12. Representación esquemática de la incorporación de un principio activo dependiendo del carácter polar en el liposoma (Clares N., 2003)

Al momento de la preparación de los liposomas, se observa que con la incorporación de otras moléculas se modifican las características de las bicapas. Por ejemplo, cuando el colesterol es adicionado, se reduce la permeabilidad de la membrana al momento en que se encapsulan moléculas hidrosolubles debido a que incrementa la rigidez de las vesículas y mejora la estabilidad en presencia de fluidos biológicos. Este efecto también se manifiesta con mayor intensidad cuanto más larga es la cadena de carbonos del o de los lípidos constituyentes de las bicapas.

La eficacia en la encapsulación es función de diversos factores, entre los que cabe destacar el tipo de vesícula, la composición de la pared lipídica, la carga del liposoma, así como la naturaleza del material a transportar (Kulkarni y Vargha-Butler., 1995).

### 2.4.3 ESTABILIDAD

La estabilidad de los liposomas es una consideración importante en todos los pasos de su producción y administración: desde la fabricación, hasta el almacenamiento y la entrega.

Los liposomas se enfrentan a una serie de procesos de desestabilización tanto químicos como físicos. Al presentar una elevada superficie, tienden de forma natural a agregarse o fusionarse, para así disminuir su área (Sabín J., 2007).

De esta manera, cuando se altera una forma de dosificación farmacéutica, la estabilidad del fármaco también puede cambiar (Vemuri S., 1995). Por lo tanto, mantener su equilibrio es una consideración de suma importancia.

#### a) Estabilidad química:

La estabilidad de los lípidos se ve afectada por varias reacciones químicas que se pueden producir en disolución.

En principio, los liposomas poseen una estructura estable ya que en ellos están presentes los fosfolípidos en el estado termodinámicamente más equilibrado. Sin embargo, su conservación es un fenómeno complejo. Por lo tanto, como parte de los estudios farmacéuticos de formulaciones basadas en liposomas, la evaluación de la estabilidad química de los fosfolípidos se ha convertido en un tema importante.

En un sistema de liposomas, tanto los fosfolípidos saturados como insaturados son propensos a hidrolizarse para formar lisofosfolípidos y ácidos grasos. Los lisofosfolípidos pueden volver a hidrolizarse, conformando compuestos glicerofosforados y de nuevo, ácidos grasos. El producto final de la hidrólisis es el ácido glicerofosfórico (Grit M., 1993).

La hidrólisis de fosfatidilcolina es principalmente catalizada por iones hidroxilo e hidrógeno.

Asimismo, los liposomas pueden llevar a cabo la peroxidación lipídica, proceso en el cual los fosfolípidos se autooxidan (Kulkarni P., 2011), a partir de los radicales libres que captan electrones de los lípidos en las membranas. La peroxidación lipídica puede verse favorecida por la presencia de metales, luz y pH elevado (Yadav A. V., 2011).

Tanto la oxidación como la peroxidación pueden llevarse a cabo a lo largo de la preparación de los liposomas, el almacenaje o durante su uso.

De modo que estas reacciones pueden inhibirse o minimizarse de diferentes maneras. Por ejemplo, introduciendo agentes como EDTA y antioxidantes, o el uso de recipientes resistentes a la luz para el almacenamiento (Vemuri S., 1995).

La presencia de defectos en el empaquetamiento en las vesículas puede ser causada por aparición de reacciones de hidrólisis y oxidación, favoreciendo la formación de estados no-bicapa seguidos por la desestabilización de la membrana (Diz V., 2019).

b) Estabilidad física:

Los procesos físicos que afectan la vida útil de los liposomas incluyen la pérdida del fármaco y cambios de tamaño, los cuales son:

A. Agregación:

Es la formación de unidades más grandes de material liposómico, compuestas de liposomas individuales. En esta adhesión se crean grandes clústers que pueden tener tamaños de micras y con el tiempo pueden precipitar (Sabín J., 2007).

Este fenómeno se presenta como un proceso reversible debido a que las partículas que componen un agregado logran mantener su estructura original y se pueden separar a partir de la adición de energía.

Los procesos de agregación de liposomas neutros se producen por interacciones de Van der Waals, principalmente se presentan de forma natural en este tipo de sistemas. Sin embargo, este fenómeno puede evitarse usando, por ejemplo, fosfatidilglicerol (PG) (Luzardo L., 2003). Al incluir una carga superficial en las vesículas se crea un campo eléctrico que permite que la repulsión electrostática entre las partículas sea superior a las fuerzas de Van der Waals.

Los liposomas son en su mayoría tan pequeños en tamaño y su diferencia de densidad en comparación al medio circundante es tan pequeña que no sedimentan ni flotan. El movimiento browniano mantiene suspendidos los liposomas. Si se produce sedimentación o flotación en una preparación de liposomas durante la vida útil, esto a menudo indica agregación (Brandl M., 2001).

La carga superficial de los liposomas no sólo determina la estabilidad termodinámica del sistema, sino que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana (Arévalo L., 2017). Los procesos de agregación y fusión de liposomas están controlados, en gran parte, por la repulsión o atracción de sus superficies lipídicas (Sabín J., 2007).

Desde este punto de vista, la selección de los lípidos que conforman la bicapa juega un papel importante sobre estos parámetros.

Sin embargo, la presencia de vesículas agregadas puede acelerar el proceso de coalescencia de liposomas, lo que indica que se forman nuevas estructuras coloidales.

#### B. Fusión:

Apunta que una nueva estructura coloidal se formó, siendo un proceso irreversible que ocurre principalmente por defectos en el empaquetamiento de las vesículas durante su preparación (Luzardo L., 2003). Durante este fenómeno, los liposomas forman una estructura diferente y no se pueden recuperar mediante la aplicación de energía, por ejemplo, agitación.

Después de la fusión de las vesículas, solo queda la nueva partícula de mayor tamaño (Yadav A. V., 2011).

#### 2.4.3.1 PRESENCIA DE COLESTEROL EN LIPOSOMAS

La permeabilidad de los liposomas es relativamente baja a temperaturas debajo de  $T_F$ , siendo un problema para la liberación de fármacos. Cuando la temperatura es más alta que  $T_F$ , su permeabilidad al agua y a los fármacos hidrofílicos se hace mayor porque la conformación de la fase fluida facilita su liberación al ambiente externo (Boenny S., 2019). Por lo tanto, las moléculas del fármaco pueden filtrarse de los liposomas.

La tasa de fuga depende fuertemente de la composición de la bicapa y de la naturaleza fisicoquímica del principio activo. De esta manera, para aumentar la retención del fármaco, es deseable que se aumente la rigidez de las bicapas del liposoma. Esto se logra agregando lípidos saturados de cadenas largas con altas temperaturas de transición, incorporando colesterol (Yatvin M. B., 1982) o utilizando lípidos con diferentes temperaturas de transición (Camacho V., 2016).

Las bicapas en fase fluida son más propensas a la pérdida del principio activo y son menos estables durante el almacenamiento (Kulkarni P., 2011). Por otro lado, bicapas con fracciones de colesterol tienden a liberar el fármaco de manera más lenta, manteniendo el fármaco biodisponible. Por lo tanto, la modificación de la superficie o la incorporación de otros lípidos como el colesterol pueden conferir estabilidad e integridad al sistema tras la administración (Alcalá-Alcalá., 2014).

La presencia de colesterol en las vesículas funge múltiples funciones, diseñado para la administración de fármacos *in vivo*: aumenta la eficiencia de atrapamiento, disminuye la pérdida de fármacos (Yatvin M. B., 1982) y estabiliza la membrana en presencia de fluidos biológicos como el plasma (Suryakanta S., 2016).

El colesterol se incluye en los liposomas para disminuir o aumentar la fluidez de la bicapa, dependiendo del estado lipídico en el que se encuentre la membrana al momento de su adición. Este comportamiento se explica a partir de la Figura 13:

- A) Aumenta la fluidez de la bicapa cuando se adiciona a temperaturas por debajo de  $T_f$ . Los fosfolípidos en estado gel presentan mayor libertad de movimiento debido a que la molécula de colesterol se posiciona predominantemente entre los grupos de cabeza lipídica. Actúa como un separador que facilita la movilidad de las cadenas hidrocarbonadas (Carrero I., 2014), engrandeciendo la distancia entre los grupos de cabeza polar lipídica.
- B) Por el contrario, disminuye la fluidez en su incorporación en la bicapa a temperaturas por encima de  $T_f$ . El anillo rígido y plano de la molécula de colesterol se posiciona adyacente a las cadenas de ácidos grasos fluidos, limitando sus movimientos. Un aumento en  $T_f$  se logra mediante un empaquetamiento más apretado de las cadenas de ácidos grasos cuando el colesterol se inserta en la bicapa de fosfolípidos en estado fluido.

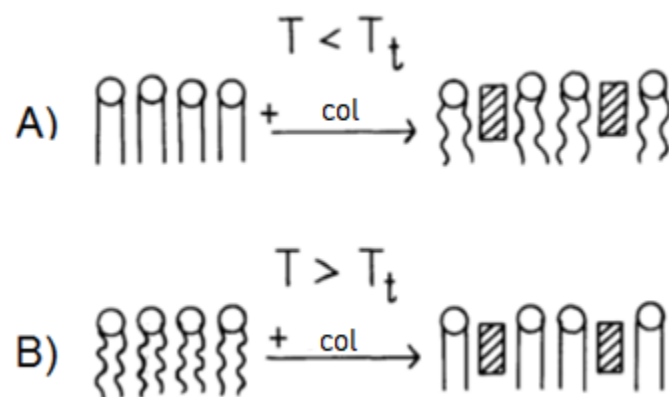


Figura 13. Localización de colesterol en la bicapa lipídica (Yatvin M. B., 1982)

Diferentes reportes indican que el aumento de permeabilidad en las vesículas se debe a la presencia en sangre HDL (lipoproteínas de alta densidad), captando a las moléculas de lecitina presentes en los fosfolípidos que integran las vesículas, inestabilizando la bicapa lipídica severamente. Por esa razón, en el trabajo de Papahadjopoulos (1972) se señala que la presencia de colesterol incrementa la permeabilidad de sus membranas gracias a la estructura que éste presenta.

Asimismo, como el colesterol limita la movilidad de los fosfolípidos (Demel y Kruyff, 1976), este impide la transferencia de los fosfolípidos constituyentes de las bicapas, a HDL y lipoproteínas de baja densidad (LDL) (Bozzuto G., 2015).

Estudios posteriores fundamentan que *in vivo* la estabilidad de los liposomas está relacionada con el contenido de colesterol con respecto al fosfolípido total, observándose que una disminución de colesterol reduce la integridad liposómica. Esto es, que los liposomas con bajo o ningún contenido de colesterol, en contacto con sangre pierden rápidamente su soluto (Kirby C. *et al*, 1980).

### 2.3.4 COMPONENTES

La elección de los lípidos en el diseño de liposomas es fundamental para conseguir las características deseadas del producto final. Propiedades de las vesículas lipídicas como tamaño y homogeneidad pueden variar según la composición lipídica (Ijeoma F., 2013). Por ejemplo, el tamaño puede tener un impacto en la distribución de la vesícula al momento de la administración.

Las principales materias primas constituyentes de los liposomas son las siguientes:

#### 1. Fosfolípidos.

Los fosfolípidos que contienen glicerol son el componente más utilizado de la formulación liposomal. Representa más del 50% del peso de los lípidos en las membranas biológicas (Suryakanta S., 2016).

Se pueden emplear también fosfolípidos semi sintéticos, cuya composición se conoce exactamente. Por ejemplo, la dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC), diestearoilfosfatidilcolina (DSPC).

Tienen especial interés productos obtenidos tras la purificación de lecitinas hidrogenadas, con los que se reduce el número de factores que influyen en la encapsulación (Kulkarni y Vargha- Butler., 1995)

#### 2. Colesterol.

Es uno de los factores que condiciona la permeabilidad y fluidez de las bicapas lipídicas, y por tanto la estabilidad de los liposomas. Generalmente, dependiendo del tipo de fosfolípido, pueden incorporar el colesterol en diferente concentración molar. Yadav A. V. (2011) establece que la incorporación de colesterol en concentraciones a partir del 25% a liposomas constituidos por fosfatidilcolina, reduce los efectos de transición de fase producidos por la temperatura. Por otro lado, su incorporación a concentraciones mayores al 50%, posiciona a los liposomas en un estado metaestable (entre gel y líquido desordenado), en donde las vesículas tienden a agregarse y precipitar, además de la formación de cristales de colesterol (Cuerda-Correa., 2005).

Al ser una molécula anfipática, el colesterol se inserta en el seno de la membrana con su grupo hidroxilo orientado hacia la fase acuosa, mientras que la cadena alifática se alinea paralelamente a las cadenas de ácidos grasos de los fosfolípidos (Yatvin M. B., 1982).

### 3. Esfingolípidos.

Uno de los componentes principales de los liposomas es la esfingosina o una base relacionada (Suryakanta S., 2016). Estos son componentes importantes de las células vegetales y animales. Las moléculas de los esfingolípidos presentan propiedades anfipáticas, lo cual les permite desempeñar un papel importante en la formación de membranas biológicas.

De acuerdo con Dolores D. (2014), junto con los fosfolípidos y glicerolípidos, los esfingolípidos son una clasificación de lípidos de almacenamiento y de membrana, debido a esto, su gran potencial para su uso en la formación de liposomas. Los más comunes son esfingomiélin y lípidos de glucosfingo.

### 4. Lípidos iónicos.

Se pueden formar liposomas neutros, aniónicos y catiónicos dependiendo de la naturaleza del grupo de cabeza en los lípidos elegidos (Kalra J., 2013).

La incorporación de anfífilos cargados no solo hará que la superficie liposómica se cargue positiva o negativamente (lo que conlleva una repulsión electrostática entre las diferentes bicapas de la vesícula), sino que también aumentará la distancia y, por lo tanto, el volumen acuoso (atrapamiento de solutos) entre las bicapas (Gregoriadis G., 1990). La carga superficial de los liposomas crea un campo eléctrico que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana (Sabín J., 2007).

Los lípidos con carga más utilizados son los siguientes (Cuerda-Correa., 2005):

-Aniónicos: ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, diacetilfosfato.

-Catiónicos: estearilamina, esfingomiélin.

### 5. Otros: glucolípidos, polímeros sintéticos o proteínas.

Recientemente se han comenzado a utilizar polímeros como PEG para incrementar la vida media plasmática de los liposomas (Bozzuto G., 2015). Similares resultados se han obtenido con otros polímeros sintéticos como la polietiloxazolina (Zalipsky *et al.*, 1996).

Como ejemplo, se tiene los liposomas de circulación prolongada (stealth liposomes), a partir de PEG (Senior J. D., 1991). Esta modificación llamada pegilación, funciona para incrementar la biodisponibilidad de los fármacos encapsulados, así como para que el proceso de liberación sea más lento, reducir la toxicidad y efectos secundarios. De esta manera, la superficie del liposoma reduce la adsorción de opsoninas y prolonga así los tiempos de circulación (Brandl M., 2001).

Además del PEG, otros polímeros como la poliácridamida, el alcohol polivinílico o la polivinilpirrolidona, han sido utilizados para lograr los mismos objetivos (Torchilin V. T., 1995).

De igual manera, en muchos casos los liposomas pueden ser elaborados utilizando especies de lípidos mixtos y así obtener las propiedades lipídicas necesarias (Ijeoma F., 2013).



### 2.3.5 CLASIFICACIÓN

Los liposomas se clasifican fundamentalmente atendiendo a dos propiedades: la lamelaridad (número de bicapas concéntricas) y el tamaño. El tamaño del liposoma puede variar desde muy pequeño (25 nm) a vesículas grandes (2.5  $\mu\text{m}$ ) (Akbarzadeh *et al.*, 2013).

De manera general, existen principalmente 2 tipos de liposomas (Navarro C., 2011):

- a. Unilamelares:  
Compuestos por una sola bicapa fosfolipídica, generalmente comprenden diámetros de 50-250 nm (Immordino M. L., 2006).
- b. Multilamelares:  
Formados con muchas bicapas fosfolipídicas y de tamaño grande. En general, se define cualquier liposoma con más de una bicapa como multilamelar u oligolamelar (Lichtenberg D., 1988).  
Las vesículas oligolamelares contienen varias bicapas, pero en menor número que las multilamelares. Por último, las vesículas multivesiculares están constituidas por bicapas que no son concéntricas (Zaragoza A., 2012).

Para referirse a los distintos tipos de liposomas más específicamente, se puede recurrir al criterio que toma en cuenta su tamaño y el número de bicapas o lamelas que conforman la pared de la estructura vesicular, presentando a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación y nomenclatura de liposomas en función de lamelaridad (Kulkarni P., 2011)

<i>Abreviatura</i>	<i>Nombre completo/ lamelaridad</i>
MLV	Vesículas multilamelares
OLV	Vesículas oligolamelares
UV	Vesículas unilamelares
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
MUV	Vesículas unilamelares medianas
LUV	Vesículas unilamelares grandes
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
MVV	Vesículas multivesiculares

El carácter hidrofóbico o hidrofílico de un fármaco (o de cualquier otro compuesto que se pretenda encapsular en los liposomas), influirá en la selección del tipo de liposoma a preparar (Kulkarni S. B., 1995). Por lo tanto, tomando en cuenta la polaridad del fármaco y a partir de la clasificación anterior, de acuerdo con lo reportado en la literatura, se puede citar:

- A. Las vesículas multilamelares grandes (MLV), generalmente presentan tamaños comprendidos entre 500 nm y 10  $\mu\text{m}$  (Villanueva A., 2019). Se caracterizan porque poseen varios compartimentos acuosos concéntricos, como se esquematiza en la Figura 14c. El volumen de líquido encapsulado por la membrana lipídica, o "volumen atrapado" es de  $> 4 \mu\text{L}/\mu\text{mol}$  (Yatvin M. B., 1982; Perkins, 1993). Este tipo de vesículas son apropiadas para la incorporación de material lipídico no sólo por estar constituidas por varias capas de fase lipídica, sino porque liberan de manera gradual y sostenida el fármaco, ya que sus membranas concéntricas pueden ser lentamente degradadas en el sitio blanco (Navarro C., 2011).
- B. Las vesículas unilamelares pequeñas (SUV), tienen un tamaño entre 20 a 100 nm de diámetro (Villanueva A., 2019). Por ser tan pequeñas (Figura 14a), tienen un radio de curvatura muy estrecho (Ball E., 1995). Asimismo, este tipo de vesícula presenta anomalías en el empaquetamiento de lípidos (Navarro C., 2011), en donde los fosfolípidos quedan con las cadenas de ácidos grasos en estado fluido, con un grado de empaquetamiento muy bajo. El volumen interno extremadamente pequeño de SUVs, limita su eficiencia de atrapamiento de fármacos y macromoléculas solubles en agua (Yatvin M. B., 1982).
- C. Las vesículas unilamelares grandes (LUV) comprenden tamaños que se encuentran entre 100 nm y 1  $\mu\text{m}$ . Encierran un núcleo acuoso grande (Figura 14b).

La gran ventaja de estas vesículas es que el volumen capturado es mayor que en el caso de otros liposomas (Sabín J., 2007), por lo tanto, son ideales para la encapsulación de fármacos hidrofílicos (Bozzuto G., 2015).

Iga K. *et al.* (1989) reportaron un porcentaje de encapsulación seis veces mayor en LUV que en SUV, debido al mayor volumen de porción acuosa que LUV tiene como consecuencia de su tamaño.

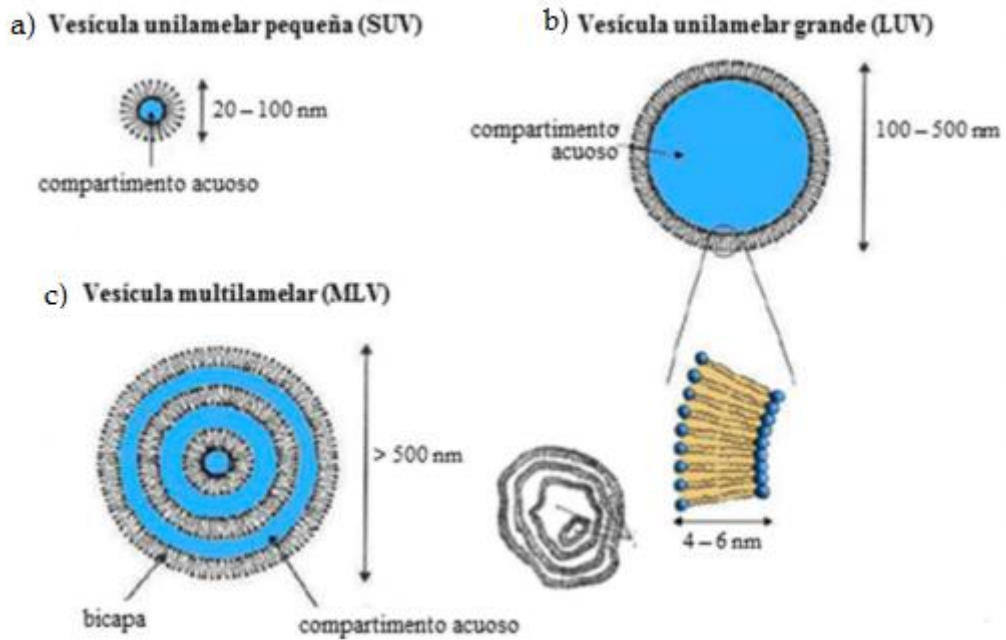


Figura 14. Representación esquemática de diferentes tipos de vesículas. a) SUV o vesículas unilamelares pequeñas, b) LUV o vesículas unilamelares grandes y c) MLV o vesículas multilamelares grandes (Ruano M., 2012)

Dependiendo de la selección de lípidos, técnica de preparación y condiciones de preparación, los liposomas pueden variar ampliamente en tamaño, número y posición de las lamelas. Estos parámetros influyen en el comportamiento de los liposomas al momento de la administración *in vivo* (Kulkarni P., 2011).

## 2.5 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS

Los liposomas se pueden obtener aplicando distintas metodologías. Una de las grandes ventajas de los liposomas es que la obtención de diferentes tamaños y lamelaridades depende exclusivamente del método de preparación (Zaragoza A., 2012), con características diferentes en función del procedimiento adaptado (tamaño y distribución de tamaños, lamelaridad, etcétera).

A continuación, se describen las técnicas de preparación más utilizadas con respecto al principio de hidratación lipídica/formación de liposomas. Así como también, se busca mencionar las ventajas y desventajas de las técnicas.

Todos los métodos de obtención tienen en común el siguiente fundamento:

A partir de una suspensión de fosfolípidos en un medio hidrofóbico, se elimina o se sustituye lentamente este disolvente por otro que sea hidrofílico, mediante procesos de dilución, evaporación o diálisis. Este cambio de disolvente provoca que los fosfolípidos se agrupen espontáneamente entre ellos, y de esta manera forman bicapas esféricas, atrapando en el interior gran cantidad del medio acuoso en el que se encuentran.

Las estructuras bicapa no pueden existir en ausencia de un medio acuoso, porque es el agua que proporciona la fuerza impulsora para que las moléculas de lípidos asuman una configuración de bicapa (Kulkarni S. B., 1995).

Este procedimiento tiene como fin la formación de vesículas de tamaño variable, que luego puede ser homogeneizado o fraccionado por diferentes métodos. Ante todo, el método de preparación debe de ser sencillo, estandarizado, reproducible y con una buena relación entre coste y eficacia (Cuerda-Correa., 2005).

La Tabla 2, será la base para explicar algunos de los diferentes métodos para la obtención de liposomas. En esta tabla, también se incluye la clasificación del tamaño a partir del método de elaboración.

Tabla 2. Métodos de preparación de liposomas y resultado del tamaño de liposoma (Wagner A., 2010)

<i>Método</i>	<i>Vesículas</i>
<p><b>A. Métodos mecánicos</b></p> <p>Vortex                      Extrusión a través de filtros de policarbonato a baja o mediana presión                      Extrusión a través de una presa francesa, técnica “microfluidizador”                      Homogeneización a alta presión                      Irradiación ultrasónica                      Burbujeo de gas</p>	<p>MLV                      OLV, LUV                      Principalmente SUV                      Principalmente SUV                      SUV, LUV                      BSV</p>
<p><b>B. Métodos basados en el reemplazo de solventes orgánicos por medios acuosos</b></p> <p>Eliminación de solventes orgánicos                      Uso de solventes inmiscibles en agua: éter y petróleo                      Inyección de etanol                      Infusión de éter (vaporización del solvente)</p>	<p>MLV, OLV, SUV                      MLV, OLV, LUV                      LUV                      LUV, OLV, MLV</p>
<p><b>C. Métodos basados en la eliminación de detergente</b></p> <p>Cromatografía de exclusión de gel                      Diálisis lenta                      Dilución rápida                      Otras técnicas relacionadas</p>	<p>SUV                      LUV, OLV, MLV                      LUV, OLV                      MLV, OLV, LUV, SUV</p>

### **A. Métodos mecánicos**

Las propiedades de las formulaciones lipídicas pueden variar según la composición (lípidos catiónicos, aniónicos y neutros). Sin embargo, el método de preparación mecánico (método general) se puede utilizar para todas las vesículas lipídicas independientemente de la composición.

Desde entonces, se han realizado muchas variaciones del método general, como el manejo de diferentes solventes orgánicos utilizados para la solubilización de lípidos. Así como también la forma de secado de lípidos y la forma de rehidratación de la película lipídica.

Bangham y cols. en 1974 propusieron un método común y simple para la obtención de liposomas, llamado “método de dispersión simple” o “vórtice de la suspensión de fosfolípidos”. Los MLV son principalmente producidos a partir de este método, el cual se lleva a cabo a temperaturas superiores a la temperatura de transición del fosfolípido (Lichtenberg D., 1988).

El método consta de las siguientes etapas:

1. El fosfolípido, o mezcla de diferentes fosfolípidos, y el resto de los componentes de la pared lipídica, son solubilizados en un disolvente orgánico volátil y se colocan en un matraz para llevar a cabo una agitación mecánica.  
 Es de especial importancia que los diversos lípidos se disuelvan primero en un disolvente orgánico común, para asegurar una mezcla adecuada a nivel molecular. Si

no se lleva a cabo de esta manera, los liposomas que se forman con la hidratación pueden ser muy heterogéneos con respecto a la composición. Por la misma razón, también es importante evitar la precipitación diferencial de lípidos en el curso de la eliminación del solvente (Lichtenberg D., 1988).

En las paredes del matraz que contiene la solución anterior, se forma una película lipídica, la cual se integra debido a la evaporación del disolvente orgánico por la aplicación de un sistema al vacío.

2. Posteriormente continúa el proceso de hidratación de la bicapa lipídica, el cual se realiza por encima de TF de los lípidos. Este proceso se logra a partir de una solución acuosa, generalmente tamponada, la cual es vertida en el matraz bajo una ligera agitación.

El cambio de disolvente sitúa a los fosfolípidos en un medio hostil, provocando que se agrupen espontáneamente entre sí formando bicapas esféricas y atrapando en su interior gran cantidad del medio acuoso en el que están suspendidos (Ball E., 1995).

El principal determinante de la tasa de hidratación lipídica es el área de superficie de los lípidos secos, este factor se determina por el método de eliminación del solvente: cuanto mayor es esta superficie, más delgada es la capa de lípidos y, por lo tanto, más rápida y uniforme es su hidratación (Lichtenberg D., 1988).

A pesar de las diversas modificaciones, el método produce poblaciones heterogéneas multilamelares de liposomas (Ijeoma F., 2013), con tamaños que oscila entre 400 y 5000 nm, y cada vesícula consiste en varias lamelas concéntricas de fosfolípidos (Sabín J., 2007). Sin embargo, el tamaño de las vesículas está influenciado por la carga de los lípidos. Otros parámetros influyentes son la naturaleza de la fase acuosa, así como la energía y la potencia de la agitación.

El método mecánico puede ser usado para cualquier tipo de mezclas de lípidos. Además, es fácil de realizar, presenta altas tasas de encapsulación, como también se pueden utilizar sustancias solubles en agua debido a la alta concentración de lípidos que se añaden en la composición.

Un inconveniente importante de este método es la dificultad de llevar a escala hasta varias decenas de litros. Asimismo, el proceso requiere de más tiempo y por lo tanto se vuelve más costoso, esto es debido a que con mayor tiempo de producción se obtiene una suspensión de liposomas más definida (Wagner A., 2010).

En la Figura 15, se muestran las etapas principales de formación de liposomas a partir del método mecánico (Cuerda-Correa., 2005), en donde se incluye la disminución del tamaño por medio de la extrusión.



Figura 15. Esquema de la formación de liposomas método Brangham: preparación de la disolución, formación de la película, hidratación y extrusión (Cuerda-Correa., 2005)

a. *Método de proliposoma-liposoma:*

En general, se trata de un material granular seco y de flujo libre que inmediatamente forma una dispersión liposomal en contacto con agua o un fluido biológico dentro del cuerpo. La tecnología se basa en la propiedad intrínseca de la membrana hidratada de los lípidos para formar vesículas en contacto con el agua. Implica la estratificación de los fosfolípidos en un soporte de partículas finamente dividido que da como resultado la formación de polvos secos.

Cuando los polvos secos se hidratan con una solución acuosa seguida de una agitación ligera, los fosfolípidos en el soporte sólido se dispersan rápidamente para dar una suspensión liposomal en una solución acuosa (Singh N., 2019). En la Figura 16 se muestra el proceso por el cual se lleva a cabo la formación de liposomas a partir de esta técnica.

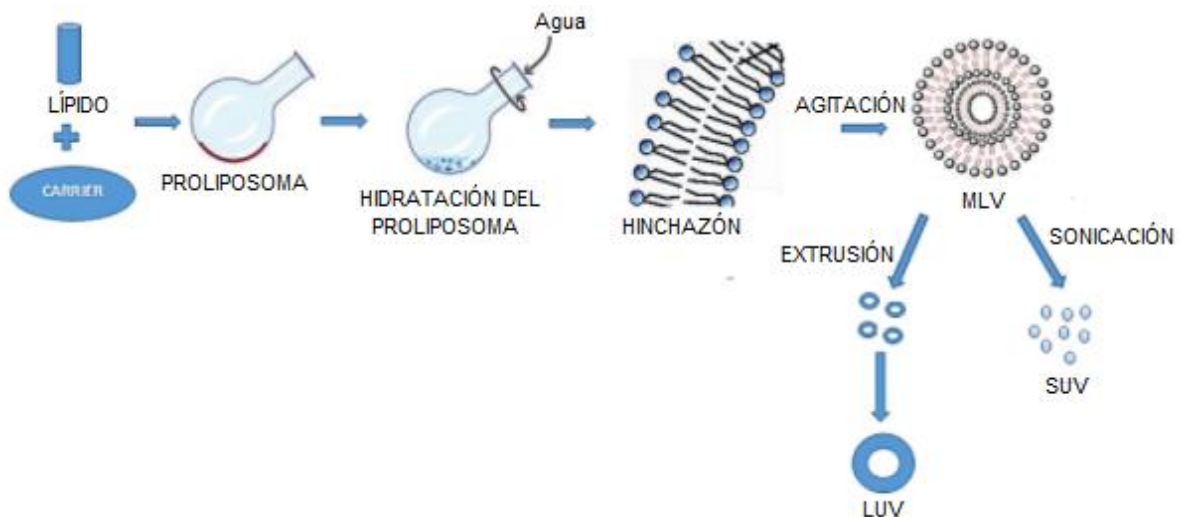


Figura 16. Mecanismo de formación de liposomas por el método proliposomas (Singh N., 2019).

Los liposomas pueden formarse *in vivo* bajo la influencia de fluidos fisiológicos o *in vitro* antes de la administración usando un adecuado hidratante.

Este método es adecuado para la encapsulación de una amplia gama de medicamentos que presentan una solubilidad variable en agua y/o alcohol y tiene eficiencias de encapsulación extremadamente altas en comparación con otros métodos basados en atrapamiento pasivo. Al estar disponibles en forma de polvo seco, tienen una comodidad adicional en el transporte, distribución, almacenamiento, procesamiento, envasado, proporcionando una flexibilidad óptima, dosificación unitaria como cápsula y estable durante la esterilización.

La preparación reproducible de liposomas es factible de manera controlada, a partir del control exacto de la velocidad de dilución y temperatura. Además, se describe como un método fácil de llevar a escala, lo que lo convierte en un enfoque alternativo para la producción de liposomas para aplicación clínica.

Existen métodos que tienen como objetivo romper los MLV, a partir de técnicas de homogeneización, ya sea por corte o fuerzas de presión. En este grupo, se incluyen métodos como microfluidización, homogeneización a alta presión y técnicas de homogeneización inducida por la fuerza (Wagner A., 2010).

En el mecanismo de fragmentación de las bicapas de lípidos, la bicapa se interrumpe en etapas anteriores y los fragmentos de doble capa de fosfolípidos se proponen como estructuras intermedias en el proceso de formación de vesículas. A continuación, se mencionan los métodos más comunes utilizados, de acuerdo con la Tabla 2.0.

#### *b. Sonicación:*

El método clásico para preparar vesículas lipídicas unilaminares es la sonicación (Fromherz P., 1985), consiste en la entrada de energía muy alta basada en la cavitación, la cual se aplica a los sistemas liposomales. Durante el proceso de sonicación ocurre un mecanismo de constante rotura y reformado de las vesículas.

El proceso de formación se lleva a cabo en dos etapas. Inicialmente el rompimiento de las partículas lipídicas se produce por colisiones entre partículas debido a la acción de sonido (Fromherz P., 1985). Las colisiones producen la fragmentación en láminas abiertas de bicapa, con la formación de fragmentos bicapa de vida corta. Estos fragmentos luego se vuelven a asociar para formar vesículas de capa única de tamaño uniforme (Finer E., 1972).

Se deben elegir adecuadamente los parámetros de sonicación como: la amplitud de la vibración, el tiempo y el periodo de cada pulso (Bozzuto G., 2015), debido a que de esto dependerá la distribución de tamaños que se obtenga.

Se distinguen dos métodos de sonicación:

##### 1. Sonicación en punta:

Consiste en colocar una sonda de titanio en el interior de la muestra de liposomas en suspensión, la sonda agita fuertemente la muestra reduciendo con ello el tamaño de los liposomas.

Los inconvenientes de este método se encuentran en que el suministro de alta energía puede llevar a un sobrecalentamiento de la muestra y en consecuencia una degradación de los liposomas, así como la posible contaminación de la muestra debido a la sonda que se encuentra en contacto.

Esta técnica se utiliza para suspensiones que requieren un alto grado de energía en pequeños volúmenes, por ejemplo, cuando la fase acuosa presenta una viscosidad alta o elevadas concentraciones de lípidos.



## 2. Sonicación en baño:

Consiste en colocar un recipiente estéril con los sistemas de liposomas, en un baño de ultrasonidos. La sonicación debe realizarse por encima o en la temperatura de transición de fase (Villanueva A., 2019).

### *c. Prensa francesa:*

La prensa francesa (Barenholz Y., 1979) implica la extrusión de MLV a través de un pequeño orificio, originalmente se estableció para el rompimiento bajo condiciones más suaves en comparación con las técnicas de ultrasonido, debido a que los lípidos, así como proteínas u otros compuestos sensibles podría degradarse durante el procedimiento de sonicación.

Este sistema se usa normalmente en un volumen de 1 a 40 mL y, por lo tanto, no es adecuado para la producción a gran escala.

La ventaja del método en comparación con la sonicación es que los liposomas resultantes son bastante más grandes que los SUV sonicados (Pradhan B., 2015).

### *d. Microfluidización:*

Se estableció una estrategia basada en la ampliación de la técnica de prensa francesa. Esta continua y escalable variación de la técnica de prensa francesa impone la reducción del tamaño de liposomas por colisión de vesículas más grandes a alta presión en la cámara de interacción del microfluidizador, donde los lípidos se introducen en él como MLV o como una suspensión de lípidos no hidratados en un medio orgánico.

Los volúmenes iniciales de 50 mL en adelante son aplicables, y se usan altas presiones (0-200 bar) para la interrupción de los sistemas multilamelares. El sistema está equipado con sistemas de calefacción y refrigeración para controlar la temperatura de la muestra durante el procesamiento. Los sistemas de liposomas pasan múltiples veces por orificios intercambiables (Wagner A., 2010).

Los liposomas se forman en el rango de tamaño de 50 a 100 nm por este proceso. Esta técnica es adecuada para la producción estéril y a gran escala.

### *e. Homogeneizadores:*

En contraste con el microfluidizador, donde la corriente de fluido se divide y se mezcla por colisión en una cámara de mezcla, los homogeneizadores funcionan de acuerdo con un principio diferente.

En un homogeneizador, el haz de fluido a alta presión procede a partir de un orificio, y este haz choca con una pared de acero inoxidable. La suspensión de liposomas se bombea continuamente a través de un sistema homogeneizador, donde se generan altas presiones para reducir las vesículas lipídicas (Wagner A., 2010).

*f. Extrusión:*

Sin embargo, el método de reducción a escala más destacado es la extrusión. La reducción de tamaño se maneja bajo condiciones más reproducibles en comparación con las demás técnicas.

En este método, las vesículas preformadas son forzadas a pasar a través de una membrana con un tamaño de poro bien definido, con una presión más baja en comparación con el método de prensa francesa (Mayer L. D. *et al.*, 1986).

La teoría mecanicista es que los liposomas más grandes que los poros se deforman en forma de túbulos para que puedan pasar por los agujeros (Brandl M., 2001) de la membrana. Durante este proceso, las bicapas sucesivas de la vesícula se despegan, dejando así solo una capa (Thulasiramaraju T. V., 2012).

En general, dependiendo del aparato y la escala, los diámetros de estas membranas varían de 25 a 142 mm.

En estos procedimientos, pueden ocurrir grandes pérdidas de producto generado, especialmente si se obstruyen las membranas de extrusión, lo que puede causar limitaciones técnicas con la producción a gran escala de bienes de alto precio.

***B. Métodos basados en el reemplazo de disolventes orgánicos por medios acuosos***

Los métodos de preparación de liposomas descritos en esta sección tienen en común que los solventes orgánicos, ya sean miscibles o inmiscibles en agua, se reemplazan por una solución acuosa. Este reemplazo se realiza por inyección del lípido que lleva la solución orgánica a la fase acuosa (métodos de inyección) o mediante la adición gradual de la fase acuosa a la fase orgánica, durante la eliminación de la fase orgánica (Lichtenberg D., 1988).

Los métodos de emulsificación, es decir, el método de evaporación en fase reversa y la técnica de doble emulsión, se basan en el reemplazo de un disolvente inmisible en agua por una fase acuosa, formando liposomas con altas tasas de encapsulación de sustancias tanto hidrofílicas, como lipófilas.

*a. Método de inyección de etanol:*

Esta técnica fue reportada como una de las primeras alternativas para la preparación de SUV sin sonicación.

Los lípidos de partida se disuelven en etanol o éter, y la disolución se inyecta rápidamente en una solución acuosa tamponada del material a encapsular. La eliminación sucesiva del disolvente orgánico a presión reducida conduce a la formación de liposomas (Pradhan B., 2015), principalmente SUV, aunque también se forman algunas MLV o LUV, en dependencia de la concentración lipídica (Lanio M. E., 2009). Posteriormente se lleva a cabo una ultrafiltración para eliminar los posibles restos de etanol o éter según sea el caso (Kremer., 1977).

*b. Inyección de flujo cruzado:*

El método está basado en la técnica de inyección de etanol, a diferencia de la inyección de flujo cruzado se desarrolló para llevar a cabo una producción a escala y estéril que logra pasar del proceso por lotes convencional a un procedimiento continuo. Esta unidad tiene el beneficio de caracterizar las corrientes de inyección y permite la fabricación de liposomas independientemente de la escala de producción.

El proceso de desarrollo se realiza a escala de laboratorio a un volumen de aproximadamente 20 mL. Una vez definidos los parámetros, es fácil llevar el proceso a escala. Además, el material utilizado puede esterilizarse, ya sea por vapor o autoclave.

El tamaño de los liposomas puede ser controlado por la concentración del lípido en el punto de inyección que se define por la concentración de lípidos en etanol, diámetro completo de inyección, presión de inyección y velocidad de flujo de la fase acuosa. Al variar estos parámetros, se obtienen diferentes tamaños de liposomas. Estos parámetros son responsables de los resultados altamente reproducibles con respecto a los diámetros de las vesículas y la tasa de encapsulación.

La filtración de flujo tangencial es el siguiente paso del proceso para eliminar el etanol que interfiera en que el fármaco no logre quedar atrapada en el liposoma (Wagner A., 2010).

*c. Evaporación en fase reversa (REV):*

La formación de vesículas mediante la mezcla de un gran volumen de solvente orgánico que contiene el lípido con un volumen relativamente pequeño de solución acuosa se conoce comúnmente como "evaporación en fase reversa". Implica una etapa de formación de una emulsión de agua en solvente orgánico, que es el paso clave para determinar la estructura y por lo tanto, las propiedades de los liposomas (Lichtenberg D., 1988).

La ventaja de esta muy popular técnica, es que tiene una tasa de encapsulación muy alta, en donde se pueden obtener vesículas con un espacio central acuoso mucho más voluminoso.

El procedimiento de obtención es el siguiente (Pérez J., 2017), esquematizado en la Figura 17:

1. Utiliza un volumen muy pequeño de fase acuosa en la solución orgánica en la que están inmersos los fosfolípidos (relación molar 1:3 (fase orgánica/fase acuosa)). Tras la adición de la fase acuosa por encima de la temperatura de transición del lípido, la mezcla se sónica, en donde se obtiene una emulsión.
2. La fase orgánica se elimina a presión reducida dando lugar a liposomas en una fase de gel intermedio.
3. Finalmente, tras una fuerte agitación se obtiene una disolución concentrada de vesículas muy polidispersa desde pocos nanómetros hasta 10  $\mu\text{m}$  según la composición y concentración de los lípidos, la temperatura, fuerza y tiempo de sonicación.

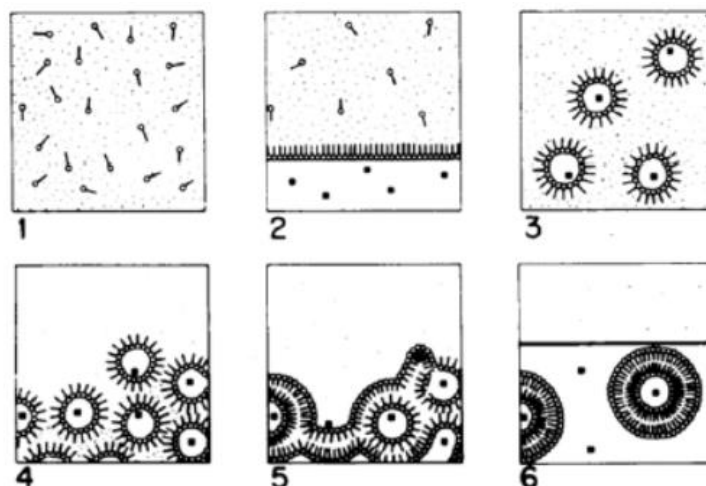


Figura 17. Obtención de liposomas tipo LUV. 1) fosfolípidos disueltos en un solvente orgánico puestos en contacto con una solución acuosa donde se encuentra disuelto el principio activo 2) para que posteriormente sea formada la emulsión (w/o) 3). Próximo a finalizar el proceso de evaporación del solvente orgánico 4), es evidente la formación de un gel, que al colapsar permite inversión de fases 5) y formar los sistemas liposomales 6), que normalmente son de tipo LUV (Pérez J., 2017)

Un posible inconveniente de este eficiente método es el solvente restante o la prueba de su ausencia, especialmente si el fin es para usos farmacéuticos (Szoka F., 1978).

### **C. Métodos basados en la remoción de detergente**

En este grupo de procedimientos para la formulación de liposomas, se utilizan detergentes, como sales biliares o alquilglicósidos, para la solubilización de lípidos en sistemas micelares. En contraste con los lípidos, los detergentes son altamente solubles tanto en medios acuosos como en orgánicos; existe un equilibrio entre las moléculas de detergente en la fase acuosa y el ambiente lipídico de la micela. El tamaño y la forma de las vesículas resultantes dependen de la naturaleza química del detergente, su concentración y los lípidos utilizados. En este método, los fosfolípidos y un detergente son mezclados para formar mezclas micelares. Entonces el detergente es eliminado de la preparación mientras las micelas se enriquecen progresivamente en fosfolípidos y finalmente los lípidos se unen para formar vesículas de una sola bicapa (Vemuri S., 1995).

Procedimientos comunes de eliminación de detergente de las micelas mixtas son a partir de dilución (Driessen A., 1990), cromatografía en gel y diálisis a través de fibras huecas o a través de filtros de membrana. Además, los detergentes también se pueden eliminar por adsorción a resinas hidrofóbicas o ciclodextrinas.

El método de diálisis de micelas mixtas en un medio acuoso fue descrito por primera vez por Kagawa y Racker (1971). Este método para la formación de vesículas se basa en la retención de la micela, mientras que las moléculas de detergente libre son eliminadas.

En la Figura 18 se muestra la relación que existe entre los liposomas MLV, LUV y SUV a partir del método de preparación mecánico. En donde con base en la hidratación de la bicapa lipídica se integran de forma espontánea los liposomas multilamelares de diferente tamaño. Si se aplica energía mecánica, como sonicación se obtienen liposomas unilamelares pequeños o grandes. La extrusión es el método que obtiene un tamaño más homogéneo y controlado de los liposomas, este parámetro depende del número de extrusiones que se realizan, mientras que la sonicación depende, entre otros factores, del tiempo de sonicación.

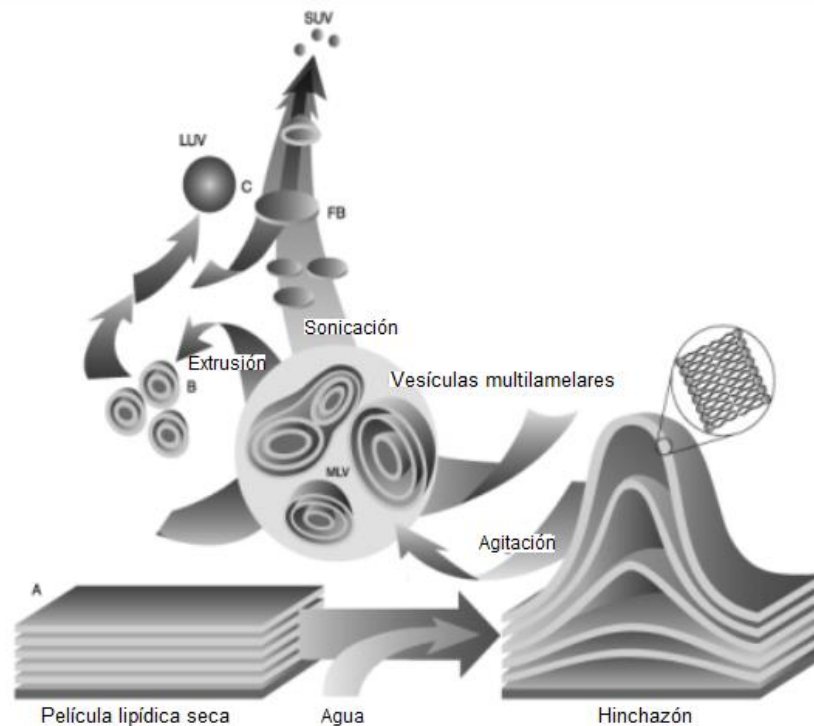


Figura 18. Procedimientos para la obtención de liposomas (MLV, LUV y SUV). A: Método de dispersión simple para la obtención de MLV, mediante agitación de películas lipídicas hidratadas. B: Método de extrusión de MLV a través de membranas de policarbonato para la obtención de LUV. C: Métodos de sonicación-homogeneización de MLV para la preparación de SUV (Ruano M., 2012)

En las últimas décadas, numerosas técnicas de preparación de liposomas fueron establecidas con el propósito de ser transportadores de un fármaco a través del organismo, mostrando los resultados finales que la mayoría de estos métodos son únicamente adecuados para escala de laboratorio y no para un enfoque industrial.

Desafortunadamente, la disponibilidad de ciertos métodos de producción, así como los aspectos de calidad dependen de las características de los mismos lípidos. Esto limita la elección del tipo de liposoma, entre los que se puede seleccionar para optimizar la terapia con medicamentos basados en estas vesículas liposomales.

Actualmente el avance se centra en la fabricación a gran escala. Se requiere un control estricto del producto para garantizar el efecto terapéutico predecible.

Además, se deben considerar problemas de calidad al momento de la fabricación de estos, como subproductos no deseados, tales como residuos de solventes orgánicos y/o degradación de productos.

Los procesos comúnmente utilizados para la esterilidad de los productos farmacológicos, como lo es la filtración estéril o el uso de autoclave, de igual manera, dan como resultado una degradación o un producto final inaceptable, así como también pérdida en combinación con liberación de fármacos e inestabilidad. Recientemente, muchos fabricantes intentan implementar estrategias alternativas, como la liofilización y procesos de producción en contenedores cerrados equipados con barreras de filtro estériles, para resolver este problema esencial (Wagner A., 2010).

### 2.5.1 TIPOS DE ATRAPAMIENTO DEL FÁRMACO

La encapsulación del principio activo se puede llevar a cabo de dos maneras: pasiva o activa. El proceso de incorporación o encapsulamiento del fármaco dentro del liposoma durante la formación de las vesículas se conoce como *atrapamiento pasivo*. La cantidad de soluto atrapado depende de la concentración lipídica (Hope M., 1993), por lo tanto, la eficiencia de encapsulación será proporcional al volumen de la fase acuosa del liposoma en formación.

Los fármacos hidrófobos se mezclan con los lípidos en solventes apropiados, esto ocurre previo a la hidratación de los fosfolípidos. Durante la formación de las bicapas, el fármaco hidrofóbico se solubiliza en la bicapa y no queda fármaco fuera del liposoma que remover (Ball E., 1995). Por ejemplo, el colesterol y los esteroides son liposolubles y se incorporan fácilmente a la membrana del liposoma.

Por otro lado, los fármacos hidrofílicos, se adicionan al momento de la hidratación de la película fosfolipídica; quedando atrapados en la fase acuosa de la vesícula.

La desventaja del atrapamiento pasivo es que se requiere de otra etapa adicional en el proceso, que consiste en remover el material no atrapado. Para remover las moléculas no atrapadas se usan métodos como diálisis, filtración en gel, resinas de intercambio iónico y absorbentes sintéticos. Esto resulta e implica pérdida de material si la eficacia de encapsulamiento es baja (Ball E., 1995).

En la Figura 19 se resume este comportamiento. Cuando el fármaco es hidrófilo, debido a su naturaleza se encuentra presente tanto en el medio acuoso (sistema donde los liposomas están inmersos), así como en los compartimentos acuosos internos que presentan las vesículas. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo un método de separación en donde se elimine el fármaco no encapsulado.

Contrario a los fármacos hidrofóbicos, por lo general, no es necesario eliminar el fármaco extraliposomal en caso de sustancias que se asocian con la bicapa porque en este caso la gran mayoría del fármaco se une a los liposomas.

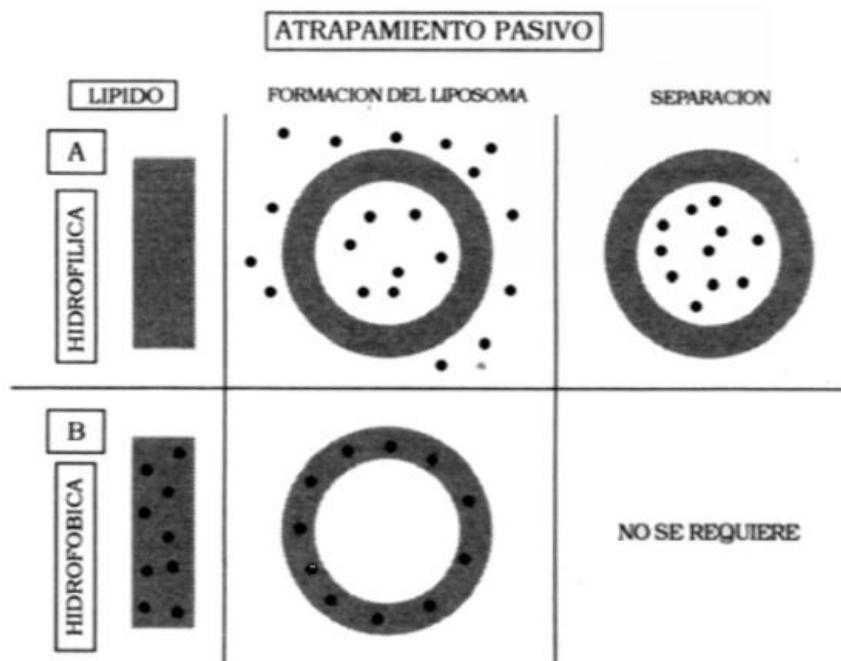


Figura 19. Método de atrapamiento pasivo (Hope., 1993). De: A) moléculas hidrofílicas y B) hidrofóbicas en liposomas

Por otra parte, en cuanto al método de *atrapamiento activo*, el proceso de carga se produce al añadir a la muestra de liposomas "vacíos" ya formados, una solución concentrada del agente a encapsular. Gracias a la permeabilidad de las bicapas, el agente puede penetrar a la fase acuosa o lipídica del liposoma por difusión (Villanueva A., 2019).

El principio es el siguiente: por fuera de los liposomas un valor de pH alto provoca un cambio del equilibrio de disociación del fármaco hacia una base no protonada. La base se difunde a través de la bicapa siguiendo el gradiente de concentración. Dentro de los liposomas, a un valor de pH bajo, la base que llega es protonada, la concentración de la forma no protonada dentro del liposoma es baja y, por lo tanto, mantiene el gradiente de concentración sobre la bicapa (Brandl M., 2001).

Cuando se usa un gradiente de pH, por ejemplo, como en el caso anterior, los liposomas se preparan en un tampón de pH ácido. Posteriormente se ajusta el pH del tampón mediante la adición de una base. El resultado neto es un ambiente externo neutro y un ambiente interno ácido (Ijeoma F., 2013).

El nivel de penetración del agente en caso de ser lipófilo dependerá de factores como el grado de empaquetamiento de la membrana, el cual se relaciona con la formulación liposomal empleada. Por ejemplo, al incorporar lípidos cargados negativamente a la membrana del liposoma, aumenta la asociación con fármacos cargados positivamente.

Una cita experimental de este tipo de atrapamiento es el caso de la doxorubicina, presentada como un fármaco lipófilico, donde se obtuvo una eficacia de atrapamiento del 100%. Se requiere que la doxorubicina se mezcle con liposomas que exhiben un gradiente de protones a través de la bicapa (ácido en el interior). Debido a que el fármaco es una amina lipófila ionizable, entra en la vesícula como una molécula sin carga y se protona, y la carga positiva resultante evita que la molécula se escape (Hope., 1993).

La Figura 20 ilustra el concepto de carga activa usando gradientes de iones a través de la membrana liposomal (Figura 20a). El mecanismo también se aplica a las moléculas hidrofóbicas ionizables que residen en la membrana, en donde pueden ser secuestradas en la mitad interna de la bicapa, controlando así su exposición al medio externo (Figura 20b).

Este tipo de proceso de encapsulación no solo simplifica la formulación, sino que puede dar como resultado una asociación mucho más alta de medicamentos con liposomas que se logra mediante otras técnicas.

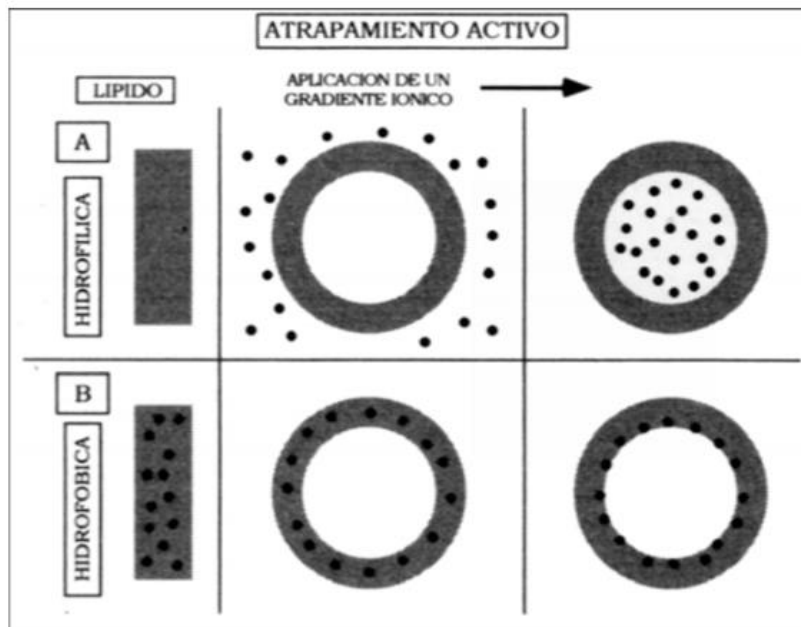


Figura 20. Método de atrapamiento activo (Hope., 1993) A) Encapsulación activa de moléculas hidrofílicas B) mediante el uso de gradientes de iones transmembrana



## 2.5.2 LIPOSOMAS PARA UNA ADMINISTRACIÓN SELECTIVA Y CONTROLADA

El aspecto más abordado en los últimos tiempos es la posibilidad de direccionar los liposomas de manera selectiva a determinados sitios del organismo que constituyen el blanco terapéutico, es decir, obtener no sólo una administración controlada sino también selectiva de fármacos.

La posibilidad de dirigir los liposomas hacia un blanco específico en términos generales se denomina "targeting", siendo su adaptación al castellano el término "direccionamiento". Globalmente, podemos distinguir entre un direccionamiento pasivo y uno activo (Lairon F., 1994):

- a. El direccionamiento pasivo ocurre cuando un vehículo, en este caso liposomas, se distribuye por sí mismo por un patrón natural al ser introducidos en el organismo.
- b. El direccionamiento activo intenta alterar dicha localización natural con el fin de dirigir a los liposomas a células, tejidos u órganos específicos.  
Por ejemplo: puede ser físico (como es el caso de los liposomas pH-sensibles o termo sensibles), o puede ser químico (mediante la estrategia de pegar a las vesículas ligandos específicos que reconozcan determinantes moleculares o macromoleculares de la superficie de la célula blanco).

### 2.5.3 IMPORTANCIA DEL TAMAÑO DE LOS LIPOSOMAS

El tamaño de los liposomas es un aspecto físico esencial que determina su éxito clínico. En cuanto a estabilidad y comportamiento físico, tiene gran importancia el tamaño y homogeneidad, ya que estos parámetros influyen en el comportamiento y destino de las vesículas en la circulación sanguínea (Sharma D., 2018).

El tamaño de los liposomas juega un papel importante en la velocidad de eliminación, como también puede caracterizar la liberación del fármaco (Santos y Guerrero., 1994).

En general, una población heterogénea (en cuanto a tamaño) se elimina en dos fases: rápida y lenta. En el caso de una población homogénea, la eliminación de la circulación sanguínea es monofásica (Espinola., 1984).

Los liposomas grandes (diámetro >200 nm) compuestos únicamente de fosfolípidos, son absorbidos rápidamente por los macrófagos y desaparecen de la circulación en breves períodos de tiempo (Bozzuto G., 2015). Por otro lado, liposomas de tamaño intermedio, de 70 a 200 nm de diámetro, tienen la posibilidad de escapar del sistema fagocito mononuclear (SFM) y, por lo tanto, circular el tiempo suficiente o alcanzar objetivos dentro o cerca del lecho vascular.

Finalmente, los liposomas pequeños (<70 nm) interactúan menos con las proteínas plasmáticas, evadiendo la captura por SFM, presentando una vida media más larga en la sangre (Brandl M., 2001).

Por otra parte, los liposomas de mayor tamaño liberan más lentamente los solutos solubles en agua que los de menor diámetro. Contrario a vesículas con diámetros más pequeños, que presentan capacidad reducida de almacenamiento de fármacos (Immordino M. L., 2006).

### 2.6 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS

La caracterización de suspensiones liposomales tiene por objeto, fundamentalmente, conocer con precisión el tipo de estructura que se obtuvo, composición, tamaño, homogeneidad, estabilidad, volumen de encapsulación y el rendimiento final de la técnica de elaboración.

Las propiedades físicas tienen un impacto directo en el comportamiento de los liposomas con su contenido *in vivo*, como: tamaño, número de lamelas, carga interna y fluidez de la bicapa. La caracterización química incluye estudios para establecer la pureza y potencia de varios componentes lipófilos. Los parámetros de caracterización biológica son útiles para establecer la seguridad e idoneidad de la formulación para la aplicación terapéutica (Pradhan B., 2015).

Se requiere aplicar los métodos de caracterización de liposomas inmediatamente después de su preparación y durante el almacenamiento de estos, para un adecuado control de calidad del producto. Los métodos tienen que ser reproducibles, precisos y rápidos en el contexto de su uso en el entorno industrial (Vemuri S., 1995).

Existen distintos métodos para llevar a cabo la caracterización de los sistemas. Los principales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Técnicas para caracterización física de liposomas (Kulkarni P., 2011)

<i>Parámetro</i>	<i>Técnica</i>
Tamaño	Microscopia de luz electrónica Dispersión de luz dinámica Dispersión de ultracentrifugación Contador de cuchillas
Número de lamelas	Espectroscopia NMR Dispersión de rayos-x de ángulo pequeño Microscopia de luz electrónica
Fluidez de la bicapa	Polarización de fluorescencia
Carga	Microelectrophoresis

Un factor importante para tener en cuenta es la presencia de la fase orgánica residual en mezclas de fosfolípidos. Por ejemplo, el cloroformo se usa como solvente para la formación de las bicapas lipídicas, además en algunos casos se utiliza para proteger los lípidos de la oxidación durante el almacenamiento.

Por lo tanto, un proceso que utiliza cloroformo como disolvente en la preparación de liposomas, debe incluir un método de prueba para corroborar su eliminación.

Es responsabilidad del fabricante establecer las especificaciones sobre los niveles residuales de disolvente en el producto final y establecer la seguridad de las cantidades residuales. Los niveles permitidos de disolvente residual pueden variar según el uso final del producto.

De acuerdo con estudios publicados por Vemuri S. (1995), se llevó a cabo una serie de experimentos para optimizar la eliminación de disolvente orgánico (cloroformo) de diferentes tamaños de lotes a diferentes temperaturas. El estudio demostró que cuanto menor es el tamaño del lote y mayor es la temperatura del baño de agua, menor es el residuo de cloroformo en la película de fosfolípidos. De igual manera, se expuso que el tamaño del lote parece afectar el residuo de cloroformo más profundamente que la temperatura del baño.

## 2.7 USOS DE LOS LIPOSOMAS

El uso de liposomas en combinación con un fármaco, como compuestos activos, es el área más ampliamente estudiada y altamente desarrollada (Kulkarni S. B., 1995).

A continuación, se enuncian los usos más comunes de liposomas en medicina:

- a. Se desarrolló una investigación para el uso de las vesículas como contenedores de hemoglobina.

La hemoglobina encapsulada en liposomas (LEH), por sus siglas en inglés "Liposome-encapsulated hemoglobin", tiene el fin para su uso como oxígeno terapéutico (Immordino M. L., 2006). LEH es una estrategia que se utiliza actualmente para crear sustitutos de sangre artificial y puede ser fácilmente producido en masa con esterilidad garantizada (Arifin R. & Palmer F., 2005).

Esta táctica implica encapsular la hemoglobina libre de estroma potencialmente tóxica, dentro del núcleo acuoso de una cubierta de membrana lipídica, que está compuesta de fosfolípidos y colesterol.

- b. Se utilizan liposomas para el tratamiento de enfermedades por acumulación de metales.

La terapia aplicada ha consistido en la encapsulación de agentes quelantes, por ejemplo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), Dietilentriaminopentaacético (DTPA), D-pencilamina, Desferrioxamina (DF) y otros (Rahman y col, 1975).

Young S. (1979), demostró que administrando liposomas conteniendo DF se incrementa muy significativamente la excreción de <sup>59</sup>Fe en ratones previamente intoxicados.

- c. Los estudios realizados en el campo destinado para la artritis indican que el cortisol (Shaw I. *et al.*1979), incorporado en liposomas e inyectado intraarticularmente es retenido en el tejido durante periodos de tiempo mucho más prolongados en comparación con la administración del fármaco libre, extendiendo por lo tanto su acción desinflamante.

Los liposomas son las vesículas que comprenden fosfolípidos junto con una alta concentración de alcohol. Este tipo de liposomas permite a los fármacos penetrar a través del estrato córneo. Se consideran un sistema seguro de administración de medicamentos que está aprobado utilizar para cosmética y farmacéutica (Thulasiramaraju T. V., 2012).

En las formulaciones cosméticas son usados como un sistema de transporte: acarrean el agente activo a las capas de la epidermis, donde es absorbido en el sitio requerido. La facilidad de absorción aumenta la efectividad de los productos de cuidado de la piel y también reducen el precio de los ingredientes (Hernández., 2017).

En el cuidado de la piel actual, se usan los liposomas de diámetros más pequeños por lo que pueden penetrar con más profundidad en la piel y transportar los ingredientes activos durante más tiempo. Por ejemplo, se encapsula, extractos de aloe vera y vitaminas.

De igual manera, existen proyectos en las siguientes áreas:

A. Tecnología de los alimentos.

Las aplicaciones de esta técnica han ido incrementando en la industria de los alimentos debido a la protección de los materiales encapsulados a factores como calor y humedad, permitiendo mantener su estabilidad y viabilidad. Ayudan a que los componentes frágiles resistan las condiciones de procesamiento y empaque, mejorando sabor, aroma, estabilidad, valor nutritivo y apariencia de sus productos.

- a) En la encapsulación de sabores, se reduce su volatilidad o previene reacciones indeseables con otros componentes del alimento aun cuando se almacene por un periodo prolongado.

Para que el sabor sea liberado rápida y efectivamente en la boca, se recomienda utilizar materiales solubles en agua como almidones y dextrinas. En el caso de encapsulación de vitaminas, minerales y otros nutrientes, éstos son liberados después de haberse consumido. Como la liberación se lleva a cabo en el estómago o el intestino, permite una máxima absorción de los compuestos con un mínimo de reacciones adversas. Los encapsulantes usados para esta aplicación son de naturaleza hidrofóbica como grasas y ceras, pero también se usan derivados de celulosa (Yáñez F., 2005).

- b) Se han aplicado los liposomas para la encapsulación de nuevas enzimas, en donde estas se adicionan a la leche, lo que permite acelerar la maduración de los quesos manchegos.

B. Acuicultura:

- a) Se ha experimentado a partir de la elaboración de liposomas unilamelares con sustancias aptas para la nutrición y enfermedades del camarón.
- b) En la alimentación y tratamiento terapéutico de larvas de peces marinos (Monroig M., 2006), se han llevado a cabo diferentes investigaciones.

## 2.8 VENTAJAS

Como todo, al inicio era difícil la experimentación progresiva con liposomas, debido al desconocimiento de muchas de sus propiedades y características, pero con el tiempo y años de investigación se han conseguido grandes éxitos (Hernandez L., 2017).

A continuación, se citan las ventajas más sobresalientes de los liposomas (Espinola., 1984):

- A. Son biodegradables: los liposomas son biocompatibles, no tóxicos y no inmunogénicos (Pradhan B., 2015). Por el hecho de que los fosfolípidos y el colesterol son constituyentes comunes de todas las células vivientes, se asimilan rápidamente.
- B. Brinda protección al material encapsulado: si la sustancia incorporada se inyectara en forma libre, podría sufrir una rápida degradación o interactuar con otros metabolitos y/o sustratos no deseados.  
Por lo tanto, los liposomas evitan que un fármaco se metabolice antes de llegar a los tejidos diana y simultáneamente minimizan la exposición del tejido sano al fármaco encapsulado durante su circulación en la sangre, incrementando el índice terapéutico (Bozzuto G., 2015).
- C. Retarda la eliminación del material incorporado: cuando se administran sustancias hidrofílicas de bajo peso molecular en forma libre, se eliminan rápidamente del organismo. Esto cambia radicalmente cuando se inyectan encapsuladas en liposomas, observándose que se mantienen por tiempo muy prolongado dentro del organismo.
- D. Transportan moléculas con baja solubilidad, evitando el uso de excipientes que puedan provocar toxicidad en el paciente.  
De esta manera, se presentan como biomateriales adecuados para la administración de fármacos hidrofóbicos, anfipáticos e hidrofílicos (Pradhan B., 2015).
- E. Varía la distribución del fármaco: el destino del fármaco liposomal, ya no depende del fármaco en sí, sino que está controlado por las características del portador liposomal. Esto, por supuesto, solo es cierto mientras el fármaco permanece asociado con el portador (Brandl M., 2001). Por lo tanto, cualquier efecto secundario indeseable del fármaco encapsulado se reduce sustancialmente en comparación a la forma libre.
- F. Aumenta la permeabilidad celular: sustancias que ordinariamente no pueden llegar al interior de las células o lo hacen en muy baja cantidad, al ser encapsuladas en liposomas tiene acceso a las mismas (quelatos, antibióticos, citostáticos, etc.).
- G. Intensifican la eficacia, ampliando los márgenes terapéuticos de los fármacos actuales (Jiménez J., 2019).

Considerado el hecho de que cuando un fármaco es administrado tiene libre acceso a muchos sitios del organismo, se podría pensar que esta amplia distribución puede aumentar la posibilidad de efectos tóxicos colaterales y disminuir la efectividad de la terapia farmacológica, por lo tanto, cualquier mecanismo que concentre el fármaco en el sitio blanco será enormemente benéfico.

En la actualidad los liposomas están siendo aceptados como agentes farmacéuticos que pueden mejorar la actividad terapéutica de una amplia variedad de compuestos; además de ser reconocidos como un poderoso modelo de membrana biológica (Helber J., 1998). Además, se ha explorado el interés como vehículos para la administración tópica cutánea y para la administración transdérmica.

## 2.9 LIPOSOMAS DE ADMINISTRACIÓN PARENTERAL

La administración parenteral de fármacos en el ser humano es la ruta más investigada y no sólo involucra la ruta intravenosa, sino también la vía subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intraarticular, intraarterial; siendo la administración intravenosa de liposomas una de las principales rutas de administración de dicho sistema terapéutico (Lairion F., 1994). El empleo de sistemas terapéuticos para lograr la administración selectiva y controlada de fármacos por vía parenteral es sujeto de constantes investigaciones en la actualidad. Dentro de dichos sistemas, los liposomas han demostrado poseer una versatilidad inusual.

El objetivo de la inclusión de fármacos de uso parenteral en liposomas, es incrementar su efectividad biológica en el tratamiento de diferentes enfermedades.

Conforme a la administración parenteral, se tienen referencias de que una vez que son inyectados por vía endovenosa, los liposomas en circulación sanguínea son capturados principalmente por células de SFM.

A diferencia de otros macrófagos fijos (peritoneales, bazo, médula ósea), la ubicación especial de las células de Kupffer (CK), intercaladas en el endotelio de las sinusoides hepáticas, poseen óptima accesibilidad a los liposomas que circulan en el torrente sanguíneo. Por tanto, los órganos con mayor tasa de acumulación de liposomas son el hígado y el bazo. La abundancia de macrófagos (80-90% de los macrófagos fijos del cuerpo se hallan en el hígado y son CK), su rica fuente de circulación sistémica y su accesibilidad son los motivos de la gran acumulación de liposomas en estos órganos. Al aumentar la dosis administrada, el depósito puede ser dirigido al bazo, la médula ósea y los pulmones, en este orden (Navarro G., 2008).

## 2.10 PRUEBA DE HEMÓLISIS

En cada una de nuestras células se llevan a cabo reacciones químicas y físicas de gran complejidad, como resultado del continuo intercambio de materia y energía entre la célula y su entorno.

Uno de tales fenómenos físicos involucrados en esos intercambios es la ósmosis, que se relaciona con la concentración de las soluciones, separadas por una membrana semipermeable (Tiskow G., 2006), en este caso, de glóbulos rojos.

La presencia de la membrana semipermeable separa dos espacios con concentraciones diferentes. Con el tiempo se produce un equilibrio dinámico por compensación de concentraciones en los compartimentos que separan la membrana. La migración del solvente de uno a otro compartimento es en este caso, la base del equilibrio del sistema, por la cual, mientras disminuye el volumen final de la solución en un lugar del sistema, aumente necesariamente en otro lugar del mismo (Droste H., 1983). Por lo tanto, la disminución de un compartimento se compensa con un aumento equivalente de la misma en el otro compartimento del sistema.

La diferencia de concentración de solutos entre los dos compartimentos separados genera una diferencia de presión a través de la membrana que representa la fuerza impulsora para el flujo osmótico.

Basados en un fenómeno como el descrito, se puede esperar que el aumento de presión en un compartimento cerrado como es la célula o glóbulos rojos dé como resultado un cambio drástico en su forma y tamaño, que puede llevar finalmente a su destrucción.

La fragilidad osmótica del eritrocito no es más que un concepto que refleja la susceptibilidad de los glóbulos rojos para hemolizar. El término hemólisis hace referencia al fenómeno de ruptura o lisis de los eritrocitos, provocando la liberación de componentes intracelulares en el líquido exterior (Pineda D., 2010), debido a la acción de agentes físicos o químicos.

Los tensoactivos se utilizan ampliamente para solubilizar y separar componentes de biomembranas (Mattei B., 2016). La habilidad que presentan para interactuar con vesículas se basa en su carácter anfifílico, de ahí su facilidad de intercalamiento entre lípidos, es decir, que presentan en la misma molécula una porción hidrófoba, la cual se encuentra unida covalentemente a una región hidrófila, que tiene afinidad por disolventes polares (Zaragoza A., 2012).

Los grupos polares de la zona hidrofílica pueden estar cargados o ser neutros, la zona apolar puede contener cadenas alquílicas o anillos aromáticos.

Las interacciones entre los detergentes y los lípidos de las membranas han podido estudiarse sobre modelos experimentales de bicapas lipídicas. Cuando un detergente se añade a una suspensión de liposomas constituidos por fosfolípidos, parte de él interacciona con los lípidos de la bicapa y parte permanece libre en disolución.

Los principales efectos de los detergentes sobre las membranas son el movimiento lipídico transmembrana (flip-flop), ruptura de la barrera de permeabilidad de la membrana (fuga) y lisis/reensamblaje de vesículas (Ahyayauch H., 2010).



El mecanismo molecular de la lisis en los eritrocitos a partir de surfactantes puede medirse siguiendo la liberación de hemoglobina, se han propuesto cuatro fases (García-Gurtubay J., 2015):

1. Adsorción de monómeros del surfactante.
2. Penetración en la membrana.
3. Alteración en la organización molecular con rotura de la membrana.
4. Finalmente, salida de hemoglobina del eritrocito.

Pineda T. (2010) indica que aquellos analitos de elevada concentración intracelular muestran un sesgo positivo como resultado de la liberación de hemoglobina desde el compartimento intracelular, indicando lisis en la membrana del eritrocito.

La hemólisis es visible después de la centrifugación de la muestra, en donde se presenta una coloración roja, esta tonalidad es apreciada en el plasma si la concentración de hemoglobina libre varía entre 100 y 300 mg/L. La medición de la concentración de hemoglobina libre por debajo de este valor se realiza a partir de espectrometría.

Se debe considerar que durante y después de la toma de la muestra se pueden producir incorrecciones que conducen a hemólisis *in vivo*. Como consecuencia de la liberación de sustancias de las células al plasma, se provocan cambios en el valor de algunas magnitudes por las siguientes razones (Thomas L., 2002):

- a) Incremento o descenso de las concentraciones obtenidas debido al gradiente de concentración entre los eritrocitos y el plasma.
- b) Interferencia de reacciones químicas mientras se produce la liberación de sustancias de las células sanguíneas.
- c) La hemoglobina en una muestra puede interferir con la reacción química porque cambia los coeficientes de absorción molar del substrato o de los productos de reacción que deben ser medidos.

La hemoglobina tiene un espectro de absorción que comienza alrededor de los 340 nm, aunque su banda característica está entre 500 y 600 nm (Sánchez-Rodríguez M., 2002).

## 2.11 GLUTATIÓN

El glutatión es un tripéptido, constituido por los aminoácidos glutamato, cisteína y glicina. Contiene un enlace peptídico entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato (Figura 21).

Se conoce químicamente al GSH reducido como N-(N-L-gamma-glutamil-L-cisteinil) glicina.

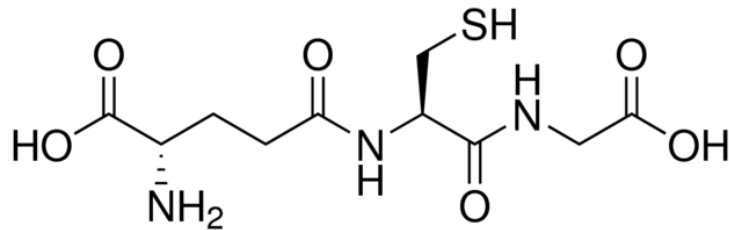


Figura 21. Estructura química de Glutatión reducido (PubChem)

Es una de las especies tiólicas de bajo peso molecular más abundante en los tejidos, participa en múltiples procesos metabólicos, su monómero reducido (GSH), ayuda a desintoxicar de xenobióticos y metales pesados, mantiene la membrana celular y desactiva los radicales libres, así como también está involucrado en la regulación redox del ciclo de la célula (González C., 2005).

Su mecanismo de acción es mediante la donación de electrones a moléculas reactivas oxidadas, ayudando a estabilizar al oxidante. Estas especies reactivas constituyen átomos, iones y moléculas con uno o más electrones sin aparear en el orbital más externo; así como moléculas derivadas del oxígeno que tengan alta capacidad reactiva, provocando daños en diferentes tejidos al interactuar con moléculas de importancia biológica (Cisneros-Prego E., 1995).

El glutatión puede encontrarse en su forma reducida como GSH, durante el proceso, se convierte en su forma oxidada, pero se combina rápidamente con otra molécula de GSH reactiva, produciendo el disulfuro de glutatión (GSSG), formando puentes disulfuro ("S-glutationilación") (Pompella, A., 2003). Lo que ocasiona que el GSH sea la especie predominante (Bonola G., 2014).

El glutatión se ha descrito durante mucho tiempo como un reactivo defensivo contra la acción de xenobióticos tóxicos (fármacos, contaminantes, carcinógenos). Se trata del principal antioxidante de las células, es ubicuo y ayuda a protegerlas de las especies reactivas del oxígeno, participando en la neutralización de radicales libres. De igual manera interviene en el mantenimiento de antioxidantes exógenos como vitamina C y E, en sus formas reducidas.

### III. TÉCNICAS EXPERIMENTALES PARA CARECTERIZACIÓN DE LIPOSOMAS

En este apartado se presentan las técnicas experimentales empleadas para la caracterización fisicoquímica y estabilidad de los sistemas liposomales. Se incluyen los fundamentos teóricos de cada técnica, así como las características de los equipos empleados.

Las principales técnicas usadas son: dispersión de luz dinámica y espectrofotometría UV-VIS.

#### 3.1 ESPECTROFOTOMETRÍA

Los métodos espectroscópicos de análisis están basados en la medida de la radiación electromagnética de una sustancia.

La espectrofotometría es una de las técnicas analíticas más extendidas por su sencillez, fiabilidad e instrumentación de bajo costo.

##### 3.1.1 FUNDAMENTOS

Los procedimientos realizados con espectrofotometría en la región UV-VIS del espectro electromagnético involucran mediciones directas de especies que absorben o emiten radiación y mediciones después de derivación química, así como acoplamiento a diversas técnicas o procesos, como cromatografía y electroforesis. Además, es una herramienta importante para determinar parámetros fisicoquímicos, como las constantes de equilibrio y velocidad de reacción (Rocha F., 2004).

Los métodos espectroscópicos se pueden clasificar en función de la región del espectro electromagnético que interviene en la técnica. Así, pueden utilizarse regiones como rayos X, ultravioleta, visible, infrarrojo, microondas, etcétera.

En la Figura 22, pueden identificarse las regiones del espectro electromagnético, en función de los valores de la longitud de onda ( $\lambda$ ) de cada radiación (Luque J., 2012):

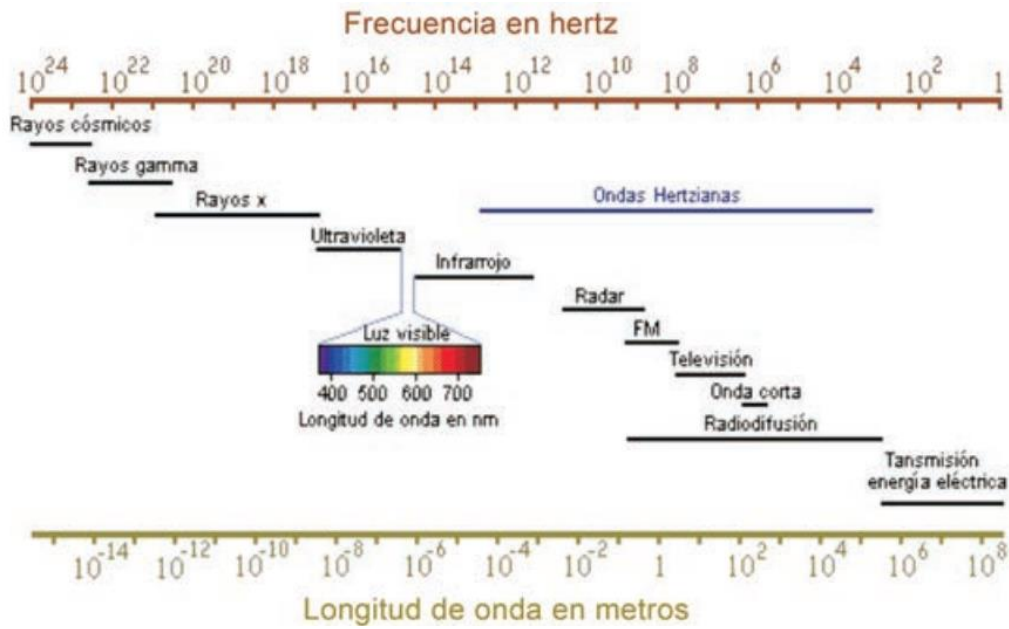


Figura 22. Espectro electromagnético (Luque J. 2012)

La espectrofotometría se basa en la ley de Lambert-Beer, que es el principio matemático para las mediciones de la absorción de radiación por muestras en estado sólido, líquido o gaseoso, en las regiones ultravioleta, visible e infrarroja del espectro electromagnético (Rocha F., 2004).

Si se considera que se dispone de una fuente de luminiscencia que hace llegar a la muestra un haz de radiación, de longitud de onda previamente seleccionada, cuya potencia es  $P_0$ , la muestra de espesor  $b$  absorbe una parte de esa radiación incidente, de forma que la potencia del haz disminuye después de atravesar la muestra siendo su nueva potencia  $P$  (Hernández-Hernández., 2002).

El cociente entre la potencia de la radiación que sale de la muestra y de la que incidió sobre ella, se define como transmitancia:

$$T = P/P_0 \quad \text{Ec... (1)}$$

La transmitancia también puede expresarse en tanto por ciento, multiplicando el cociente anterior por 100. Es más frecuente utilizar el concepto de absorbancia, o densidad óptica, que se define como el logaritmo de la transmitancia cambiado de signo:

$$A = \log (P_0/P) = -\log T \quad \text{Ec... (2)}$$

De acuerdo con estas expresiones, si la muestra no absorbe radiación,  $P$  y  $P_0$  coinciden, por lo tanto,  $A=0$ , y se transmite toda la radiación  $T=1$  (100% de transmitancia).

Si, en otro caso, se transmite solo un 1% de radiación ( $T=0.01$ ),  $P=P_0/100$ , la absorción de radiación que ha tenido lugar corresponde a  $A=2$ .

La absorbancia está relacionada con la concentración de la sustancia,  $c$ , por la ley de Lambert-Beer, que se resume con la ecuación (Harris., 2007):

$$A = \varepsilon b c \quad \text{Ec... (3)}$$

Donde  $c$  se expresa en mol/L,  $b$  es la longitud del camino óptico (anchura de la celda que contiene la suspensión de la sustancia) y se expresa en cm, y  $\varepsilon$  es la absorptividad molar, propiedad característica de cada sustancia correspondiente a la cantidad de radiación que absorbe a una longitud de onda determinada por unidad de concentración, siendo sus unidades  $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Por otro lado, la absorbancia no tiene unidades.

Si bien la ley de Lambert-Beer indica que a una representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración le correspondería una línea recta, esto sólo tiene lugar para soluciones diluidas, por ello, no es conveniente utilizar la expresión matemática directamente, sino construir en cada caso la recta de calibrado que confirme que la ecuación de Lambert-Beer se cumple en el intervalo de concentraciones en el que se trabaja. Esta recta se construye midiendo la absorbancia de una serie de disoluciones de concentración perfectamente conocidas.

### 3.1.2 INSTRUMENTACIÓN

Para medir los valores de absorbancia y transmitancia de una disolución se utilizan espectrofotómetros UV-Vis, que, se componen de cinco elementos principales, como se muestra en la Figura 23 (Harris., 2007):

1. Una fuente de radiación que suele ser una lámpara de filamento de wolframio.
2. Un monocromador que permite seleccionar una longitud de onda determinada originando un haz monocromático.
3. Un recipiente para contener la muestra denominado cubeta o celda, con un material que permite el paso de la radiación en la región del espectro de interés. Suelen ser de vidrio, plástico o cuarzo. El espesor de la cubeta más habitual es 1 cm.
4. Un detector que convierte la energía radiante en una señal eléctrica.
5. Una pantalla de visualización.

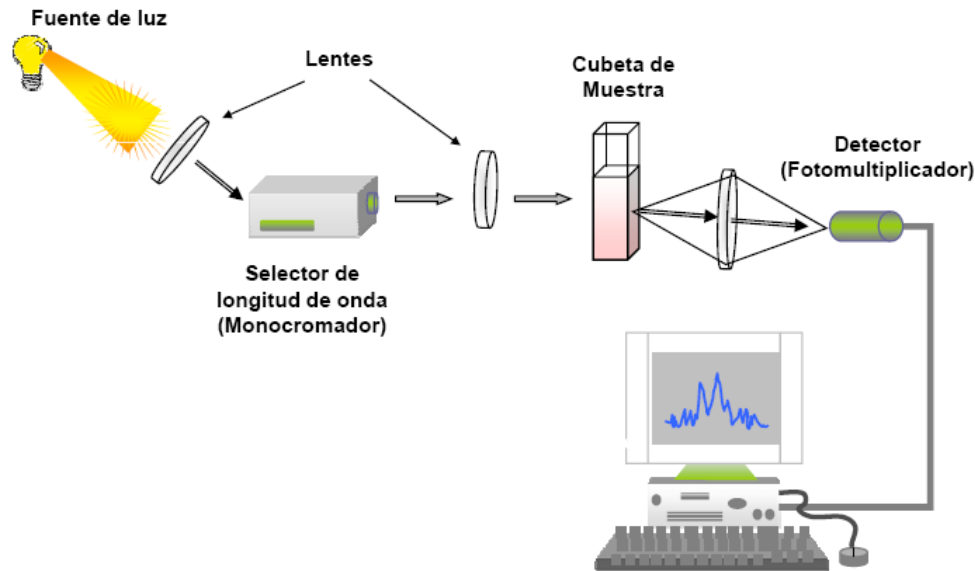


Figura 23. Esquema de las partes de un espectrofotómetro (Rodríguez R., 2018)

## 3.2 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ

La dispersión de luz se encuentra dentro del amplio conjunto de técnicas experimentales basadas en la interacción radiación-materia. Este tipo de técnica es una herramienta eficaz para determinar características de la materia, en donde se define el tamaño promedio o distribución de tamaños de partícula.

### 3.2.1 FUNDAMENTOS

Para determinar el tamaño de las partículas, la dispersión de luz dinámica toma en cuenta la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo.

La dispersión dinámica de luz (DDL o DLS, por sus siglas en inglés de "Dynamic light Scattering"), es una técnica fisicoquímica empleada para especificar la distribución de tamaños de partículas en suspensión (Ruano M., 2012), o macromoléculas en solución tales como proteínas o polímeros.

El término "dinámica" no se refiere al movimiento de la muestra como un conjunto, sino a la "vibración" de las partículas que la componen.

La luz láser al alcanzar las numerosas partículas que se encuentran en suspensión se dispersa en todas las direcciones posibles. Si se separa una dirección, los haces de luz dispersados por distintas partículas interfieren entre sí y se obtiene una intensidad de dispersión determinada (Cuadros-Moreno *et al.*, 2014).

La luz dispersada por una disolución polimérica o coloidal contiene información sobre la estructura, interacciones y dinámica de las nanopartículas, macromoléculas o coloides. Es por eso que la dispersión de luz es una de las técnicas más ampliamente empleadas para la caracterización de polímeros y coloides en disolución.

La dispersión dinámica de luz mide la difusión de partículas en movimiento Browniano, donde las posiciones relativas de las partículas varían constantemente entre sí. La técnica convierte el valor del movimiento a tamaño y a una distribución de tamaño, basándose en la relación de Stokes-Einstein.

Como resultado, en un experimento de dispersión, varía tanto la relación de fase de la luz dispersada por diferentes partículas que se mueven al azar, como el número de partículas en el volumen de dispersión. Ambos efectos producen una fluctuación de la intensidad de luz dispersada (Caballero V. *et al.*, 2013), este efecto también provoca cambios en las condiciones de interferencia y en la propia intensidad de dispersión.

Si las partículas se mueven rápidamente (partículas pequeñas), se acelera la variación de la intensidad de dispersión. Por el contrario, las partículas lentas (grandes) llevan a variaciones más lentas (Cuadros-Moreno *et al.*, 2014).

Como se mencionó, esta técnica permite conocer el tamaño promedio y la distribución poblacional de las vesículas a través del cálculo del radio hidrodinámico de las partículas, utilizando la ecuación de Stokes-Einstein:

$$D = \frac{k T}{3\pi \eta D_H} \text{ Ec... (4)}$$

Donde  $D$  es el coeficiente de difusión,  $k$  es la constante de Boltzmann,  $T$  es la temperatura absoluta,  $\eta$  es la viscosidad del fluido y  $D_H$  es el diámetro hidrodinámico de la partícula.

La técnica consiste en irradiar la suspensión con un láser a cierta longitud de onda. La luz dispersada es recolectada por un detector y analizada por un correlador (Giudice F., 2016). Las fluctuaciones generadas en la intensidad de luz dispersada son traducidas por una función de correlación a medidas de  $D$ , que es inversamente proporcional al  $D_H$ .

### 3.2.2 INSTRUMENTACIÓN

Para medir el tamaño de partícula de una disolución, se utiliza el Nanosizer Nano-ZS90, el cual consta de los siguientes elementos (Giudice F., 2016), esquematizados en la Figura 24:

1. Fuente de luz láser monocromática que incide sobre la solución a analizar. La mayor parte del haz molecular pasa en línea recta a través de la muestra, pero una parte es dispersada por las partículas en el interior de la muestra.
2. Detector para medir la intensidad de la luz dispersada. La intensidad de la luz dispersada dentro de la muestra debe estar dentro de un rango específico para que el detector pueda medirla correctamente.
3. Atenuador necesario para reducir la intensidad del láser si la luz detectada es demasiado elevada, y evitar la sobrecarga del detector.
4. Fotómetro posicionado a un ángulo dado de detección, medido con respecto a la dirección de incidencia del láser sobre la muestra. Colecta la luz dispersada por las partículas en un ángulo sólido pequeño.
5. Correlador digital que calcula a partir de la intensidad dispersada en intervalos de tiempos  $\Delta t$ , la función de autocorrelación de intensidades.
6. Ordenador el cual está conectado al equipo. Tanto el manejo del equipo como el almacenamiento de los datos se llevan a cabo de forma automática mediante el programa suministrado por el fabricante, donde el software permite analizar los datos.

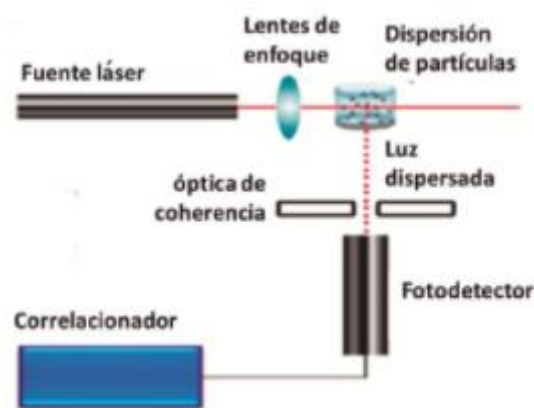


Figura 24. Esquema de las partes de un equipo de DLS (Giudice F., 2016).



#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La forma de dosificar o incorporar fármacos al organismo es clave para reducir su toxicidad, efectos secundarios y mejorar la eficacia de acción. En las últimas décadas se han estudiado diferentes tecnologías farmacéuticas para ofrecer nuevas soluciones a problemas de administración, en donde el aspecto clave es lograr que los fármacos lleguen al sitio que lo requiere en la concentración adecuada.

La farmacoterapia ha evolucionado en la terapia dirigida, donde se investigan principalmente formas de liberación controlada, direccionadas a los organismos en los que debe actuar el fármaco, sin problema de efectos secundarios.

En este sentido, los liposomas han sido desarrollados como matrices de vehiculización de numerosas moléculas de aplicación funcional, ya que permiten la encapsulación en las formulaciones tanto de moléculas lipo e hidrosolubles, como compuestos relativamente inestables. Adicional a que poseen la capacidad de evitar la descomposición de las moléculas encapsuladas, posibilitando su liberación en un sitio o bajo condiciones específicas.

De manera general, las especies reactivas del oxígeno son moléculas capaces de provocar daños importantes en órganos y tejidos. Para combatirlas el organismo presenta medios de defensa entre los que se encuentra el sistema de glutatión (Cisneros-Prego E., 1995).

El glutatión es el mayor antioxidante endógeno, neutraliza radicales libres y otros oxidantes, ayudando a mantener a las células en un estado reducido. Debido a su proceso de regeneración (ciclo redox), su capacidad como antioxidante es esencial, razón por la cual es actualmente una de las moléculas de mayor interés.

Debido a las propiedades químicas que presenta el GSH, en particular la estructura que le confiere una alta solubilidad en agua es muy sensible a la degradación y su biodisponibilidad es muy baja. Como consecuencia, muy poco de este llega al hígado (su principal órgano diana), representando una baja efectividad al momento de su administración.

Por lo tanto, los liposomas a partir de su versátil capacidad de integrar moléculas hidrosolubles en su interior posicionan a esta forma farmacéutica como el mejor candidato para la incorporación del glutatión en su interior. Las moléculas de glutatión quedan recubiertas por moléculas de fosfolípidos y colesterol, protegiendo así al GSH de la degradación y aumentando su tasa de biodisponibilidad.

## **V. HIPÓTESIS**

El glutatión es una molécula altamente hidrofílica que no presenta buena biodisponibilidad, entonces, mediante el desarrollo y optimización de una formulación parenteral con base en liposomas centrados en colesterol y fosfatidilcolina, tendremos un sistema con las características de tamaño de partícula e isotonicidad para ser evaluado posteriormente en sistemas biológicos.

## **VI. OBJETIVOS:**

- A. Desarrollar y optimizar una formulación parenteral a base de liposomas de colesterol y fosfatidilcolina, a partir del método vórtex para la administración de glutatión.

### **-OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) Realizar un diseño experimental para la obtención de formulaciones basadas en liposomas cargados con glutatión.
- b) Estandarizar el procedimiento para medir el tamaño de partícula de los liposomas y definir el tamaño presente en estos para la administración de glutatión.
- c) Estandarizar la técnica de porcentaje de hemólisis en liposomas y determinar este parámetro en los experimentos realizados para la administración de glutatión.
- d) Estandarizar la metodología de medición de glutatión encapsulado en liposomas y realizar las cuantificaciones en los experimentos realizados para comprobar la eficiencia de encapsulación de los liposomas.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 MATERIALES

A continuación, se describen los componentes de las preparaciones de liposomas elaboradas. En su composición destacan las fases lipídica y acuosa.

#### 7.1.1 LÍPIDOS

La fase lipídica, está compuesta por los siguientes elementos:

- *Fosfolípidos*

Los fosfolípidos son los componentes fundamentales de la bicapa lipídica de los liposomas. El fosfolípido empleado en este trabajo corresponde a L- $\alpha$ -fosfatidilcolina (FC) de haba de soya, tipo IV-S (Figura 25), suministrada por la firma Sigma-Aldrich, en estado sólido y con un contenido base de colina del 30%, su peso molecular es de 758.1 g/mol.

La temperatura de transición reportada es de -20 a -30 °C (Li J., 2015; Diz V., 2019).

La conservación de la fosfatidilcolina se llevó a cabo en recipientes herméticamente cerrados a temperatura de congelación (-20 °C) y en ausencia de luz.

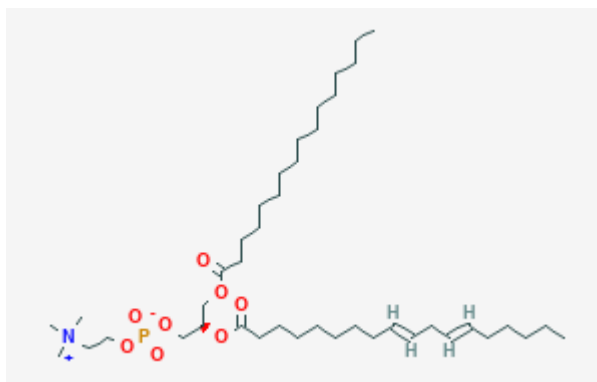


Figura 25. Estructura química de 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PubChem)

- *Colesterol*

El colesterol actúa a nivel de la bicapa lipídica proporcionando una estructura más compacta y menos permeable.

Se utilizó colesterol suministrado por la firma Sigma-Aldrich, en estado sólido a un grado del 99% de pureza, su peso molecular es de 386.65 g/mol. Las condiciones de conservación se llevaron a cabo de la misma manera que con la fosfatidilcolina.

### 7.1.2 ANTIOXIDANTE

Se ha encapsulado L-Glutatión reducido como principio activo, suministrado por Sigma-Aldrich, se presenta como sólido blanco con un grado de pureza de 98%, su peso molecular es de 307.32 g/mol.

La conservación se llevó a cabo en un recipiente herméticamente cerrado a una temperatura de 4°C (refrigeración).

### 7.1.3 OTROS MATERIALES

#### a) Solventes orgánicos

Todos los componentes de la fase lipídica han sido solubilizados en solventes orgánicos volátiles.

Los seleccionados son los siguientes: cloroformo ( $\text{Cl}_3\text{CH}$ ), alcohol etílico desnaturalizado ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ ) y alcohol metílico ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) proporcionados por J.T.Baker, almacenados a temperatura ambiente. Por igual manera los tres solventes presentan un grado de pureza del 99.75%

#### b) Disolución tampón

Se utilizó PBS: (cloruro de sodio ( $\text{NaCl}$ ) + cloruro de potasio ( $\text{KCl}$ ) + fosfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) + fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )).

Todos los reactivos necesarios para la elaboración del buffer son procedentes de Sigma-Aldrich, cumpliendo con una pureza del 99%, almacenado a temperatura ambiente.

#### c) Reactivos para prueba de hemólisis (tensoactivo)

El tensoactivo utilizado en esta prueba fue Tritón X-100.

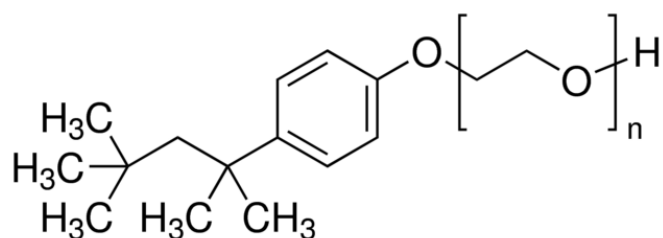


Figura 26. Estructura química de Tritón X-100 (PubChem)

El Tritón X-100 proporcionado por Sigma-Aldrich es un tensoactivo no iónico con un grupo hidrofílico de óxido de polietileno y una cadena hidrofóbica (Figura 26), a temperatura ambiente presenta alta viscosidad.

Es un producto muy utilizado en la degradación de biomembranas ya que cuando entra en contacto con las mismas rompe con facilidad las estructuras formadas por los lípidos.

d) *Reactivos para estimación de GSH (curva de calibración)*

\*Los siguientes reactivos para esta prueba fueron proporcionados por Sigma-Aldrich, almacenados a temperatura ambiente.

- a. T-buffer: PBS + EDTA (sólido incoloro con un grado de pureza del 99.0-101.0%). Este tipo de buffer reduce la posibilidad de degradación de la muestra. En este caso, la presencia de EDTA retrasa la autooxidación de los tioles libres (Bindoli A., 2002).
- b. Reactivo de Ellman: DTNB (sólido fotosensible color anaranjado, con un grado de pureza del 98%) + DMSO (líquido incoloro con un grado de pureza del 99.9%), es un líquido orgánico altamente polar que se utiliza ampliamente como solvente químico.

El reactivo de Ellman (también llamado DTNB), se emplea para cuantificar los grupos sulfhidrilo existentes en una disolución. Este reactivo reacciona con los grupos sulfhidrilo para formar disulfuros mixtos y TNB, cuyo color se puede medir a una longitud de onda de 412 nm con un lector de placas. La reacción se esquematiza en la Figura 27:

Debido a que el tiolato de TNB es el principal responsable de la alta absorbancia a la longitud de onda mencionada, el pH es importante y debe mantenerse por encima de 7.0 (Gromer S., 2002).

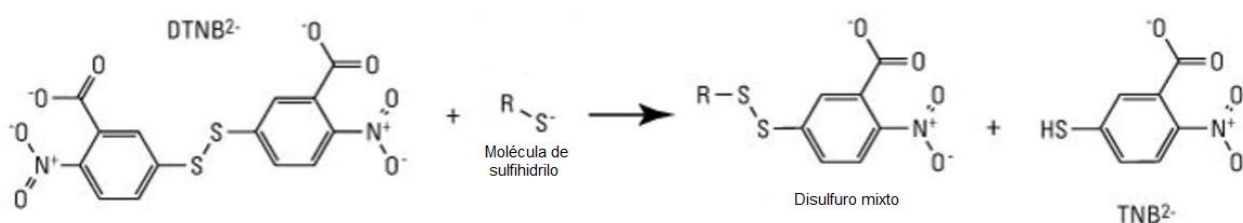


Figura 27. Reacción de formación de color del reactivo de Ellman con grupos sulfhidrilo (Thermofisher)

## 7.2 METODOLOGÍA

En este estudio, los liposomas formados son elaborados a partir de una mezcla de colesterol y fosfatidilcolina, en donde se ha variado la concentración relativa de cada uno con el fin de observar si existe algún cambio físico en la formación de las vesículas.

Inicialmente se llevó a cabo el experimento manejando las siguientes cantidades: 0.277 mg/mL para colesterol y 1.1319 mg/mL para fosfatidilcolina, representando el 100 por ciento de cada lípido.

Las concentraciones experimentales anteriores se obtuvieron a base de trabajos previos realizados en el laboratorio.

Con el fin de conocer las concentraciones óptimas de estabilidad para el desarrollo de liposomas, se realizó un diseño para obtener diferentes ensayos a partir de las cantidades anteriores, variando el porcentaje de concentración de fosfatidilcolina al 100% (1.1319 mg/mL), 50% (0.5712 mg/mL), 40% (0.467 mg/mL) y 30% (0.351 mg/mL).

Y de colesterol al 50% (0.1137 mg/mL), 40% (0.1125 mg/mL) y 30% (0.07875 mg/mL). En la siguiente tabla se muestran las combinaciones realizadas con los porcentajes de los lípidos.

Tabla 4. Variación de porcentajes para ensayos

<i>% FC</i>	<i>% Col</i>
100	50
100	40
100	30
50	50
50	40
50	30
40	50
40	40
40	30
30	50
30	40
30	30

Posteriormente a partir de la medición del tamaño de partícula, se detectó que los ensayos que presentan un tamaño más homogéneo son las mezclas con variación del colesterol al 30, 40 y 50 por ciento, y fosfatidilcolina al 30 por ciento.

Entonces, se realizaron mezclas con base en los porcentajes anteriores, mostrando la variación para los ensayos a continuación:

Tabla 5. Porcentajes óptimos para realizar ensayos de liposomas

<i>% Colesterol</i>	<i>% Fosfatidilcolina</i>
30	30
40	30
50	30

Los sistemas liposomales a analizar, se realizaron con base en las concentraciones porcentuales mostradas en la Tabla 5, centrándose en el estudio de liposomas con porcentajes variables de colesterol.

Los elementos generales del procedimiento para la obtención de liposomas implican la preparación del lípido en forma de película, la hidratación con agitación, y la sonicación para tener un tamaño de partícula homogéneo.

## 7.2.1 PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS Y ENCAPSULAMIENTO DE GSH

### *1. Preparación de la película lipídica*

En una balanza analítica pesar la cantidad necesaria de fosfatidilcolina y de colesterol de acuerdo con la tabla 6 (en la tabla se indica el porcentaje real a partir de la medición de los lípidos, en donde se expresa como porcentaje experimental. Por otro lado, el porcentaje teórico hace referencia al porcentaje que se presenta en el diseño de experimentos).

Tabla 6. Cantidades utilizadas de lípidos para la formación de liposomas

<i>Sistema</i>		<i>FC</i>	<i>Col</i>
1	% teórico	<b>30</b>	<b>30</b>
	% experimental	30	37.5
	mg	29.7	7.5
2	% teórico	<b>30</b>	<b>30</b>
	% experimental	28.2	35
	mg	27.9	7
3	% teórico	<b>30</b>	<b>40</b>
	% experimental	29.2	40
	mg	28.9	8.8
4	% teórico	<b>30</b>	<b>40</b>
	% experimental	28.1	40.5
	mg	27.8	8.9
5	% teórico	<b>30</b>	<b>50</b>
	% experimental	28.6	61.7
	mg	28.3	13.7
6	% teórico	<b>30</b>	<b>50</b>
	% experimental	29.2	55
	mg	28.9	12.2

\*Dónde: % (porcentaje) y mg (miligramos).



Una vez determinados los pesos exactos de cada reactivo, en un termoagitador ajustar la temperatura a 25°C y colocar un vaso de precipitado para solubilizar FC en 10 mL de etanol. Posteriormente, agregar el colesterol (manteniendo la temperatura). Tras la solubilización de ambos lípidos, dejar enfriar la mezcla hasta temperatura ambiente.

En seguida preparar una mezcla al 50% de cloroformo:metanol (10:10 v/v), y añadir a la mezcla de lípidos. Los solventes utilizados deben de ser volátiles, a fin de permitir su eliminación durante la formación de la película.

De acuerdo a Lichtenberg D. (1988) la solubilidad de FC y Col en cloroformo son similares y en consecuencia, después de una solución mixta de ambos lípidos, cuando este solvente se ha secado, la hidratación del residuo produce homogeneidad de liposomas.

Subsiguiente a la preparación de la mezcla de lípidos disueltos, colocar la mezcla final en un matraz de bola para llevarlo al rotavapor heidolph (modelo laborota 4011 digital) y efectuar la evaporación de los disolventes con el fin de formar una película de fosfolípidos. En donde se opera a vacío por 1 hora a 40°C (Diz V., 2019), a una velocidad de 50 rpm (Figura 28).



Figura 28. Sistema de rotavapor (1. Refrigeración, 2. Baño termostático, 3. Sistema al vacío)

## *2. Hidratación de la película*

En esta etapa se lleva a cabo la formación de vesículas multilamelares grandes (denominadas de esta forma debido al método mecánico utilizado), por hidratación de la película de lípidos. De igual manera, esta fase conduce a la obtención de la suspensión liposomal portadora de GSH, refiriéndose a la fase acuosa.

Para la hidratación de la película, la temperatura del medio de hidratación debe ser mayor a  $T_F$ , para que los lípidos se encuentren en estado fluido, de lo contrario, la estructura de los fosfolípidos en la bicapa no presenta las características de rigidez e impermeabilidad necesarias para la encapsulación eficaz del fármaco.

Después de la adición del líquido, la suspensión formada se debe mantener a temperatura mayor a la de transición de fase durante el periodo de hidratación, se recomienda en general un tiempo aproximado de una hora con una fuerte agitación (Ruano., 2012).

Preparar una solución de sacarosa al 10% (con agua destilada), mantenerla en refrigeración. Medir 50 mL de la solución de sacarosa y disolver 1 gramo de glutatión. Debido a la polaridad que presenta el GSH, es que se adiciona en esta etapa, la cual incluye el medio acuoso.

Una vez transcurrido el tiempo de formación de película, llevar a cabo la hidratación, agregando la solución de sacarosa + GSH en el matraz de bola que contiene la película de lípidos. Retornar al rotavapor la mezcla por 1 hora a 50 rpm, manteniendo la temperatura que el baño termostático presenta ( $40^\circ\text{C}$ ), para así conseguir la formación de los liposomas.

En este caso, la sacarosa actúa como agente crioprotector de los liposomas (Clares N., 2003). Harrigan (1990) propuso que el efecto crioprotector de sacáridos resulta de su capacidad para funcionar como una matriz espaciadora entre liposomas, evitando así la fusión. Al agregar sacáridos solo al exterior de los liposomas, la fusión de los liposomas se evita por completo. De la misma forma los sacáridos juegan un papel manteniendo la barrera de permeabilidad de la membrana internamente (Suzuki T., 1996), sugiriendo una interacción entre los grupos -OH en la molécula de sacarosa y el fosfato del lípido mediante la formación de puentes de hidrógeno; como resultado el grupo polar del fosfolípido disminuye su movilidad (Croew J., 1987), evitando fugas a través de las bicapas (Wolkers W. F., 2004).

Los fundamentos teóricos de la transición vítrea de la sacarosa se encuentran en el Anexo I.

## *3. Sonicación de liposomas*

Después de completar la hora para la hidratación de la película, la suspensión de liposomas se debe estabilizar para evitar que el fármaco se fugue a través de las bicapas (Laouini A., 2012). Por lo tanto, transferir la solución a baño maría durante dos horas, a una temperatura de  $40^\circ\text{C}$ .

Posteriormente, sonicar los liposomas por 3 minutos en un baño de ultrasonido Elma (modelo Elmasonic S 30H) (Figura 29).

El objetivo de llevar a cabo este procedimiento es con el fin de que los liposomas no mantengan equilibrio con ninguna otra especie en la disolución, ni se formen agregados, de tal manera que, únicamente se encuentran las vesículas individualmente. Además, las técnicas de reducción de tamaño, como en este caso la sonicación, forman LUVs (Laouini A., 2012), consiguiendo que el tamaño de las vesículas sea homogéneo.



Figura 29. Sonicador (baño de ultrasonido)

## 7.2.2 DETERMINACIÓN DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

Una vez obtenidos los sistemas liposomales portadores de GSH, con objeto de evaluar la homogeneización de los sistemas, se mide el tamaño de partícula obtenido.

Tomar una muestra de 1 mL aproximadamente del sistema liposomal y colocarlo en una celda espectrofotométrica para posteriormente introducirla en el Nanosizer Nano-ZS90 (Figura 30) y obtener una lectura de tamaño de partícula, repetir para cada uno de los 6 sistemas.

El tipo de medida que se llevó a cabo fue automático, con 3 mediciones del equipo por lectura y las lecturas por réplica fueron 2, por lo que se obtuvieron para cada muestra 6 mediciones.



Figura 30. Nanosizer Nano-ZS90

### 7.2.3 EFICIENCIA DE ENCAPSULACIÓN

Las preparaciones de liposomas son una mezcla de fracciones de fármacos encapsulados y no encapsulados. El objetivo de esta técnica es evaluar el efecto del método de preparación y la influencia de la composición lipídica (Hosny K. M., 2009; Laouini A., 2011).

En el presente estudio, a fin de conocer la eficiencia de encapsulación que presentan los LUVs, se determinó el porcentaje de glutatión no encapsulado, utilizando la técnica de ultracentrifugación.

Inicialmente, llevar a cabo un tratamiento para los sistemas liposomales:

1. Tomar 20  $\mu\text{L}$  del sistema liposomal homogéneo y colocarla en un tubo Eppendorf, añadir 1980  $\mu\text{L}$  de solución de sacarosa al 10% para obtener un volumen total de 2 mL (repetir para cada uno de los 6 sistemas).
2. Colocar los 6 tubos Eppendorf en la microcentrifuga (Beckman Coulter Microfuge 22R, (Figura 31) a 4,000 rpm, 4°C por 2 horas.

Una vez finalizado el proceso de ultracentrifugación, preparar las muestras problema para cada sistema liposomal:

1. De la superficie del tubo Eppendorf, tomar 250  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y verter en otro tubo Eppendorf limpio.
2. Agregar 750  $\mu\text{L}$  de PBS en el tubo Eppendorf limpio, para obtener un volumen total de 1 mL (repetir para cada uno de los 6 sistemas).

Posteriormente, preparar la curva de calibración, de acuerdo con la Tabla 7.

La reacción que se sigue en la curva de calibración es la interacción del glutatión con el reactivo de Ellman, llevando a cabo una reducción de DTNB que da como producto TNB (Gromer S., 2002).

Tabla 7. Preparación de curva de calibración

	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	8
<i>Solución patrón <math>\mu\text{L}</math></i>	0	10	20	30	40	50	100	200	250
<i>BRx <math>\mu\text{L}</math></i>	750	750	750	750	750	750	750	750	750
<i>Ac <math>\mu\text{L}</math></i>	250	200	210	220	230	240	0	50	150
<i>mL Totales</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<i>[GSH] <math>\mu\text{M}</math></i>	---	1.66	3.32	4.98	6.64	8.33	16.66	33.22	41.5

\*En donde:

-Solución patrón: solución de GSH al 166.666  $\mu\text{M}$

-Buffer de reacción (BRx): solución de DTNB (12.5 mL) y EDTA (625  $\mu\text{L}$ ) aforado con PBS (25 mL)

-Solución acuosa (Ac): solución de sacarosa al 10%

Finalmente, incubar la curva de calibración y las muestras problema a 37°C por 25 minutos y leer en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 450 nm.

Con el fin de comprobar la eficacia de encapsulación de los sistemas liposomales, se calcula el porcentaje de encapsulamiento de GSH, a partir de la ecuación 5 (Bruglia M.L., 2015).

$$\%EE = \frac{\text{mg de GSH experimental}}{\text{mg de GSH teórico}} \times 100 \quad \text{Ec... (5)}$$

En donde los mg de GSH experimentales se refiere a la cantidad total de fármaco en la suspensión de liposomas y los mg de GSH teóricos hace referencia a la cantidad total de fármaco añadida inicialmente durante la preparación.



Figura 31. Microcentrífuga

#### 7.2.4 DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE HEMÓLISIS

Con el objetivo de investigar la integridad de la membrana de los eritrocitos, el ensayo *in vitro* utilizando eritrocitos humanos permite evaluar la hemocompatibilidad por parte de los liposomas a partir de la cuantificación del porcentaje de hemólisis que las vesículas pueden ejercer sobre estos. En dicho proceso, la hemoglobina liberada es el indicador empleado y es detectada espectrofotométricamente.

Como control positivo de perturbante de membrana, se eligió el detergente no iónico Tritón X-100, que induce la pérdida del contenido intracelular debido a que altera la permeabilidad de las bicapas lipídicas de los eritrocitos.

La prueba de hemólisis se efectúa a partir la siguiente metodología:

1. Obtener 10 mL de sangre en un tubo con heparina.
2. Centrifugar a 3500 rpm por 5 min y remover la espuma presente en la superficie.
3. A la solución restante, lavar con solución salina hasta llegar a un volumen total de 12.5 mL.
4. Centrifugar a 3500 rpm por 5 min.
5. Lavar 3 veces con solución salina hasta llegar a un volumen total de 10 mL y después de cada lavado, centrifugar bajo las mismas condiciones antes mencionadas.
6. Transferir el paquete globular a un tubo de ensayo y agregar solución salina hasta obtener un volumen total de 12.5 mL. Mezclar por inversión, cuidando no formar burbujas.
7. Preparación de muestras:
  - a) Control positivo: colocar 0.5 mL de paquete globular y añadir 50 µL de solución tritón X-100 al 1%
  - b) Control negativo: colocar 0.5 mL de paquete globular y añadir 50 µL de solución salina fisiológica.
  - c) Muestra problema: colocar 0.5 mL de paquete globular y añadir 50 µL de muestra problema de liposomas.
8. Centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos.
9. Separar el sobrenadante del paquete globular.
10. Tomar 100 µL y transferirlos a un tubo de ensayo.
11. Agregar 4.9 mL de solución salina fisiológica para tener un volumen final de 5 mL.
12. Leer en el lector de placas (Thermo scientific Multiskan Go, Figura 32) a 540 nm.

De acuerdo con la ecuación 6.0, calcular el porcentaje de hemólisis.

$$\% \text{ Hemólisis} = \frac{A_t - A_s}{A_c} \times 100 \quad \text{Ec... (6)}$$

Donde:

$A_t$ = Absorbancia del sobrenadante obtenido de la muestra (prueba inyectable).

$A_s$ = Absorbancia del sobrenadante obtenido de la solución salina fisiológica ((-) control negativo).

$A_c$ = Absorbancia del sobrenadante obtenido de la hemoglobina de la lisis completa de las células ((+) control positivo).



Figura 32. Lector de placas

### 7.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En la investigación, se efectuó la síntesis de sistemas liposomales a diferentes concentraciones de fosfatidilcolina y colesterol, para los cuales se realizó un diseño experimental.

Para realizar las combinaciones, se utilizó un diseño factorial 4X3 para un total de 12 experimentos por triplicado. Se usaron cuatro niveles de fosfatidilcolina: 100% (1.1319 mg/mL), 50% (0.5712 mg/mL), 40% (0.467 mg/mL) y 30% (0.351 mg/mL). Y tres niveles de colesterol 50% (0.11375 mg/mL), 40% (0.1125 mg/mL) y 30% (0.07875 mg/mL).



## VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los liposomas se han convertido en una poderosa herramienta utilizada como vehículo de transporte de fármacos. Sus propiedades como capacidad de carga dependen enormemente de sus cualidades morfológicas y composición, de ahí la importancia en efectuar una caracterización de estos (Villanueva A., 2019).

Para evaluar las características estructurales de las vesículas en este trabajo de tesis, se efectuó la caracterización de estas, en donde se realizó un promedio de 3 determinaciones para cada sistema. Finalmente se reportó promedio y desviación estándar de cada prueba (tamaño de partícula, porcentaje de encapsulación y prueba de hemólisis).

### 8.1 REACTIVIDAD ESTRUCTURAL DE MEMBRANAS LIPÍDICAS CONTENIENDO DOMINIOS ENRIQUECIDOS EN COLESTEROL (COMPOSICIÓN DEL LIPOSOMA)

Una de las características más importantes de los liposomas es la fluidez de la bicapa lipídica. De acuerdo con el grado de saturación de los fosfolípidos que constituyen los liposomas, éstos variarán su estado. En este caso, la fosfatidilcolina presenta dos insaturaciones en una de sus cadenas hidrocarbonadas. Teóricamente, cuando los liposomas contienen ácidos grasos insaturados o presentan una TF baja (menor a 37°C), a temperatura corporal adquieren un estado líquido y son menos estables, propensos a la fuga del fármaco (Sharma D., 2018).

La adición de colesterol evita la transición de fase sólida a fluido, alcanzando la transición de fase a mayor temperatura, por lo que elimina más lentamente el fármaco encapsulado. Asimismo, al disminuir la fluidez de la membrana, los liposomas son más estables (Clares N., 2003).

Estudios de resonancia magnética nuclear indican que como consecuencia de la incorporación de colesterol en las bicapas lipídicas de los liposomas, se agrega otra fase en equilibrio, la fase *Lo* (líquido ordenada), presentando un comportamiento como un fluido en dos dimensiones, es decir las moléculas difunden sobre la orientación normal a la bicapa pero al mismo tiempo las cadenas de acilo están estructuradas como en la fase sólida de fosfolípidos puros (Stottrup & Keller, 2006; Mateos D., 2011).

De acuerdo a Bloom T. (1992) y Brown, D. A. (1998) los diagramas de fases de fosfatidilcolina:colesterol, a concentraciones de colesterol en un rango a partir de 30% (a temperaturas menores a 60 °C), el sistema se encuentra en estado *Lo*.

Por lo tanto, debido a las concentraciones de trabajo experimental en esta tesis, los sistemas se encuentran en fase líquido ordenado.

Hay una cantidad creciente de evidencia de que los mecanismos de organización en la bicapa lipídica, son específicos de la estructura del colesterol (Martínez-Seara *et al.* 2010).

Cuando el colesterol se adiciona en la fase *L<sub>d</sub>* (temperatura > TF), el grupo hidroxilo del colesterol forma puentes de hidrógeno con el átomo de oxígeno del carbonilo de la cabeza del fosfolípido (Guyer W., 1983; Berj J., 2008). La distinta forma del colesterol perturba las interacciones regulares entre las cadenas de ácidos grasos (Berj J., 2008), en donde los 4 anillos cíclicos reducen la capacidad de movimiento de las cadenas hidrocarbonadas de los fosfolípidos, induciendo un empaquetamiento más apretado de la membrana (Brandl M., 2001). Así que, se disminuye la permeabilidad (Yatvin M. B., 1982) de la vesícula, característica esencial para mantener encapsulado el fármaco.

Además, existe expansión de la superficie de las moléculas de fosfolípido en presencia de colesterol debido a una reordenación de los grupos cabeza del fosfolípido, que requieren acceso a un área más grande de moléculas de agua para hidratarse completamente (Martínez-Seara *et al.* 2010). En consecuencia, al incrementar la concentración de colesterol, las cadenas de hidrocarburos se enderezan, aumentando el grosor de la bicapa (Demel R. A., 1976).

Por último, el grado de difusión a través de las membranas lipídicas puede variar mucho de unas moléculas a otras. Este parámetro es de gran importancia porque a partir de él, dependerá el grado de encapsulación del fármaco.

En este caso, moléculas como el glutatión, con alta solubilidad en medios acuosos pueden atravesar las paredes de los liposomas de forma eficaz (Sabín J., 2007), teniendo como resultado alta biodisponibilidad del fármaco a la hora de la administración.

El estudio de la permeabilidad de las membranas a distintas sustancias de interés terapéutico es de relevancia para la aplicación de estos sistemas como transportadores de fármacos y para su liberación controlada.

## 8.2 ANÁLISIS DEL TAMAÑO Y DISTRIBUCIÓN POBLACIONAL DE LIPOSOMAS POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LA LUZ

El análisis de seguimiento de nanopartículas es un método comúnmente aplicado para caracterizar las dimensiones de los liposomas. Utiliza las propiedades de la luz, dispersión y movimiento browniano en un medio de fondo (Trucillo P., 2020).

Con el fin de obtener una comprensión más detallada y cuantitativa del efecto de las diferentes cantidades de colesterol integradas en las vesículas, se utilizó DLS para medir el tamaño que los sistemas liposomales presentan.

Para confirmar la homogeneidad en los sistemas liposomales se midió el índice de polidispersidad (PDI). Este indicativo representa una medida de la diferencia del tamaño que suele tener la mayoría de los liposomas analizados en función de su diámetro medio.

El valor máximo para PDI es 1 y, cuanto más se aproxime a cero, más monodispersa es la disolución. Así, un valor elevado (0.8 - 1), es representativo de una muestra heterogénea, mientras que un valor bajo (< 0.2), indicará una elevada homogeneidad de las vesículas en cuanto a sus dimensiones, por lo que su comportamiento es más reproducible en comparación con sistemas heterogéneos (Villasmil-Sánchez., 2010).

Tabla 8. Medias experimentales de tamaño de partícula y PDI

<i>Sistema</i>	<i>PC:Col</i>	<i>Tamaño (nm)</i>	<i>PDI</i>
1	30:30	155.33 ± 5.44	0.576 ± 0.06
2	30:30	180.33 ± 6.60	0.614 ± 0.04
3	30:40	160.00 ± 13.95	0.657 ± 0.03
4	30:40	174.00 ± 11.05	0.562 ± 0.03
5	30:50	129.67 ± 62.63	0.661 ± 0.01
6	30:50	170.67 ± 29.26	0.666 ± 0.03

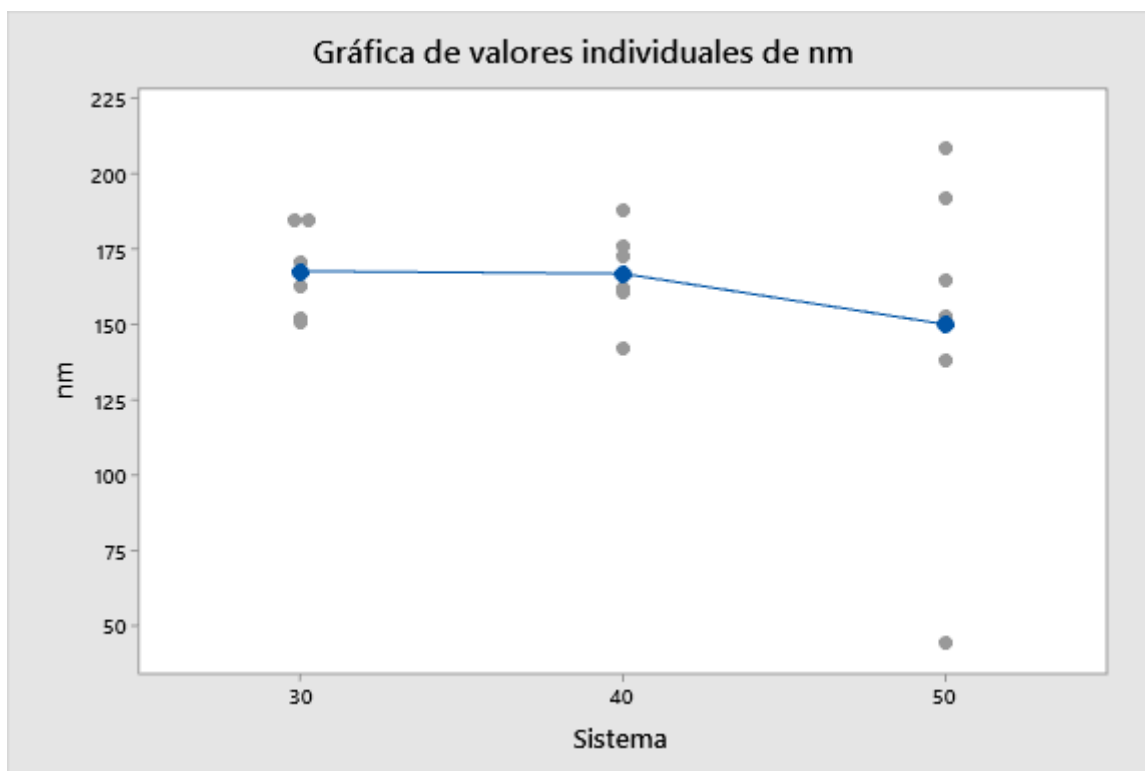


Figura 33. Análisis de la distribución de tamaño por DLS respecto a porcentaje íntegro de colesterol en los sistemas liposomales sonicados. La unión de los puntos resaltantes representa la media de cada sistema

A partir de la Tabla 8 (en donde se incluye la desviación estándar para ambas mediciones) y su representación gráfica en la Figura 33, se estudia la dispersión de datos que existen entre los sistemas liposomales, con el fin de analizar la distribución de tamaños que estos presentan.

Las vesículas que contienen un porcentaje de colesterol del 30% muestran mayoritariamente una población homogénea, presentando un diámetro promedio de 155 nm para el sistema 1 y 180 nm para el sistema 2. La diferencia de tamaño entre ambos sistemas resulta igual a 25 nm.

los sistemas con 40% de Col, mantienen poblaciones homogéneas con diámetros promedio de 160 nm (sistema 3) y 174 nm (sistema 4), la dispersión es menor, mostrando una diferencia de 14 nm.

Finalmente, al aumentar la concentración de colesterol a 50%, el sistema 5 muestra una población con un promedio de diámetro de 129 nm, a diferencia del sistema 6 donde existe una tendencia a la aparición de partículas lipídicas mayores, con un diámetro de 170 nm, exponiendo mayor heterogeneidad entre ambos sistemas, con una diferencia de 41 nm.

La diversidad que presentan los sistemas 1 y 5 de poblaciones con respecto a tamaños menores, puede deberse a que los lípidos no se distribuyeron homogéneamente en las vesículas, produciendo variaciones de composición entre las poblaciones.

Para el sistema 2, que presenta poblaciones con diámetro superior sobre los demás, se considera que esta variación es resultado de alteraciones en su estabilidad química, como fenómenos de agregación vesicular.

De acuerdo con Chen & Rand (1997), la agregación de membranas involucra cambios en la curvatura de la vesícula, en donde las estructuras se proponen como intermediarios durante el proceso, teniendo como consecuencia el aumento de tamaño.

Bozzuto G., (2015) expone que debido a que las vesículas unilamelares grandes encierran un gran núcleo acuoso, representan a las vesículas ideales para la encapsulación de fármacos hidrófilos, las cuales comprenden tamaños en un rango entre 100 y 500 nm.

De esta manera, a partir del análisis anterior, se concluye que se llevó a cabo la formación de LUVs.

Una de las principales propiedades que influye en la estabilidad de los liposomas es el tamaño de partícula. Se considera que, a mayor tamaño, los liposomas son más estables.

De acuerdo con Yamauchi, M. (2007) SUV, al ser vesículas tan pequeñas, la curvatura es mayor, y el empaquetamiento es más suelto. Por lo tanto, liberan los fármacos más fácilmente en comparación con LUVs (Clares N., 2003).

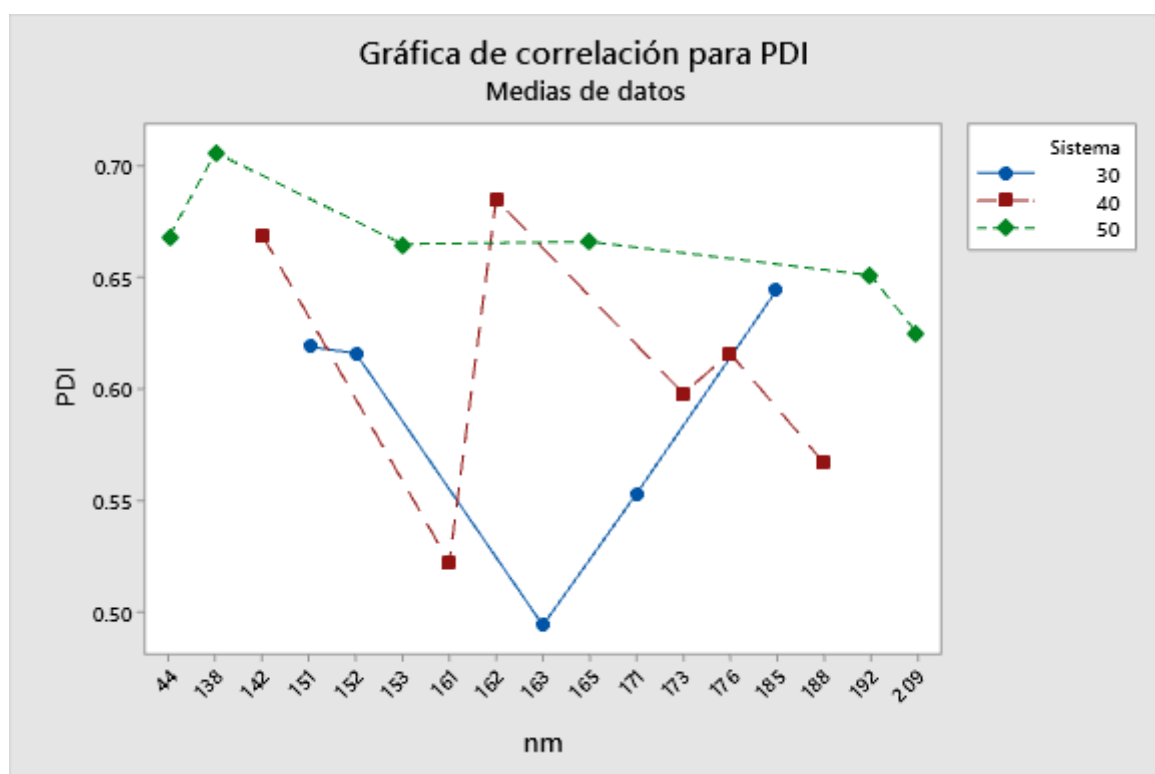


Figura 34. Gráfica de correlación de PDI dependiente de concentración de colesterol

El análisis se completa a partir de la estimación de PDI, que exhibe la variabilidad en cuanto al tamaño nanométrico que los sistemas presentan, esquematizado en la Figura 34.

A concentraciones de colesterol de 30% (sistemas 1 y 2) el valor de PDI es más bajo (próximo a cero), por lo tanto, la solución presenta tendencia monodispersa, indicando mayor homogeneidad en cuanto a las dimensiones de los liposomas.

Con respecto a los sistemas 3 y 4 con concentraciones de 40% de colesterol, la población presenta valores medios de PDI con menor uniformidad. A diferencia de los sistemas 5 y 6, con concentraciones de colesterol al 50%, mantienen un valor de PDI más alto, mostrando mayor variabilidad.

No obstante, de acuerdo con Villasmil Sánchez (2010) quien enuncia los parámetros para indicar la heterogeneidad en una población, ningún valor de PDI entra en el rango para establecer la muestra como heterodispersa.

En consecuencia, a que el valor de PDI no se mantuvo al mínimo en todos los sistemas, es necesario un tiempo de sonicación en baño mayor para controlar la distribución de tamaños.

A continuación, se presentarán los diagramas utilizados para determinar la magnitud e importancia de las variables sobre la estabilidad de los sistemas liposomales, refiriéndonos a la fosfatidilcolina y el colesterol.

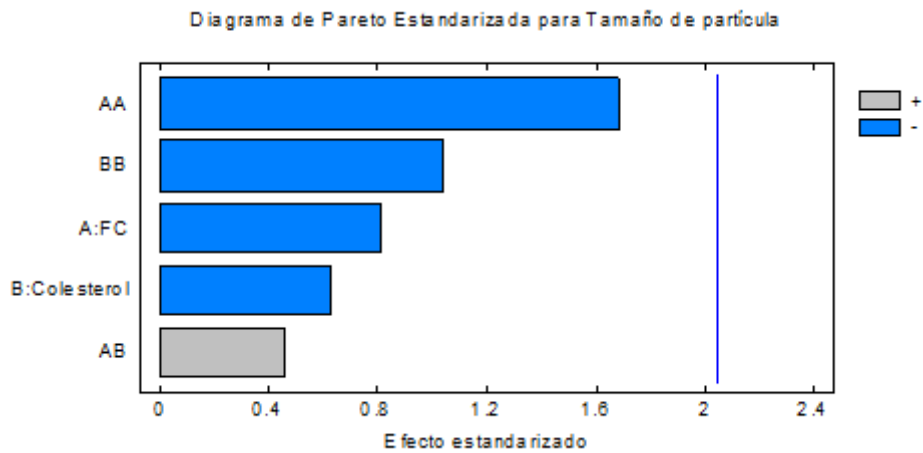


Figura 35. Diagrama de Pareto estandarizado para medición de tamaño de partícula a un nivel de confianza del 95%

En donde:

AA: fosfatidilcolina-fosfatidilcolina; BB: colesterol-colesterol; A: fosfatidilcolina; B: colesterol; AB: fosfatidilcolina-colesterol

En el diagrama de Pareto, se grafica una línea de referencia que indica cuáles efectos son estadísticamente significativos (representando el nivel de significancia).

En cuanto al tamaño de partícula, de acuerdo con la Figura 35, ninguna variable afecta de forma significativa en el nivel de 0.05, siendo la fosfatidilcolina como efecto cuadrático, la variable principal que podría representar mayor significancia. Posteriormente, el colesterol como efecto cuadrático y finalmente la fosfatidilcolina y el colesterol como efecto principal, son las variables que más afectan.

Por lo tanto, si todas estas variables aumentan, el tamaño de partícula disminuiría.

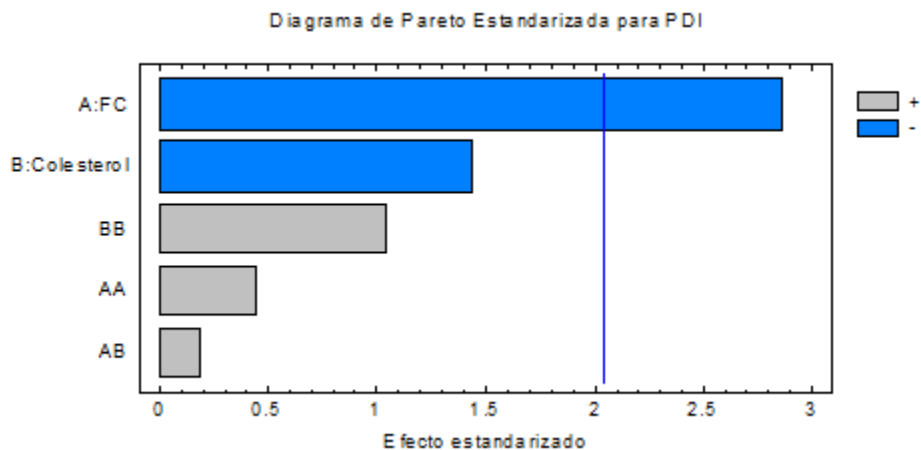


Figura 36. Diagrama de Pareto estandarizado para medición de índice de polidispersidad a un nivel de confianza del 95%

En donde:

AA: fosfatidilcolina-fosfatidilcolina; BB: colesterol-colesterol; A: fosfatidilcolina; B: colesterol; AB: fosfatidilcolina-colesterol

De la misma manera, en la Figura 36 de acuerdo con la línea de nivel de significancia, la variable que más afecta es la fosfatidilcolina, la cual se presenta como la única significativa al 95% de confianza ( $\alpha=0.05$ ).

El colesterol por otra parte, no se presenta como un parámetro significativo, sin embargo, es el segundo en importancia.

De acuerdo con la tendencia que presentan, se destaca que si la concentración de ambos (individualmente) aumenta, el índice de polidispersidad disminuye.

La aplicación terapéutica de los liposomas está condicionada por su tamaño promedio y distribución de tamaño (Villanueva A., 2019), especialmente cuando los liposomas son destinados para su uso terapéutico por ruta parenteral (Laouini A., 2012).

Dominar este parámetro es importante, debido a que, si en una muestra los tamaños de las vesículas son heterogéneos, al ingresar en el organismo, su eliminación es irregular. Por lo tanto, muestras con tamaños homogéneos da lugar a procesos de eliminación monofásicos (Clares N., 2003), consiguiendo un índice terapéutico mayor.

### 8.3 ANÁLISIS DE OPTIMIZACIÓN PARA MÚLTIPLES RESPUESTAS

Con el fin de evaluar el impacto del tamaño de partícula e índice de polidispersidad sobre la estabilidad de los sistemas liposomales, se realizó un análisis de optimización para múltiples respuestas. En donde, el objetivo es identificar la significancia de las variables que, en combinación optimicen una respuesta.

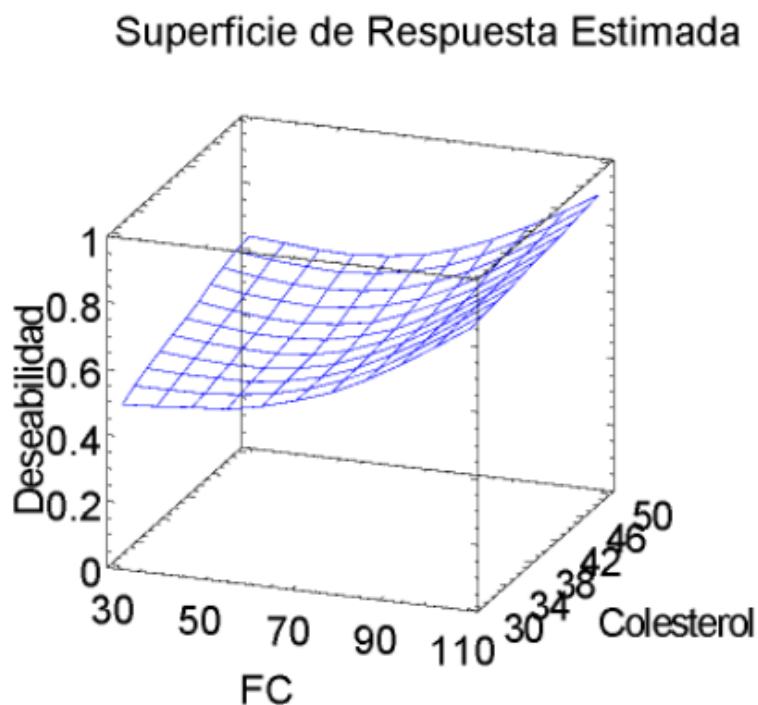


Figura 37. Diagrama de superficie de respuesta estimada

De acuerdo con la Figura 37, a niveles altos tanto de FC como de colesterol, existe el mayor grado de deseabilidad.

La deseabilidad es una función que proporciona el programa estadístico (en este caso Statgraphics), para evaluar múltiples respuestas al mismo tiempo y generar experimentos con propiedades estadísticas óptimas deseables.

Un experimento óptimo se diseña para responder a algún criterio de idealidad que se establece (Rudnykh S., 2018), estimando qué tan bien una combinación de variables satisface las metas que se definieron para las respuestas.

En esta opción, el nivel de respuesta se puede igualar a un valor determinado, ya sea mínimo, óptimo o máximo.

En específico para este trabajo de tesis, se requiere que el tamaño de partícula y, por consiguiente, el índice de polidispersidad se encuentren en el nivel mínimo. De esta manera, se optimiza la respuesta del tamaño liposomal lo más estrecho posible, con el fin de que estos logren estar en circulación el mayor tiempo y así conseguir un mayor grado de índice terapéutico por parte del glutatión.

Al tener un tamaño de partícula homogéneo y reducir el valor de PDI al mínimo, nos cercioramos de que no existan agregados de liposomas, aumentando la estabilidad de estos.



De acuerdo con el programa, se obtuvieron las siguientes tablas.

Tabla 9. Nivel de Factor

<i>Factor</i>	<i>Bajo</i>	<i>Alto</i>	<i>Óptimo</i>
FC	30.0	100.0	100.0
Colesterol	30.0	50.0	50.0

Tabla 10. Valor óptimo de la respuesta

<i>Respuesta</i>	<i>Óptimo</i>
PDI	0.49142
Tamaño de partícula (nm)	113.792

Tanto en la Tabla 9 como 10, se muestra la combinación de niveles de factores que maximizan la función de deseabilidad en la región indicada. Así como también exhiben la combinación de factores a la cual se alcanza el nivel óptimo.

En donde se presenta que el mejor sistema está compuesto por 100 por ciento de FC y 50 por ciento de colesterol.

#### 8.4 ANÁLISIS DE PODER DE EFICIENCIA DE ENCAPSULAMIENTO DE GSH

La encapsulación de una suficiente cantidad de fármaco es una de las propiedades deseables para el uso de los liposomas. Alcanzar tal objetivo sólo es posible si se mejora la estabilidad de retención de estas nanoestructuras (Yadav A. V., 2011)

Los factores que afectan en la eficacia de encapsulación provienen tanto de las propiedades del liposoma como de las del fármaco. Con respecto al fármaco, el carácter hidrofílico o hidrofóbico del mismo, o con base en la vesícula, el tamaño del volumen acuoso, el tamaño en general que componen las paredes lipídicas, así como el método de preparación (Villasmil-Sánchez *et al*, 2010), de tal forma que se plantea la posibilidad de que siempre existirá una parte del fármaco no incorporada en las vesículas lipídicas.

La estimación de GSH se basó en la relación proporcional que existe entre la concentración y la señal analítica dada por el espectrofotómetro, en donde los valores de absorbancia permiten calcular las concentraciones de glutatión no encapsulado. Dicha relación se presenta en la Figura 38.

El tratamiento que se llevó a cabo fue la regresión lineal mediante el ajuste por mínimos cuadrados, para obtener la ecuación de la recta que relaciona ambas variables. El propósito de esta prueba es demostrar que todo el sistema exhibe una respuesta lineal y que es directamente proporcional a un intervalo de concentración del analito objeto de estudio.

Se trabajó con una solución estándar de GSH donde el 100% corresponde a una concentración de 166.666  $\mu\text{M}$ . La linealidad se evaluó a partir del 10% (1.666  $\mu\text{M}$ ) al 250% (41.666  $\mu\text{M}$ ) de la concentración de la solución.

En la Figura 38 se esquematiza la gráfica de dispersión, a simple vista muestra una tendencia recta de los datos (a excepción de los valores 2 y 3 que, presentaron un valor de absorbancia un poco mayor en comparación con los demás), sin embargo, este comportamiento se confirma a partir del cálculo del coeficiente de determinación ( $R^2= 0.996$ ). Este valor simboliza un índice de dispersión muy bajo que a su vez, exhibe la fuerza de relación que las variables presentan.

A partir de los datos se puede afirmar que el método es lineal para el intervalo de concentraciones estudiado, de manera que nos proporcionará resultados fiables.

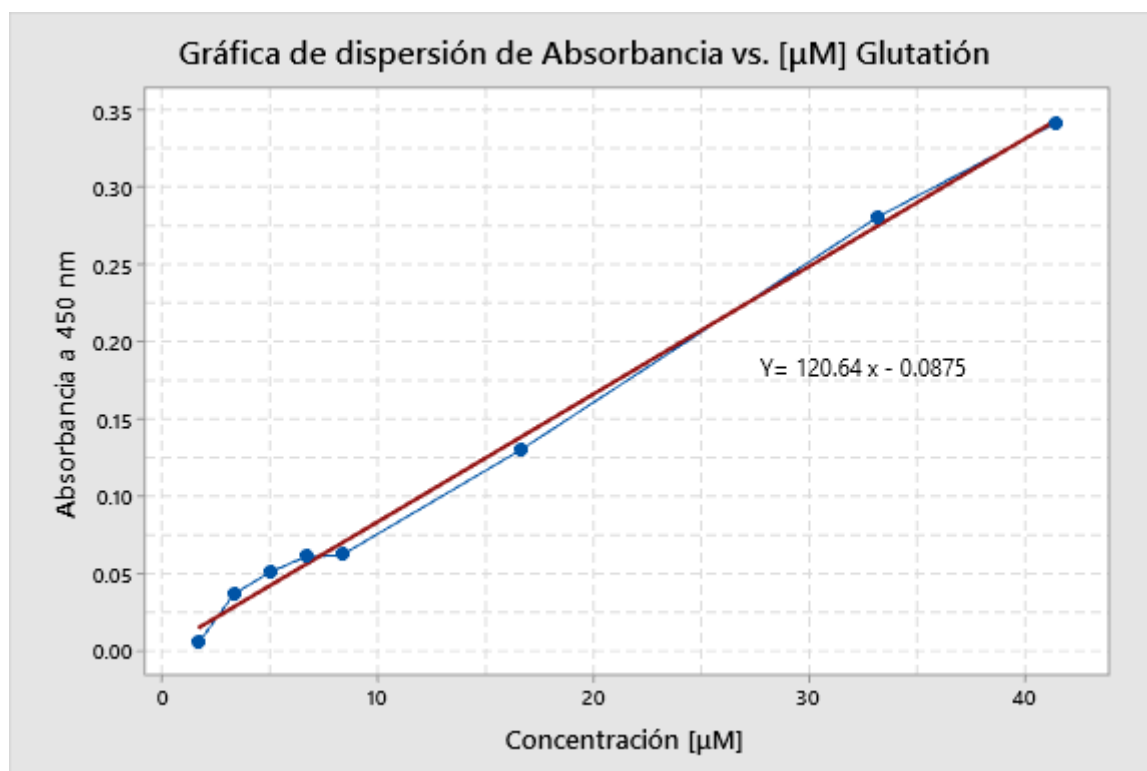


Figura 38. Representación gráfica de la curva de calibración de Glutación

En la Tabla 11 se muestra la concentración de GSH teórico, refiriéndose a la concentración inicial que se incorporó al momento de la formación de las vesículas multilamelares. La concentración experimental, hace referencia a la concentración medida al final del tratamiento, calculada a partir de la ecuación de la recta (las mediciones se realizaron por triplicado para cada sistema).

Posteriormente incluyendo los efectos de dilución y la ecuación 5.0, se calculó la eficacia de captación para cada uno de los sistemas.

La eficiencia de encapsulación (EE) es el porcentaje de compuesto activo que está atrapado en volúmenes internos de los liposomas. Su complemento al 100% representa un compuesto no atrapado, que se pierde en la masa externa liposomal acuosa. Esta cantidad de fármaco no participa en la administración terapéutica; por esta razón, es necesario atrapar la mayor cantidad de fármaco posible para reducir la pérdida del principio activo (Trucillo P., 2020).

Tabla 11. Evaluación del grado de encapsulación de liposomas

<i>Sistema</i>	<i>Proporción PC:Col</i>	<i>[GSH] <math>\mu</math>M inicial</i>	<i>[GSH] <math>\mu</math>M Experimental</i>	<i>% Encapsulación</i>
1	30:30	6859	0.403	99.511 $\pm$ 0.678
2	30:30	7404	0.546	99.987 $\pm$ 0.005
3	30:40	7347	0.689	99.987 $\pm$ 0.005
4	30:40	7816	0.696	99.987 $\pm$ 0.005
5	30:50	7358	1.014	99.970 $\pm$ 0.022
6	30:50	7026	0.640	99.987 $\pm$ 0.005

En la Tabla 11 se incluyen las medias de las 3 determinaciones efectuadas para cada uno de los seis sistemas liposomales, en particular se introduce las desviaciones estándar del porcentaje de encapsulación. El objeto de este análisis es comprobar la difusión de los valores entre cada uno de los sistemas.

En general, la desviación estándar resultante del porcentaje de encapsulación para cada sistema muestra una dispersión muy baja.

Cuando el colesterol se encuentra al 30%, la diferencia en el porcentaje de encapsulación entre el sistema 1 y 2 es de 0.476, por lo tanto, existe una pérdida porcentual de encapsulación del 0.489 y 0.013 respectivamente.

Para los sistemas 3 y 4 que presentan una incorporación de colesterol al 40%, la dispersión es casi nula y el rendimiento resultó muy elevado, lo que confiere que estos sistemas son los que encapsularon mayor cantidad de fármaco.

Finalmente, cuando la concentración de colesterol es del 50%, existe una diferencia mínima entre las medias porcentuales de 0.017 para los sistemas 5 y 6, señalando una pérdida de encapsulación del 0.03 y 0.013 respectivamente.

Para comprender el dominio que desempeñan LUVs a fin de incorporar GSH, se estudiará la influencia ejercida por los lípidos seleccionados. La cantidad de soluto encapsulado depende del volumen de atrapamiento del liposoma y de la concentración lipídica.

De acuerdo con la concentración de FC y Col, en comparación con la concentración de GSH empleada y encapsulada, se observa que, a partir de una concentración baja de lípidos, se obtiene una alta concentración de encapsulamiento. Por lo tanto, la ventaja más útil de LUVs es que se requiere menos porción de lípidos para encapsular una gran cantidad de fármaco (Sharma D., 2018).

La elevada capacidad de incorporación de glutatión por parte de LUVs, es debido al mayúsculo núcleo acuoso que presentan, ya que pueden contener un gran volumen de solución en su cavidad. Posicionando a estos liposomas como ideales para la encapsulación de fármacos hidrofílicos (Bozzuto G., 2015).

De modo que como se mencionó anteriormente, la presencia de ácidos grasos insaturados de la fosfatidilcolina, ayuda a la óptima integración del colesterol en las paredes lipídicas. En donde los voluminosos anillos de esterano del colesterol permiten a la molécula modular la rigidez de la membrana (Ijeoma F., 2013). De esta forma el colesterol mejora la función de barrera de permeabilidad de la bicapa, desempeñando un papel en la eficacia de encapsulación de fármacos, maximizando la admisión del principio activo y evitando su salida.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este estudio pusieron de manifiesto que el rango elegido para incorporar colesterol (de 30 a 50 por ciento) en las vesículas de fosfatidilcolina da como resultado altos niveles de encapsulación. Este alto porcentaje de eficiencia de encapsulación se debe a la alta solubilidad del fármaco en la fase hidrófila.

Por lo tanto, se demuestra cómo el método de película utilizado para preparar los liposomas cargados produce interacciones entre la cabeza polar del fosfolípido (Briuglia M. L, 2015) y las moléculas de GSH, obteniendo un excelente nivel de encapsulamiento.

## 8.5 PRUEBA DE HEMÓLISIS

Es muy frecuente, que los fármacos interaccionen con las células presentes en la sangre, ello condiciona en gran medida sus efectos farmacológicos, pero como medida principal, no debe dañar a las células (Velázquez, 2008).

Posterior a los estudios estructurales de las vesículas lipídicas, finalmente se evaluó la hemocompatibilidad de los liposomas cargados con GSH sobre eritrocitos humanos, aislados de una muestra de sangre de un donante sano. El potencial hemolítico de un material refleja la fragilidad de la membrana de los eritrocitos y su posterior liberación de hemoglobina, cuando entra en contacto con un biomaterial.

De la misma manera como en las pruebas anteriores, se realizaron tres evaluaciones para cada sistema liposomal, en total se tienen seis muestras para cada concentración de colesterol (introducidos en la Tabla 12), con el fin de confirmar la integridad de las vesículas unilamelares grandes.

Tabla 12. Evaluación de ensayos de estabilidad estructural a partir de valoración de hemólisis

<i>Sistema</i>	<i>PC:Col</i>	<i>Absorbancia</i>	<i>% Hemólisis</i>
1	30:30	0.05	1.02 ± 3.44
2	30:30	0.05	-0.38 ± 1.09
3	30:40	0.14	32.63 ± 28.34
4	30:40	0.04	-2.94 ± 0.48
5	30:50	0.05	-1.41 ± 0.48
6	30:50	0.12	28.02 ± 3.56

\*Los valores negativos son igual a 0

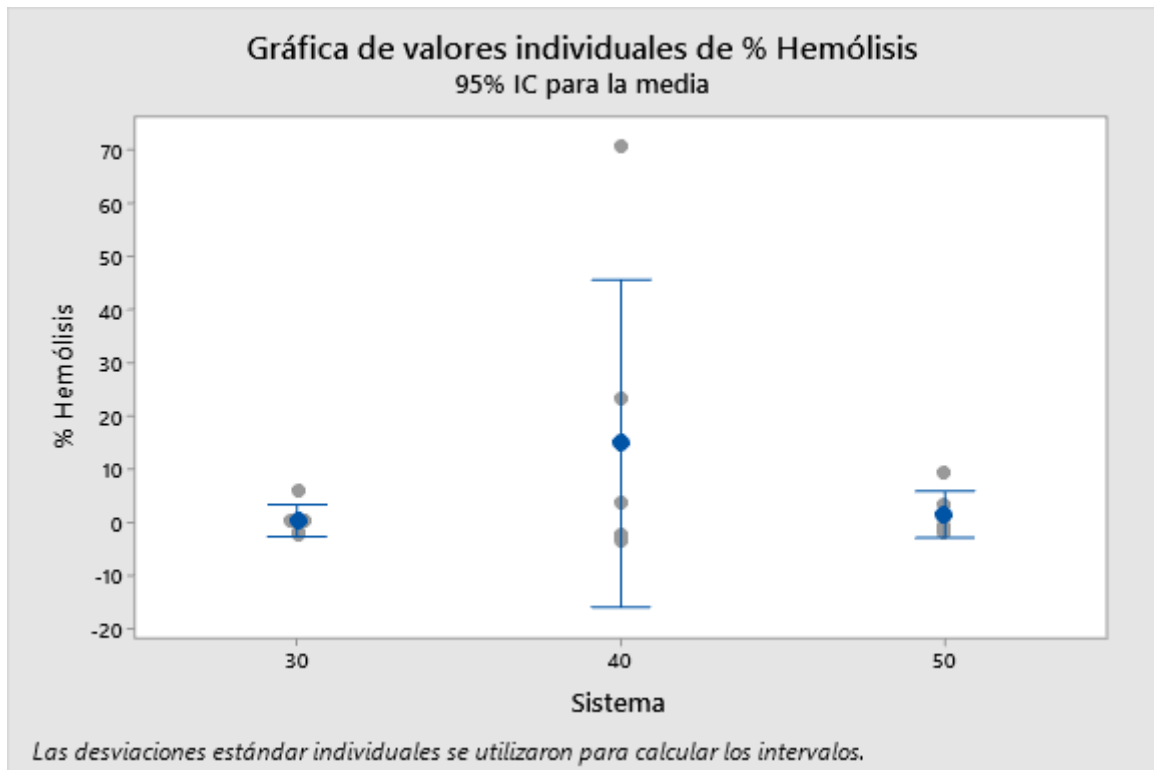


Figura 39. Análisis porcentaje de hemólisis para los sistemas vesiculares (30%, 40% y 50% de colesterol). Las barras corresponden al intervalo de confianza y el punto resaltante en azul representa la media de cada sistema

Como se muestra en la Figura 39, la gráfica exhibe que para la mayoría de los sistemas (1, 2, 4, 5), presenta una tendencia muy cercana o igual (para los sistemas con valores negativos) a cero, siendo la hemólisis obtenida menor al 1%, en donde se mantiene la presión osmótica deseada.

Por lo tanto, no ocurre lisis en los eritrocitos humanos, de esta manera no se presentan alteraciones morfológicas y mantiene su estructura de disco bicóncavo (Jiménez J., 2019). Los liposomas han sido considerados tradicionalmente como biocompatibles al diseñarse a partir de fosfolípidos que conforman las membranas biológicas.

En cuanto a los sistemas 3 y 6, presentan un porcentaje de hemólisis del 32 y 28 respectivamente, lo que significa que existió liberación de hemoglobina de los eritrocitos mediante la ruptura de la membrana.

La actividad hemolítica se refleja como un aumento en el valor de la absorbancia, es decir, aumento en el contenido de hemoglobina (Ahyayauch H., 2010), la hemólisis aumenta la absorción y causa un incremento de la concentración medida (Thomas L., 2002).

Cambios en la presión osmótica pueden causar alteración a la membrana. Por lo tanto, mantener la estructura del eritrocito es de fundamental importancia (Ensinck M., 2013).

Realizando un análisis de las cantidades que integra a cada sistema liposomal, el sistema 3 contiene una mayor proporción de fosfatidilcolina en la matriz lipídica, en comparación con el sistema 4, ambos sistemas representan el 40% de colesterol. La misma situación se presenta entre los sistemas 5 y 6 (50% Col), en donde el sistema 6 contiene mayor cantidad de FC. Con base en esta observación, el aumento de la concentración de fosfatidilcolina induce un incremento de la permeabilidad de la membrana y un movimiento de iones, ocasionando que la membrana explote, permitiendo de este modo la salida de la hemoglobina (Bruneton., 2001).

Como consecuencia, la perturbación de cantidades que comprenden la integridad liposomal, favorecen un comportamiento hemolítico.

La estabilidad de los eritrocitos frente a los liposomas representa implicaciones importantes en vista del uso potencial de estos como portadores de fármacos, ya que no deben presentar ninguna clase de lisis una vez administrados en el torrente sanguíneo.

De esta manera, una vez más se comprueba el importante papel que la incorporación del colesterol en las bicapas implica, produciendo una estabilización a tal grado de mantener íntegra la membrana (Urbaneja M. A., 1988), sin reacciones adversas frente a eritrocitos.

## IX. CONCLUSIONES

En el trabajo realizado para esta tesis se llevó a cabo el desarrollo de nuevos sistemas de liberación de fármacos denominados liposomas para la administración parenteral del antioxidante glutatión.

El objetivo principal fue estudiar las combinaciones de lípidos, esencialmente mezclas de fosfatidilcolina y colesterol para la formulación de liposomas con un perfil de estabilidad adecuado. Este propósito se alcanzó a partir de la estandarización de técnicas específicas, como medición de glutatión encapsulado y tamaño de partícula, así como el cálculo de porcentaje de hemólisis.

1. Se produjeron MLV que posteriormente se estandarizaron a partir de la disminución de su tamaño tras la sonicación en baño de ultrasonido. El resultado fue LUVs de diámetro entre 155 y 180 nm.
2. La medición de la eficacia de encapsulación de glutatión por parte de los liposomas dio como resultado un porcentaje promedio de 99% en los sistemas.
3. El porcentaje de hemólisis de los liposomas al estar en contacto con eritrocitos humanos, en general, fue igual a cero, demostrando una alta biocompatibilidad.
4. La incorporación de colesterol en la matriz lipídica, al introducir la fase líquido ordenada en la vesícula, aumenta la rigidez, intensificando la impermeabilidad de la bicapa. Además, incrementa la retención de fármacos a partir de un mayor grado de encapsulación.

En general, se agrega colesterol para aumentar la estabilidad en los sistemas liposomales, concluyendo que, de acuerdo con el análisis experimental realizado, el sistema liposomal más estable es el que contiene 30% de colesterol, debido a que mantuvo una menor dispersión de tamaño, un nivel de encapsulación de 99% y no presentó hemólisis frente a los eritrocitos humanos.

Las principales ventajas de la aplicación de liposomas es la protección de los compuestos activos frente a la degradación, el aumento del tiempo de circulación y la posibilidad de lograr una selectividad parcial o total. La selectividad mejora el índice terapéutico del fármaco, elimina los efectos secundarios.

Debido a estas razones el estudio de esta clase de tecnologías es de suma importancia en el desarrollo de nuevas formas farmacéuticas.



## X. ANEXOS

### 10.1 FORMACIÓN DE TRANSICIÓN VÍTREA (GLASS TRANSITION) A PARTIR DE LA ADICIÓN DE SACÁRIDOS

La transición vítrea ( $T_g$ ) es el paso de un estado termodinámico metaestable, caracterizado por una alta agregación y orden molecular, a otro estado termodinámico conocido como estado gomoso, donde existe mayor movilidad de las moléculas y por ende menor estabilidad. Conocer la temperatura a la cual sucede el cambio del estado vítreo al estado desordenado supone una información muy importante a la hora de predecir y controlar las condiciones de almacenamiento, con miras a preservar sus características y propiedades sensoriales y alargar su vida útil (Gutiérrez L. F., 2014).

Los factores más importantes que determinan la temperatura de transición vítrea en una solución azucarada corresponden a la flexibilidad de las cadenas orgánicas, a su peso molecular y a las posibles interacciones existentes entre ellas. La  $T_g$  disminuye si la cadena polimérica se mueve más fácil, como en el caso de la glucosa y la fructosa.

La  $T_g$  de los monosacáridos tales como glucosa, es generalmente demasiado baja para estabilizar los liposomas en estado seco, mientras que los oligo- y polisacáridos son capaz de formar un estado vítreo estable, pero, debido a su gran tamaño, no pueden interactuar con los grupos de cabeza de los lípidos (Wolkers W. F., 2004).

Los disacáridos son lo suficientemente pequeños como para poder interactuar con vesículas y tienen una  $T_g$  suficientemente alta. Por tanto, un buen estabilizador para los liposomas debe tener un  $T_g$  suficientemente alto y proporcionan una buena interacción con la bicapa lipídica.

Los liposomas de PC, por ejemplo, no se pueden estabilizar con glucosa o hidroxilo almidón de etileno (HES) solo, pero la estabilización se puede lograr usando una combinación de los dos. En este caso, la interacción es proporcionada por la glucosa, mientras que HES, que no puede interactuar con la bicapa lipídica debido a su gran tamaño, proporciona una  $T_g$  suficientemente alta.

De acuerdo con Gutiérrez L. F., (2014), la sacarosa aumenta la  $T_g$  en las disoluciones, presentando un valor igual a 67 °C, nivel adecuado para estabilizar las soluciones liposomales.

## 10.2 CONCENTRACIÓN DE GSH ( $\mu\text{M}$ ) EN CURVA DE CALIBRACIÓN

Para la preparación de la curva de calibración, como se muestra en la Figura 38., a concentraciones con valores aproximados en el rango de 3 a 7  $\mu\text{M}$  (en este caso, los puntos 2, 3 y 4), no presentan una tendencia alta a la linealidad.

Debido a esta situación, se añadieron los puntos 6, 7 y 8 (disminuyendo la dilución del sistema y por lo tanto aumentando la concentración), a partir de este cambio, se observa mayor linealidad.

Para conocer la concentración real de los puntos 1 a 8 de la curva de calibración, se tomó en cuenta las diluciones realizadas. Por ejemplo, para el punto 1:

$$\frac{(166.666 \mu\text{M GSH})(10 \mu\text{L})}{(1000 \mu\text{L})} = 1.66 \mu\text{M GSH}$$

Realizando este cálculo para cada punto, se obtienen las concentraciones que se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Concentración de GSH a partir de la recta de la curva

<i>Puntos</i>	<i>Absorbancia</i>	<i>GSH (<math>\mu\text{M}</math>)</i>
1	0.005	1.66
2	0.037	3.32
3	0.051	4.98
4	0.061	6.64
5	0.062	8.3
6	0.13	16.6
7	0.281	33.2
8	0.342	41.5

Con base en la Tabla 13, se realiza la grafica de la Figura 38.

### 10.3 CÁLCULO PARA OBTENER CONCENTRACIÓN EXPERIMENTAL DE GSH

De acuerdo con el valor de absorbancia obtenido para cada sistema (muestra problema), se calcula la concentración experimental de GSH. Por ejemplo, para el sistema 1:

Absorbancia: 0.032

Ecuación de la recta:  $y = 120.64x - 0.0875$

Despejando x:

$$x = 9.90 \times 10^{-4} \mu M \text{ GSH}$$

Considerando las diluciones realizadas en el sistema, se calcula la concentración:

$$\frac{(9.90 \times 10^{-4} \mu M \text{ GSH})(1000 \mu L)}{(250 \mu L)} = \frac{3.96 \times 10^{-3} \mu M \text{ GSH} (2000 \mu L)}{(20 \mu L)} = 0.396 \mu M \text{ GSH}$$

Realizando un promedio de las 3 mediciones realizadas, se obtiene una concentración promedio de 0.403  $\mu M$  GSH.

Este procedimiento se repite para los 6 sistemas liposomales, presentándose en la Tabla 11.

## XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1,2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine (2021). Sitio web: [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1\\_2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine#section=2D-Structure](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_2-Diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine#section=2D-Structure)
- Aguayo, G. (2011). *Nanotecnología y Nanoquímica*. Sevilla Técnica., 36, pp.29-32
- Ahmed, S. N.; Brown, D. A. & London, E. (1997) *On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: Physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquidordered lipid phase in model membranes*. *Biochemistry.*, 36, pp.10944-10953
- Ahyayauch, H.; Bennouna, M. & Goñi, F. M. (2010) *Detergent effects on membranes at subsolubilizing concentrations: transmembrane lipid motion, bilayer permeabilization, and vesicle lysis/reassembly are independent phenomena*. *Langmuir.*, 26, pp.7307–7313
- Akbarzadeh *et al.* (2013) *Liposome: classification, preparation, and applications*. *Nanoscale Research Letters.*, 8(102), pp.3-8
- Alcalá-Alcalá. (2014) *La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos*. *Mundo Nano.*, 7, pp.7-10
- Arévalo L. (2017) *Modificación superficial de liposomas mediante un polímero catiónico bioadherente para la vehiculización de ampicilina*. Febrero 7, 2021, de Universidad ICESI. Sitio web: [https://repository.icesi.edu.co/biblioteca\\_digital/bitstream/10906/83510/1/T01258.pdf](https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/83510/1/T01258.pdf)
- Arifin, R. & Palmer, F. (2005) *Physical Properties and Stability Mechanisms of Poly(Ethylene Glycol) Conjugated Liposome Encapsulated Hemoglobin Dispersions, Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*. Taylor & Francis., 33(2), pp.137-16
- Ball, E. (1995) *Liposomas en dermatología*. *Dermatología Venezolana.*, 33, pp.15-23
- Barenholtz, Y. & Amselem, D. L. (1979) *A new method for preparation of phospholipid vesicles (liposomes)—french press*. *FEBS Letters.*, 99(1), pp.210–214
- Berg J. (2008). *Bioquímica*. España: Editorial Reverté.
- Bindoli, Alberto. (2002) *Mitochondrial Thioredoxin Reductase and Thiol Status*. [Methods in Enzymology] *Protein Sensors and Reactive Oxygen Species - Part A: Selenoproteins and Thioredoxin.*, 347, pp.307–316.
- Bloom, T. (1992) *Phosphatidylcholine: cholesterol phase diagrams*. *Biophys. J.*, 63, pp.1176-1181
- Boenny, S. (2019) *Síntese e caracterização de lipossomas termossensíveis com potencial para atuar como drug delivery systems*. Julio 28, 2020, de Universidad Federal de Río Grande Do Sul. Sitio web: <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/197879/001098747.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bonola, G. (2014) *Estrés oxidante: el sistema enzimático glutatión y la salud bucal*. *Revista de ciencias clínicas.*, 15(1), pp.2-8
- Botella, C. (2015) *Administración parenteral de medicamentos: conceptos generales*. Mayo 27, 2020, de La Laguna-Mercedes. Servicio Canario de la Salud. Sitio web: <http://www.fisterra.com/material/tecnicas/parenteral/admonparent1.pdf>
- Bozzuto, G. & Molinari, A. (2015) *Liposomes as nanomedical devices*. *Int J Nanomedicine.*, 10, pp.975–999

18. Brandl, M. (2001) *Liposomes as drug carriers: a technological approach*. Biotechnology Annual Review., 7, pp.59–85
19. Briuglia, M. L.; Rotella, C.; McFarlane, A. & Lamprou, D. A. (2015) *Influence of cholesterol on liposomes stability and on in vitro drug release*. Drug Deliv Transl Res., 5(3), pp. 231-242
20. Brown, D. A. & London, E. (1998) *Structure and origin of ordered lipid domains in biological membranes*. J. Membrane Biol. 164, pp.103-114
21. Bruneton, J. (2001) *Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinales*. España: Editorial Acribia, S.A.
22. Caballero, V.; Castillo, J.; Ranaudo, M. & Gutiérrez, H. (2013) *Estudio de la cinética de agregación de asfaltenos de crudos furrrial y cerro negro mediante dispersión de luz*. Revista de la Facultad de Ingeniería UCV (online)., 28(3), pp.47-53
23. Camacho, V. (2016) *Preparación de nanotransportadores liposomales, basado en el uso de tensoactivos para el transporte del antibiótico  $\beta$ -lactámico cefepima*. Enero 14, 2020, de Universidad de Sevilla. Sitio web: <https://idus.us.es/bitstream/handle/11441/65108/CAMACHO%20SANCHEZ,%20VANESA.pdf?sequence=1>
24. Carrero, I. (2014). *El mundo de los lípidos*. Julio 26, 2020, de Universidad de Valladolid. Sitio web: <http://biomodel.uah.es/model2/lip/fluidez.htm>
25. Chen, Z. & Rand, R. P. (1997) *The influence of cholesterol on phospholipid membrane curvature and bending elasticity*. Biophysical journal., 73(1), pp.267–276
26. Clares, N. (2003) *Sistema de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona*. Junio 2, 2020, de Universidad de Granada. Sitio web: <https://hera.ugr.es/tesisugr/17722238.pdf>
27. Cisneros-Prego, E. (1995) *La glutatión reductasa y su importancia biomédica*. Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas, 14(1), pp.1-4
28. Crowe, J. H; Carpenter, J. F. & Aurell-Wistrom, C. (1987) *Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars*. Biochem. J., 242, pp.1-10
29. Cuadros-Moreno, A.; Pimentel, R. C.; Martínez, E. S. M. & Fernández, J. Y. (2014) *Dispersión de luz dinámica en la determinación del tamaño de nanopartículas poliméricas*. Latin-American Journal of Physics Education., 8(4), p.14
30. Cuerda-Correa. (2005) *Obtención de liposomas a partir de arqueas halófilas extremas y aplicaciones en tecnología farmacéutica*. Junio 16, 2020, de Universidad de Granada. Sitio web: [digibug.ugr.es](http://digibug.ugr.es)
31. Demel, R. A. & de Kruffyff, B. (1976) *The Function of Sterols in Membranes*. Biochim Biophys Acta., 457, p.109
32. Devlin, M. (2006). *Bioquímica con aplicaciones clínicas*. Barcelona: Reverté
33. Diz, V. (2019) *Fotosensibilizadores nanoconfinados. Caracterización fotofísica y fisicoquímica. Estudio de las propiedades fotofísicas de fotosensibilizadores nanoencapsulados*. Enero 5, 2021, de Universidad de Buenos Aires. Sitio web: [https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis\\_n5232\\_Diz.pdf](https://bibliotecadigital.exactas.uba.ar/download/tesis/tesis_n5232_Diz.pdf)
34. Dolores, D. (2014). *Bioquímica Estructural y Metabólica: Lípidos*. Julio 13, 2020, de Universidad de Cantabria. Sitio web: <https://ocw.unican.es/pluginfile.php/800/course/section/857/Tema%25207.%2520Lipidos.pdf>
35. Driessen, A.; & Wickner, W. (1990) *Solubilization and functional reconstitution of the protein-translocation enzymes of *Escherichia coli**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 87(8), pp.3107–3111

36. Droste H. (1983) *La ósmosis asociada a los glóbulos rojos*. Marzo 29, 2021 de Universidad de Antioquia. Sitio web: <https://revistas.udea.edu.co/>
37. DTNB (2021). Sitio web: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/22582#/22582>
38. Ensínck, M. (2013) *Mecanismo biológicos involucrados en el reconocimiento y la fagocitosis de los eritrocitos senescentes*. Marzo 29, 2021, de Universidad Nacional del Rosario. Sitio web: <https://rehip.unr.edu.ar/handle/2133/11030>
39. Espinola, L. (1984) *Liposomas en sistemas biológicos: Aplicación en el tratamiento de las porfirias*. Junio 2, 2020, de Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Sitio web: [http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_1853\\_Espinola.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1853_Espinola.pdf)
40. Finer, E. G.; Flook, A. G. & Hauser, H. (1972) *Mechanism of sonication of aqueous egg yolk lecithin dispersions and nature of the resultant particles*. Biochim.Biophys. Acta., 260, pp.49-59
41. Fosfatidilcolina (2020). Sitio web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/24895164#section=Available-Date>
42. Fromherz, P. & Ruppel, D. (1985) *Lipid vesicle formation: the transition from open disks to closed shells*. FEBS Lett., 179, pp.155-159
43. García-Gurtubay J. (2015) *Efectos del detergente no iónico Tritón X-100 sobre las membranas mitocondriales*. Marzo 26, 2021, de Universidad Complutense de Madrid. Sitio web: <https://eprints.ucm.es/id/eprint/52231/1/5309852880.pdf>
44. García, S. (2015) *Aplicaciones farmacéuticas de las lipasas microbianas*. Junio 1, 2020, de Universidad de Salamanca. Sitio web: [https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/127824/TG\\_GarciaEstebanS\\_Lipasas\\_microbianas.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://gredos.usal.es/bitstream/handle/10366/127824/TG_GarciaEstebanS_Lipasas_microbianas.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
45. Giudice, F. (2016) *Caracterización estructural de liposomas y su interacción con moléculas anfifílicas de interés farmacológico*. Julio 2, 2020, de Universidad Nacional de Córdoba. Sitio web: [https://www.researchgate.net/publication/319300998\\_Caracterizacion\\_estructural\\_de\\_liposomas\\_y\\_su\\_interaccion\\_con\\_moleculas\\_anfifilicas\\_de\\_interes\\_farmacologico](https://www.researchgate.net/publication/319300998_Caracterizacion_estructural_de_liposomas_y_su_interaccion_con_moleculas_anfifilicas_de_interes_farmacologico)
46. González C. (2005) *Determinación de especies de glutatión por electroforesis capilar en plantas bajo estrés por cobre*. Marzo 14, 2021, de Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Departamento de Química Inorgánica y Analítica. Sitio web: [http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2005/gonzalez\\_c3/sources/gonzalez\\_c3.pdf](http://www.tesis.uchile.cl/tesis/uchile/2005/gonzalez_c3/sources/gonzalez_c3.pdf)
47. Gregoriadis, G. (1976) *The carrier potential of liposomes in biology and medicine*. New Engl. J. Med., 295, pp.704-710
48. Gregoriadis, G. (1990) *Inmunological adjuvants, a role for liposomes*. Immunol. Today., 11, pp.89-97
49. Grit, M.; Underberg, W. J. & Crommelin, D. J. (1993) *Hydrolysis of saturated soybean phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions*. J Pharm Sci., 82(4), pp.362-6
50. Gromer, Stephan (2002) *Human Placenta Thioredoxin Reductase: Preparation and Inhibitor Studies*. [Methods in Enzymology] Protein Sensors and Reactive Oxygen Species - Part A: Selenoproteins and Thioredoxin., 347, pp.382-394
51. Gutiérrez, L. F.; Arias, S.; Garzón, D.; López, D. M. & Osorio, A. (2014). *Transición vítrea en alimentos: sistemas binarios agua-carbohidratos*. Revista Vector., 9, pp.21-28

52. Guyer, W. & Bloch, K. (1983) *Phosphatidylcholine and cholesterol interactions in model membranes*. Chem. Phys. Lipids., 33, pp.313-322
53. Harrigan, P. R.; Madden, T. D. & Cullis, P. R. (1990) *Protection of liposomes during dehydration or freezing*. Chem. Phys. Lipids., 52, pp.139-149.
54. Harris, D. C. (2007) *Análisis Químico Cuantitativo*. México: Editorial Reverté.
55. Helber, J. (1998) *Caracterización de vesículas liposomales. Efecto de la composición fosfolipídica sobre el volumen atrapado*. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas., 27, p.4
56. Hernández-Hernández, L. & González-Pérez, C. (2002) *Introducción al análisis instrumental*. México: Editorial Ariel Ciencia.
57. Hernández, L. (2017) *El pequeño mundo de los liposomas*. Biología on-line. Revista de divulgación de la Facultad de Biología., 6(2), pp.1-13
58. Hope, M. & Kitson, N. (1993) *Liposomes. A Perspective for Dermatologists*. Dermatologic. Clinics., 11(1), pp.143-54
59. Hosny, K. M. (2009) *Preparation and evaluation of thermosensitive liposomal hydrogel for enhanced transcorneal permeation of ofloxacin*. AAPS PharmSciTech, 10(4), pp.1336–1342
60. Iga, K.; Hamaguchi, N.; Igari, Y.; Ogawa, J. & Shimamoto, T. (1989) *Heat-specific drug release from large unilamellar vesicles as hyperthermia-mediated targeting delivery*. International Journal of Pharmaceutics., 57, pp.241-251
61. Ijeoma F. (2013) *Fundamentals of Pharmaceutical Nanoscience*. Londres: Springer.
62. Immordino, M. L.; Dosio, F. & Cattell, L. (2006) *Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential*. Int J Nanomedicine., 1(3), pp.297-315
63. Irache, J. M. (2008) *Nanomedicina: nanopartículas con aplicaciones médicas*. Junio 14, 2020, de Anales del Sistema Sanitario de Navarra. Recuperado de: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1137-66272008000100001&lng=es&tlng=es](http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000100001&lng=es&tlng=es).
64. Jiménez J. (2019). *Evaluación biológica de nanoformulaciones asociadas a paclitaxel para el tratamiento del cáncer de pulmón*. Marzo 26, 2021, de Universidad de Granada (España). Sitio web: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=247171>
65. Kagawa, Y. & Racker, E. (1971) *Partial resolution of the enzymes catalysing oxidative phosphorylation. Reconstitution of vesicles catalysing adenosinetriphosphate exchange*. The Journal of Biological Chemistry., 246, pp.5477–5487
66. Kalpesh, A. (2013) *Nanoparticulate drug delivery system: a novel approach*. International Journal of Drug Regulatory Affairs., 1(2), pp.39-48
67. Kirby, C.; Clarke, J. & Gregoriadis, G. (1980) *Effect of the Cholesterol Content of Small Unilamellar Liposomes on Their Stability in Vivo and in Vitro*. Biochemical Journal, 186, p.591
68. Kremer, J. (1977) *Vesicles of Variable Diameter Prepared by a modified Injection Method*. Biochemistry., 16, p.3
69. Kulkarni, S. B.; Betageri, G. V. & Singh, M. (1995) *Factors affecting microencapsulation of drugs in liposomes*. Journal of Microencapsulation., 12(3), pp.229–246
70. Kulkarni, S. B. & Vargha-Butler. (1995) *Study of liposomal drug delivery systems. Encapsulation efficiencies of some steroids in MLV liposomes*. Colloids and surfaces B: Biointerfaces., 4, pp.77-85



71. Kulkarni, P. (2011) *Liposomes: a novel drug delivery system*. International Journal of Current Pharmaceutical Research., 3(2), pp.10-18
72. Lairion, F. (1994) *Aspectos biofarmacéuticos de liposomas administrados por vía parenteral*. Acta Farmacéutica Bonaerens., 13(1), pp.5-19
73. Lanio, M. E. (2009) *Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina*. Revista Cubana de Física., 26, pp.23-30
74. Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Sfar, S.; Charcosset, C. & Fessi, H. (2011) *Liposome preparation using a hollow fiber membrane contactor—Application to spironolactone encapsulation*. International Journal of Pharmaceutics., 415(1-2), pp.53–61
75. Laouini, A.; Jaafar-Maalej, C.; Limayem-Blouza, I.; Sfar, S.; Charcosset, C.; Fessi, H. (2012) *Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art*. Journal of Colloid Science and Biotechnology., 1(2), pp.147–168
76. Lehninger. (2009) *Principles of Biochemistry*. New York: Omega.
77. Li, Jing; Wang, Xuling; Zhang, Ting; Wang, Chunling; Huang, Zhenjun; Luo, Xiang; Deng, Yihui (2015) *A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems*. Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 10(2), pp.81–98.
78. Li, Z., & Vance, D. E. (2008) *Thematic review series: glycerolipids. Phosphatidylcholine and choline homeostasis*. Journal of lipid research., 49(6), pp.1187-1194
79. Lichtenberg, D. (1988) *Liposomes: Preparation, characterisation and preservation*. Methods of Biological analysis., 33, pp.337- 461
80. Luque, J. (2012) *Espectro electromagnético y espectro radioeléctrico*. Manual formativo de ACTA., 62, pp.17-31
81. Luzardo, L. (2003) *Encapsulación del Factor de Crecimiento Epidérmico humano recombinante (EGFhr) en liposomas y estudio de la respuesta inmune anti-EGFhr en ratones*. Julio 27, 2020, de Universidad de la Habana. Sitio web: <https://files.sld.cu/digitalizacion-bmn/files/2017/12/T2003.103-04.pdf>
82. L-Glutation (2020). Sitio web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Glutathione>
83. Maldonado, O.; Ramírez, I.; García, J.; Ceballos, G. & Méndez, E. (2012) *Colesterol: Función biológica e implicaciones médicas*. Revista mexicana de ciencias farmacéuticas., 43(2), p.7-22
84. Martínez-Balbuena, L. (2010) *Elasticidad de las membranas biológicas*. Revista mexicana de física, 56(1), pp.107-122
85. Martinez-Seara, H. et al., (2010) *Cholesterol induces specific spatial and orientational order in cholesterol/phospholipid membranes*. PLoS ONE., 5(6)
86. Mattei, B.; Lira, R. B.; Perez, K. R. & Riske, K. A. (2016) *Membrane permeabilization induced by Triton X-100: The role of membrane phase state and edge tension*. Chem Phys Lipids., 202, pp.28-37
87. Mateos, D. (2011) *Transiciones de fase en membranas lipídicas*. Octubre 28, 2020, de Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra. Sitio web: <https://rdu.unc.edu.ar/bitstream/handle/11086/48/15841.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
88. Mayer, L. D.; Hope, M.J. & Cullis, P. R. (1986) *Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure*. Biochimica et Biophysica Acta., 858(1), pp.161–168
89. Mayer, C. (2005) *Nanocapsules as drug delivery systems*. International Journal of Artificial Organs., 28(11), pp.1163-1171
90. Mertins, O. (2008) *Estudios fisicoquímicos y estructurales de liposomas compuestos de fosfatidilcolina y quitosano*. Julio 28, 2020, de Universidad Federal de Río Grande



- Do Sul. Sitio web:  
<https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/14354/000657747.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
91. Mohanraj, V. (2006) *Nanoparticles – A Review*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research., 5(1), pp.561-573
  92. Monroig, M. (2007) *Diseño y optimización de liposomas para uso como sistema de suministro de nutrientes a larvas de peces marinos*. Julio 16, 2020, de Universitat de Valencia (Servei de Publicacions). Sitio web: <https://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/10348/monroig.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
  93. Murthy, S. K. (2007) *Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges*. Int J Nanomedicine., 2, pp.129-141
  94. Navarro, C. (2011) *Liposomes for Targeted Delivery of Active Agents against Neurodegenerative Diseases (Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease)*. Junio 5, 2020, de Department of Pathology and Neuropathology, University Hospital of Vigo (CHUVI). Sitio web: [https://www.researchgate.net/publication/51954273\\_Liposomes\\_for\\_Targeted\\_Delivery\\_of\\_Active\\_Agents\\_against\\_Neurodegenerative\\_Diseases\\_Alzheimer's\\_Disease\\_and\\_Parkinson's\\_Disease](https://www.researchgate.net/publication/51954273_Liposomes_for_Targeted_Delivery_of_Active_Agents_against_Neurodegenerative_Diseases_Alzheimer's_Disease_and_Parkinson's_Disease)
  95. Navarro, G. (2008) *Diseño de liposomas para el transporte de diclofenac sódico*. Enero 25, 2020, de Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas. Sitio web: [www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-74182008000200009](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-74182008000200009)
  96. Papahadjopoulos, D. & Wilson, T. (1972) *Permeability Properties of Phospholipid Membranes: Effect of Cholesterol and Temperature*. Biochimica et Biophysica Acta., 266, p.561
  97. Pradhan, B.; Kumar, N.; Saha, S. & Roy, A. (2015) *Liposome: method of preparation, advantages, evaluation and its application*. Journal of Applied Pharmaceutical Research., 3(3), pp.1-8
  98. Perkins, W.R; Minchey S.R; Ahl P.L. & Janoff A.S. (1993) *The determination of liposome captured volume*. Chem. Phys. Lipids., 64(1-3), pp.197–217
  99. Pérez, J. (2017) *Estudio comparativo de dos métodos de producción de liposomas para el encapsulamiento de proteína hidrolizada de leche como modelo de componente funcional de aplicación cosmética*. Junio 3, 2020, de Universidad Icesi Facultad de Ciencias Naturales. Sitio web: [https://repository.icesi.edu.co/biblioteca\\_digital/bitstream/10906/83509/1/T01257.pdf](https://repository.icesi.edu.co/biblioteca_digital/bitstream/10906/83509/1/T01257.pdf)
  100. Pineda, D.; Martínez, C.; Menchén, A. & Fernández, E. (2010) *Aproximación matemática para la corrección de la influencia de la hemólisis en pruebas frecuentes del laboratorio clínico*. Revista Del Laboratorio Clínico., 3(1), pp. 25–30
  101. Pompella, A.; Visvikis, A. & Paolicchi, A. (2003) *The changing faces of glutathione, a cellular protagonist.*, 66(8), pp.1499–1503
  102. Rahman, Y. & Wright, B. J. (1975) *Liposomes containing chelating agents*. J Cell Biol., 65, p.112
  103. Raisman, S. (2004) *Lípidos*. Junio 1, 2020, de Universidad Nacional del Nordeste. Sitio web: <http://www.biologia.edu.ar/macromoleculas/lipidos.htm>
  104. Rodriguez, R. (2018) *Mantenimiento de laboratorio: Espectrofotómetro*. Octubre 19, 2020, de Rekner. Sitio web: <http://rekner.com/mantenimiento-de-laboratorio-espectrofotometro-0-2/>

105. Rocha-Fábio, R. P. (2004) *Estrategias para aumentar la sensibilidad en espectrofotometría UV-VIS*. Quim. Nova., 27(5), pp.807-812
106. Rojas-Aguirre. (2016) *La nanomedicina y los sistemas de liberación de fármacos: ¿la (r)evolución de la terapia contra el cáncer?* Educación Química., 27, pp.286-291
107. Ruano, M. (2012) *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas*. Mayo 20, 2020, de Universidad Complutense de Madrid Facultad de Ciencias Químicas, Departamento de Química Física I. Sitio web: <https://eprints.ucm.es/18042/1/T34218.pdf>
108. Rudnykh S. (2018). *Elección de la función de deseabilidad para diseños óptimos bajo restricciones*. Octubre 20, 2021, de Revista EIA. Sitio web: <https://www.redalyc.org/journal/1492/149259394001/html/>
109. Sabín, Juan. (2007) *Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas*. Diciembre 28, 2020, de Universidad de Santiago de Compostela. Sitio web: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=282449>
110. Sánchez-Rodríguez M. (2002) *Ecuaciones para eliminar la interferencia de sueros hemolizados, ictericos e hiperglucémicos en las determinaciones rutinarias de química clínica*. Bioquímica., 27(2), pp.46-52
111. Santos y Guerrero. (1994) *Administración de medicamentos: teoría y práctica*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
112. Senior, J. D. & Fischer, D. (1991) *Influence of Surface Hydrophilicity of Liposomes on their Interaction with Plasma Proteins and Clearance from the Circulation; Studies with Polyethylenglycol-coated Vesicles*. Biochim. Biophys. Acta., 1062, p.5
113. Sharma, D.; Aara, A.; Ali, E.; Trivedi, L. (2018) *An Updated Review On: Liposomes as Drug Delivery System*. Pharmatutor., 6, pp.50–62
114. Shaw, I. H.; Knight, C. G.; Page-Thomas, D. P.; Phillips, N. C. & Dingle, J. T. (1979) *Liposome-incorporated corticosteroids: i. the interaction of liposomal cortisol palmitate with inflammatory synovial membrane*. Br. J. Exp. Pathol., 60, p.142
115. Silverthorn. (2008) *Fisiología Humana. Un Enfoque Integrado*. México: Editorial Panamericana.
116. Singh, N. (2019) *Proliposomes: An Approach for the Development of Stable Liposome*. Ars Pharm., 60(4), pp.231-240
117. Stottrup, B. L. & Keller, S. L. (2006) *Phase behavior of lipid monolayers containing DPPC and cholesterol analogs*. Biophysical journal., 90(9), pp.3176–3183
118. Stryler, L. (1976) *Introducción a las membranas biológicas*. Barcelona: Editorial Reverte
119. Suryakanta, S. (2016) *Pharmaceutical Drug Delivery Systems and Vehicles*. India: Woodhead Publishing India (WPI).
120. Suzuki, T.; Komatsu, H. & Miyajima, K. (1996) *Effects of glucose and its oligomers on the stability of freeze dried liposomes*. Biochim Biophys Acta (BBA)—Biomem., 1278, pp.176–182
121. Szoka, F. & Papahadjopoulos, D. (1978) *Procedure for preparation of liposomes with large internal aqueous space and high capture by reverse-phase evaporation*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America., 75(9), pp.4194–4198
122. Thassu, D. (2007) *Nanoparticulate. Drug Delivery Systems*. New York: Informa Healthcare.
123. Thomas, L. (2002) *Hemólisis como influencia y factor de interferencia*. EJIFCC., 13(4), pp.107–113

124. Thulasirammaraju, T. V. (2012) *Liposomes: A Novel Drug Delivery system*. International Journal of Biopharmaceutics., 3(1), pp.5-16
125. Tiskow G. (2006) *El fenómeno de la ósmosis*. Marzo 29, 2021, de Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Sitio web: <http://www.ucla.edu.ve/dmedicin/DEPARTAMENTOS/fisiologia/WEB%20FISIO/OSMOSIS.pdf>
126. Torchilin, V. T. V. & Whitemen, K. (1995) *New Synthetic Amphiphilic Polymers for the Steric Protection of Liposomes in Vivo*. J.Pharm.Sci., 84, p.4
127. Torchilin. (2014) *Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery*. Nature Reviews. Drug Discovery., 13(11), pp.813-827
128. Tritón X-100 (2020). Sitio web: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5590#section=2D-Structure>
129. Trucillo, P., Campardelli, R., & Reverchon, E. (2020) *Liposomes: From bangham to supercritical fluids*. Processes, 8(9), p.1022
130. Urbaneja, M. A.; Goñi, F. M. & Alonso, A. (1988) *Structural changes induced by Triton X-100 on sonicated phosphatidylcholine liposomes*. Eur. J. Biochem., 173, pp.585–588
131. Velázquez, L. (2008) *Farmacología Básica y Clínica*. México: Editorial Panamericana.
132. Vemuri, S. (1995) *Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*. Pharmaceutics Acta Helvetiae., 70, pp.95-111
133. Vázquez-González, L. (2015) *Desarrollo y caracterización de liposomas para aplicación tópica de fármacos*. Octubre 10, 2019, de Universidad de Barcelona. Sitio web: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=117814>
134. Villanueva, A. (2019) *Síntesis, optimización y caracterización de liposomas como transportadores moleculares*. Julio 18, 2020, de Universidad de Cantabria. Sitio web: [repositorio.unican.es](http://repositorio.unican.es)
135. Villasmil-Sánchez, Sheila.; Dhimeur, Wijdane.; Ospino, Sirce Cecilia Salas.; Rabasco Alvarez, Antonio M. & González-Rodríguez, M.L. (2010) *Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization*. Drug Development and Industrial Pharmacy, 36(6), pp.666–675
136. Wagner, A. & Vorauer-Uhl, K. (2010) *Liposome technology for industrial purposes*. Journal of Drug Delivery., 2011, pp.4-7
137. Williams, D. (2008). *The relationship between biomaterials and nanotechnology*. Biomaterials., 29, pp.1737-1738
138. Wolkers, W. F.; Oldenhof, H. & Tablin, F. (2004) *Preservation of dried liposomes in the presence of sugar and phosphate*. Biochim Biophys Acta (BBA)—Biomem., 1661, pp.125–134
139. Yadav, A. V.; Murthy, M. S; Shete, A. S. & Sfurti, S. (2011) *Stability Aspects of Liposomes*. Ind. J. Pharm. Edu. Res., 45, pp.402-413
140. Yamauchi, M.; Tsutsumi, K.; Abe, M.; Uosaki, Y.; Nakakura, M. & Aoki, N. (2007) *Release of drugs from liposomes varies with particle size*. Biological and Pharmaceutical Bulletin., 30(5), pp.963-6
141. Yatvin, M. B. & Lelkes, P. I. (1982) *Clinical prospects for liposomes*. Med. Phys., 9, pp.149-175
142. Yañez, F. (2005) *Aplicaciones biotecnológicas de la microencapsulación*. Julio 28, 2020, de Mundo alimentario Revista. Sitio web: [https://www.researchgate.net/publication/271836989\\_Aplicaciones\\_biotecnologicas\\_de\\_la\\_microencapsulacion](https://www.researchgate.net/publication/271836989_Aplicaciones_biotecnologicas_de_la_microencapsulacion)

143. Young, S. P.; Baker, E. & Huehns, E. R. (1979) *Liposome Entrapped Desferrioxamine and Iron Transporting Ionophores: A New Approach to Iron Chelation Therapy*. British Journal of Haematology., 41, p.357
144. Zalipsky, S.; Hansen, C. B.; Oaks, J. M. & Allen, T. M. (1996) *Evaluation of blood clearance rates and biodistribution of Poly(2-oxazoline)-grafted liposomes*. Journal of Pharmaceutical Sciences., 85, p 2
145. Zaragoza A. (2012) *Propiedades bioquímicas de tensioactivos biológicos de origen bacteriano*. Marzo 29, 2021, de Universidad de Murcia. Sitio web: <https://digitum.um.es/digitum/bitstream/10201/29557/1/TESIS%20ANA%20ZARAGOZA%20MART%C3%8DNEZ.pdf>