



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA DE LIPOSOMAS
A DIFERENTES CONDICIONES DE PREPARACIÓN

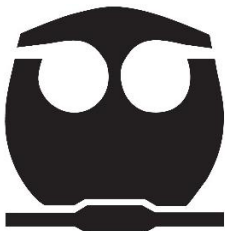
TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGICO

PRESENTA:

ERIK ANTONIO BAUTISTA QUIROZ



Ciudad Universitaria, CD.MX.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: **LUIS MEDINA TORRES.**

VOCAL: Profesor: **MARÍA GUADALUPE LEMUS BARAJAS.**

SECRETARIO: Profesor: **MARÍA JOSEFA BERNARD BERNARD.**

1 er. SUPLENTE: Profesor: **CARLOS JUAREZ OSORNIO.**

2 do. SUPLENTE: Profesor: **LUZ ANTONIA BORJA CALDERÓN.**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Facultad de Química, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Luis Medina Torres

SUSTENTANTE:

BAUTISTA QUIROZ ERIK ANTONIO

Contenido

Resumen.....	9
1.- Introducción.....	10
2.- Antecedentes	11
2.1- Nanoacarreadores	11
2.2.- Liposomas.....	11
2.3.- Excipientes.....	14
2.4- Métodos de Preparación de Liposomas	15
2.5.- Caracterización de los liposomas	18
2.6.- Fármaco: Rapamicina	19
2.7.- Administración de fármacos oculares.....	23
2.8.- Reología	28
2.8.1.-Estado sólido y líquido desde la Reología	29
2.8.2.- Viscosidad.....	31
2.8.3.- Modelos constitutivos (Ley de la potencia).....	33
2.8.4.- Clasificación Reológica con base en la curvatura del flujo.....	35
2.8.5.- Pruebas oscilatorias.....	36
Objetivo	40
Objetivos Particulares	40
Hipótesis.....	40
3.- Diseño Experimental y metodología	41
3.1.- Materiales	43
3.2.- Preparación de Liposomas	43
3.2.1.- Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS)	43
3.2.2.- Preparación de Liposomas por el Método de Calentamiento.....	43
3.3.- Caracterización fisicoquímica de las formulaciones liposomales	44
3.3.1.- Tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula y potencial Z.....	44
3.4.- Propiedades reológicas de la formulación de Liposomas.....	44
3.4.1.- Preparación de la muestra	44
3.4.2.- Mediciones reológicas	45
3.4.3.- Pruebas de flujo a la cizalla simple.....	45
3.4.4.- Pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud de deformación	45
3.4.5.- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)	45
3.4.6.- Espectroscopia por IR.....	45

3.4.7.- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).....	46
3.5.- Determinación de Rapamicina.....	46
3.5.2.- Determinación de Fosfolípido	47
3.5.3.- Análisis cualitativo de Lecitina por cromatografía de dos dimensiones en capa fina (TLC).....	48
3.5.4.- Índice de Acidez.....	48
3.5.5.- Materia Insoluble en Acetona	49
3.6.- Cinética de liberación <i>In vitro</i>	49
4. Análisis de Resultados.....	50
4.1.- Análisis de Tamaño de Partícula, Índice de Polidispersión (PDI) y Potencial Z.	50
4.2.- Caracterización reológica	54
4.3.- Caracterización de la formulación de liposomas: Metarin/Colesterol/Manitol (MCM) con Rapamicina.	65
.....	69
4.4.- Microscopia electrónica de Transmisión (TEM) de la formulación de liposomas: Metarin/Colesterol/Manitol (MCM) con y sin Rapamicina.....	70
4.5.- Caracterización Química de la Formulación de Liposomas: Metarin/Colesterol/Manitol (MCM)	72
4.6.- Análisis de liberación controlada de la Rapamicina a partir del sistema liposomal: Metarin – Colesterol – Manitol.	75
5.- Conclusiones	87
Perspectivas a futuro.	87
Anexo 1.- Caracterización de química de las muestras comerciales de Lecitina	90
Anexo 2.- Análisis químico de Rapamicina	98
Anexo 3.- Curvas de Calibración para Lecitina de Soya y Rapamicina.	101
Referencias Bibiligraficas	105

Índice de Tablas.

TABLA 1.	26
TABLA 2.	35
TABLA 3.	42
TABLA 4.	50
TABLA 5.	52
TABLA 6.	63
TABLA 7.	67
TABLA 8.	72
TABLA 9.	73
TABLA 10.	74
TABLA 11.	77
TABLA 12.	78
TABLA 13.	83
TABLA 14.	84
TABLA 15.	90
TABLA 16.	102
TABLA 17.	104

Índice de Figuras.

FIGURA 1.-	13
FIGURA 2.-	17
FIGURA 3.-	20
FIGURA 4.-	21
FIGURA 5.-	22
FIGURA 6.-	24
FIGURA 7.-	29
FIGURA 8.-	31
FIGURA 9.-	32
FIGURA 10.-	34
FIGURA 11.-	36
FIGURA 12.-	37
FIGURA 13.-	39
FIGURA 14.-	54
FIGURA 15.-	55
FIGURA 16.-	56
FIGURA 17.-	59
FIGURA 18.-	60
FIGURA 19.-	62
FIGURA 20.-	65
FIGURA 21.-	66
FIGURA 22.-	69
FIGURA 23.-	71
FIGURA 24.-	76
FIGURA 25.-	79
FIGURA 26.-	80
FIGURA 27.-	81
FIGURA 28.-	82
FIGURA 29.-	86
FIGURA 30.-	89
FIGURA 31.-	91
FIGURA 32.-	93
FIGURA 33.-	94
FIGURA 34.-	97
FIGURA 35.-	99
FIGURA 36.-	99
FIGURA 37.-	7100
FIGURA 38.-	7101
FIGURA 39.-	7103
FIGURA 40.-	105

RESUMEN

Los liposomas son pequeñas vesículas artificiales de forma esférica, se desarrollan partir de otros fosfolípidos naturales o sintéticos, debido a estas propiedades pueden aumentar la solubilización y absorción de fármacos, protegiéndolos de la degradación. En el presente trabajo se buscó proteger un principio activo como lo es la Rapamicina, que contiene una amida cíclica terciaria que exhibe actividades inmunosupresoras significativas en aplicaciones farmacéuticas. Se elaboraron nueve formulaciones de liposomas para encapsular a este fármaco. La formulación con lecitina (Metarin), y Manitol como crioprotector fue la que mostró una buena estabilidad mecánica al flujo, una distribución modal en el tamaño de partícula, y un buen potencial Z e índice de polidispersión, que en principio aseguraron una buena estabilidad mecánica al flujo, y aseguraron una liberación exponencial controlada de este tipo de fármaco con posibles aplicaciones en la industria.

1.- INTRODUCCIÓN

Los liposomas están compuestos principalmente de fosfolípidos, moléculas anfifílicas que tienen una cabeza hidrofílica y dos cadenas hidrófobas. Cuando los fosfolípidos son dispersados en una solución acuosa, debido a su naturaleza anfipática, tienden a formar membranas. La organización final de una estructura liposomal, dependerá de la naturaleza y la concentración de los lípidos, la temperatura y su forma geométrica (**Bozzuto & Molinari, 2015**). Por lo tanto, fármacos solubles en agua pueden ser encapsulados en la parte hidrófila del liposoma, mientras que los fármacos liposolubles se encapsulan en el interior de las cadenas hidrófobas, gracias a estas propiedades de los liposomas, facilita la administración de ciertos fármacos, estos pueden ser suministrados por vía intravenosa, oral o intramuscular y se logra un mejor control de la liberación del principio activo. Debido a que los liposomas son micropartículas dispersas en una fase continua, son considerados como una suspensión (microsuspensión). La mayoría de las partículas que componen una suspensión en un medio acuoso tienen una carga adquirida en su superficie, causada por la adsorción de iones o la ionización de algunas especies químicas, si es que están presentes. Por consiguiente, las partículas liposomales tienen una carga en su superficie y puede estar influenciada también por el pH, potencial zeta, tamaño de partícula y el uso de agentes surfactantes o floculantes. Lo cual ocasiona un incremento en las fuerzas de atracción o repulsión, debido a las interacciones eléctricas entre cada partícula liposomal o entre las dobles capas lipídicas, por lo tanto, se observara una modificación del potencial eléctrico en el sistema (Florence, 2015). A causa de los factores antes mencionados, la estabilidad de una suspensión liposomal, es necesario realizar estudios de tamaño de partícula y potencial zeta principalmente porque son parámetros críticos durante el diseño de una formulación de liposomas, proporcionando cierta información sobre la estabilidad del sistema (Pattni et al., 2015).

En este trabajo, se busca encontrar una alternativa para el análisis de la estabilidad al flujo de una suspensión de liposomas por medio de estudios reológicos (Myers, 2002), además de que nos permitirá encontrar una correlación entre la concentración de lípidos, y las propiedades mecánicas respecto a su estabilidad mecánica de una formulación liposomal.

2.- ANTECEDENTES

2.1- Nanoacarreadores.

Recientemente, las compañías farmacéuticas han reportado pérdidas en sus mercados debido al surgimiento de medicamentos genéricos, los cuales repercuten en sus ganancias, generando la necesidad de desarrollar formas novedosas para administrar sus viejas moléculas y seguir conservando su patente (**Ranade, 2003**). Por lo anterior, surge la idea de probar una nueva área conocida como "*nanomedicina*" para la introducción de nuevas y viejas moléculas de manera segura y eficaz, dando como consecuencia el surgimiento de fármacos de administración en un sitio específico, los cuales consideran tanto el tipo de acarreador al que se une el principio activo, como la vía de administración y la *diana* biológica (**Gaspar & Duncan, 2009**). Su diseño debe estar dirigido para mejorar su eficacia dentro del organismo y controlar su liberación, mejorando la biodisponibilidad, el margen terapéutico y la aceptación por parte del paciente (**Arachchige, 2015**). La nanomedicina utiliza materiales estructurales a esta escala, diseñados para tener efectos médicos únicos y aprovechar dos fenómenos que ocurren a nano escala: las reacciones fisicoquímicas y las interacciones fisiológicas (**Etheridge et al., 2013**). Esta área de la medicina se relaciona específicamente con el desarrollo y el diseño de herramientas a nivel nanométrico: tamaños de 1 a 1000 nm. La Fundación Europea de la Ciencia sobre la Nanomedicina define a los nanofármacos o nanomedicamentos como sistemas que constan de al menos dos componentes: el ingrediente activo y el sistema de administración o nanoacarreador (**Gaspar & Duncan, 2009**).

La primera generación de nanoacarreadores utilizados fueron los liposomas, que son vesículas esféricas con una estructura de membrana de bicapa lipídica en donde se pueden encapsular agentes hidrófilos e hidrófobos (**Petros & DeSimone, 2010**).

2.2.- Liposomas.

Los liposomas parecen ser un sistema fármaco-acarreador casi ideal debido a su capacidad para incorporar diversas sustancias a su matriz. Por lo tanto, durante los últimos 50 años los liposomas han sido ampliamente investigados, y siguen siendo objeto de investigación de sus propiedades fisicomecánicas (**Bozzuto & Molinari, 2015**). Son pequeñas vesículas artificiales de forma esférica que pueden crearse a partir de otros fosfolípidos naturales o sintéticos. Las propiedades difieren considerablemente de acuerdo con la composición lipídica, la carga

superficial, el tamaño y el método de preparación. Además, la elección de los componentes de la bicapa determina la rigidez o fluidez y la carga de la bicapa (**Akbarzadeh et al., 2013**). Debido a estas propiedades fisicoquímicas pueden aumentar la solubilización y absorción del fármaco encapsulado, mientras que lo protegen de la degradación. Dado que los liposomas tienen una composición similar a las membranas celulares, se espera que sean biocompatibles y biodegradables. Por otro lado, los fármacos ideales para el suministro por medio de liposomas son aquellos con alta solubilidad en lípidos o en agua y potente actividad farmacológica (**Linares-Alba et al., 2016**). Los liposomas como análogos de las membranas celulares son generalmente ensamblados por una auto organización espontánea de una mezcla de fosfolípidos en agua (**Figura 1A**).

El tamaño del liposoma y el número de bicapas son parámetros que permiten clasificarlos en: vesículas multilamelares (**MLV**) y vesículas unilamelares. Las vesículas unilamelares también se pueden clasificar en dos categorías: vesículas unilamelares grandes (**LUV**) y pequeñas vesículas unilamelares (**SUV**) y se muestran en la **Figura 1B**.

Los liposomas unilamelares, la vesícula tiene una bicapa de fosfolípidos que encierra la solución acuosa, y en los liposomas multilamelares, las vesículas tienen una estructura de tipo cebolla, es decir varias vesículas unilamelares se formarán en el interior de la otra con menor tamaño, haciendo una estructura multilamelar de fosfolípidos concéntricos, no concéntricos o mezcla de ambos, formando esferas separadas por capas de agua (**Akbarzadeh et al., 2013**).

Por lo tanto, los liposomas almacenan, protegen y transfieren al fármaco durante su administración, previniendo el metabolismo del principio activo antes de alcanzar su sitio de acción, contribuyendo a incrementar el índice terapéutico del fármaco (**Bozzuto & Molinari, 2015**).

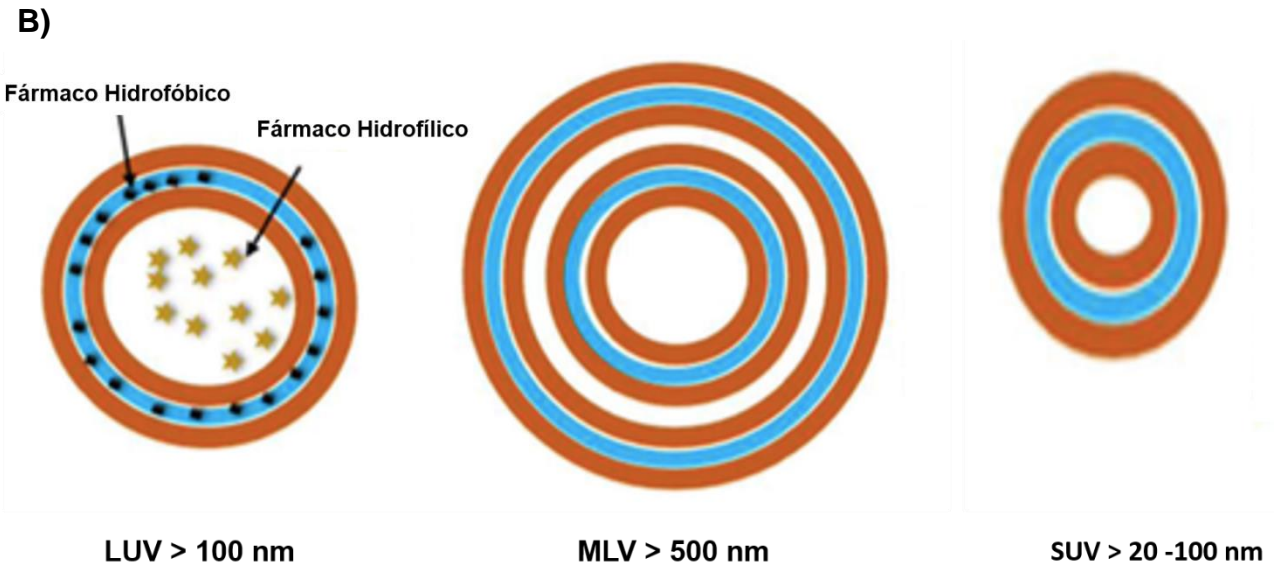
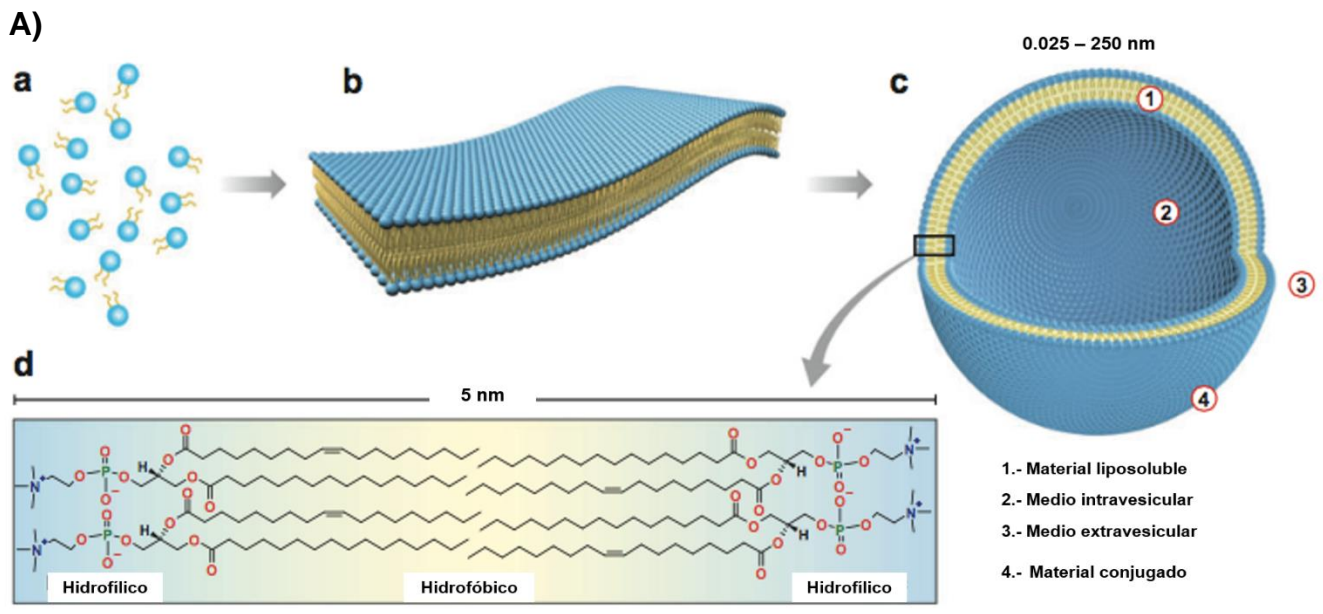


Figura 1.- A) Ilustración esquemática del proceso de formación de liposomas a partir del ensamblaje de fosfolípidos. **a)** Moléculas fosfolípicas formadoras de la doble membrana, **b)** Formación de la membrana del liposoma, **c)** Una bicapa lipídica tiene aproximadamente 5 nm de grosor, formada a partir de una cola hidrofóbica y una cabeza hidrofílica, **d)** Estructura química de la doble membrana de un liposoma. Imagen obtenida de: **Jesorka, A., & Orwar, O. (2008).** **B)** Diferentes tipos de liposomas basados en su estructura y lamellaridad. Imagen obtenida de: **Pattni, B. S., Chupin, V. V., & Torchilin, V. P. (2015).**

2.3.- Excipientes.

Las vesículas liposomales existen tanto en un estado fluido, como en un estado de gel dependiendo de su temperatura. En un estado fluido la composición de los liposomas es más permeable al agua y puede utilizarse para encapsular fármacos. A temperaturas del cuerpo (por ejemplo, $T = 37^{\circ}\text{C}$), un estado fluido hará que los liposomas goteen y los fármacos encapsulados puedan escapar antes de llegar al sitio de acción. Por este motivo, la elección de fosfolípidos con características de gel a condiciones fisiológicas es deseable para poder estabilizar a los liposomas (**Pattni et al., 2015**). Los liposomas usualmente están hechos a base de fosfatidilcolina, ya sea de mezclas naturales obtenidas de soya o de yema de huevo, exhibiendo una temperatura de transición de fase más alta (mayor a 37°C), proporcionando una mayor estabilidad térmica en el liposoma.

La incorporación de colesterol, uno de los principales componentes de las membranas en las bicapas liposómicas, contribuye a una mejor organización de las membranas, reduciendo la libertad de rotación de las cadenas hidrocarbonadas en los fosfolípidos, ayudando a que el principio activo no se pierda, debido a una alta permeabilidad de la membrana, y ayuda a estabilizar la bicapa lipídica. Además, la inclusión de colesterol en el liposoma puede afectar al diámetro de la vesícula, y por consiguiente afecta la eficiencia de encapsulación del fármaco. Otros excipientes utilizados en la formulación de los liposomas son algunos disacáridos, tales como sacarosa o trehalosa, debido a que protegen al liposoma cuando estos son sometidos a procesos de liofilización, ya que reducen la temperatura de transición de fase cristalina a fase líquida de la bicapa lipídica debido al enlace de hidrógeno entre el disacárido y la cabeza polar del lípido (**Eloy et al., 2014**). A parte de los excipientes mencionados para la elaboración de liposomas, se puede agregar un excipiente que funcione como un preservativo, tal es el caso del 2-fenoxietanol (ethylene glycol mono phenyl ether). El cual se utiliza como conservante en la cosmética y algunas preparaciones farmacéuticas, un antiséptico tópico, como coalescente en pinturas de látex y algunas suspensiones, o como disolvente o conservante en tintes (**Roper et al., 1997**). Los productos que contienen 2-fenoxietanol se incluyen: productos para el maquillaje de los ojos, polvo para el rostro, el cuerpo y los pies, detergentes para el baño y productos para el bronceado, como cremas o emulgeles (**Rowe, 2009**).

2.4- Métodos de Preparación de Liposomas.

Existen varios métodos para preparar liposomas de acuerdo con su tamaño, lamelaridad y eficiencia de encapsulación. Además, otro parámetro importante a considerar cuando se prepara el liposoma, es la rigidez de las bicapas (**Pattni et al., 2015**). Por lo tanto, hay tres estrategias diferentes para la preparación de liposomas con base a las características mencionadas:

- 1.- Métodos mecánicos
- 2.- Métodos basados en la sustitución de un disolvente orgánico
- 3.- Métodos basados en la transformación del tamaño o la fusión de vesículas preparadas.

Todos estos implican cuatro etapas básicas:

- 1.- Secado de los lípidos del disolvente orgánico.
- 2.- Dispersión del lípido en medio acuoso.
- 3.- Purificación del liposoma resultante.
- 4.- Análisis del producto final.

A continuación, se explicará brevemente en consisten las técnicas para la elaboración de liposomas que pertenecen a los métodos mecánicos:

A) Método de película.

Es el procedimiento más sencillo para la formación de liposomas, pero tiene cierta limitación debido a su baja eficacia de encapsulación. En esta técnica, los liposomas se preparan hidratando una delgada película de lípidos en un disolvente orgánico y el disolvente orgánico se elimina luego por deposición. Cuando se elimina todo el disolvente, la mezcla de lípidos sólidos se hidratan usando una sustancia buffer. Los lípidos se hinchan y se hidratan espontáneamente para formar liposomas (**Samad et al., 2007**).

B) Método por sonicación.

Este método es usado para la preparación de nanopartículas SUV con un diámetro entre el rango de 15-25 μm . La sonicación de una dispersión acuosa de fosfolípidos se realiza

mediante dos tipos de sonicadores: de sondeo o de baño. Los de sonda se utilizan para el volumen pequeño que requiere alta energía mientras que los de baño se emplean para un gran volumen (**Samad et al., 2007**).

C) Método por extrusión.

La extrusión es una técnica adecuada para generar nanopartículas LUV. Se lleva a cabo en presencia de un medio que contiene al principio activo concentrado. Los residuos se eliminan después de haberse completado la formación de los liposomas. Las vesículas liposomales hidratadas se someten inicialmente a varios ciclos de congelación-descongelación, posteriormente se hacen pasar a través de membranas de policarbonato, de tamaño de poro decreciente a temperaturas elevadas (**Jesorka & Orwar, 2008**).

Por otro lado, los métodos basados en la sustitución de un disolvente orgánico, se encuentran las siguientes técnicas de elaboración de liposomas:

A) Evaporación en fase reversa.

La mezcla de lípidos se añade a un matraz de fondo redondo y el disolvente se elimina a presión reducida mediante un rotaevaporador. El sistema se purga con nitrógeno y los lípidos se vuelven a disolver en la fase orgánica que es la fase en la que se formará la vesícula de fase reversa. Después de que los lípidos se vuelven a disolver, se obtiene la emulsión y se elimina el disolvente por evaporación hasta obtener un gel semisólido a una presión reducida. Los liposomas resultantes se denominan vesículas de evaporación de fase reversa (**Samad et al., 2007**).

B) Método de inyección.

Existen dos métodos según el disolvente utilizado:

- i. Método de inyección de etanol: En este método, el lípido se inyecta rápidamente a través de una aguja fina en un exceso de solución salina u otro medio acuoso.
- ii. Método de inyección de éter: En este método de inyección de éter, el lípido se inyecta muy lentamente a través de una aguja fina en un exceso de solución salina u otro medio acuoso. Formándose de inmediato nanopartículas MLV (**Samad et al., 2007**).

En este trabajo se utilizó un método modificado para la producción rápida de liposomas sin el uso de ningún disolvente orgánico o procedimiento donde se lleve a cabo un esfuerzo mecánico. Este método implica la hidratación de los componentes liposómicos en un medio acuoso seguido por un método de calentamiento de estos componentes:

La incorporación de fármacos en los liposomas por este método se lleva a cabo cuando se ha alcanzado un punto cercano a la temperatura de transición (T_c) de los lípidos. Esto se debe a que, por debajo de la T_c , los lípidos están en un estado de gel y normalmente no pueden formar estructuras de bicapa continua cerrada. Sin embargo, cuando se utiliza colesterol como un componente de la formulación, los liposomas son preparados exitosamente a $120\text{ }^\circ\text{C}$.

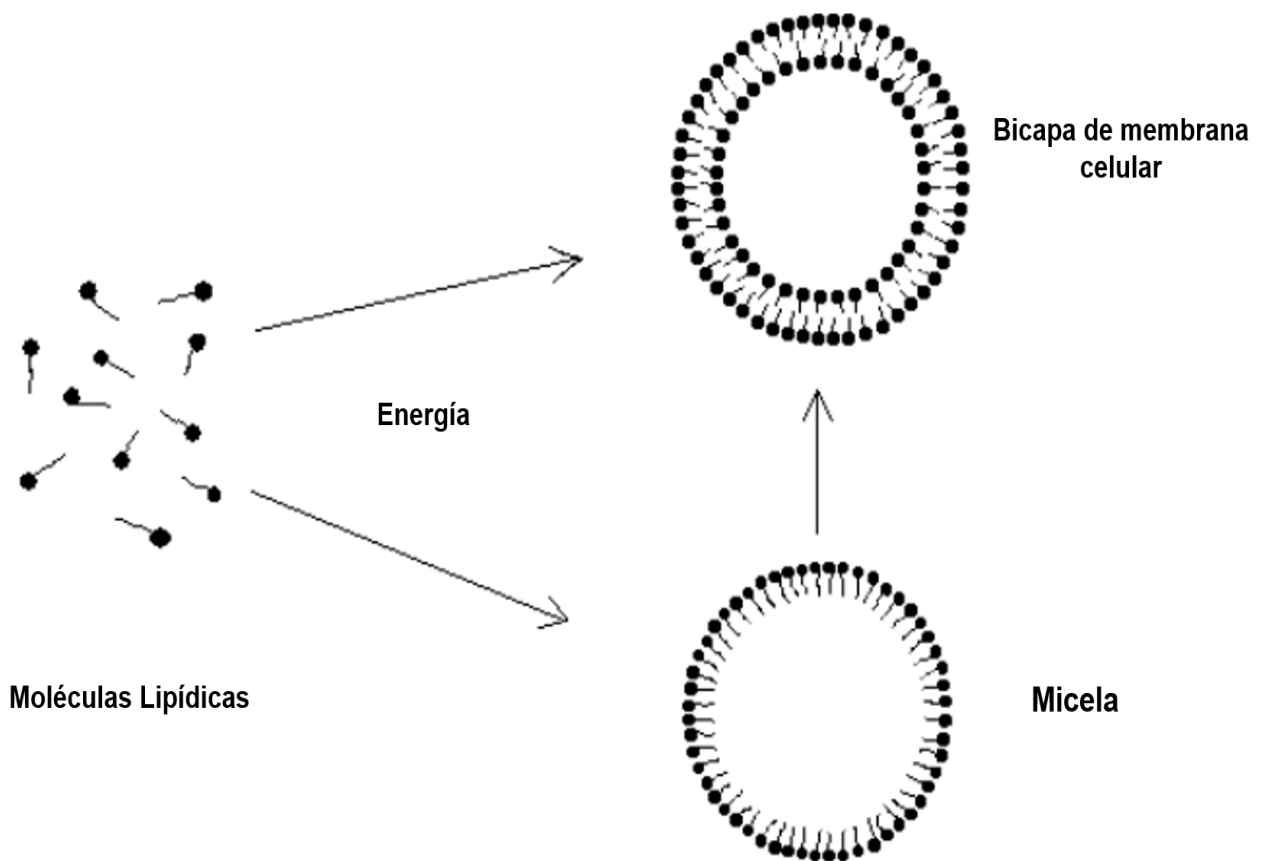


Figura 2.- En esta imagen se muestran dos posibles mecanismos de formación de una doble membrana a partir de precursores lipídicos: ya sea por algún aporte de energía o por la formación de micelas en una primera etapa y en una segunda etapa, la aplicación de energía. Imagen obtenida de: **Mozafari, M. R. (2005).**

Debido a que los esteroides se disuelven a altas temperaturas y dan estabilidad a las membranas. En este punto los liposomas no están formados, por lo tanto, son capaces de incorporar eficientemente las moléculas del fármaco. Para fármacos sensibles a altas temperaturas se obtienen buenos rendimientos en un intervalo de temperaturas de 60°C - 70°C.

El método por calentamiento se fundamenta en la interacción hidrofílica - hidrofóbica entre las moléculas lípido-lípido y lípido-agua y la entrada de energía (en forma de sonicación, homogeneización, agitación, calentamiento, etc.). Que da lugar a la formación de las moléculas lipídicas, en forma de vesículas, para conseguir un equilibrio termodinámico en la fase acuosa, tal como se observa en la **Figura 2**. El empleo de esta técnica de producción de liposomas permite posiblemente su producción a nivel industrial, y suprime la necesidad de llevar a cabo cualquier procedimiento de esterilización adicional debido al empleo de calor en la producción, reduciendo así el tiempo y el coste de la manufactura de liposomas (**Mozafari, 2005**).

2.5.- Caracterización de los liposomas.

La estabilidad de los liposomas en diferentes condiciones de almacenamiento, se pueden estimar conociendo las propiedades fisicoquímicas de las formulaciones liposomales, algunas de las cuales se mencionan a continuación:

A) Tamaño, Polidispersidad, Potencial zeta.

El tamaño y la carga superficial de un nanomaterial en este caso el liposoma, son parámetros clave que se pueden controlar durante su elaboración ya que estas características fisicoquímicas controlan el destino *In vivo* y por ende deben caracterizarse para garantizar su confiabilidad (**Shekunov et al., 2007**). Así pues, para la determinación del tamaño de partícula se utilizó la técnica de Dispersión Dinámica de la Luz (DLS) empleando un Nano Zetasizer ZS (Malvern) equipado con una fuente láser de longitud de onda de 633 nm que opera con un ángulo de dispersión a 173 °, y con el software Zetasizer (versión 7.04).

La información sobre la carga superficial del material se proporciona mediante la evaluación del potencial zeta que puede deducirse de la movilidad electroforética de las partículas. El potencial zeta depende de los parámetros fisicoquímicos, incluido el tamaño y la composición de los materiales, además del medio de dispersión, que influyen en la carga superficial (**Varenne et al., 2015; Varenne et al., 2019**).

Entonces el potencial zeta se deduce al medir la movilidad electroforética, a partir de la ecuación de Henry con la aproximación de Smoluchowski, y esto nos da como resultado los valores del potencial zeta. Con base en la información anterior obtenemos un mejor análisis de los datos proporcionados. A través de diferentes indicadores durante las mediciones como: el trazado de la gráfica de fase final, la traza del gráfico de frecuencia, la conductividad y el Informe de calidad por parte del Software proporcionan parámetros importantes para determinar la calidad de las muestras analizadas (**Varenne, 2015**).

B) Eficiencia de la encapsulación

La encapsulación de fármacos en liposomas presenta diversos problemas durante su elaboración. Debido a la alta o baja solubilidad de los fármacos en el medio, es importante conocer qué porcentaje queda dentro de los liposomas formados, ya que este porcentaje puede depender del método de preparación, la concentración de lípidos, el tamaño de los liposomas y la lamelalidad (**Xu et al., 2012**).

C) Liberación *in vitro* del fármaco.

Este análisis es simple de realizar e implica condiciones de diálisis, las muestras de liposomas se ponen en bolsas de diálisis para un peso molecular apropiado, y se agitan continuamente en un medio de disolución. El medio es usualmente una solución salina tamponada a pH 7.4, y se mantiene en condiciones cerradas de 37 °C para imitar un entorno *in vivo*. En diferentes intervalos de tiempo, se toman muestras y se analiza la liberación del fármaco, mediante un perfil de liberación por difusión de manera exponencial (**Pattni et al., 2015**).

2.6.- Fármaco: Rapamicina.

Sirolimus, también conocido como Rapamicina, tiene una actividad *antiproliferativa* e *inmunosupresora*. Este fármaco fue descubierto en 1965 a partir de muestras de suelo recolectadas en la Isla de Pascua o Rapa Nui (**V Paghda & A Schwartz, 2008**). Así pues, el principio activo se aisló del micelio presente en una cepa de estreptomicetos de esa región (*Streptomyces hygroscopicus*), el cual tenía un aspecto cristalino después de purificarse y presentaba una potente actividad anti fúngica (**Sehgal, 2003**).

Características fisicoquímicas de la Rapamicina, un sólido blanco cristalino, con un punto de fusión de 183 ° a 185 ° C. Es ampliamente soluble en metanol, etanol, acetona, cloroformo, diclorometano, tricloroetano, dimetilformida, dimetilsulfóxido; escasamente soluble en éter, y prácticamente insoluble en agua 2,6 µg / ml (**N Sehgal et al., 1975**).

Estructuralmente es una lactona macrocíclica lipófila (**Figura 3**), la cual tiene un peso de 913.6Da (**Sehgal, 2003**), tiene un coeficiente liposolubilidad de $\log PO / W = 5,77$ lo que indica una baja solubilidad acuosa (**Simamora et al., 2001**).

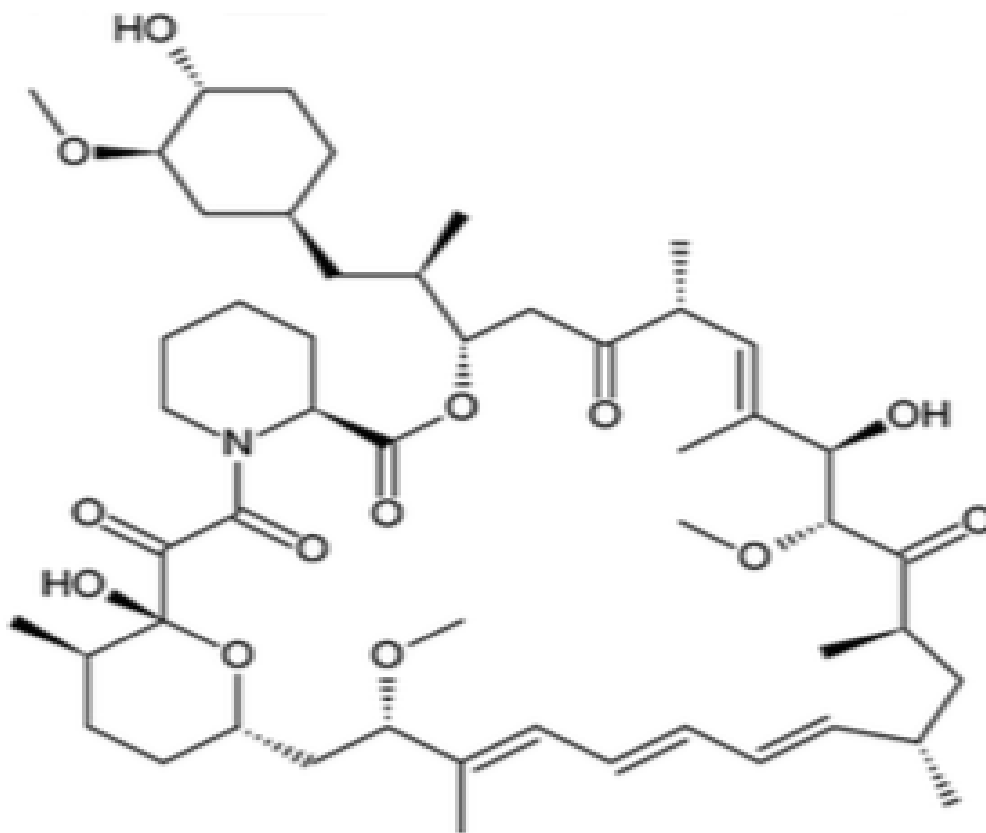


Figura 3.- Estructura química de la Rapamicina. Imagen obtenida de: **V Paghdal, K., & A Schwartz, R. (2008)**.

Esta molécula contiene una amida cíclica terciaria que exhibe actividades inmunosupresoras significativas, pero independientemente de su actividad farmacológica, la mayoría de las moléculas que contienen enlaces amida muestran isómeros *trans* y *cis* en solución debido a un doble enlace parcial entre el C-N (**Zhou Casey et al., 2004**). En un estudio realizado por (**Findlay & Radics, 1980**), revelaron que la Rapamicina, en estado sólido, se encuentra como una mezcla de dos isómeros no separables y encontraron que su relación isomérica es de aproximadamente 4: 1.

La relación se debe a la conjugación del enlace entre la amida, el grupo carbonilo y el grupo oxo, tal como se muestra en la **Figura 4**, para evitar el impedimento estérico entre el átomo de nitrógeno y el sustituyente en el carbono del carbonilo.

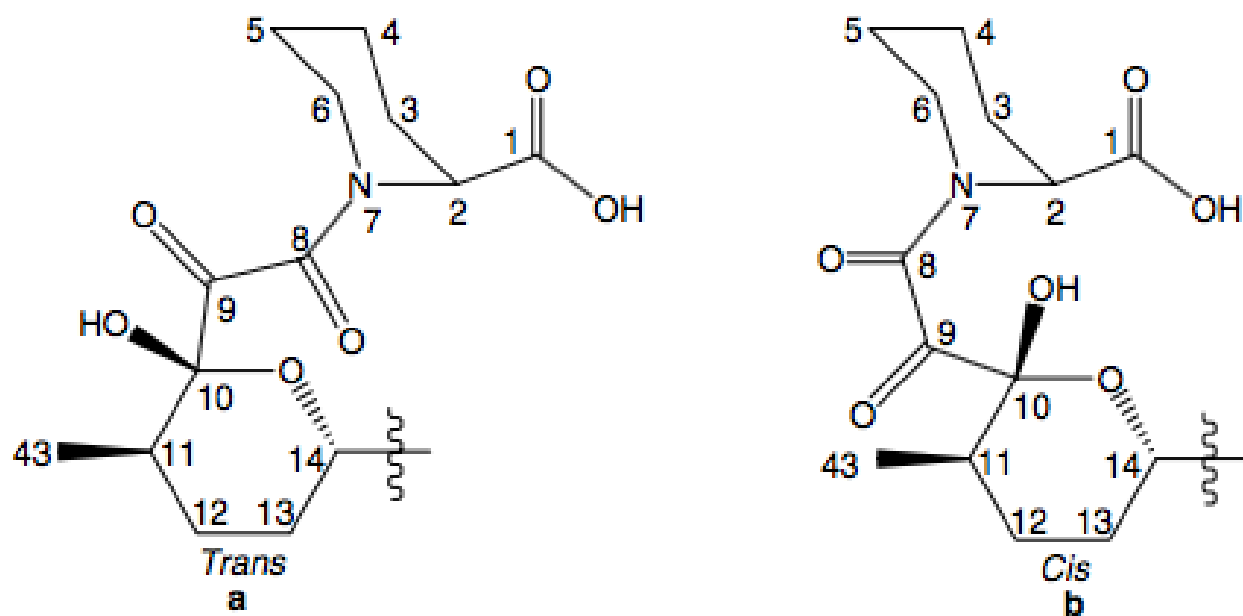


Figura 4.- Representación de los distintos tipos de isomería presentados en la Rapamicina la forma a) corresponde a la estructura *trans* y la forma b) corresponde a la estructura *cis*. Imagen obtenida y editada de: **Zhou Casey, C., Stewart Kent, D., & Dhaon Madhup, (2004)**.

En cuanto a la estabilidad química del fármaco, (Ilitchev, 2007), (A. Rouf et al., 2007) y Sun et al. inestabilidad en Buffer de Fosfatos (PBS) y Buffer Ácido (4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanosulfónico) (HEPES) y fotosensibilidad.

Su biodisponibilidad por vía oral, es del 15% y su vida media es de 57 a 62 horas, con concentraciones sanguíneas máximas alcanzadas entre 0,5 y 2,3 horas. De esta cantidad, el 95% está unido a eritrocitos y posteriormente distribuido por todo el cuerpo. Se metaboliza principalmente por la enzima citocromo 3A4 y se excreta principalmente por las heces (V Paghdal & A Schwartz, 2008). Adicionalmente, la Rapamicina presenta un mecanismo inmunosupresor único, ya que inhibe la activación y proliferación de las células T y B mediante la unión a la proteína FK de inmunofilina-12. También suprime la proliferación de células T a través de la inhibición de interleucinas específicas (IL-2, IL-4, IL-6 e IL-12), que son inducidas tanto por las vías dependientes de Ca^{2+} como independientes (Wu et al., 2016).

En la **Figura 5** se muestra un diagrama del mecanismo de acción. Debido a sus propiedades farmacológicas, la Rapamicina ha sido ampliamente utilizada en el tratamiento del rechazo inmune tras el trasplante de órganos. También ha demostrado, ser un buen tratamiento para la Esclerosis tuberosa, el Sarcoma de Kaposi, Psoriasis, y posiblemente el síndrome de Muir-Torre (Wu et al., 2016).

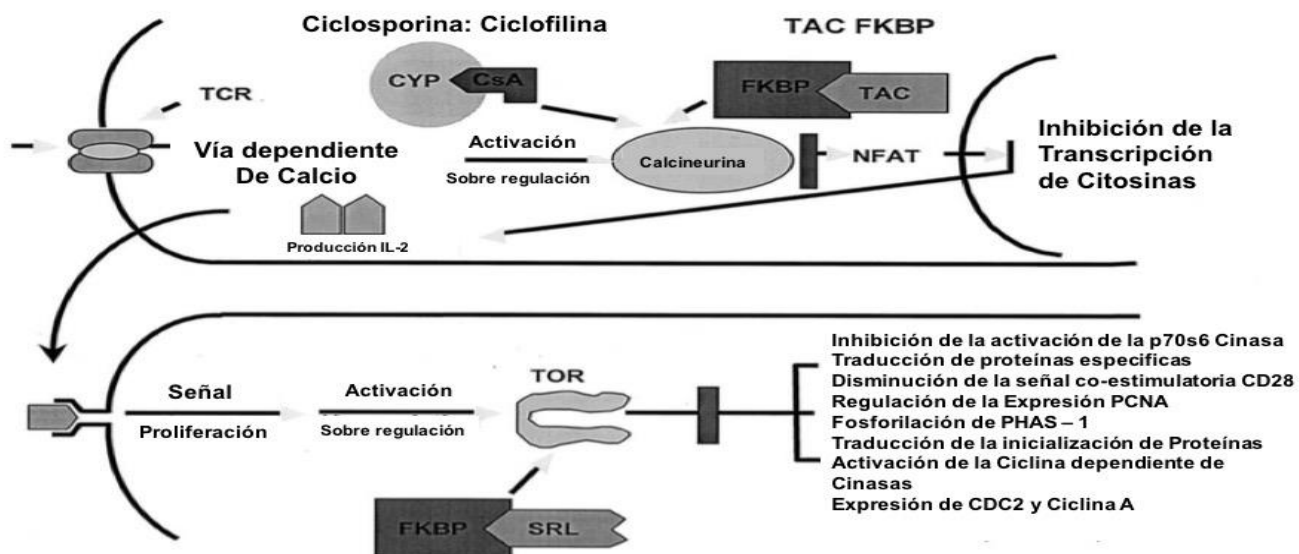


Figura 5.- La Rapamicina interactúan con una familia de proteínas de unión intracelular denominadas FKBP (proteínas de unión FK, siendo la más relevante FKBP12 presenta una interacción con la Calcineurina. La Calcineurina es una fosfatasa calmodulina-calcio-dependiente necesaria para desfosforilar el factor nuclear NFAT para la activación de las células T. La desfosforilación permite la translocación de NFAT al núcleo y la iniciación de la transcripción de IL-2. La inactivación de la calcineurina bloquea la transcripción de interleucinas. Imagen obtenida: Sehgal, S. N. (2003).

Este fármaco también ha sido empleado como tratamiento de algunas enfermedades oculares como: la uveítis posterior y el tratamiento del Síndrome de Sjögren en donde el sistema inmunológico ataca a las células del interior del ojo (**Wu et al., 2016; Linares-Alba et al., 2016**).

El tratamiento para estas enfermedades actualmente consiste en sustitutos de lágrimas y estimulantes de la producción de lágrimas como la ciclosporina A y tacrolimús que es un fármaco análogo a la Rapamicina. Sin embargo, estos tratamientos tienen como desventaja: la irritación causada por la administración, la absorción sistémica y la imposibilidad de devolver la producción de lágrimas a niveles normales. (**Berdoulay, 2005**)

En este trabajo la Rapamicina será utilizada para elaborar un nuevo sistema de administración ocular a base de una suspensión de liposomas cargados con este fármaco, para el tratamiento de las enfermedades mencionadas, con la finalidad de alcanzar una concentración terapéutica intraocular adecuada.

2.7.- Administración de fármacos oculares

El ojo es un órgano muy complejo debido a que tiene dos segmentos anatómicos principales: el segmento anterior y el segmento posterior (**Figura 6**). El segmento anterior es una parte del globo ocular en la parte trasera a la lente y se compone principalmente de la córnea, la conjuntiva, el iris, la lente, el cuerpo ciliar y la porción anterior de la esclerótica. Este último segmento además se subdivide en dos cámaras, la anterior y la posterior (ambas entre la superficie posterior de la córnea y el iris), que están conectadas por la abertura de la pupila y se rellenan con el humor acuoso secretado por procesos ciliares. Este proporciona nutrientes para la lente y la córnea, mantiene la presión intraocular y se reemplaza varias veces al día (**Janagam et al., 2017**).

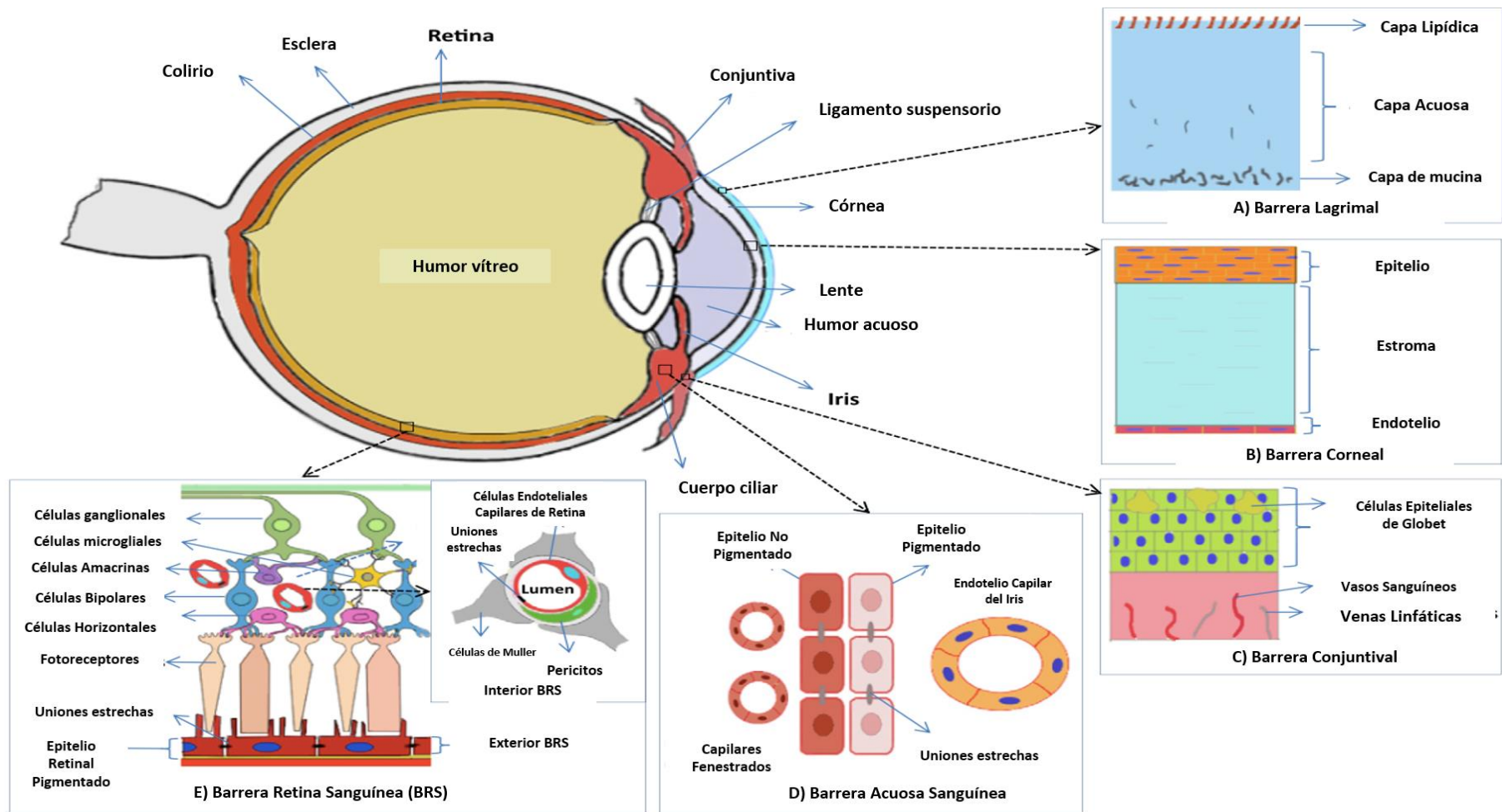


Figura 6.- Estructura del segmento anterior del ojo y barreras oculares para el suministro de fármacos. A) Barrera de película lagrimal: los componentes principales de la película lagrimal incluyen mucinas, agua y lípidos, y actúa como una barrera defensiva para el acceso de objetos extraños a la córnea y la conjuntiva. B) Barrera corneal: vascular y compuesta de tres capas principales que son epitelio (capas múltiples apiladas entre sí), estroma y endotelio (capa única). Actúa como una barrera que impide la absorción del fármaco desde el líquido lagrimal a la cámara anterior después de la administración tópica. C) Barrera conjuntival: membrana mucosa que consta de epitelio conjuntival (2-3 capas de espesor) y un tejido conectivo vascularizado subyacente. Actúa como una barrera para los medicamentos administrados tópicamente y relativamente eficiente en comparación con la barrera corneal. D) Barrera hemático-acuosa: ubicada en el segmento anterior del ojo. Formado por el endotelio capilar en el iris y el epitelio ciliar que ambos contienen uniones estrechas. La barrera es relativamente ineficiente en comparación con la barrera retiniana de la sangre y las moléculas pequeñas pueden alcanzar el humor acuoso por permeación a través de capilares fenestrados en los procesos ciliares. E) Barrera hemato-retiniana: ubicada en el segmento del posterior del ojo. Formado por el epitelio pigmentario de la retina (Barrera hemato - retina externo) y la membrana endotelial de los vasos sanguíneos de la retina (Barrera hemato - retina interno), ambos contienen uniones estrechas. Las uniones estrechas restringen la entrada de los fármacos desde la sangre (sistémica) a la retina / humor acuoso. Imagen obtenida de: **Janagam, D. R., Wu, L., & Lowe, T. L. (2017).**

La gran mayoría de enfermedades y trastornos oculares como: cataratas, ojo seco, anormalidades congénitas y del desarrollo, enfermedades inflamatorias, enfermedades infecciosas, enfermedades hereditarias y degenerativas, glaucoma, tumores, lesiones, traumatismos y manifestaciones oculares de enfermedades sistémicas ocurren en el segmento anterior. Estas se tratan con mayor frecuencia mediante el uso de gotas para los ojos o ungüentos, no obstante la eficacia de estos tratamientos es baja debido a que el ojo está bien protegido por varios mecanismos (**Figura 6**) como: parpadeo, lagrimación inducida, recambio de lágrimas, barreras conjuntivales y el drenaje naso - lacrimal que causa la eliminación rápida de sustancias en la superficie del ojo y de la córnea, además de formar una barrera físico-biológica (**Bucolo et al., 2012; Janagam et al., 2017**). Aunque este tipo de terapias son más favorables que las terapias a través de la administración de fármacos orales o intravenosos para tratar las enfermedades oculares. Esto se debe a que el ojo tiene menos vasos sanguíneos y un menor flujo de sangre, por lo que la cantidad de fármacos que se eliminan mediante la administración ocular local, es mucho menor que a través de la administración sistémica, además de que existe una barrera sanguínea, que limita la penetración del fármaco desde la circulación sistémica hacia el segmento anterior del ojo, tal como lo reporta (**Janagam et al., 2017**).

Para que los fármacos lleguen al segmento anterior del ojo existen cuatro vías de administración ocular:

1. tópica,
2. intracameral,
3. subconjuntival
4. sistémica.

Dependiendo de las vías de administración, es necesario atravesar una o más barreras oculares para que lleguen a los sitios de acción en el segmento anterior del ojo. En la **Tabla 1** se mostrará las ventajas y limitaciones (**Janagam et al., 2017**) para estas cuatro rutas de administración.

Tabla 1.- Rutas de administración para aplicar medicamentos oculares al segmento anterior del ojo.

Ruta de administración	Ventaja	Limitante
Tópica	Administración simple, conveniente, autoadministrable y no invasiva; Evitando la barrera sangre-acuosa; sin metabolismo de primer paso.	Corto tiempo de contacto del medicamento en la superficie ocular; baja eficiencia y baja biodisponibilidad debido a barreras corneales y conjuntivales, eliminación de fármaco por medio de lágrimas.
Intracameral	Evitar la córnea, la conjuntiva y la barrera sanguínea acuosa; sin metabolismo de primer paso; alta eficacia; alta biodisponibilidad.	Usualmente necesita reconstitución de fármaco; la dosis debe ser correcta y la formulación debe ser la adecuada.
Subconjuntival	Administración fácil y mínimamente invasiva; evitando la córnea y la barrera sangre-acuosa; sin metabolismo de primer paso; buena eficacia; buena biodisponibilidad; liberación sostenida	El principio activo se puede perder por medio de la sangre conjuntival y o por una depuración linfática.
Sistémica	Conveniente para administrar una gran dosis de fármaco; no invasivo y evita la córnea	Baja biodisponibilidad debido a la absorción sistémica; pérdida en la barrera de sangre-acuosa y barrera sangre - retina; metabolismo de primer paso

Para las limitantes mostradas en la **Tabla 1**, se ha propuesto el uso de nanopartículas como sistemas oftálmicos de administración que puedan controlar la liberación del fármaco, mantener niveles terapéuticos durante un período prolongado de tiempo y aumentar la biodisponibilidad. Otra ventaja, es que tienen una mayor penetración corneal y un menor número de inyecciones intraoculares para las enfermedades oculares en el segmento anterior. Las nanopartículas son sistemas poliméricos portadores del principio activo con un tamaño que varía de 10 nm a 1 μm . Estas pueden ser: nanoesferas, nanocápsulas, liposomas y sistemas micelados (**Bucolo et al., 2012; Janagam et al., 2017**). El éxito de los estos sistemas para la administración de fármacos oculares puede depender de una optimización de las propiedades lipófilas-hidrófilas del sistema polímero-fármaco y la optimización de las tasas de biodegradación. Donde la liberación del fármaco dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la molécula, el polímero utilizado para crear a las nanopartículas y del proceso de fabricación de estos sistemas (**Bucolo et al., 2012**). Además de su diseño y el proceso de fabricación, debe ser evaluado por tres parámetros farmacocinéticos:

1. **C_{max}**, la concentración máxima de fármaco alcanzada en el sitio ocular;
2. **T_{max}**, el tiempo requerido para alcanzar la **C_{max}**
3. **AUC**, el área bajo la curva. Es la concentración de fármaco en el tejido ocular frente a la curva de tiempo, y son los parámetros más utilizados para describir la biodisponibilidad ocular.

Los modelos farmacodinámicos deben de calificar las respuestas oftálmicas como la miosis y la midriasis, la inhibición del reflejo de la luz y la presión intraocular para comprobar la efectividad del suministro de los fármacos oculares a través de estos sistemas nanoparticulados (**Worakul & Robinson, 1997**).

2.8.- Reología.

El término Reología fue acuñado por el profesor Bingham De Lafayette (1929), que significa: “el estudio del flujo y la deformación de la materia”. Esta definición fue aceptada cuando se fundó la Sociedad Americana de Reología en 1929 (**Jobling, 2007**). Aunque este término fue usado en la antigua Grecia por el filósofo Heráclito al decir “Πάντα ῥεῖ” (Panta rei) o “todo fluye” (**Osswald & Rudolph, 2015a**). La Reología es una herramienta para comprender las propiedades mecánicas del material al aplicar una fuerza de deformación, mediante la construcción de modelos que describen cualitativamente o cuantitativamente los resultados experimentales del comportamiento mecánico (**Lubansky, 2011**). El objetivo principal de la Reología consiste en establecer la relación entre las fuerzas aplicadas y los efectos reométricos inducidos por estas fuerzas en un punto, la forma matemática de esta relación se llama la ecuación reológica del estado o la ecuación constitutiva, y se usan para resolver problemas macroscópicos relacionados con la mecánica de materiales, ya que dan un modelo físico de lo que ocurre en la realidad. Además, consiste en establecer relaciones entre las propiedades reológicas del material y su estructura molecular (composición), porque está relacionado con la estimación de la calidad de los materiales. La reología es una ciencia multidisciplinaria que tiene muchas relaciones con la física y la química, así como muchas aplicaciones en tecnología, ingeniería de materiales y muchos campos de ciencias biológicas, tal como se observa en la **Figura 7**. Además, la conexión de la Reología con la física consiste en explicar y predecir las propiedades reológicas basadas en la estructura de un cuerpo. La conexión entre la química consiste en la correlación directa entre parámetros químicos (masa molecular y distribución de masa molecular, estructura química, interacciones intermoleculares, etc.) y propiedades reológicas; por lo tanto, es posible sintetizar materiales con propiedades deseables.

En resumen, la Reología es una ciencia que se ocupa de las propiedades mecánicas de diversos productos, entre ellos los farmacéuticos. Por lo tanto, busca lograr sus objetivos mediante modelos que representan las principales peculiaridades del comportamiento al flujo de estos materiales (**Malkin & Isayev, 2017 y Faustino et al., 2015**).

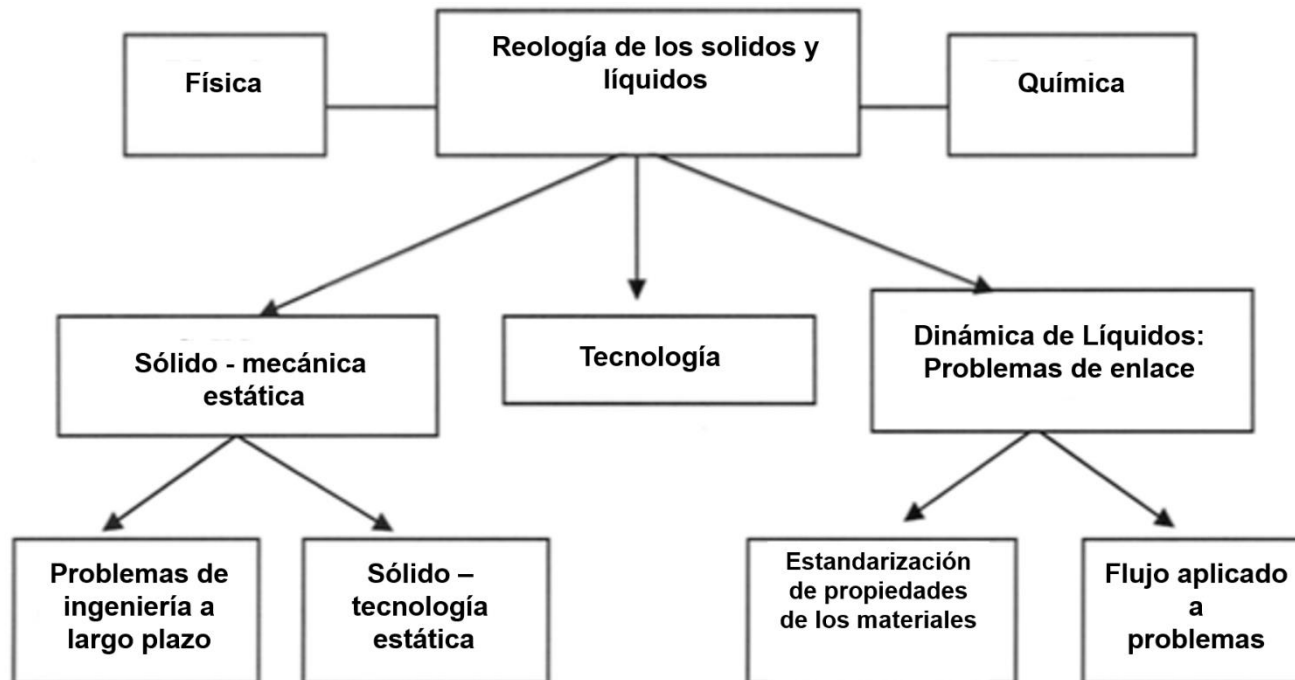


Figura 7.- La Reología como ciencia interdisciplinaria; su lugar entre otras ciencias. Imagen obtenida de: Malkin, A. Y., & Isayev, A. (2017).

2.8.1.-Estado sólido y líquido desde la Reología.

Sin embargo, reconocemos a un líquido o a un sólido por su respuesta a bajos esfuerzos, es decir, si aplicamos una fuerza en un amplio espectro de tiempo o frecuencia, por medio de aparatos reológicos, podemos observar propiedades similares de los líquidos en sólidos y propiedades sólidas en líquidos. Por lo tanto, un material dado, puede comportarse como un sólido o un líquido dependiendo de la escala de tiempo del proceso de deformación aplicado. Esta escala de tiempo es conocida como: 'número de Deborah', la cual fue propuesta en 1964 por Marcus Reiner, del Technion en Haifa, es un número adimensional que captura mejor el efecto de la escala de tiempo del proceso sobre el comportamiento al flujo de un material.

El número de Deborah se define por la siguiente ecuación:

$$De = \tau/T \tag{1}$$

Donde: T es un tiempo característico del proceso de deformación observado y τ es el tiempo característico del material.

El número de Deborah varía entre 0.1, para la baja tasa de deformación, y de 10, para alta tasa de deformación. El tiempo τ es infinito para un sólido elástico Hookeano y cero para un líquido viscoso newtoniano (**Jobling, 2007; Osswald & Rudolph, 2015b**).

Así, para números altos de Deborah el comportamiento de un material es similar a un sólido y a números bajos de Deborah el comportamiento es más similar a un líquido. Por lo tanto, un sólido es un material que no cambiará instantáneamente su forma cuando se somete a una deformación y un líquido es un material que cambiará su forma (es decir, fluirá) cuando se somete a una deformación.

El término viscoelasticidad, se utiliza para describir el comportamiento que se encuentra entre los extremos de una respuesta elástica de Hooke y el comportamiento viscoso newtoniano (**Jobling, 2007**).

Existen dos modelos matemáticos simples que se describen en las siguientes ecuaciones Una es la ley de Newton de líquidos:

$$\dot{\gamma} = \frac{\sigma}{\eta} \quad (2)$$

Y otra es la ley de sólidos de Hooke:

$$\varepsilon = \frac{\sigma_E}{E} \quad (3)$$

Tenemos que ε representa la deformación, $\dot{\gamma}$ es la velocidad de deformación cortante, σ es el esfuerzo cortante, σ_E esfuerzo de tensión, E - módulo elástico (o Young), y η es la viscosidad.

De acuerdo con **Malkin & Isayev, 2017** las principales características de estas leyes son:

- Dependencia lineal de ε (σ) para sólidos y dependencia lineal de $\dot{\gamma}$ (σ) para líquidos.
- Ausencia de efectos de tiempo en la dependencia de ε (σE) para sólidos; deformación estrictamente correspondiente al estrés y cambios inmediatamente después de la evolución del estrés.
- Ausencia de una deformación fija de líquidos porque en cualquier fuerza de deformación, esta incrementa linealmente con el tiempo a una fuerza constante.

- La presencia de una sola constante que caracteriza las propiedades del material: la viscosidad, η , para líquidos y módulo de elasticidad, E , para sólidos (**Figura 8**).

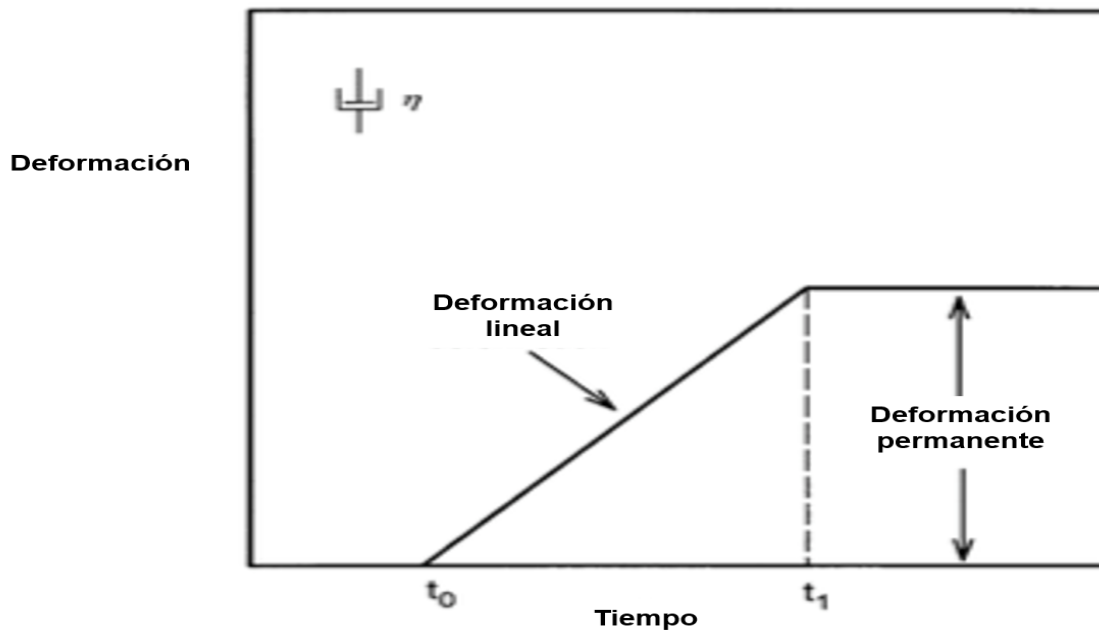


Figura 8.- La respuesta a la deformación de un fluido newtoniano bajo una tensión. Imagen obtenida de: **Darvell, 2018; Faustino et al., 2015; Kulkarni & Shaw, 2016.**

2.8.2.- Viscosidad.

El comportamiento de un líquido está intrínsecamente asociado con su viscosidad, una propiedad que describe su resistencia al flujo bajo un esfuerzo aplicado. La viscosidad surge de la fricción entre capas adyacentes de un fluido que se mueven a diferentes velocidades. El gradiente de *velocidad de cizalla*, en un flujo laminar, es un indicador de que tan rápido fluye el líquido cuando se le aplica un *esfuerzo de corte* (**Hayes, 2014**).

El *esfuerzo de cizalla* o *de corte*, se expresa en unidades de presión (pascal, Pa) y las unidades de la *velocidad a la cizalla* son s^{-1} . En el SI, la viscosidad tiene unidades de $Pa \cdot s$. ($1 Pa \cdot s = 1 kg \cdot m^{-1} \cdot s^{-1}$). En el sistema cgs (sistema centímetro-gramo-segundo) estas unidades son los poises ($1 P = 0.1 Pa \cdot s$) aunque la viscosidad se expresa comúnmente en centipoises ($1 cP = 0.01 P = 1 mPa \cdot s$) ya que $1 cP$ es la viscosidad del agua a $20.2^\circ C$.

En el tipo flujo más simple, el esfuerzo cortante σ es directamente proporcional a la velocidad de deformación cortante $\dot{\gamma}$, y la constante de proporcionalidad es la viscosidad η del fluido, de acuerdo con la ley de Newton para el flujo en la ecuación 2 (Faustino et al., 2015). Un fluido que cumple con la **ecuación 2** se describe como *newtoniano*, porque muestra flujo puro, es decir, cuando la deformación aumenta constantemente mientras se aplica un esfuerzo, no habrá un cambio cuando deje de ser aplicado. Cuando la viscosidad es mayor (es decir, el valor de η), menor es la pendiente de su curva de deformación frente al tiempo, como se muestra en la **Figura 9** (Darvell, 2018). La velocidad de deformación de un cuerpo viscoso está determinada por la definición del coeficiente de viscosidad, por lo tanto, el gradiente de velocidad es fijo. La viscosidad de muchos materiales varía en función de la *velocidad de cizalla o de corte simple*. En otras palabras, la viscosidad observada depende de qué tan rápido se deforme el material.

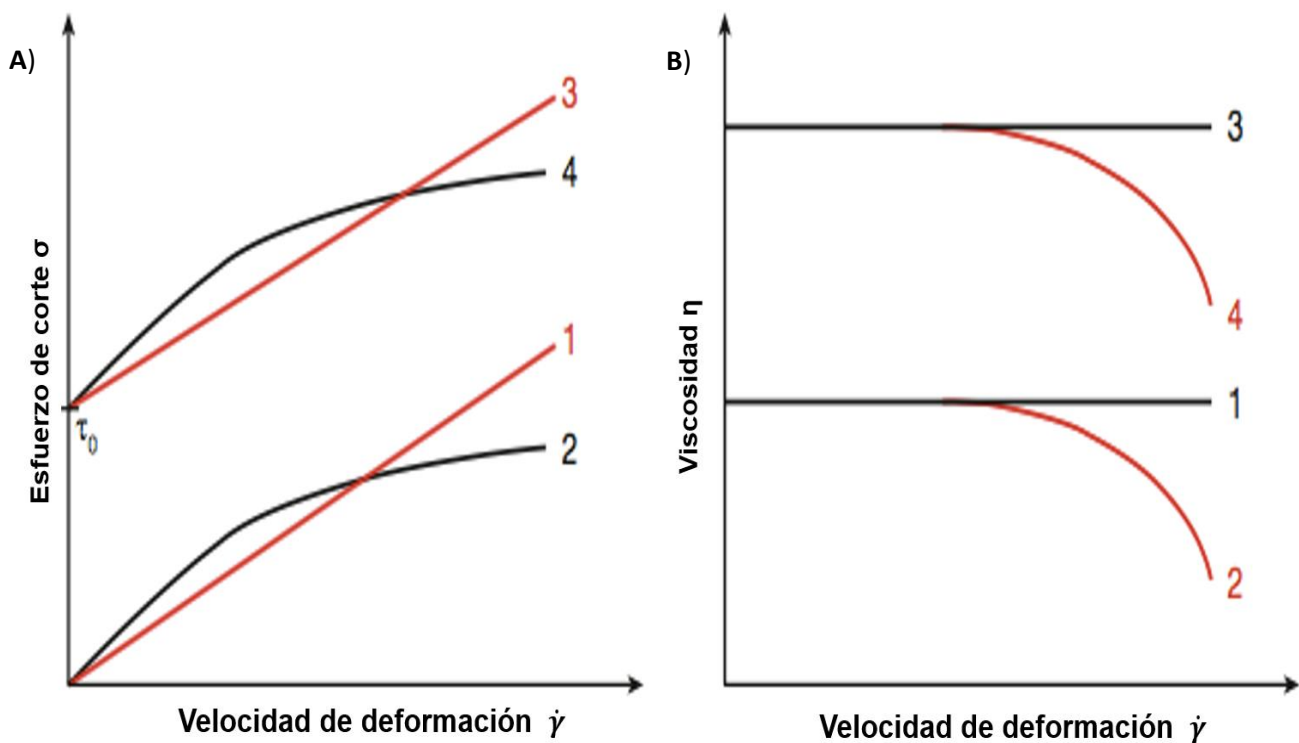


Figura 9.-Curvas de fuerza cortante (A) y curvas de viscosidad (B) para diferentes fluidos; (1) Fluido Newtoniano, (2) Fluido adelgazante al flujo. (3) Fluido Newtoniano con tensión de fluencia τ_0 , (4) Fluido adelgazante al flujo con tensión de fluencia τ_0 . Imagen obtenida de: Osswald, T., & Rudolph, N. (2015b).

2.8.3.- Modelos constitutivos (Ley de la potencia).

Algunos modelos fenomenológicos han sido propuestos en la literatura. Estos varían en su forma y en el número de parámetros necesarios para adaptarlos a los resultados experimentales. Estos modelos tienen dos propósitos generales: obtener soluciones analíticas para diferentes escenarios de flujo encontrados en el procesamiento de materiales y permitir el almacenamiento de los datos medidos con un número mínimo de parámetros. El comportamiento del flujo de diferentes muestras requiere del uso de diferentes modelos; algunas muestras pueden ser adelgazantes al flujo, otras pueden experimentar un límite elástico o pueden tener ambos comportamientos (**Figura 10**). Al final solo se busca el que mejor se ajuste a los datos de viscosidad medidos, y al mismo tiempo el que sea apropiado para una aplicación específica (proceso) de acuerdo al tipo de flujo (**Osswald & Rudolph, 2015b**).

Una relación empírica simple es el modelo de la **Ley de la potencia** propuesto por Ostwald y de Waele, es un modelo simple que representa con precisión la región de adelgazamiento al flujo en la curva viscosidad a la cizalla simple, pero omite la meseta newtoniana observada a velocidades de deformación pequeñas, ver **Figura 10**. Este modelo se puede escribir como:

$$\sigma = K\dot{\gamma}^n \quad (4)$$

En donde, **K** es el índice de consistencia y **n** es el índice de shear - thinning (exponente del modelo de la ley de la potencia).

Un diagrama log-log de σ vs $\dot{\gamma}$ da una pendiente **n**; donde **n < 1** para materiales adelgazantes al flujo y **n > 1** para materiales engrosantes al flujo y **n = 1** para Fluidos Newtonianos (**Kulkarni & Shaw, 2016; Osswald & Rudolph, 2015b**).

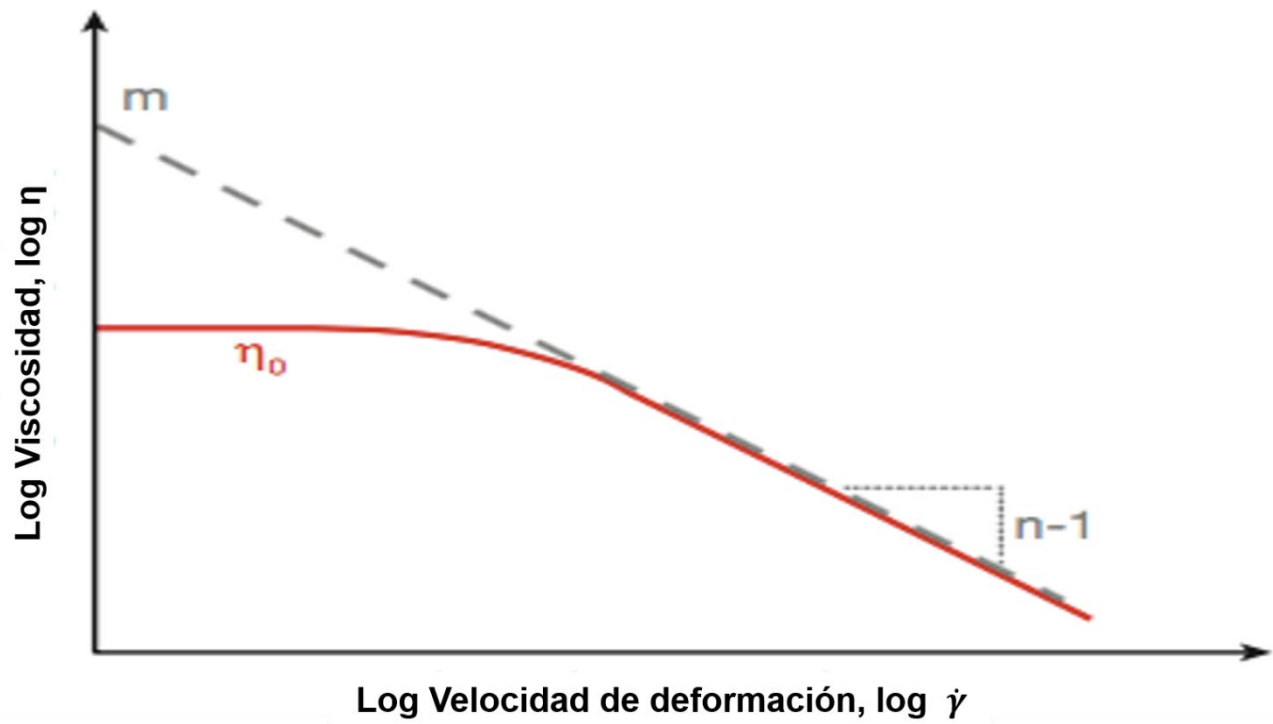


Figura 10.- Curva de viscosidad (línea continua) y aproximación según el modelo de la Ley de Potencia (línea punteada). Imagen obtenida de: Osswald, T., & Rudolph, N. (2015b).

2.8.4.- Clasificación Reológica con base en la curvatura del flujo.

De acuerdo a la clasificación reológica en base a una curva del flujo, es decir, la representación del **esfuerzo de corte** frente a la **velocidad de cizalla (flujo)**, describen a los fluidos newtonianos **Figura 11c.** que muestran una relación lineal mientras que los fluidos que presentan un comportamiento no newtoniano se describen la **Tabla 2.**

Tabla 2.- Clasificación Reológica de fluidos No Newtoniano de acuerdo a Darvell, (2018); Faustino et al., (2015).

	Tipo de Fluido	Definición	Ejemplo
Tiempo independiente	Shear – thinning o adelgazante	La viscosidad disminuye con el aumento de la velocidad de cizalla.	Sangre, Concentrado de frutas, shampoo, cremas y lociones para el cuerpo.
	Shear – thickening o engrosaste	Aumento de la viscosidad al incrementar la velocidad de cizalla.	Suspensiones concentradas, Almidón de maíz, mezclas de agua y arena.
	Plástico	Son materiales que presentan una propiedad sólido elástica (yield stress) y viscosa, los cuales resisten valores de velocidad de deformación extremos.	Kétchup, pasta de dientes, cremas para manos.
Tiempo dependientes	Tixotrópicos	Estos fluidos muestran un cambio en la viscosidad con el tiempo cuando se exponen a condiciones de velocidad de cizallamiento constante. Los fluidos tixotrópicos Figura 11a muestran una disminución de la viscosidad; los fluidos reopécticos Figura 11b. exhiben un aumento en la viscosidad.	Suspensiones de arcilla, grasas, tintas de impresoras y pinturas.
	Reopécticos		Dispersiones concentradas de látex, yesos.

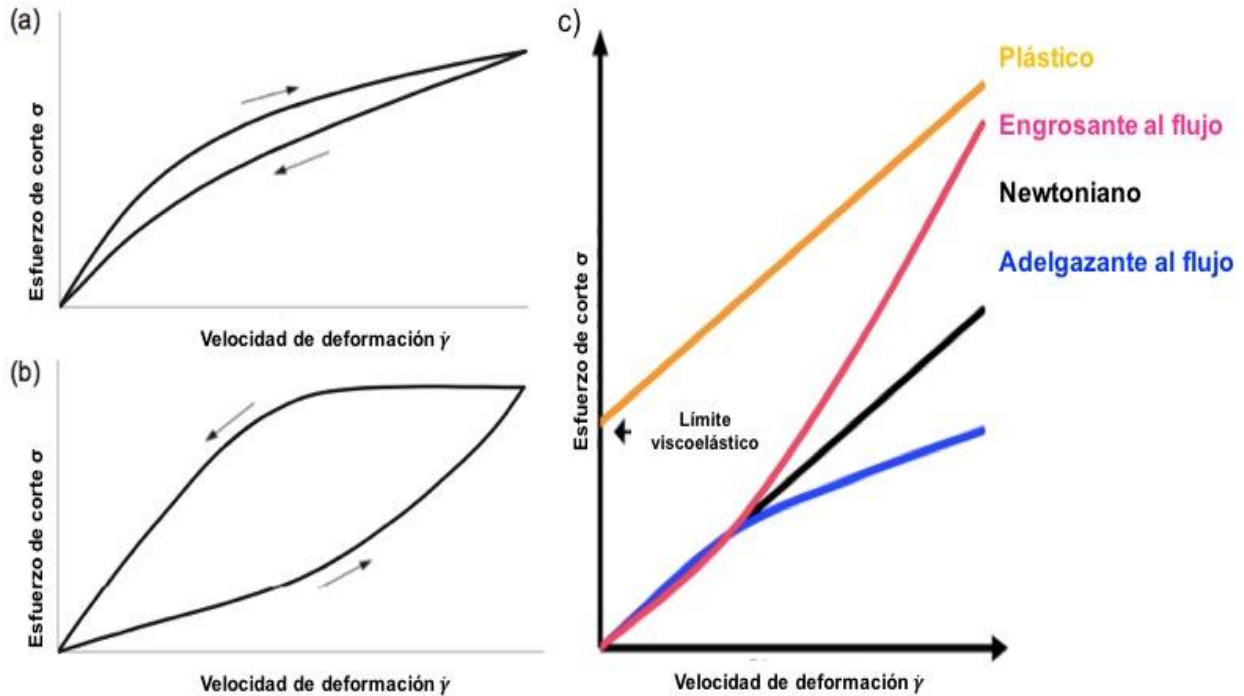


Figura 11.- Curvas de flujo / hysteresis loops. (a) material tixotrópico, (b) material reopéctico y c) Curvas de flujo para fluidos Newtonianos y No Newtonianos. Imagen obtenida de: **Faustino, C., Bettencourt, A. F., Alfaia, A., & Pinheiro, L. (2015) y Kulkarni, V. S., & Shaw, C.(2016).**

2.8.5.- Pruebas oscilatorias.

Dentro de las pruebas, están las de flujo oscilatorio, que permiten determinar las propiedades viscoelásticas de una muestra en función de la escala de tiempo. En esta prueba, la respuesta estructural de la muestra se evalúa a oscilaciones pequeñas de deformación, en un rango de frecuencias. Para el análisis, los módulos de almacenamiento y pérdida se grafican contra la frecuencia.

El módulo (G' o G'') que es dominante en una frecuencia particular, muestra si el material pudiera ser elástico o viscoso, respectivamente, en una escala de tiempo. Si los módulos elásticos y viscosos se cruzan, esta frecuencia de cruce marca la transición del comportamiento viscoso al elástico y viceversa. Así pues, las pruebas oscilatorias de pequeña amplitud de deformación son no destructivas, en donde se aplica una onda de esfuerzo sinusoidal que distorsionan la estructura del material, y miden la onda de esfuerzo resultante.

Por lo que, si un material es puramente elástico **Figura 12a**, la diferencia de fase entre las ondas de esfuerzo y deformación es 0° (es decir, las ondas de esfuerzo y deformación están en fase), por otro lado, si un material es puramente viscoso, la diferencia de fase es de 90° (es decir, el esfuerzo y la deformación están desfasados). La mayoría de los materiales son viscoelásticos y, por lo tanto, tienen una diferencia de fase entre estos dos extremos **Figura 12b**.

Por lo que, la diferencia de fase, junto con las amplitudes de las ondas de esfuerzo y deformación proporcionan información relacionada con las contribuciones viscosas y elásticas a la estructura del material, dentro del rango viscoelástico lineal del material (Kulkarni & Shaw, 2016). De acuerdo con **Kulkarni & Shaw, (2016)** y **Hayes, (2014)** se usan varios tipos de experimentos de oscilación, incluido el torque (esfuerzo), barrido de frecuencia, barrido de tiempo y barrido de temperatura. Los parámetros obtenidos son: módulo complejo o módulo de deslizamiento dinámico (G^*), módulo elástico o almacenamiento (G'), módulo viscoso o pérdida (G''), ángulo de fase (δ) y tangente del ángulo de fase ($\tan\delta$).

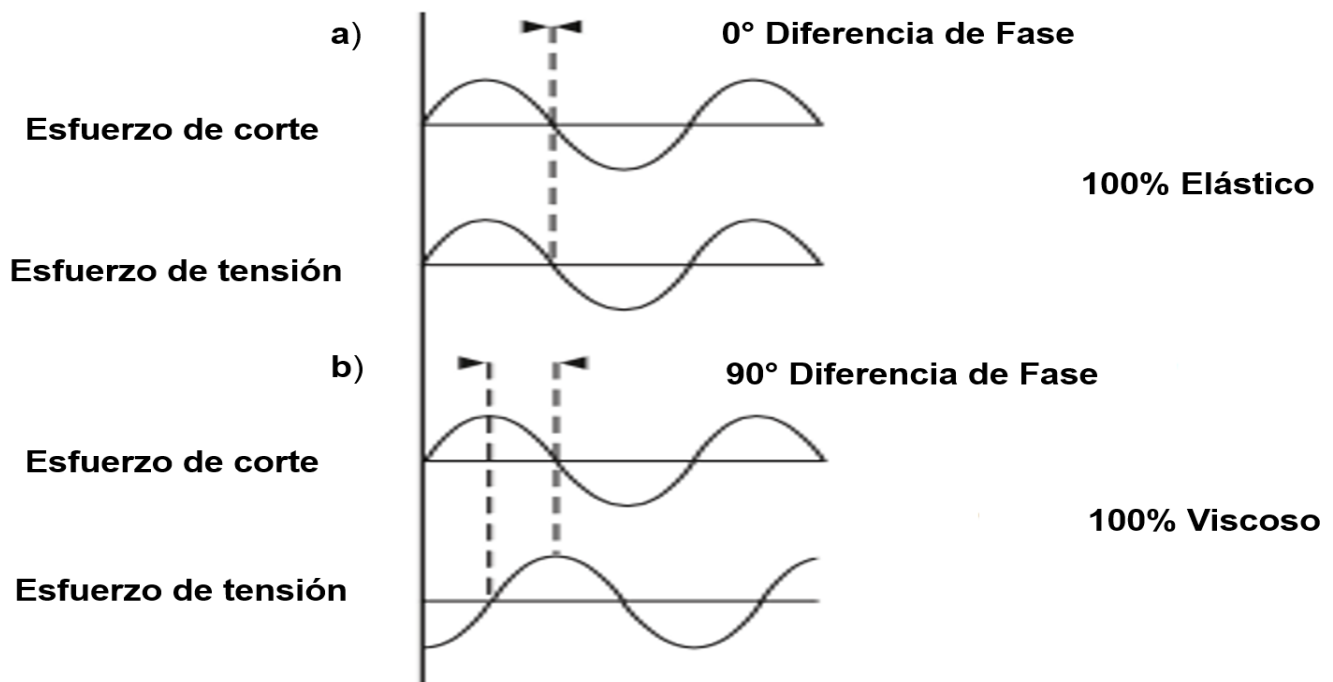


Figura 12.- Tensión Oscilatoria/ ondas de tensión: materiales puramente elásticos y viscosos. Imagen obtenida de: **Kulkarni, V. S., & Shaw, C. (2016)**.

- **Módulo complejo o Módulo de deslizamiento dinámico (G^*).** - Es una medida de la resistencia a la deformación de la muestra.
- **Módulo elástico (o almacenamiento) (G').** - Es una medida de la energía que se almacena en un material en el que se ha impuesto una deformación. Este módulo es la proporción de la rigidez total (el módulo complejo) de un material que es atribuible a la deformación elástica.

$$G' = G^* \cos \delta \quad (5)$$

- **Módulo viscoso (o pérdida) (G'').** - Es una medida de la energía que se disipa en un material sobre el que se ha impuesto la deformación. Este módulo es la proporción de la rigidez total de un material que es atribuible al flujo viscoso, más que a la deformación elástica.

$$G' = G^* \cos \delta \quad (6)$$

- **Ángulo de fase (δ).** - Es la diferencia de fase entre las curvas de esfuerzo y deformación en una prueba oscilatoria, y es una medida del grado de estructura elástica ("gel") dentro de un material, Una caída en el módulo complejo durante el proceso de producción se corresponde con un aumento en el ángulo de fase, lo que indica que hay una ruptura de la estructura elástica interna en la muestra a medida que aumenta la tensión impuesta.
- **Tangente del ángulo de fase ($\tan \delta$).** - Es la relación del módulo viscoso (G'') con el módulo elástico (G'), y es un cuantificador útil de la presencia y el grado de elasticidad en un fluido. Los valores $\tan \delta$ inferiores a la unidad indican un comportamiento elástico dominante (es decir, similar a un sólido), y valores mayores que la unidad indican el comportamiento de viscosidad dominante (es decir, similar a un líquido).

$$\tan \delta = G''/G' \quad (7)$$

- **Oscillation Stress Sweep** (Barrido de estrés oscilatorio). – En esta prueba, la muestra se somete a un corte oscilatorio de pequeña amplitud (es decir, a la derecha, luego a la izquierda). En las primeras etapas de la prueba, el estrés es suficientemente bajo para preservar la estructura. En la región de meseta (región viscoelástica lineal) proporciona información relacionada con la resistencia del material a la deformación (la rigidez del producto). A medida que avanza la prueba, cuando el estrés aplicado aumenta, provoca un cambio sobre la estructura, disminuyendo la elasticidad (módulo de almacenamiento, G') y la rigidez (módulo complejo, G^*), pero aumenta el módulo de pérdida (G'') **Figura 13**.

El límite elástico es una medida útil del estrés requerido para inducir el flujo en un producto. De hecho, cuando se exponen a tensiones por debajo del límite elástico (velocidad muy baja –flujo progresivo), fluyen materiales viscoelásticos como cremas, lociones y ungüentos. El punto en el que los módulos elásticos y viscosos se cruzan, marcan la transición de la región de la meseta (elástica) "sólida" a la región "fluida" (viscosa).

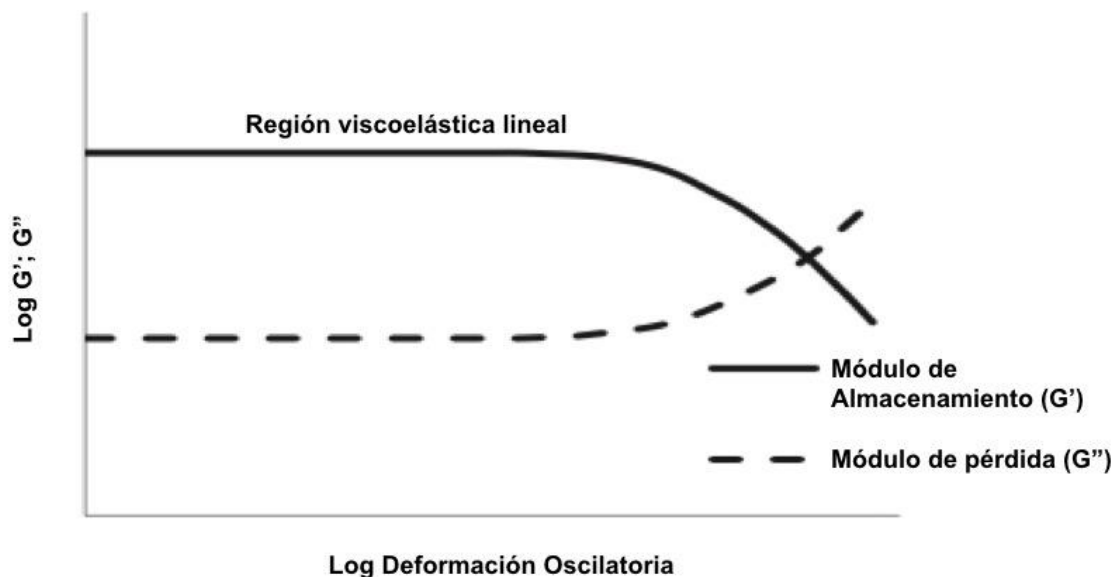


Figura 13.- Barrido de Frecuencia Oscilatoria. Imagen obtenida de: **Kulkarni, V. S., & Shaw, C. (2016).**

OBJETIVO GENERAL.

Estudiar la respuesta reológica de diferentes dispersiones de liposomas cargados con Rapamicina, elaborados a partir de diferentes marcas comerciales de lecitina de soya y crioprotectores, con el fin de evaluar la estabilidad mecánica al flujo para sus posibles aplicaciones farmacéuticas.

Objetivos Particulares.

- ❖ Caracterizar fisicoquímicamente las diferentes formulaciones liposomales propuestas.
- ❖ Caracterizar las propiedades mecánicas al flujo de distintos tipos comerciales de lecitina (fosfolípido), y con los crioprotectores usados en la fabricación de liposomas.
- ❖ Determinar el comportamiento reológico de distintas formulaciones de liposomas.
- ❖ Determinar el efecto del fármaco sobre su comportamiento mecánico al flujo.
- ❖ Realizar los estudios de disolución a nivel *in vitro* de las formulaciones para determinar la cinética de liberación del fármaco, y el ajuste a modelos de difusión.

HIPÓTESIS.

Las formulaciones de liposomas, fabricadas con distintos tipos de lecitinas (fosfolípidos) y crioprotectores tendrán características morfológicas de doble membrana definidas, mecánicamente estable al flujo, y con una liberación prolongada.

3.- DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA.

En la **Tabla 3**, se muestra una serie de formulaciones liposomales optimizadas que se obtuvieron a partir de un diseño de experimentos *Taguchi*. Propuesto por **Tonix Aburto, Luis Ángel (2017)** donde se variaron los factores experimentales: tipo de crioprotector y marca de lecitina.

Tabla 3.- Formulaciones liposomales optimizadas, con sus respectivas condiciones de fabricación y cantidades propuestas para 25 mL de formulación.

Formulación	Cantidad de colesterol (mg)	Cantidad de fosfolípido (mg)	Cantidad de Crioprotector (mg)	Marca de Fosfolípido	Tipo de Crioprotector	Tiempo de calentamiento (min)	Temperatura de Calentamiento (°C)	Agitación (RPM)	Tiempo de sonicación (min)
1	14.3	67.5	2422.2	Metarin	Trehalosa	60	80	750	60
2	14.3	67.5	1163.2	Metarin	Manitol	60	80	750	60
3	14.3	67.5	2183.2	Metarin	Sacarosa	60	80	750	60
4	14.3	67.5	2422.2	Sigma	Trehalosa	60	80	750	60
5	14.3	67.5	1163.2	Sigma	Manitol	60	80	750	60
6	14.3	67.5	2183.2	Sigma	Sacarosa	60	80	750	60
7	14.3	67.5	2422.2	S.micro	Trehalosa	60	80	750	60
8	14.3	67.5	1163.2	S.micro	Manitol	60	80	750	60
9	14.3	67.5	2183.2	S.micro	Sacarosa	60	80	750	60

3.1.- Materiales.

Para la preparación de liposomas, el Sirolimus (Rapamicina) fue donado por Laboratorios Santgar (Henan Legend Wealth Trading Co). Fosfato monobásico de sodio Monohidratado; Fosfato dibásico de sodio Anhidro; Hidróxido de sodio y Biftalato de potasio (J. T. Baker). El 2-Phenoxyethanol; Lecitina de soya grado reactivo y grado microbiológico; Sacarosa; Trehalosa dihidratada; Cloruro de hierro (III); Estándar de Rapamicina (Sigma-Aldrich USA). La lecitina de soya grado alimenticio, Metarin (Ampher Foods). El Colesterol grado técnico (Química Meyer). El Manitol (Química USP de México). El Tiocianato de amonio (Merck Chemicals, USA). El Sulfato de zinc heptahidratado (HYCEL de México). Las placas cromatográficas empleadas son TLC plastic sheets Silica gel 60 F₂₅₄ precoated 20 X 20 cm layer thickness 0.2 mm (Merck; Frankfurt). El Nitrógeno, gaseoso de alta pureza (N₂) (Infra Group.). Los disolventes empleados fueron de grado reactivo (J. T. Baker y Sigma-Aldrich, México). El agua destilada fue obtenida de CONQUIMEX y sometida a un proceso de desionización por medio de un sistema Barnstead Nanopure Diamond con calidad de 18.2 MΩ.

3.2.- Preparación de Liposomas.

3.2.1.- Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS).

Se disolvió la cantidad necesaria de Fosfato dibásico de sodio Anhidro y Fosfato monobásico de sodio Monohidrato en agua destilada y desionizada para obtener una solución 0,01 M. El pH se ajustó a 7,45 mediante la adición de una solución de NaOH 0.5 M con la ayuda de un potenciómetro (Orion 3 star; Electron corporation, USA).

3.2.2.- Preparación de Liposomas por el Método de Calentamiento.

De acuerdo a las formulaciones propuestas en la **Tabla 3** se pesó en una balanza analítica (Adventurere OHAUS) la cantidad de fosfolípido y colesterol, como ahí se indican. Estos se colocan en un matraz de bola y se agrega 10 mL de PBS. Esta mezcla es dispersada durante una 1 hora en una parrilla de agitación (RT – Elite; Barnstead Thermolyne) a temperatura ambiente de 25 °C y con una velocidad de agitación de 750 rpm (modelo y tipo de parrilla de agitación).

Después se pesa la cantidad de crioprotector de cada formulado con base en la **Tabla 3** y 25 mg (± 0.01 mg) de Rapamicina. En un matraz volumétrico de 25 mL, se coloca el crioprotector, la Rapamicina, 1 mL de metanol y 250 μ L de 2-Phenoxyethanol, llevar a la marca de aforo con PBS, para obtener una concentración de 1.0 mg/mL de fármaco. Esta disolución es transvasada nuevamente al matraz de bola, se sella con un tapón de hule y se satura con N₂, con la ayuda de una aguja de jeringa, durante un minuto para desplazar el Oxígeno que se encuentra dentro del matraz. Posteriormente la mezcla es colocada en una parrilla de calentamiento con termopar (Ceramag Midi; IKA Works USA) bajo las condiciones de calentamiento de la **Tabla 3**, así como de sonicación, se lleva a cabo el proceso de sonicado (Cole – Parmer; 8890) y finalmente, la suspensión se hace pasar por dos filtros de Nylon con tamaño de poro de 0.45 y 0.22 μ m (Millex; Millipore). Esta metodología también aplica para la elaboración de Liposomas sin fármaco (Blancos), los cuales se utilizan para evaluar el comportamiento de las diferentes marcas de fosfolípidos, así como del crioprotector en las pruebas reológicas.

3.3.- Caracterización fisicoquímica de las formulaciones liposomales.

3.3.1.- Tamaño de partícula, distribución de tamaño de partícula y potencial Z.

El tamaño de partícula y el índice de polidispersidad (PDI) para cada formulación liposomal, se determinaron mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) por medio de un analizador Zetasizer Nano ZS ZEN 3600 (Malvern Instruments Ltd.). El análisis se realizó a 25 °C en celdas plegadas transparentes tipo capilar con una retrodispersión de 173 ° como ángulo de detección y se registraban 3 mediciones por punto de datos.

3.4.- Propiedades reológicas de la formulación de Liposomas.

3.4.1.- Preparación de la muestra.

Se prepararon los blancos de las diferentes formulaciones de liposomas conforme a la **Tabla 3**. Se concentraron mediante centrifugación y las condiciones indicadas en la centrífuga (Biofuge Stratos Sorvall; Thermo Scientific) fueron las siguientes: una muestra de 25 mL fue centrifugada a 15,000 rpm durante una hora a 0 °C.

El sobrenadante obtenido es desechado y el precipitado que corresponde a las partículas liposomales fue resuspendido en 10 mL de PBS para análisis reológico. La misma metodología aplica para las formulaciones de liposomas cargados con Rapamicina.

3.4.2.- Mediciones reológicas.

Todas las mediciones reológicas se realizaron en un reómetro rotacional (TA instrument, Discovery DHR - 3), la geometría utilizada para llevar a cabo las mediciones se empleó un sistema reométrico de cilindros concéntricos a una temperatura controlada de 25 °C.

3.4.3.- Pruebas de flujo a la cizalla simple.

Se utilizó un flujo unidireccional de cizalla constante, con una velocidad de cizalla de: 0.3 a 300s⁻¹.

3.4.4.- Pruebas de cizalla oscilatoria de pequeña amplitud de deformación.

Las propiedades viscoelásticas, el módulo elástico G' y el módulo viscoso G'', se determinaron a una frecuencia de 1 a 50 rad/s. La zona lineal se determinó previamente para identificarla con una prueba de barrido de deformación a una frecuencia constante (1.0, 10, 100 rad/s).

3.4.5.- Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Se utilizó un microscopio (JEOL: 2010), De cada formulación se colocó una cantidad de 1 µL muestra diluida (1:5) en diferentes rejillas de carbono y se dejó secar, después se realizó una tinción negativa con acetato de uranilo al 2%. La rejilla con la muestra se expone a 2 µL de esta solución durante 3 minutos y el exceso se retira con un papel adsorbente.

3.4.6.- Espectroscopia por FT-IR.

Esta técnica se realizó con el fin de verificar que los Fosfolípidos y la Rapamicina, empleados no contuvieran otras sustancias. Este análisis fue hecho en un equipo de Perkin Elmer UATR (FT-IR Spectrometer) con un intervalo de 4000-500 cm⁻¹ y una resolución espectral de 1 cm⁻¹. Aproximadamente 20 mg se utilizaron para hacer estas determinaciones y se usó como blanco el aire a temperatura ambiente.

3.4.7.- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Los termogramas de DSC de las lecitinas comerciales y el fármaco se midieron en un calorímetro diferencial de Barrido (DSC1/700 Mettler-Toledo). Aproximadamente tres mg de muestra fueron pesados y sellados en un platillo de aluminio. Las mediciones se realizaron en una atmósfera de nitrógeno con un flujo de arrastre 20 mL/min, en un Intervalo de temperatura de 0 °C a 220 °C y una velocidad de calentamiento de 10 °C/min.

3.5.- Determinación de Rapamicina.

Esta determinación se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV – visible, la cual se realizó en un espectrómetro S2000, el cual utiliza una fuente de luz de deuterio DT1000, una interfaz de puerto serie SAD500 (Ocean Optics, Inc.) y una celda de cuarzo de 1 cm de longitud (Prolab).

❖ *Curva de calibración de Rapamicina.*

Se preparó una solución stock de Rapamicina (0.01 mg/mL), el disolvente ocupado fue una solución de Acetonitrilo al 40%. De la solución stock, se tomaron las alícuotas necesarias para obtener el siguiente intervalo de concentraciones: .825 – 9.59 µg/mL, y el pico máximo de absorbancia fue a 281.52 nm.

➤ *Cálculo del porcentaje de encapsulación (EE%).*

En un tubo de microcentrífuga se colocan 2 mL de muestra y se centrifugan (Sorvall Biofuge Primo R.; Thermo Electron Corporation) toda la noche a 15, 000 rpm. De las dos fases que se obtienen, el sobrenadante se coloca en un matraz volumétrico de 2 mL, se adicionan 100 µL de metanol, 50 µL de sulfato de zinc al 2% en una mezcla de metanol – agua (60:40) y se agitó por 30 s en un vórtex. Finalmente se llevó a la marca de aforo con la solución de Acetonitrilo al 40%. Se centrifuga a 15,000 rpm durante 10 minutos, después se mide la muestra en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 281. 52 nm. El precipitado se resuspende en un mililitro de la solución de Acetonitrilo al 40%, se coloca en un matraz volumétrico de 2 mL y se sigue el mismo tratamiento aplicado al sobrenadante. Para obtener el porcentaje de encapsulación, se utilizó la siguiente ecuación:

$$EE\left(\% \frac{m}{m}\right) = \frac{\text{masa de fármaco encpasulado}}{\text{masa inicial de fármaco}} * 100 \quad (8)$$

Las concentraciones del precipitado y el sobrenadante se obtienen por interpolación en la curva de calibración y el cálculo de la **Ecu. 8** se hace en miligramos.

3.5.2.- Determinación de Fosfolípido.

Con base en la metodología propuesta por **Stewart,(1980)**, y aplicada en el trabajo de **Linares-Alba et al., (2016)**. Se aplicó el siguiente procedimiento:

➤ *Solución reactiva de Ferrotiocianato de Amonio*

Para preparar esta solución se pesaron 2.703 g de Cloruro de Hierro Hexahidratado y 3.040 g de Tiocianato de Amonio, se solubilizan por separado con agua desionizada, luego se transvasan a un matraz volumétrico de 100 mL.

➤ *Curva de calibración de lecitina (Fosfolípido)*

Preparar una solución stock de lecitina (0.1 mg/ml) en cloroformo. De la solución stock se tomaron las alícuotas necesarias para obtener el siguiente intervalo de concentraciones: 0.01 a 0.1 mg/ml. De cada solución obtenida, transferir 2 mL de esta a un tubo de ensayo, de su respectiva concentración, después se agregan 2 mL de la solución reactivo de Ferrotiocianato de amonio. Debido a que los disolventes empleados son inmiscibles, forman un sistema bifásico. Este sistema se agita durante dos minutos en un vórtex. Una vez que se terminó de agitar, la parte no polar se extrae con una pipeta Pasteur y se coloca en un tubo de micro centrífuga.

La muestra es centrifugada (Sorvall Biofuge Primo R.; Thermo Electron Corporation) a 15,000 rpm durante 5 minutos con el fin de eliminar residuos de la parte acuosa. Con una Micropipeta sustraer cuidadosamente la parte no polar y cuantificar por espectrofotometría UV – visible. El análisis se realizó en un espectrómetro S2000, el cual utiliza una lámpara de tungsteno DT-1000CE-BT, una interfaz de puerto en serie SAD500 (Ocean Optics, Inc.) y una celda de cuarzo de 1 cm, utilizar el Cloroformo como blanco (n=3).

➤ *Preparación de la muestra*

En un tubo de microcentrífuga se colocan 2 mL de muestra y se centrifugan (Sorvall Biofuge Primo R.; Thermo Electron Corporation) por 6 ha 15, 000 rpm. De las dos fases que se obtienen, se extrae la Lecitina del sobrenadante con 2 mL de Cloroformo y el precipitado es resuspendido con 2 mL del mismo disolvente.

3.5.3.- Análisis cualitativo de Lecitina por cromatografía de dos dimensiones en capa fina (TLC).

Pesar una cantidad de 50 mg de muestra y transferirla a un matraz volumétrico de 5.0 mL, llevar a la marca de aforo con Hexano. Por medio de una Micropipeta aplicar 100 µL de la muestra en la esquina inferior derecha de la placa de Sílice a una altura de 2 cm y colocarla en una cámara de elución con el solvente A (130 mL Cloroformo; 60mL Metanol y 8 mL de hidróxido de amonio). Después de haber eludido este disolvente retirar la placa de sílice y dejarla secar por 30 min, posteriormente voltearla 90° a la derecha y colocar en la cámara de elución el solvente B (170 mL de Cloroformo; 25 mL de Metanol; 25 mL de ácido acético y 6 mL de agua). Revelar la placa de Sílice sumergiéndola dentro una cámara de yodo.

3.5.4.- Índice de Acidez.

Pesar 2.0 g a un matraz Erlenmeyer de 250 mL, disolver con 50 mL de hexano y agregar 50 mL de alcohol, que previamente ha sido neutralizado con 5 gotas de Hidróxido de Sodio 0.1 N y después agregar la fenolftaleína. Valorar la muestra de lecitina hasta que la solución cambie a un color rosa (este debe persistir durante 5 s.). Calcular el número de miligramos de Sodio necesarios para neutralizar los ácidos libres en 1.0 g de la muestra de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$I=5.61/V*m \quad (9)$$

Donde, **I** es el índice de acidez, **V** es igual a los mL gastados durante la valoración y **m** corresponde al peso de la muestra en gramos.

3.5.5.- Materia Insoluble en Acetona.

Colocar 2.0 g de la muestra en un tubo de centrifuga de 40 mL, previamente tarado. Agregar 15.0 mL de acetona a la muestra, después colocar el tubo de centrifuga en un baño de agua a 45 °C para ayudar a la disolución completa de los compuestos solubles en este disolvente, una vez que la mayor parte de la muestra este resuspendida en el disolvente, colocarla durante 5 minutos en un baño de agua fría. Agregar acetona enfriada previamente a 0 °C, Enfriar durante 15 minutos en un baño de agua fría y agitar. Centrifugar durante 5 minutos a 2000 rpm y separar el sobrenadante del precipitado. Romper el precipitado y volver a rellenar el tubo hasta su aforo con acetona fría y agitar. Enfriar la muestra durante 15 minutos en un baño de agua fría, volver a centrifugar de acuerdo con las condiciones anteriores decantar. Colocar el tubo en posición horizontal hasta que se evapore la mayor parte del disolvente, calentar el tubo a 105 °C hasta que el peso sea constate. Determinar el peso del residuo y calcular el porciento de la materia insoluble en acetona.

3.6.- Cinética de liberación *In vitro*.

Para la realización de esta prueba se utilizó una membrana de diálisis (Dialysis tubing, Spectra/Por; tamaño de poro 12 a 14 kDa). Con base en las especificaciones del proveedor, un trozo de membrana fue cortado e hidratado durante 24 horas. Al finalizar este tiempo, dentro de la membrana se colocaron 3 mL de formulación y 3 mL de medio de Acetonitrilo al 40 % (con concentración final de fármaco: 0.5 mg/mL), la membrana fue sellada con hilo de Nylon. El sistema en el cual se llevaron a cabo las liberaciones estaba compuesto por: 130 mL de medio de Acetonitrilo al 40 % a una temperatura de 37 ± 2 °C con agitación constante. Para llevar a cabo la recolección de muestra, eran extraídos 2 mL de medio cada hora durante 7 h con reposición de medio por cada muestra.

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

4.1.- Análisis de Tamaño de Partícula, Índice de Polidispersión (PDI) y Potencial Z.

Los resultados mostrados en la **Tabla 4** resumen el tamaño de partícula, índice de polidispersidad y potencial Z, de los nueve sistemas estudiados.

Tabla 4.- Tamaño de Partícula, Índice de polidispersión (PDI) y potencial Z.

Lecitina	Crioprotector	Tamaño (D ₉₀) d. nm	PDI	Potencial Z mV
Metarin	Manitol	164.2±4.6	0.334±0.039	-49.7±2.33
	Sacarosa	955.4±4.2	0.606±0.045	-23.8±1.04
	Trehalosa	255.0±3.6	0.256±0.008	-46.4±0.99
Sigma	Manitol	220.2±3.4	0.348±0.025	-47.7±1.27
	Sacarosa	295.5±3.4	0.253±0.012	-44.5±1.13
	Trehalosa	396.1±0.2	0.292±0.021	-43.0±1.77
S. micro	Manitol	122.4±1.1	0.246±0.047	-2.39±0.01
	Sacarosa	122.4±4.7	0.173±0.003	-44.4±2.69
	Trehalosa	220.2±3.4	0.261±0.020	-45.2±1.77

De acuerdo con estos datos, los sistemas liposomales más pequeños se obtuvieron al usar lecitina Sigma Microbiológica, los tamaños se encuentran en un intervalo de 122.4 a 220.2 nm, y con un PDI 0.173 a 0.261, respecto al potencial Z los sistemas SMCS y SMCT tienen un potencial negativo muy similar. Sin embargo, el sistema SMCM presenta un valor de potencial Z que no satisface los criterios de calidad antes mencionados, este valor puede ser una consecuencia de tener una conductividad eléctrica baja, indicativo de que los iones disueltos en la formulación, principalmente sodio y fosfatos a causa del buffer, están adsorbiéndose en la superficie del liposoma, lo que conduce a un cambio en el valor del punto isoeléctrico.

La adsorción de iones en la superficie, incluso a bajas concentraciones, puede tener un efecto sobre la potencial zeta de la dispersión de liposomas. En algunos casos, la adsorción iónica puede conducir a una inversión de la carga de la superficie.

Respecto a los sistemas elaborados a partir de la lecitina Sigma, tienen liposomas con los tamaños de partícula más grandes, estos se encuentran en un intervalo de 220.2 a 396.1 nm, las poblaciones de liposomas son relativamente homogéneas ya que la media del PDI (0.292) hay una diferencia de ± 0.05 aproximadamente entre cada sistema y tiene los valores de potencial Z muy cercanos entre sí.

Finalmente, los sistemas hechos a partir de la lecitina Metarin, presentan tamaños de partícula muy diferentes y los índices de polidispersión más elevados de todos los sistemas, esto se debe a que posiblemente hay poblaciones de liposomas con tamaños de partícula distintos. Sin embargo, el sistema MCM presenta el potencial Z más negativo de todas las formulaciones (-49.7 ± 2.33), esto puede ser un indicio de que probablemente sea un poco más estable y tenga un comportamiento reológico adelgazante al flujo. Mientras que el sistema MCT presenta valores aceptables de tamaño, PDI y potencial Z.

Por último, el sistema MCS presenta, de todos los sistemas, el tamaño de partícula y PDI más grande (0.606) además de un potencial Z más cercano a cero (-23.8 mV) posiblemente los liposomas estén sufriendo un efecto de floculación y por lo tanto se están aglomerando, lo que explicaría un tamaño de partícula grande y un potencial Z bajo.

Respecto a los resultados de Conductividad y Movilidad Electroforética de los diferentes sistemas liposomales estudiados, se presentan en la siguiente tabla (**Tabla 5**).

Tabla 5. - Resultados de Conductividad (Cond) y Movilidad Electroforética (Mob)

Lecitina	Crioprotector	Mob. ($\mu\text{mcm/Vs}$)	Cond. (mS/cm)
Metarin	Manitol	-3.503 \pm 0.1619	1.62 \pm 0.099
	Sacarosa	-1.71 \pm 0.0297	1.13 \pm 0.0566
	Trehalosa	-3.274 \pm 0.06788	1.37 \pm 0.0707
Sigma	Manitol	-3.365 \pm 0.08839	1.52 \pm 0.0849
	Sacarosa	3.14 \pm 0.08061	1.45 \pm 0.0849
	Trehalosa	-3.034 \pm 0.1245	1.47 \pm 0.0849
Sigma Microbiológica	Manitol	-0.1689 \pm 0.1689	0.273 \pm 0.0233
	Sacarosa	-3.135 \pm 0.1902	1.52 \pm 0.0919
	Trehalosa	-3.188 \pm 0.1266	1.44 \pm 0.0849

Los resultados de la movilidad electroforética de todos los sistemas son muy bajos lo que significa que no se necesita de mucha energía eléctrica para vencer a la fuerza de fricción provocada por la viscosidad del medio (**Malvern, 2018**). Por último, el criterio de calidad proporcionado por el equipo fue aceptable para todos los sistemas a excepción de los sistemas: MCS, SCT y SMCT.

El comportamiento de los nueve sistemas liposomales con base en los resultados obtenidos tanto del tamaño de partícula y el potencial Z, se puede explicar considerando que, los liposomas están elaborados principalmente a base de lecitinas, las cuales contienen fosfolípidos. De acuerdo con **Myers, (1999)**, los fosfolípidos naturales y sintéticos son materiales anfífilicos que no pueden empaquetarse en estructuras compactas como las micelas en solución acuosa, tales materiales tienen grupos hidrófobos demasiado voluminosos para ser empaquetados al igual que las micelas normales. Generalmente cuando se dispersan

en agua, formarán espontáneamente estructuras de bicapa cerradas a las que se hace referencia a liposomas o vesículas. Si las multicapas que se formaron espontáneamente se someten a ultrasonido o a una agitación vigorosa, la estructura multicapa compleja puede romperse para producir un conjunto de bicapa única que consiste en una vesícula. Típicamente, una vesícula así producida tendrá un diámetro entre 30 a 100 nm, que se encuentra dentro del rango de tamaño de los sistemas coloidales (un coloide son moléculas o partículas de un soluto dispersas uniformemente en todo el solvente o medio continuo) (Hunter, 2001). Debido a lo anterior, los sistemas liposomales elaborados pueden considerarse como una **dispersión coloidal**. En ciertas circunstancias, las partículas en una dispersión como los coloides pueden adherirse entre ellos mismos y formar agregados de tamaños grandes, que pueden asentarse por el efecto de la gravedad. Un agregado inicialmente se llama floculo y el proceso de su formación es conocido como floculación. Generalmente se separa ya sea por sedimentación (si es más densa que el medio) o por cremación (si es menos densa que el medio). Estos procesos están influenciados por la Teoría de DVLO, la cual sugiere que la estabilidad de un sistema coloidal está determinada por la suma de estas fuerzas atractivas de **van der Waals y las repulsiones eléctricas de doble capa** que existen entre las partículas a medida que se acercan entre sí debido al movimiento browniano que están experimentando. Por lo tanto, si los liposomas tienen una repulsión suficientemente alta, la dispersión resistirá la floculación y el sistema coloidal en principio, será estable al flujo. El potencial zeta es un índice que ayuda a medir la magnitud de la interacción entre las partículas coloidales y estas se utilizan para evaluar la estabilidad de los nueve sistemas liposomales objeto de este estudio (Malvern Instruments, 2017).

Es importante mencionar que, si todos los liposomas en suspensión tienen un gran potencial zeta, ya sea negativo o positivo, tenderán a repelerse entre sí y no habrá ninguna tendencia a que las partículas se aglomeren. Sin embargo, si tienen valores bajos de potencial Z, no habrá fuerzas necesarias para evitar que ocurra el fenómeno anteriormente descrito. La línea divisoria general entre suspensiones estables e inestables generalmente se toma a +30 o -30 mV. Las partículas con potenciales zetas más positivas que +30 mV o más negativas que -30 mV normalmente se consideran estables al flujo. Las que no se encuentran dentro de este intervalo como las formulaciones MCS y SMCM, no se suelen considerar como sistemas estables y por lo tanto pueden sedimentarse.

4.2.- Caracterización reológica.

La **Figura 14**, muestra la curva de viscosidad al flujo de cizalla simple para las lecitinas de soya de diferente marca comercial empleadas en la producción de estos formulados a una concentración fija de 2.7 mg/mL demostrando que tienen un comportamiento no newtoniano del tipo adelgazante al flujo.

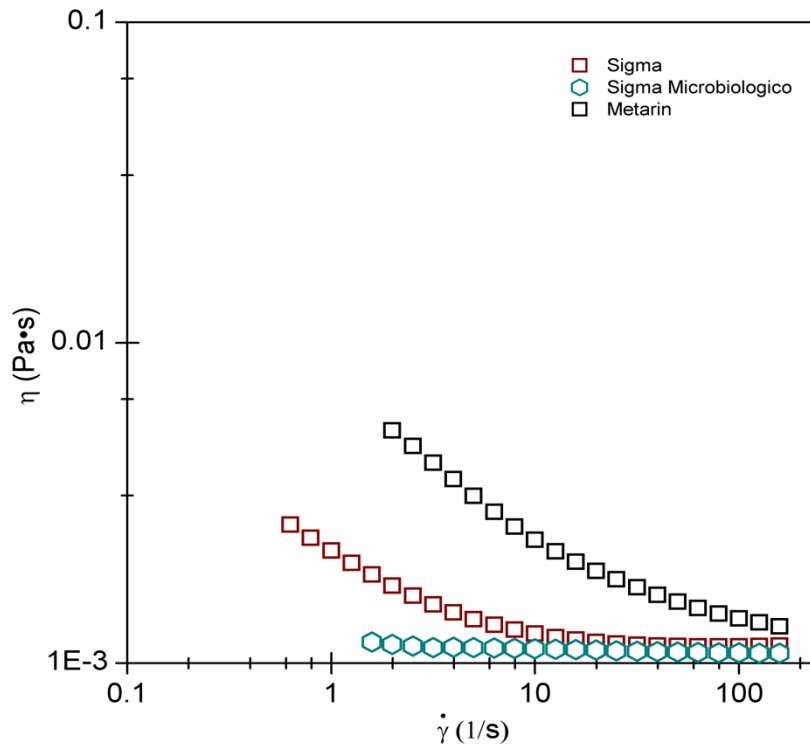


Figura 14.- Curva de viscosidad a la cizalla simple de los distintos tipos de Lecitinas

Esta curva de viscosidad al flujo corresponde al sistema empleando, tanto La lecitina Sigma Microbiológica la cual presenta un comportamiento Newtoniano ($n=1$), ya que la viscosidad es constante en toda la ventana de velocidad de deformación y las lecitinas. Sigma y Metarin las cuales exhiben un comportamiento no newtoniano del tipo adelgazante al flujo ($n<1$), esto significa que la viscosidad de estas lecitinas disminuye a medida que la velocidad de deformación se incrementa. Siendo menos estable al flujo la lecitina de soya marca Metarin porque la viscosidad no disminuye de forma gradual conforme a lo explicado en **Medina et al. (2000)**.

Debido a esta formación, las lecitinas generaron estructuras de diferentes tamaños y altos pesos moleculares que al aplicar una velocidad de cizalla se deslizan unos sobre otros, obstaculizados solamente por sus fuerzas intermoleculares, que generan un entrelazamiento entre ellos. Entonces cuando están entrecruzadas entre ellas mismas, de forma aleatoria experimentan una baja velocidad de deformación (**Figura 14**, $\dot{\gamma} \leq 10 \text{ s}^{-1}$) tienen una viscosidad relativamente alta, y a medida que aumenta $\dot{\gamma}$, hay un aumento del esfuerzo cortante (σ), que es lo suficientemente alto para desenredar las estructuras autoensambladas. Una vez desenredadas pueden deslizarse más allá de estas conformaciones con facilidad, lo que genera una viscosidad (η) más baja ($\dot{\gamma} > 10 \text{ s}^{-1}$). Eventualmente cuando estas formaciones ya no pueden estirarse se observa una viscosidad constante ($\dot{\gamma} > 100 \text{ s}^{-1}$). Por lo tanto, esto se conoce como comportamiento adelgazante al flujo. La **Figura 15**, muestra de manera ilustrativa el desenredo de las estructuras autoensambladas cuando incrementa $\dot{\gamma}$ (**Osswald & Rudolph, 2015b**).

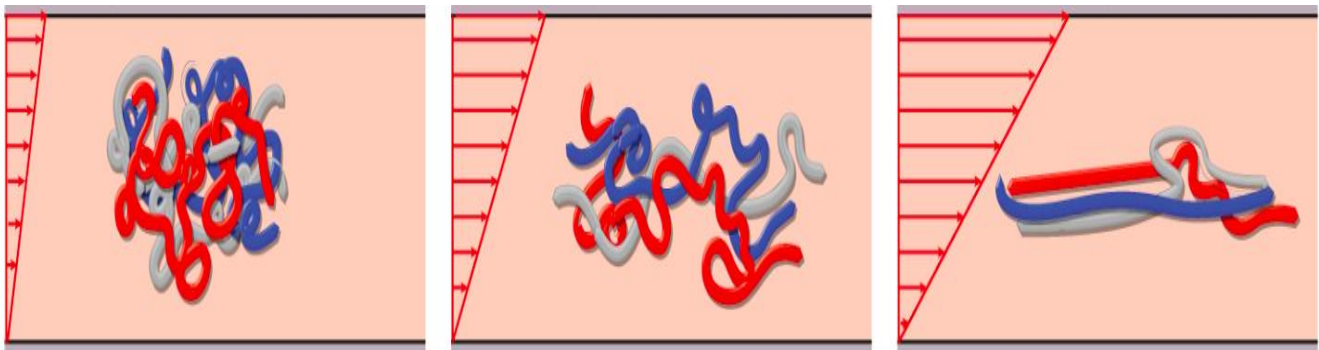


Figura 15.- Desenmarañamiento de los fosfolípidos autoensamblados al aumentar la velocidad de deformación que se representa por las flechas rojas. Imagen tomada de: **Osswald, T., & Rudolph, N. (2015b)**.

Por otro lado, al llevar a cabo la evaluación del comportamiento reológico de los crioprotectores empleados en las formulaciones, se observó en la **Figura 16** que el Manitol (0.047 g/mL), la Sacarosa (0.087 g/mL) y la Trehalosa (0.097 g/mL) presentan un comportamiento no newtoniano del tipo adelgazante al flujo ($n < 1$). Entre las dos primeras el comportamiento reológico es muy parecido a bajas velocidades de deformación ($\dot{\gamma} \leq 10 \text{ s}^{-1}$), porque la viscosidad (η) es casi la misma para ambos materiales a las concentraciones indicadas, por lo que no habría diferencia si se utiliza cualquiera de las dos o si se emplean simultáneamente en procesos que impliquen estas mismas condiciones.

Sin embargo, en rangos de $20 \text{ s}^{-1} \leq \dot{\gamma} \leq 100 \text{ s}^{-1}$ comienzan las diferencias en la viscosidad porque el Manitol empieza a ser ligeramente más viscoso que la Sucrosa, incluso a valores de $\dot{\gamma} \geq 100 \text{ s}^{-1}$ donde la viscosidad empieza a ser constante. En cambio, la Trehalosa a esta concentración es más adelgazante al flujo ($n < 1$), pero a velocidades por debajo de $\dot{\gamma} \leq 60 \text{ s}^{-1}$ es más viscosa que las otras dos, lo que también implica un mayor esfuerzo de corte. A valores de $\dot{\gamma} \geq 60 \text{ s}^{-1}$ la viscosidad se vuelve constante en ambas a medida que aumenta la velocidad de deformación o flujo.

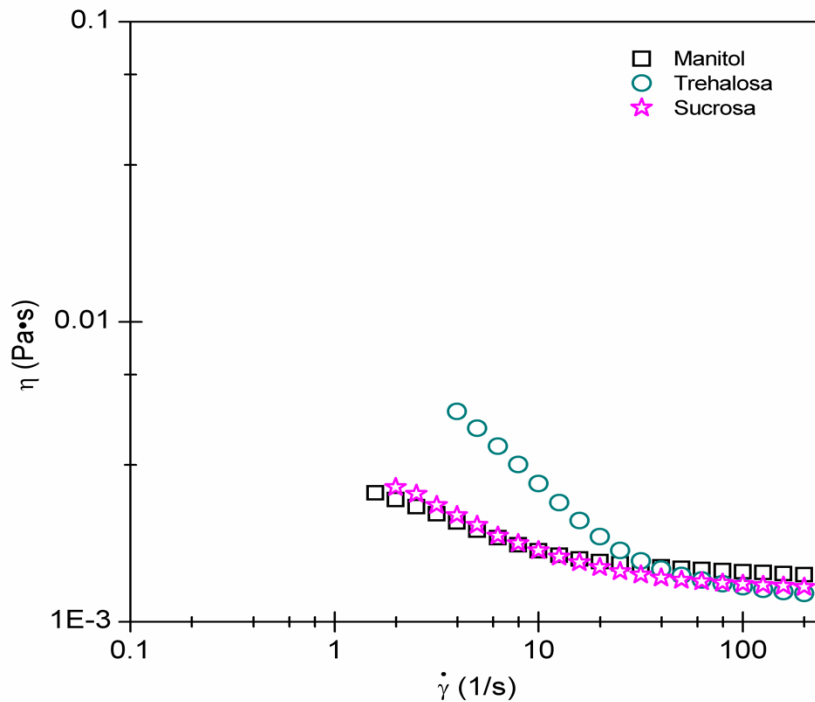


Figura 16. - Curva de viscosidad a la cizalla simple de los distintos tipos de Crioprotector.

Cabe recordar, que los crioprotectores empleados son polisacáridos y pueden controlar la viscosidad del agua debido a la naturaleza de sus unidades de monómero presentes, las disposiciones secuenciales de estas unidades dentro de las cadenas de polímero y las uniones entre monómeros. Un polisacárido al entrar en contacto con el agua, a cierta concentración y temperatura, se convierte en un plastificante porque debido a la movilidad de sus estructuras químicas en el medio, formarán enlaces entre los puentes de hidrógenos del agua con los grupos hidroxilo de los monómeros presentes, para que finalmente se produzcan partículas rígidas.

Por lo tanto, la mayoría de las preparaciones con polisacáridos, forman dispersiones moleculares o hidrocoloides, que a veces se les llama soles. Por ende, cuando los hidrocoloides están en movimiento, estas moléculas chocan entre sí y entre más grandes sean, también es mayor su viscosidad. Por lo anterior hay un cambio en la viscosidad del medio y puede ser aprovechado para espesar, gelificar, modificar o controlar las texturas y propiedades de flujo de los alimentos y bebidas (**Shewry, 2008**). Entonces el comportamiento adelgazante al flujo de los crioprotectores es debido a que los hidrocoloides formados por las cadenas largas de los polisacáridos, que al igual que las lecitinas, generaron un entrelazamiento y al experimentar una baja velocidad de deformación tienen una viscosidad relativamente alta. Cuando aumenta $\dot{\gamma}$, hay un aumento del esfuerzo cortante (σ) que es lo suficientemente alto para ir desenredándolos lo que se conoce como adelgazamiento al flujo y una vez que $\dot{\gamma}$ es muy alta, la viscosidad es constante porque las estructuras están orientadas en dirección al flujo. Estos resultados son similares a lo reportado en la literatura por **Medina-Torres et al., (2000)**, los cuales reportan las propiedades que tienen los polisacáridos en la industria alimenticia para mejorar la calidad del producto. **Medina et al. (2000)**, mencionan que las propiedades mecánicas del mucílago del *Opuntia ficus indica*, está compuesta por polisacáridos, principalmente de: Arabinosa, Galactosa, Xilosa, Ramnosa y Ácido Galacturónico, presentando un comportamiento adelgazante al flujo ($n < 1$), esto significa que la viscosidad disminuye a medida que aumenta la velocidad de deformación, producido posiblemente por la orientación de los polisacáridos que lo componen. En nuestro estudio, observamos que, la estimación de la viscosidad a la cizalla simple de la lecitina y los crioprotectores es un poco mayor a la del agua en un rango de velocidad de deformación 0.3 s^{-1} a 300 s^{-1} , y no requirieron de un gran esfuerzo para comenzar a fluir.

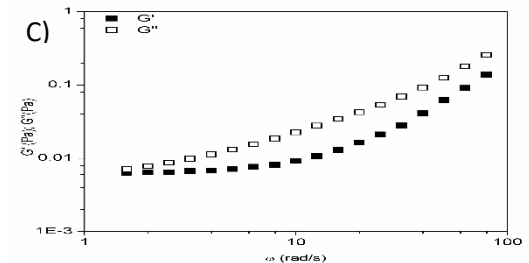
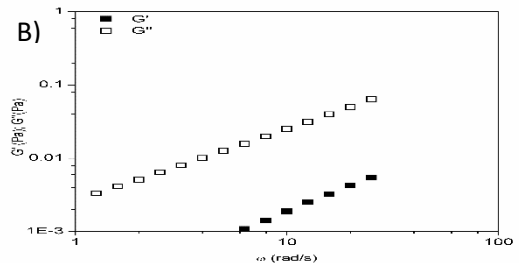
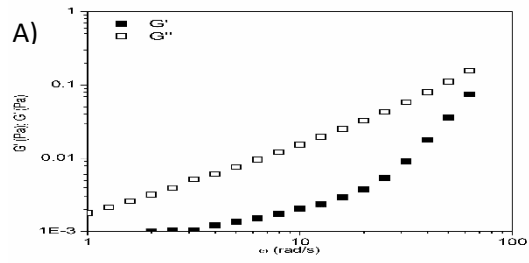
En las **Figuras 14 y 16**, se observa que estos materiales no son muy rígidos y, por lo tanto, los sistemas liposomales no tendrían dificultad en formarse, incluso podrían mejorarse las propiedades reológicas cuando se combinen ambos materiales.

Finalmente, los resultados de las pruebas SAOS para las 9 formulaciones se muestran en la **Figura 17**. La parte superior corresponde a las formulaciones elaboradas con la lecitina Metarin y su respectivo crioprotector. Los sistemas MCM (Figura 17A) y MCT (Figura 17C) se observa que el módulo viscoso (G'') predomina sobre el módulo elástico (G'), es decir ($G'' > G'$). Esto significa que estas dos formulaciones de liposomas se comportan más como fluidos viscosos, que como fluidos viscoelásticos. Además, en las Figuras de ambas formulaciones se observa que a bajas frecuencias ($\omega \leq 10$ rad/s) existe una zona que tiene forma de meseta (parte horizontal formada por G'), que pone en evidencia posibles interacciones que tienen los liposomas para que el sistema sea estable al flujo. El sistema MCS (Figura 17B) G'' es mayor que G' en todo el rango de frecuencias estudiado, por lo que este sistema se comportará más como un fluido viscoso y no se distingue una zona de meseta como en los otros dos sistemas, lo que denota que no hay interacciones entre los liposomas.

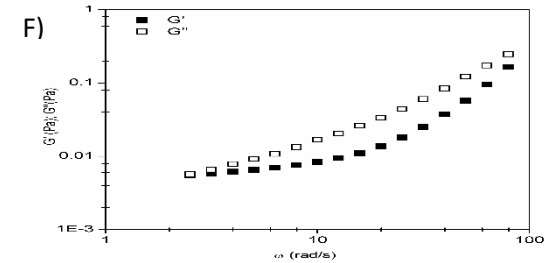
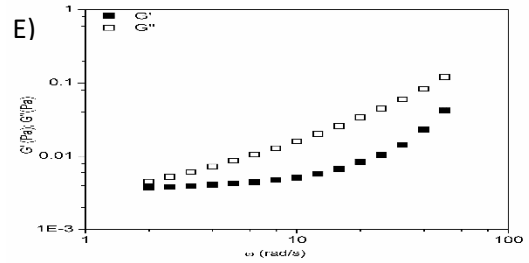
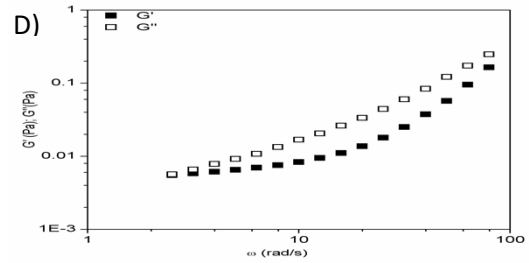
En el centro de la **Figura 17**, están los sistemas liposomales elaborados a partir de la lecitina Sigma con su respectivo crioprotector. Los 3 sistemas: SCM (**Figura 17D**), SCS (**Figura 17E**) y SCT (**Figura 17F**) el módulo viscoso (G'') predomina sobre el módulo elástico (G'), por lo tanto, las 3 formulaciones de liposomas se comportarán más como fluidos viscosos. En las Figuras se observa que a bajas frecuencias ($\omega \leq 10$ rad/s) existe una zona que tiene forma de meseta (parte horizontal formada por G'), comportamiento pseudosólido que muestra las interrelaciones que tienen los liposomas para mantener un sistema firme.

Por último, la parte inferior la **Figura 17** es para las formulaciones elaboradas con la lecitina Sigma Microbiológica y su respectivo crioprotector. El sistema SMCM (**Figura 17G**) y SMCS (**Figura 17H**) tiene un comportamiento más viscoso (G'') que viscoelástico (G'). A bajas frecuencias ($\omega \leq 10$ rad/s) existe una zona que tiene forma de meseta similar a lo ya mencionado (parte horizontal formada por G'), que muestra la estabilidad que tienen los liposomas para no sedimentarse. En cuanto al sistema SMCT al inicio tiene un comportamiento más elástico (G') que viscoso (G'') a bajas deformaciones ($\omega \leq 10$ rad/s) y después de este punto se comporta más como un fluido viscoso. Sin embargo, existe una alta probabilidad de que el sistema haya sedimentado ya que a medida que aumenta la frecuencia el material se resuspenderá poco a poco en el medio, y por eso se muestra después un predominio del módulo viscoso y posiblemente es muy poco estable.

Sistema Metarin



Sistema Sigma



Sistema Sigma Microbiológica

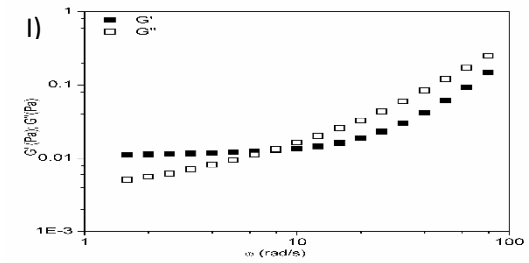
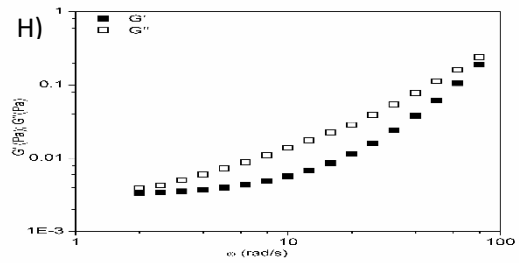
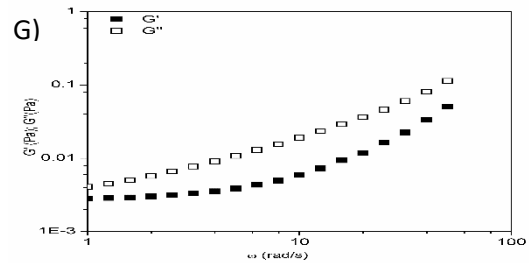


Figura 17.- SAOS de Sistemas liposomales sin fármaco, A) Metarin/Colesterol/ Manitol (MCM), B) Metarin/Colesterol/ Sacarosa, (MCS), C) Metarin/Colesterol/ Trehalosa (MCT), D) Sigma/Colesterol/ Manitol (SCM), E) Sigma/Colesterol/ Sacarosa (SCS), F) Sigma/Colesterol/ Trehalosa (SCT), G) *S. micro*/Colesterol/ Manitol (SMCM), H) *S. micro*/Colesterol/Sacarosa (SMCS), I) *S. micro*/Colesterol/ Trehalosa (SMCT).

A fin de complementar el análisis anterior, fueron sometidas a las pruebas de flujo a la cizalla simple (pruebas destructivas) y los resultados se muestran en la **Figura 18**. De acuerdo con la figura, los sistemas tienen un comportamiento no Newtoniano del tipo adelgazante al flujo ($n < 1$) a excepción del sistema MCS, es de esperarse este resultado debido a que tanto el crioprotector empleado como la lecitina por si solos presentan esta misma propiedad, esto nos da a entender que, durante el proceso de fabricación no hay un cambio en sus propiedades individuales y mecánicas al flujo y, por lo tanto, la suspensión de liposomas puede ser muy estable.

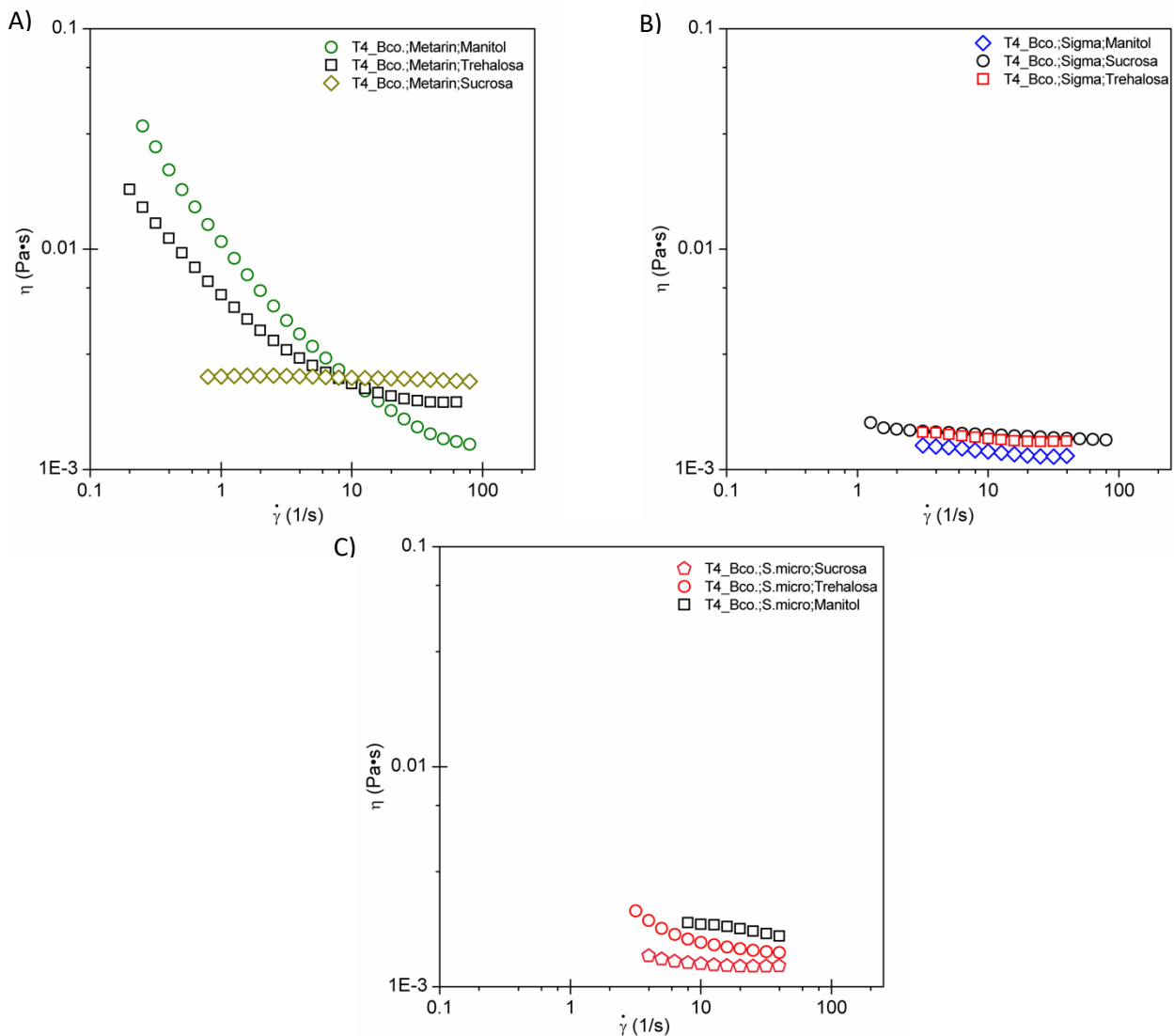


Figura 18.- Curva de viscosidad a la cizalla simple de las 9 formulaciones de liposomas. A) Sistema de liposomas con lecitina Metarin. B) Sistema de liposomas con lecitina Sigma. C) Sistema de liposomas con lecitina Sigma Microbiológica.

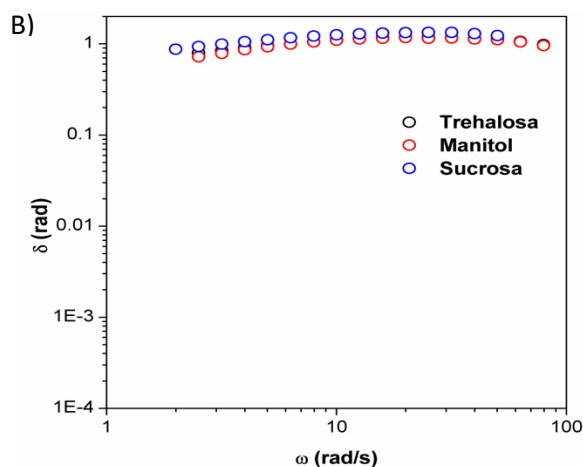
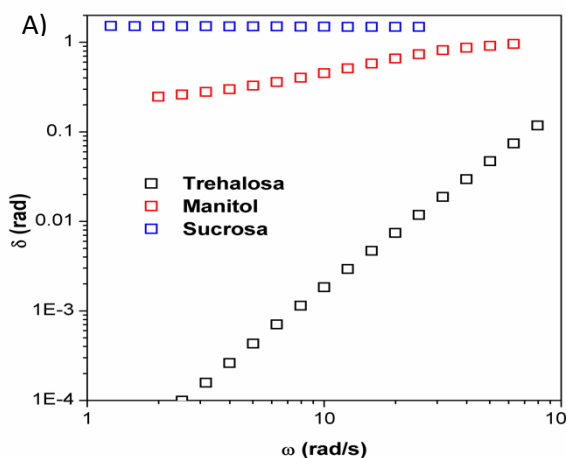
Por último, se muestra la Tangente de Delta o Tangente de Pérdida (**Figura 19**) obtenida del barrido de frecuencia para los tres sistemas de liposomas. Este gráfico indica la proporción que hay entre el módulo de pérdida y el módulo de almacenamiento (**Osswald & Rudolph, 2015c**), y se interpreta de la siguiente forma:

Si $\delta = 0$ o $\tan\delta = 0$ cuando G' predomine sobre G'' (sólido elástico).

Si $\delta = 90^\circ$ o $\tan\delta = \infty$ cuando G'' predomine sobre G' (fluido viscoso)

Si $\delta = 45^\circ$ o $\tan\delta = 1$ cuando G' es igual a G'' (material viscoelástico)

La **Figura 19A**, corresponde al sistema de liposomas con lecitina Metarin. Vemos que el sistema MCS se comporta más como un fluido viscoso, debido a que el desfase máximo que se puede observar es $\pi/2$ encontrado en un fluido newtoniano, por lo tanto, se reafirma el resultado obtenido en la prueba SAOS, y en la curva a la cizalla simple para esta formulación. El sistema MCM se observa el comportamiento de una solución diluida, debido a que este tipo de soluciones a valores altos de δ en frecuencias bajas, indican una tendencia hacia un comportamiento más fluido. Lo mismo sucede para las formulaciones de liposomas con la lecitina Sigma (**Figura 19B**) y Sigma Microbiológico (**Figura 19C**). Por último, tenemos que la formulación de liposomas MCT a valores bajos de δ y a bajas frecuencias tiene un comportamiento sólido, pero a medida que aumenta la frecuencia, δ aumenta y el sistema es más fluido, esto nos puede indicar la presencia de interacciones fuertes entre los liposomas.



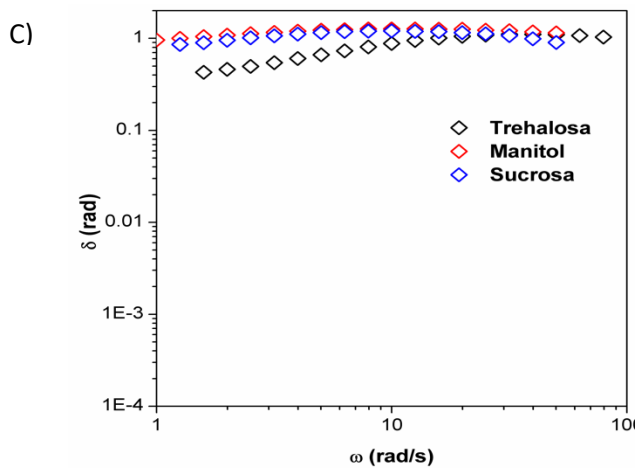


Figura 19.- Gráficos de la Tangente de Delta de las 9 formulaciones de liposomas. A) Sistema de liposomas con lecitina Metarin. B) Sistema de liposomas con lecitina Sigma. C) Sistema de liposomas con lecitina Sigma Microbiológica

En resumen, los resultados obtenidos de cada prueba reológica junto con el potencial Z, Tamaño de partícula y PDI se muestran en la **Tabla 6**, la cual nos va ayudar también a selección la mejor formulación de Liposomas sin fármaco.

Tabla 6. - Resumen de resultados de las 9 formulaciones con liposomas

Formulación	Curvas de Flujo a la cizalla oscilatorio de baja amplitud de deformación	Curvas de flujos a la cizalla simple.
MCM	$G'' > G'$	Adelgazante al flujo
MCS	$G'' > G'$	Newtoniano
MCT	$G'' > G'$	Adelgazante al flujo
SCM	$G'' > G'$	Adelgazante al flujo
SCS	$G'' > G'$	Adelgazante al flujo
SCT	$G'' > G'$	Adelgazante al flujo
SMCM	$G'' > G'$	Adelgazante al flujo
SMCS	$G'' > G'$	Adelgazante al flujo
SMCT	$G' > G''$ hasta 10 rad/s, luego $G'' > G'$	Adelgazante al flujo

De acuerdo con la tabla anterior, todas las formulaciones con excepción del sistema SMCT y MCS presentan una formación de una meseta a bajas amplitudes de deformación (parte horizontal formada por G'). Este comportamiento es indicativo de fuertes interacciones en un sistema complejo. En la **Tabla 4** se puede apreciar que estos sistemas presentan tamaños de partícula menores a 400 nm y los PDI's más bajos (menores a 0.4) por lo que es posible que existan fuerzas que ayuden a mantener estable el sistema.

Esta meseta que se observa en la **Figura 17**, también fue observada en estudios de **Santiago-Adame et al., (2015)** ellos encontraron que su suspensión de micropartículas, tienen resultados muy parecidos cuando realizan la prueba de SAOS, los resultados que obtuvieron, indican un comportamiento ($G'' > G'$), la formación de una meseta a bajas amplitudes de deformación, similar a los resultados de los liposomas. Ellos atribuyen a las interacciones entre los excipientes y compuesto encapsulado dentro de sus micropartículas. De igual manera en el trabajo de **Moreno et al., (2015)** esta misma meseta puede ser observada a bajas frecuencias cuando estudian el efecto de una concentración elevada de colesterol en la sangre. Ellos lo asociaron a interacciones fuertes por agregados celulares. Es importante aclarar que estos Sistemas Liposomales no pueden formar agregados ya que el potencial Z es lo suficientemente negativo para evitar que los liposomas se agreguen entre ellos, pero de acuerdo con **Crowe et al., (1984)** reportaron que los carbohidratos interactúan con los grupos polares de los fosfolípidos que afecta el empaquetamiento de la monocapa y provoca un mejor efecto estabilizante, esto puede ser el causante de las fuertes interacciones observadas.

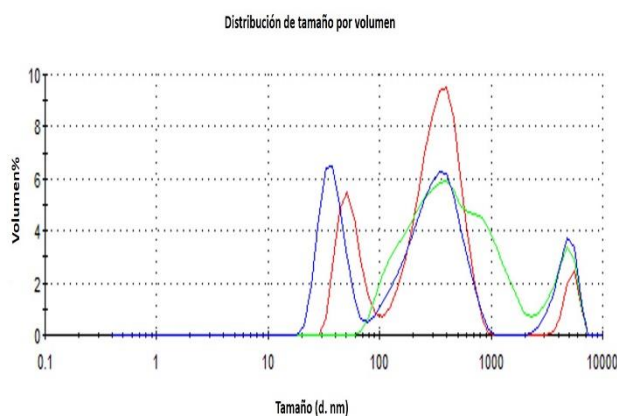
Por último, **Zhang et al., (2012)** obtuvieron un comportamiento adelgazante al flujo para todas sus formulaciones de liposomas, ellos lo asocian a que la lecitina en solución tiende a formar ensamblados supramoleculares que forman las bicapas del liposoma. Con base a esta información, el mejor sistema que reúne las mejores propiedades reológicas, tamaño de partícula, PDI y potencial Z fue el sistema: Metarin/Colesterol/Manitol (**MCM**), ya que es uno de los sistemas con el tamaño de partícula más pequeño, tiene el potencial Z más negativo por lo que es el sistema más estable al flujo, en las pruebas de SAOS (**Figura 17A**) presenta una formación de una meseta a bajas amplitudes de deformación (parte horizontal formada por G') indicativo de fuertes interacciones (comportamiento pseudosólido) y es el sistema más viscoso a bajas velocidades de deformación, indicativo del efecto estabilizante de los liposomas, por las fuerzas de repulsión de su carga negativa.

4.3.- Caracterización de la formulación de liposomas: Metarin/Colesterol/Manitol (MCM) con Rapamicina.

La formulación de liposomas MCM se utilizó para incorporar a la Rapamicina. Primero se evaluó el tamaño y la carga superficial para observar los cambios en el sistema que comprometa la estabilidad del producto final, es decir que este sedimento o no se llegase a formar. Para ello en la **Figura 20** se presenta los resultados correspondientes al Tamaño de partícula para liposomas cargados y no cargados con el fármaco.

Sistema Metarin / Colesterol / Manitol sin Rapamicina **Sistema Metarin / Colesterol / Manitol sin Rapamicina**

A)



B)

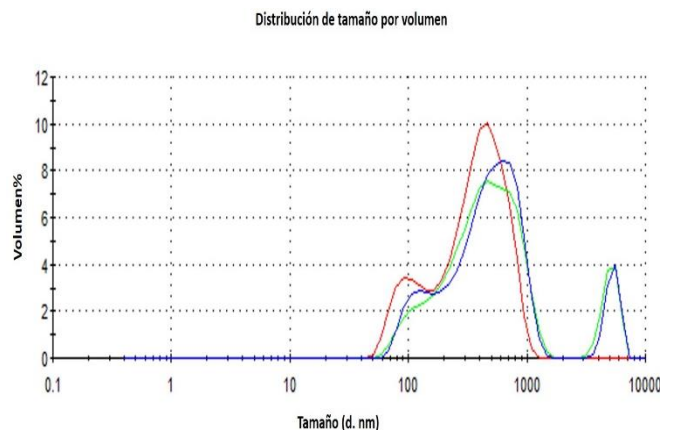


Figura 20.- Distribución de tamaño de partícula por intensidad de la formulación de Liposomas cargados y no cargado con Rapamicina

Se observa al agregar la Rapamicina (**Figura B**) no aumento significativamente el tamaño de partículas, pero hay un ligero cambio en la polidispersión, y en las **Figuras 21** se comparan las señales del potencial Z obtenidas por el equipo.

**Sistema Metarin / Colesterol / Manitol
con Rapamicina**

**Sistema Metarin / Colesterol / Manitol
sin Rapamicina**

Gráfica de fase final

Gráfica de fase final

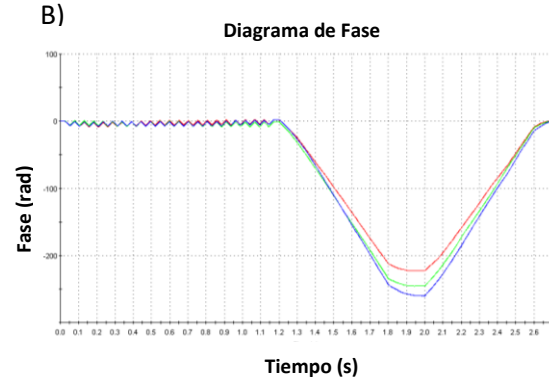
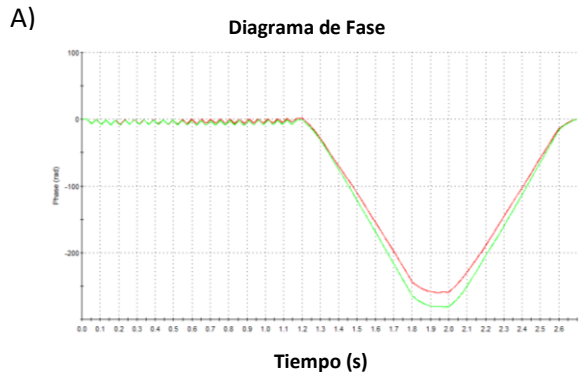


Gráfico de frecuencia

Gráfico de frecuencia

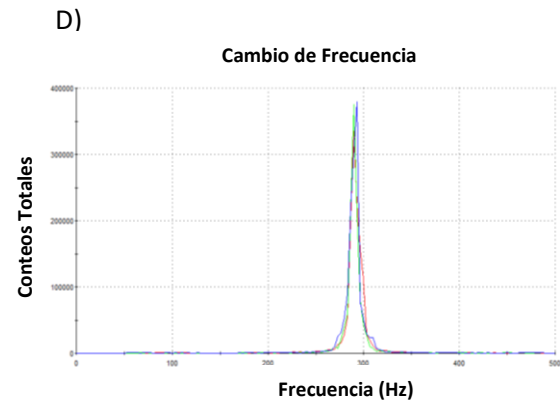
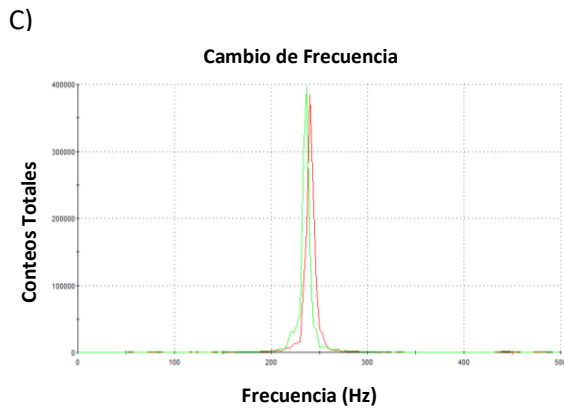


Figura 21.-Gráfico de Fase y Frecuencia de la determinación del potencial Z para el sistema: Metarin / Colesterol / Manitol

Las **Figura A y B**, corresponden al gráfico de fase, el cual está dividido en dos pendientes positivas y negativas, que tienen una muy buena señal, esto quiere decir que los liposomas tienen una buena movilidad electroforética media con y sin Rapamicina y el criterio de calidad por parte del programa del equipo, indica que las formulaciones de liposomas son de buena calidad, y en las **Figuras C y D**, se muestran señales bien definidas que nos indican que ambas muestras son estables de acuerdo al programa.

De acuerdo a la **Tabla 7**, la adición del fármaco al sistema de liposomas coadyuva a que el tamaño se aumentara aproximadamente 27 nm del promedio de la población, pero también el sistema se volvió ligeramente más polidisperso con base al PDI y el potencial Z es más negativo, lo que favorece un mayor número de repulsiones entre cada liposoma y evita que el sistema sea inestable.

Tabla 7.-Comparación de Tamaño de partícula, Potencial Z y PDI para el sistema Metarin/Colesterol/Manitol (MCM) con y sin fármaco.

Sistema Metarin / Colesterol / Manitol sin Rapamicina			Sistema Metarin / Colesterol / Manitol sin Rapamicina		
Tamaño d. nm	PDI	Potencial Z mV	Tamaño d. nm	PDI	Potencial Z mV
244.5±5.84	0.334±0.032	-49.7±2.33	271.0±14.19	0.408±0.011	-52.0±1.36

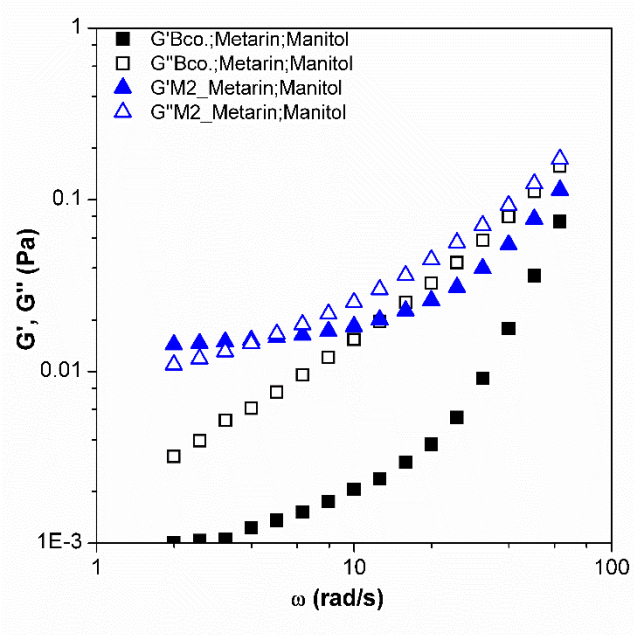
En las pruebas reológicas se observó que las curvas de flujo oscilatorio de baja amplitud de deformación (**Figura 22A**) para el sistema MCM sin fármaco que el módulo viscoso (G'') predomina sobre el módulo elástico (G'), es decir ($G'' > G'$), esto significa que esta formulación se comporta más como un fluido viscoso que como un líquido. Cabe señalar que a bajas frecuencias y a tiempos largos se observa una la formación de una meseta en G' , que representa las interacciones entre los liposomas, debido a las repulsiones entre estos por el efecto del potencial Z, lo cual ayuda a mantener estable al sistema. Sin embargo, al agregar la Rapamicina cambia completamente la forma de la gráfica, ya que a bajas frecuencias de deformación y tiempos largos ($\omega < 4$ rad/s) predomina el módulo elástico (G') sobre el módulo viscoso (G''), esto se debe al efecto del aumento del número de repulsiones cuando el potencial Z se hace más negativo, por consecuencia el sistema tiende a comportarse más como un sólido. Al llegar a una fuerza de deformación ($\omega = 4$ rad/s) hay un punto de cruce donde ($G' = G''$) y significa que al llegar a este tiempo la muestra tiene características como un sólido y un líquido viscoso Finalmente, cuando la fuerza de deformación ($\omega > 4$ rad/s) el módulo viscoso (G'') predomina sobre el módulo elástico (G'), es decir ($G'' > G'$). Ocurriendo el efecto contrario del inicio.

Con estos resultados podemos observar que la formulación de liposomas será estable al flujo tanto en su vida de anaquel como en el punto donde se requiere el efecto terapéutico, ya que tiene una viscosidad mayor a la del agua y una buena estabilidad mecánica al flujo, que favorecerá la permanencia en el sitio de aplicación.

Es muy importante garantizar que la muestra permanezca por más tiempo en su sitio de acción y que resista las pequeñas deformaciones mecánicas presentes durante el lagrimeo o parpadeo para que los liposomas puedan atravesar las barreras oculares.

En cuanto a la **Figura 22B**, esta representa las pruebas de flujo a la cizalla simple, se observa que la formulación de Liposomas MCM con y sin fármaco tienen un comportamiento no Newtoniano del tipo adelgazante al flujo ($n < 1$), debido a que a las fuerzas electrostáticas que mantienen a los liposomas se debilitan conforme la velocidad de deformación aumenta. Al inicio de la prueba ambos sistemas mantienen la misma viscosidad, esto significa que mientras no exista una fuerza externa que perturbe el sistema va a ser la misma para ambas formulaciones, pero a medida que aumenta la velocidad de corte ($\dot{\gamma} \geq 2 \text{ s}^{-1}$) hay una separación de la viscosidad entre el sistema con y sin Rapamicina. Los liposomas con el principio activo encapsulado son más viscosos que los liposomas vacíos y tienen un cambio de pendiente gradual. Por lo que suponemos que el potencial Z está ayudando a la estabilidad de la formulación y también lo hace mecánicamente más estable al flujo.

A)



B)

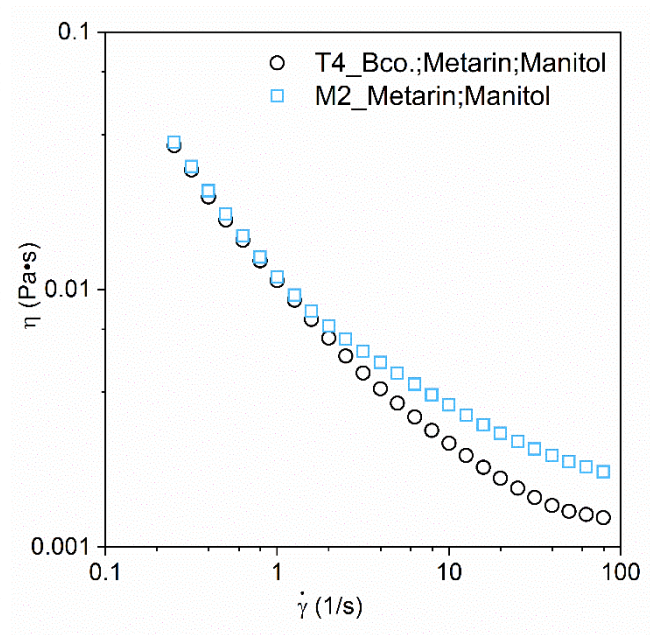


Figura 22.- Comparación reológica de la Formulación: Metarin/Colesterol/Manitol (MCM) con y sin Rapamicina. A) Módulo Elástico G' y Viscoso G'' en función de frecuencia bajo la prueba SAOS para la formulación de liposomas con y sin fármaco. B) Viscosidad de las formulaciones bajo un flujo de corte simple.

4.4.- Microscopia electrónica de Transmisión (TEM) de la formulación de liposomas: Metarin/Colesterol/Manitol (MCM) con y sin Rapamicina.

De esta técnica se obtienen micrografías que poseen una resolución mayor que la Microscopía de Barrido (SEM), cuyas zonas más brillantes corresponden a una gran cantidad de materia (mayor densidad o mayor número atómico) (http://www.linan-ipicyt.mx/Microscopio_HR-TEM.html 25/2/22) por lo tanto, la **Figura 23** nos muestra un análisis de la Formulación de Liposomas desde otra perspectiva.

La **Figura 23 A**, es una vista de la solución de liposomas MCM sin fármaco en el cual podemos apreciar con mejor resolución que el sistema casi mantiene el mismo tamaño para toda la población de Liposomas. Entonces en la **Figura 23B**, se hizo un acercamiento a uno de los liposomas capturado en la **Figura 23A**, y observamos un liposoma esférico con muchas subdivisiones internas, de acuerdo con la clasificación que existe para los liposomas, puede que esta formulación contenga Liposomas Multilamelares.

La **Figura 23C**, corresponde a la solución de liposomas MCM con fármaco en el cual se observa una población de Liposomas bien definida y comprueba lo obtenido por DLS.

Finalmente, en la **Figura 23D** se observa un acercamiento a un liposoma de la imagen anterior, en esta imagen observamos que el liposoma multilamelar que se había formado en la segunda figura, al menos para esta formulación cambió a un sistema liposomas unilamelar. Muy posiblemente el cambio de estructura se debió a que el liposoma logró encapsular a la Rapamicina, y por lo tanto adoptó una estructura que le permite mantener el fármaco encapsulado sin que se pierda la estabilidad.

De acuerdo con otros estudios llevados a cabo por **Linares-Alba et al., (2016); Zhang et al., (2012)**, ellos realizan el mismo sistema de liposomas por calentamiento y dispersión de la lecitina por lo tanto su sistema obtenido y analizado por TEM coincide con estos resultados.

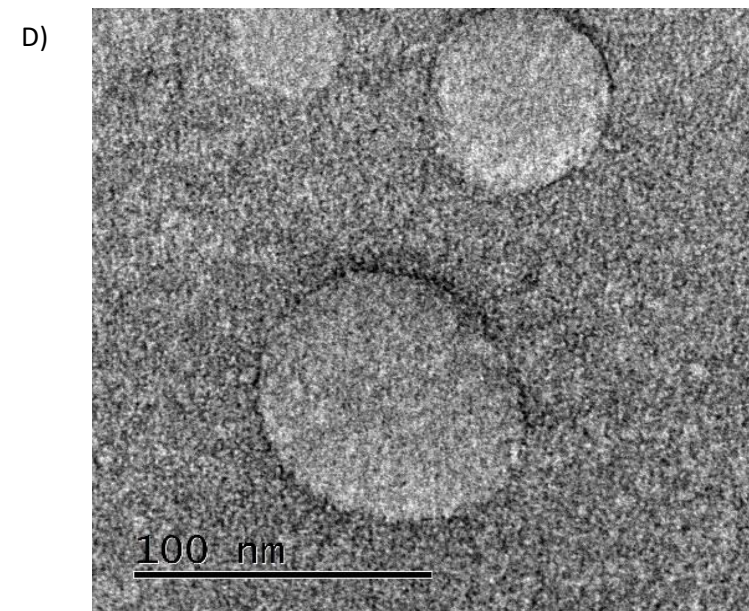
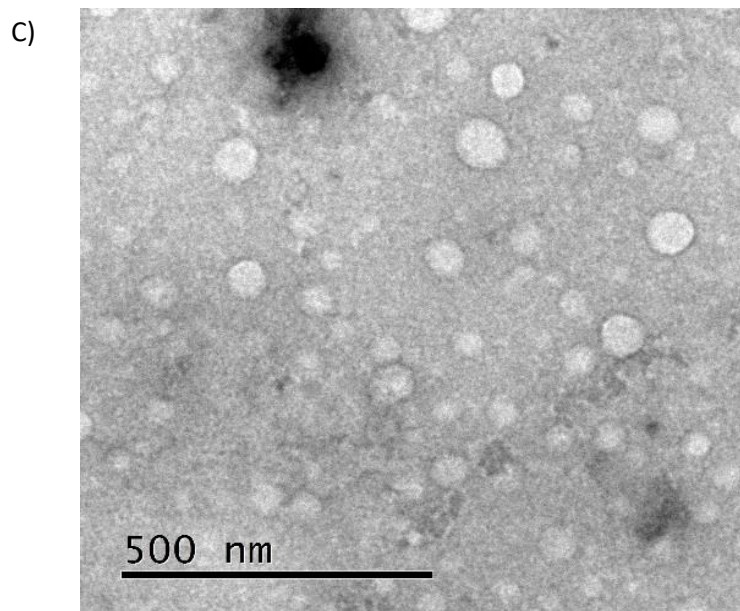
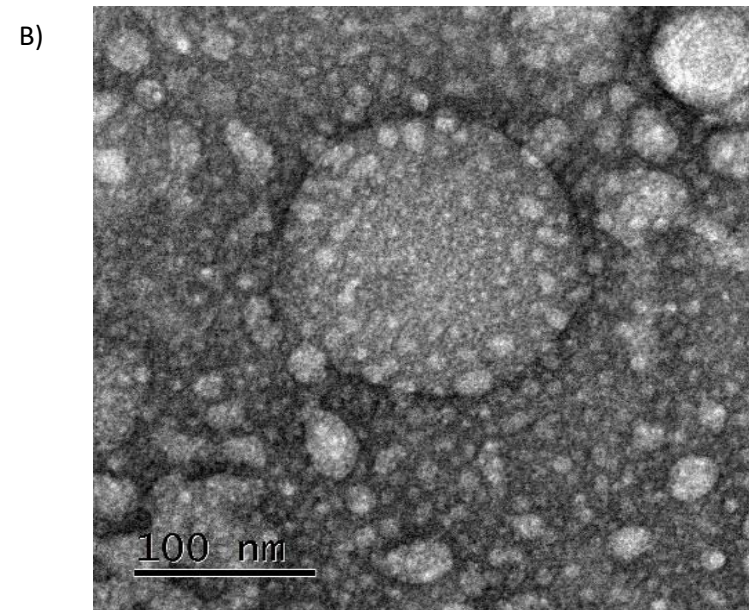
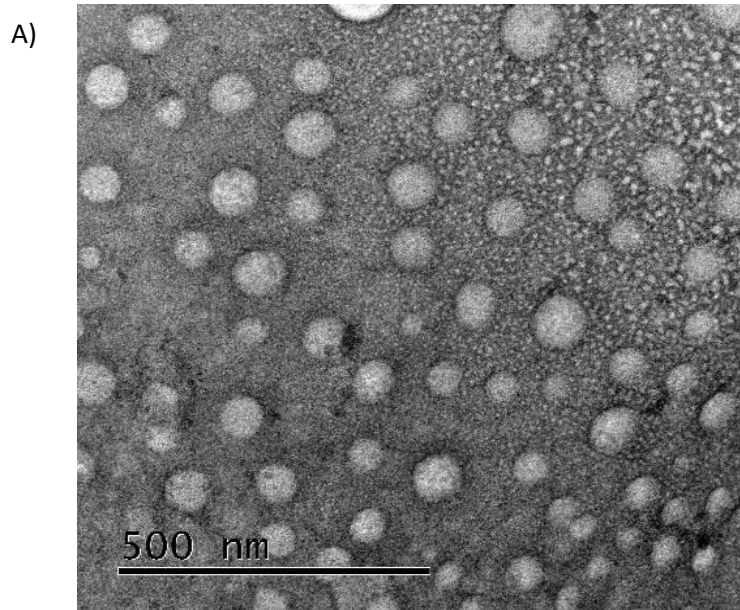


Figura 23.- Microscopía electrónica de Trasmisión de la Formulación de Liposomas: Metarin/Colesterol/Manitol (**MCM**) con y sin Rapamicina. A) Sistema **MCM** sin fármaco a un aumento de una escala de 500 nm) Sistema **MCM** sin fármaco a un aumento de una escala de 100 nm. C) Sistema **MCM** con fármaco a un aumento de una escala de 500 nm y D) Sistema **MCM** con fármaco a un aumento de una escala de 100 nm.

4.5.- Caracterización Química de la Formulación de Liposomas: Metarin/Colesterol/Manitol (MCM).

En este apartado analizaremos los aspectos químicos y estructurales de los materiales empleados, así como de la formulación final de liposomas. Por lo que primero necesitamos saber cuánto fármaco se encapsulo y qué cantidad de Lecitina se ocupó para formar el sistema. Para la cuantificación de las sustancias mencionadas, se empleó la técnica de absorción UV - Vis, medimos la absorbancia de concentraciones conocidas de Rapamicina y Lecitina para el trazado de las curvas de calibración mostradas en el **Anexo 3**.

La Eficiencia de Entrampe (EE%), nos indica cuanto fármaco esta encapsulado dentro del liposoma. Para ello se analizaron tres muestras y los resultados se enlistan en la **Tabla 8**.

Tabla 8.- Porcentaje de Rapamicina Encapsulada por cada Lote

Formulación	Eficiencia de Entrampe EE%
M1 MCM	0.56 ± 0.20
M2 MCM	0.67± 0.20
M3 MCM	0.80± 0.23

De acuerdo con estos resultados la EE% es limitada por la poca solubilidad de la Rapamicina en agua, recordemos que este principio activo es muy poco soluble (2.6 µg/mL) (**Sun et al., 2011**). De igual forma **Tonix (2017) reportó** problemas con el porcentaje de encapsulación porque también obtuvo rendimientos muy bajos debido a la baja solubilidad del fármaco.

Otra razón por la cual no se está obteniendo un buen porcentaje de entrampe es porque la Rapamicina se adhiere al material de vidrio, ya que existe una alta afinidad de este analito por el borosilicato que está presente en la cristalería de los instrumentos usados y en los contenedores del producto terminado (**Herman, 2004; Napoli & Taylor, 2001**) lo que disminuye su concentración en el medio. **Buech et al., (2007)** propuso utilizar concentraciones elevadas de fosfolípidos, más sin embargo no obtuvieron los resultados esperados ya que no detectaron la presencia de la Rapamicina en los liposomas. Esto se puede atribuir a que su preparación no fue la óptima, y por lo tanto el principio activo se perdió en la etapa de filtrado.

Para corroborar la pérdida que se tiene al momento de la fabricación y tener un aproximado de lo que se pierde en cada etapa del proceso. Se elaboró en la **Tabla 9**, con la finalidad de obtener los miligramos de Rapamicina perdidos en cada una de las etapas de fabricación. Para hacer esta cuantificación solo se utilizaron 10.0 mg de Rapamicina.

Tabla 9.- Conciliación de Rapamicina durante el proceso de fabricación

Proceso	Cantidad de Rapamicina pérdida en mg	Cantidad de Rapamicina pérdida en %
Pesado	10.0000	100
Agitación en Matraz	0.0009	0.009
Extrusión en filtro de 0.45 μ	0.0101	0.1
Extrusión en filtro de 0.22 μ	0.0553	0.5
Fármaco libre	0.0002	0.002
Fármaco encapsulado	0.0007	0.007
Cantidad adherida a vidrio	9.9328	99.32

Con base en esta información se obtuvo que en los procesos de Extrusión en filtro de 0.22 μ y Cantidad adherida a vidrio es en donde hay mayor pérdida de Rapamicina. En el trabajo de **Tonix (2017)**, se propuso solubilizar el fármaco primero en metanol y después adicionarlo a la dispersión de liposomas, pero esta propuesta no parece solucionar el problema de la solubilidad, y mejorar el porcentaje de fármaco encapsulado porque el metanol se volatiliza y por lo tanto el principio queda dentro del buffer de PBS que es un medio acuso, lo que provocó que la Rapamicina volviera a sedimentarse.

Otro factor que puede afectar la Eficiencia de Entrampe es la concentración de Fosfolípido empleado en la formación del liposoma. Por ello calculamos la cantidad de fosfolípidos empleada. Para esto la **Tabla 10** se muestran tres lotes preparados con 6 formulaciones, para dar un total de 18 muestras, la mitad de los formulados eran liposomas vacíos y la otra mitad con el fármaco cargado.

Tabla 10.- Cuantificación de lecitina empleada en la elaboración de liposomas vacíos y cargados con Rapamicina

<i>Lote</i>	<i>Formulación</i>	<i>Concentración de Lecitina en liposomas vacíos (mg/mL)</i>	<i>Concentración de Lecitina en liposomas con fármaco (mg/mL)</i>
<i>L1</i>	M1 MCM	0.032	0.037
	M2 MCM	0.031	0.044
	M3 MCM	0.076	0.089
<i>L2</i>	M1 MCM	0.023	0.065
	M2 MCM	0.066	0.091
	M3 MCM	0.072	0.099
<i>L3</i>	M1 MCM	0.036	0.046
	M2 MCM	0.045	0.053
	M3 MCM	0.043	0.058

Con estos datos (**Tabla 10**), se aplica una relación entre la Concentración de Lecitina en liposomas con fármaco respecto a la Concentración de Lecitina en liposomas vacíos y obtenemos que la lecitina aumenta en promedio 1.3 veces cuando se añade la Rapamicina, y con esta información calculamos que la cantidad aproximada de fármaco que puede encapsularse es de 0.001 mg por 0.064 mg de lecitina en promedio. Esto también confirma el aumento de tamaño de partícula de los liposomas que se obtuvo en el apartado 4.3.

Los resultados obtenidos en esta parte, tienen un parecido con los estudios de **Rouf et al., (2009)**, donde la cantidad neta de Rapamicina que encapsularon fue de entre 1.78 y 2.25 mg de fármaco por 100 mg de fosfolípido total.

Finalmente, el factor: **Marca de Fosfolípido** indica que es importante para este trabajo porque de acuerdo con las **Figuras 19 y 21** esto influyó en la estabilidad mecánica al flujo de los preparados de liposomas y muy posiblemente también puede influir en la eficiencia de entrapamiento por el contenido de fosfolípidos que se explica en el Anexo 1.

4.6.- Análisis de liberación controlada de la Rapamicina a partir del sistema liposomal: Metarin – Colesterol – Manitol.

Los perfiles de liberación del fármaco encapsulado son muy importantes para determinar cuánto tiempo puede permanecer el fármaco dentro del liposoma y cómo sería su liberación a lo largo del tiempo, por lo tanto, las suspensiones de liposomas mencionadas en la Tabla 8 fueron evaluadas. Este experimento se realizó tomando un volumen de 3 mL de muestra y se colocó dentro de una membrana de diálisis con 3 mL de medio de liberación, lo que nos da un volumen final de 6 mL. Recordemos que la encapsulación de Rapamicina no fue la adecuada, lo que significa una parte está adherida al vidrio y otra parte está dispersa fuera del liposoma, por lo que podemos tener una variación muy alta si planteamos que el 100% son los 0.001 mg que se encapsularon. Entonces consideramos que en 1 mL de formulación habrá 1 mg de Rapamicina según a lo indicado en la metodología. Por lo que al realizar los cálculos de dilución correspondientes obtenemos que dentro de la membrana de diálisis hay una concentración aproximada de 0.5 mg/mL de Rapamicina.

Adicionalmente, también se analizó la liberación de 3 muestras como control que contenían una concentración de 1 mg/mL de fármaco solubilizado en un volumen de 6 mL con medio de liberación dentro de una membrana de diálisis para ver si esta no interfiere con la liberación del fármaco, y ver el comportamiento de la liberación sin el sistema de liposomas.

Estas cinéticas de liberación tuvieron un seguimiento por 12 horas con la finalidad de obtener el mejor modelo matemático que se ajuste a la liberación de la Rapamicina contenida en la suspensión de liposomas.

Primero obtuvimos la curva de liberación del fármaco libre dentro de la membrana de diálisis (**Figura 24**). De acuerdo con este gráfico, observamos que, de las 12 horas para medir la liberación del principio activo, en una hora se libera aproximadamente el 80% de fármaco y en 2 horas la Rapamicina ya está completamente fuera de la membrana de diálisis.

Con base en la información de la **Figura 24**, y al programa DDsolver elaborado por **Zhang et al., (2010)** se realizó el ajuste de los datos para obtener el mejor modelo matemático que explique el cómo es que se lleva a cabo la liberación de la Rapamicina soluble dentro de la membrana de diálisis.

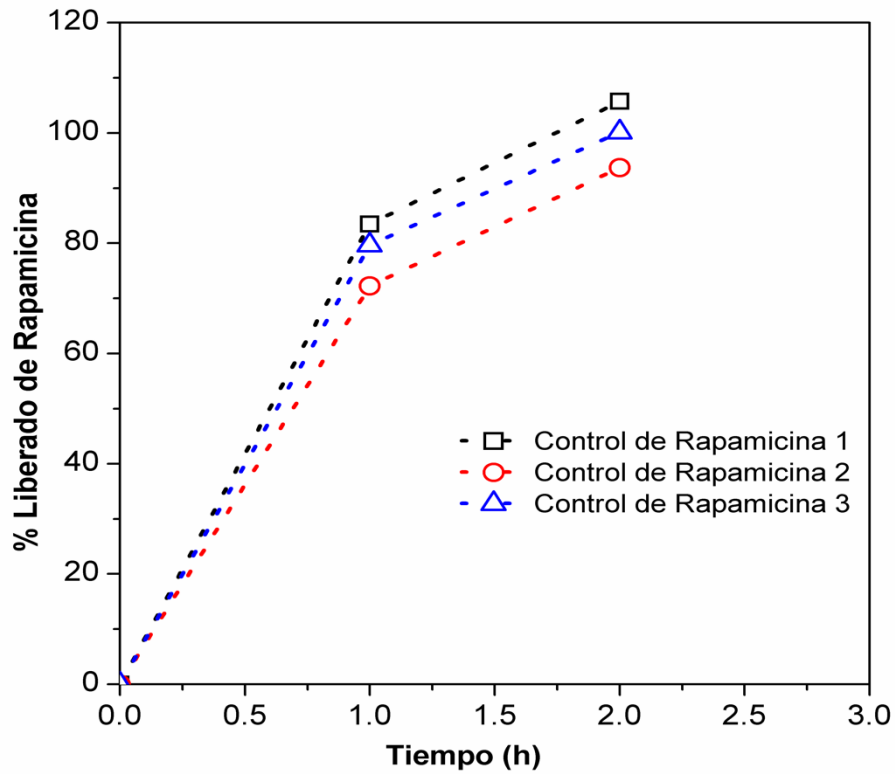


Figura 24.-Cinética de Liberación del grupo Control

De acuerdo con el ajuste estadístico indicado en la **Tabla 11**, los mejores modelos matemáticos que tuvieron un buen ajuste a nuestro sistema fueron: el modelo de Higuchi, el modelo de Hixson-Crowell, y el modelo de Primer – Orden.

Tabla 11.- Ajuste estadístico de los modelos matemáticos

MODELO PARÁMETRO	HIGUCHI	HIXSON- CROWELL	PRIMER – ORDEN
N	3	3	3
DF	2	2	2
R_OBS-PRE	0.9965	0.9993	0.9999
RSQR	0.9925	0.9975	0.9997
RSQR_ADJ	0.9925	0.9975	0.9997
MSE	21.1274	7.3369	14
MSE_ROOT	4.5336	2.2715	3.1225
SS	42.2548	14.6738	27.4291
WSS	42.2548	14.6738	27.4291
AIC	13.0562	7.0295	9.3113
MSC	3.2439	5.2528	4.4922

N.- Número de muestras

DF. - Grados de Libertad de cada suma de cuadrados

R_obs-pre. - Coeficiente de correlación

Rsqr. - Coeficiente de determinación (R^2)

Rsqr_adj.- Coeficiente de determinación ajustado (R^2 ajustado)

MSE. - Error cuadrático medio

MSE_root. - Desviación estándar de los residuos

SS.- Sumas de cuadrados

WSS. - Suma ponderada de cuadrados

AIC. - Criterio de información de Akaike

MSC. - Criterio de selección del modelo

Con base en el trabajo publicado por **Zhang et al., (2010)**, los criterios más usados en el campo de la identificación del modelo de disolución son el R^2 ajustado, el AIC, y el MSC y en la información de su material suplementario de apoyo que es una introducción a los enfoques utilizados (programa DDSolver) nos indican cuales son los criterios a considerar (**Tabla 12**) para elegir el mejor modelo, de acuerdo a nuestros resultados.

Tabla 12.- Resumen de los enfoques dependientes del modelo utilizados para comparar los perfiles de disolución

Modelos Candidatos	Criterios para la selección del modelo
Zero-order, First-order, Hixson-Crowell, Higuchi, Quadratic, Weibull, Gompertz, Logistic	MSC
First-order, Hixson-Crowell, Higuchi, Weibull, Logistic	COD, RMS
Zero-order, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, First-order, Hixson-Crowell, Weibull, Logistic	AIC

MSC. - Criterio de selección del modelo

AIC. - Criterio de información de Akaike

RMS. - Error cuadrático medio (MSE)

COD. - Coeficiente de determinación (R^2)

Conforme a los criterios expuestos en la **Tabla 12**, para el coeficiente de determinación (R^2) según **Costa & Sousa Lobo, (2001)** se puede usar el valor que está más cercano a 1 para el mismo número de parámetros, porque representa un mejor ajuste entre los resultados teóricos con los experimentales. Entonces con base en la información de la **Tabla 11**, el que cumplió con este parámetro fue el de Primer – Orden con un valor de 0.9997.

Para seleccionar el que tiene el mejor valor del error cuadrático medio **Hurtado y de la Peña et al., (2003)**, indican que debe tener un valor de RMS bajo, debido a que se tiene un buen ajuste. De acuerdo con los resultados obtenidos de la **Tabla 11** el que cumplió este criterio es el de Hixson-Crowell con un valor reportado de 7.3369.

En cuanto al Criterio de información de Akaike (AIC) en el trabajo de **Yamaoka et al., (1978)**. Ellos reportaron una técnica estadística para estimar el número de términos exponenciales n , para modelar la distribución de sus fármacos de estudio en el cuerpo a lo largo del tiempo después de una inyección por vía intravenosa y seleccionaron el que tiene el valor mínimo de AIC porque indica que los resultados experimentales tuvieron un buen ajuste o que es menos complejo. Por lo tanto, este criterio ofrece un valor objetivo que, de manera relativa, cuantifica simultáneamente la precisión y sencillez del modelo.

Según nuestra **Tabla 11** el modelo de Hixson-Crowell es el que cumple con los criterios mencionados, en donde encontramos un valor de 7.0295. Por último, en el estudio de **Mayer et al., (1999)** indican que el criterio de selección del modelo MSC es un parámetro que permite comparar el juego de datos experimentales a diferentes ajustes matemáticos y relaciona el coeficiente de determinación al número de parámetros que son requeridos para obtener el gráfico, por lo tanto, el más adecuado es el que tiene un valor más alto de MSC. Con respecto a esta información y con los datos que se obtuvieron en la **Tabla 11**, sabemos que el modelo de Hixson-Crowell también cumple con este criterio ya que se obtuvo un valor de 5.2528.

Entonces, el modelo matemático de Hixson-Crowell es el que mejor se ajustó al experimento con 3 de 4 parámetros estadísticos cumplidos, indicando que la liberación de la Rapamicina se debe a una disminución de las partículas del fármaco dentro de la superficie interna que lo contiene por un proceso de disolución (**Costa & Sousa Lobo, 2001**).

De acuerdo a **Hixson & Crowell, (1931)** que son los autores de este modelo, el proceso de disolución tiene lugar en la superficie de contacto de la membrana cuando la agitación dentro del medio de liberación es el mismo.

Esto quiere decir que la concentración de 1.0 mg/mL de Rapamicina al interior de la membrana de diálisis, forma cilíndrica de área constante (**Figura 25**), se disolverá al mismo tiempo que disminuye el volumen de la membrana, sin perder su forma geométrica, ver **Figura 26**.

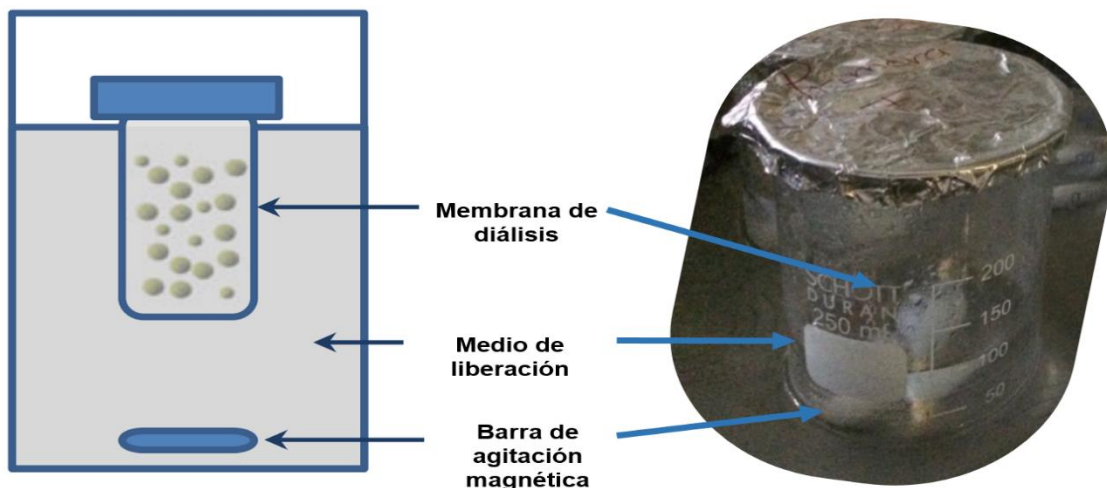


Figura 25. - Sistema de Liberación In vitro, imagen tomada y editada de: **Amatya et al., 2013**.

Con base en lo anterior, este modelo, supone que la liberación está limitada por la velocidad de disolución en el medio y no por la difusión de la Rapamicina. Lo cual tiene sentido, porque el principio activo solo estaba disuelto en un determinado volumen, y no estaba al interior de una forma farmacéutica o dentro de un sistema de liberación de fármacos.

Sin embargo, es importante aclarar que la membrana de diálisis es de Celulosa regenerada, la cual no se solubiliza ni se degrada en nuestro medio de liberación, pero es un material permeable y por lo tanto el volumen interno como externo entran en contacto. Con base en esto, a medida que la Rapamicina se va disolviendo por el efecto del medio exterior, disminuye la concentración interna del soluto, que pudo ocasionar un cambio en la presión interna y por efectos de gradientes de difusión, se haya perdido un poco del volumen interno también, lo que pudo causar el efecto ejemplificado en la **Figura 26** porque al finalizar este experimento, se notó una ligera reducción del volumen que había al interior de la membrana.

Debido a lo anterior, con el modelo matemático de Hixson-Crowell construimos un gráfico de la cinética liberación teórica de Rapamicina (**Figura 27**), sin la influencia de algún sistema de liberación de fármacos para las primeras 2 horas que tarda en liberarse 100%.

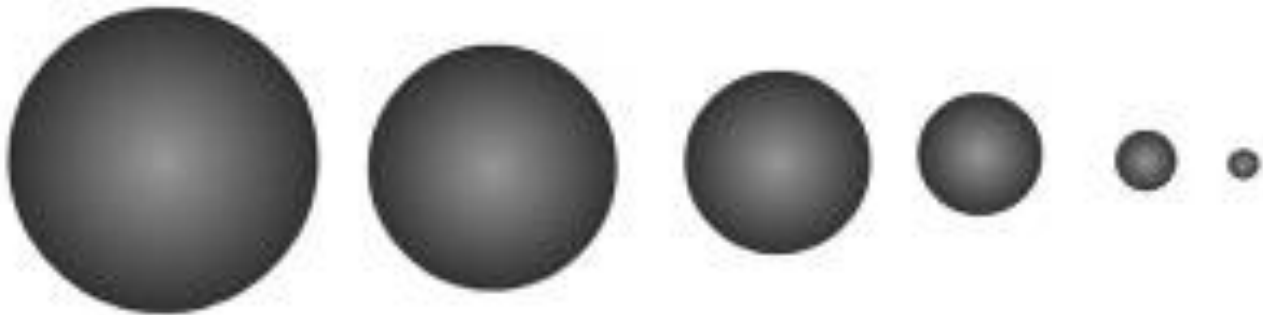


Figura 26.- Disminución proporcional de la superficie interna del sistema de liberación (Membrana de diálisis). Imagen tomada de: "5 - *Mathematical models of drug release*," (2015).

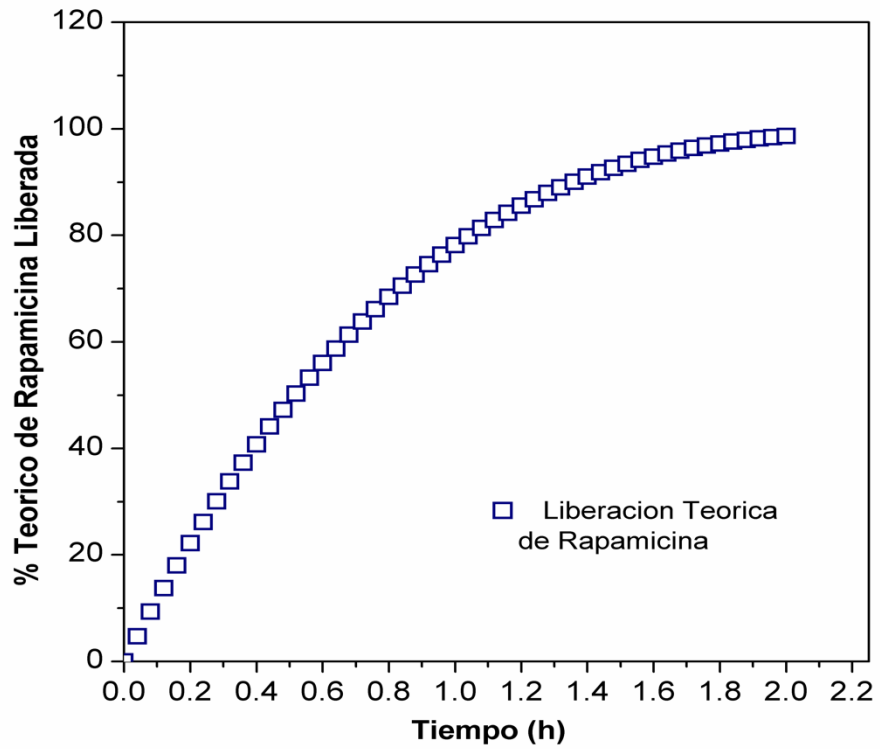


Figura 27.- Cinética de Liberación teórica de Rapamicina con base en el modelo matemático de Hixson-Crowell

Una vez que conocemos el tipo de cinética de liberación de la Rapamicina disuelta dentro de una membrana de diálisis, determinamos el de los modelos de liberación para las muestras indicadas en la **Tabla 8**, y los resultados para este análisis se muestran en la **Figura 28**.

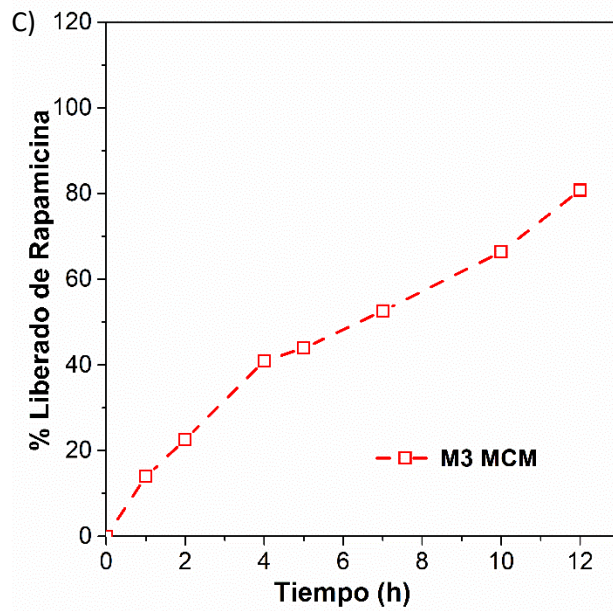
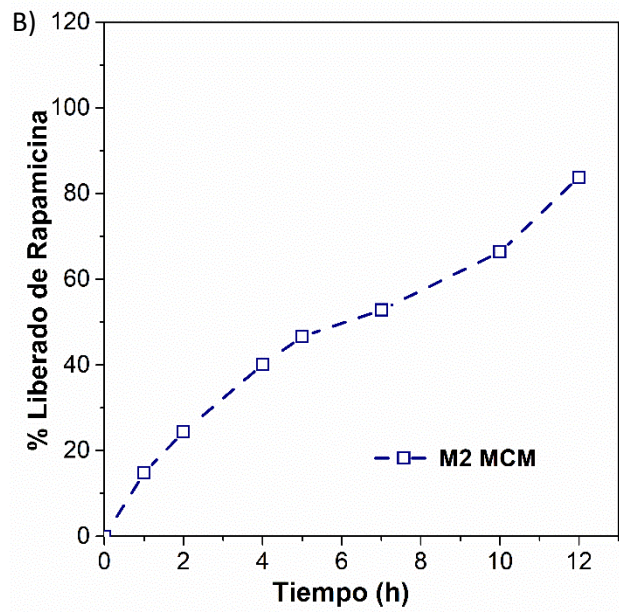
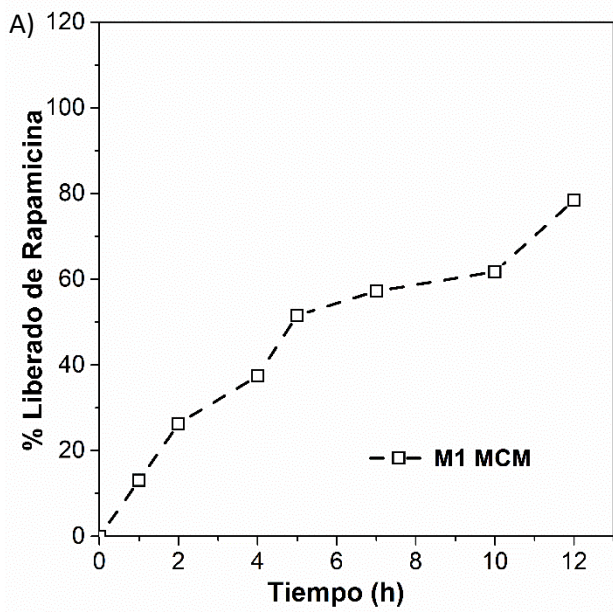


Figura 28.- Cinética de Liberación de las diferentes formulaciones de Liposomas cargados con Rapamicinia. A) Formulación M1 MCM. B) Formulación M2 MCM y C) Formulación M3 MCM

Con base en la información graficada en la **Figura 28**, observamos que las tres formulaciones, durante las primeras cuatro horas, el fármaco se libera a una velocidad constante y siguen la misma tendencia, pero la formulación M1 MCM cuando alcanza este tiempo, libera menos del 40% de principio activo y las otras dos liberaron un poco más. Cuando han transcurrido seis horas del experimento, los sistemas liberan a la Rapamicina de forma sostenida, pero a una baja velocidad y este ritmo de liberación se mantiene por casi dos horas. Después la cinética de liberación es más rápida, pero para la suspensión de liposomas M1 MCM todavía mantiene una baja tasa de liberación hasta alcanzar las 10 horas y después sigue la misma tendencia de las otras dos formulaciones.

De acuerdo con la gráfica de la **Figura 28** y al programa Ddsolver reportado por **Zhang et al., (2010)** se realizó el ajuste de los datos para obtener el modelo matemático que explique el cómo es que se lleva a cabo la liberación de la Rapamicina contenida en los sistemas liposomales y los resultados que se obtuvieron, están en la **Tabla 13**.

Tabla 13.- Modelos matemáticos que mejor explicaron la liberación de la Rapamicina del interior del liposoma

Modelo Parámetro	Primer Orden	Korsmeyer- Peppas	Makoid- Banakar	Peppas-Sahlin
N	8	8	8	8
DF	7	6	5	5
R_obs-pre	0.990531	0.9933891	0.993991	0.993869
Rsqr	0.979284	0.9867831	0.988013	0.987771
Rsqr_adj	0.979284	0.9845803	0.983218	0.982879
MSE	15.00206	11.069185	12.05203	12.30363
MSE_root	3.833623	3.2112269	3.364228	3.404017
SS	105.0144	66.415109	60.26014	61.51813
WSS	105.0144	66.415109	60.26014	61.51813
AIC	38.89684	36.437958	37.79549	38.00138
MSC	3.281925	3.5892851	3.419594	3.393857

Con base en el trabajo publicado por **Zhang et al., (2010)**, y a los criterios anteriormente mencionados sobre el R^2 ajustado, el AIC, y el MSC, el mejor modelo de disolución para los resultados mostrados en la **Tabla 13** fue el de Korsmeyer-Peppas.

El modelo de Korsmeyer-Peppas, combina dos modelos matemáticos diferentes que explican el paso de fármacos vía difusión – erosión a través de una barrera que controla la disolución

de estos en su medio de liberación. Con base en esto, el modelo de Korsmeyer describe el comportamiento de la liberación general de un soluto a través de una matriz de liberación controlada (**Ecuación 10**) y el modelo de Peppas indica si el mecanismo de liberación del soluto es por medio de un mecanismo de difusión Fickiano o involucra la desintegración de la matriz (**Ford, 1991**).

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n \quad (10)$$

Donde:

$\frac{M_t}{M_\infty}$ = fracción de fármaco liberada

t = tiempo de liberación

k = Constante cinética

n = exponente de difusión para el fármaco

Entonces en la **Tabla 14**, se muestran estas variables calculadas por el programa DDSolver, obtenidos del perfil de la liberación de Rapamicina de cada formulación, para determinar el mecanismo por el cual el fármaco sale del interior de los liposomas.

Tabla 14.-Ajuste de datos de la liberación de Rapamicina de los Liposomas

Formulación	Constante cinética k(h ⁻ⁿ)	Exponente n
M1 MCM	17.125	0.601
M2 MCM	15.229	0.667
M3 MCM	14.733	0.672

Según a lo reportado en el trabajo de **Wu (2019)**, el modelo de Korsmeyer-Peppas, es una regresión no lineal muy utilizada para describir la liberación de un fármaco a través de un sistema de liposomas. De acuerdo con la ecuación 10, la constante K proporciona principalmente información sobre la formulación del fármaco, como las características estructurales de las nanopartículas, mientras que el exponente n se relaciona con el mecanismo de liberación con el fármaco.

Entonces los datos ajustados a este modelo se refieren a la difusión a través de barreras de baja retención / alta retención debido a la capa de fosfolípidos, lo que explica también, el comportamiento de las gráficas de la **Figura 28**.

Wu (2019), evaluó la liberación de dos sistemas liposomales cargados con cafeína e hidrocortisona. Reportaron que una constante K más alta indica que el sistema facilita la liberación de la cafeína debido a la alta permeabilidad. Por el contrario, un valor más bajo de K indica una cinética de transporte baja para el sistema de hidrocortisona, por lo tanto, una liberación de fármaco baja de los nanoportadores porque se queda principalmente en el interior. Entonces debido a que la formulación reportada en este informe es similar al del trabajo anterior, entonces los resultados de la constante K presentados en la Tabla 13, hacen referencia a un sistema de liberación en donde la Rapamicina es muy permeable a estas estructuras fosfolípicas y de acuerdo con los valores obtenidos de n, sigue una difusión anómala o no Fickiano, lo que también explica el comportamiento de los gráficos mostrados en la **Figura 28**.

Finalmente, en el trabajo publicado por **Korsmeyer, (1983)** nos habla de que este modelo es adecuado para sistemas hinchables, es decir que, haya un aumento de tamaño progresivo de las partículas estructurales del sistema, que permite cambios de la movilidad de las cadenas macromoleculares, en este caso la estructuras fosfolípicas del liposoma, permitiendo que la estructura tenga huecos por donde la Rapamicina difunde al medio. El liposoma al ser una barrera compuesta por cadenas largas de fosfolípidos, el sistema se afecta por la explicación anterior y sus propiedades como la viscosidad puede retardar la liberación del fármaco.

De acuerdo con la **Figuras 14 y 22**, referentes a la curva de viscosidad a la cizalla simple de la marca comercial de lecitina Metarin, y la curva de viscosidad a la cizalla simple del sistema de liposomas con el fármaco, se observó que a bajas velocidades de deformación la lecitina que compone este sistema, presenta una viscosidad elevada producida por la naturaleza de las cadenas de los fosfolípidos, y en la **Figura 28** durante las primeras 7 horas de la liberación, hay un efecto retardante en la difusión de la Rapamicina debida a la viscosidad.

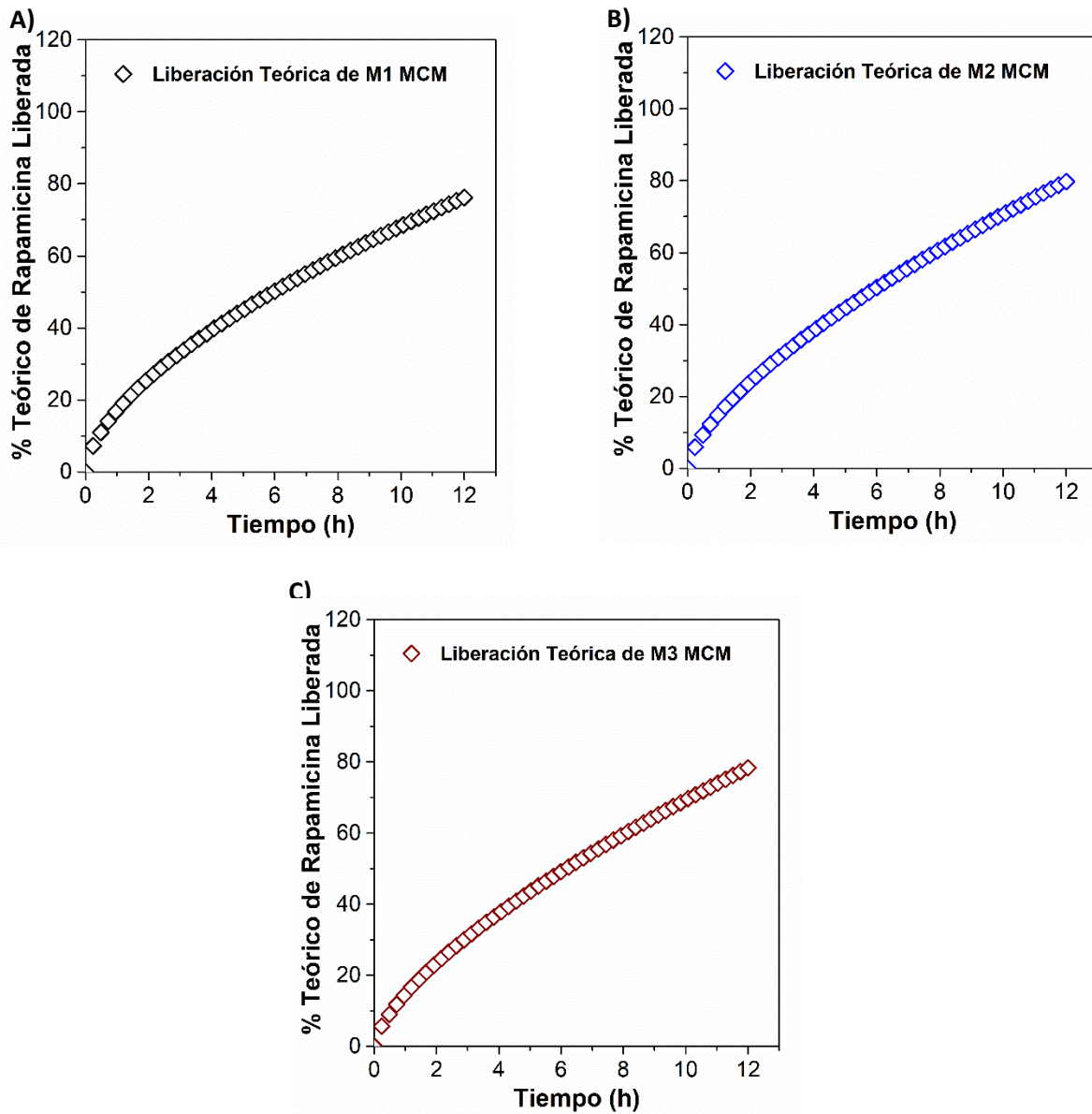


Figura 29.- Cinética de Liberación teórica de las diferentes formulaciones de Liposomas cargados con Rapamicina. A) Formulación M1 MCM. B) Formulación M2 MCM y C) Formulación M3 MCM

Entonces, con el modelo matemático de Korsmeyer-Peppas y el programa DDSolver elaborado por **Zhang et al., (2010)** se realizó la curvas de liberación teóricas para poder observar el efecto indicado el párrafo anterior, **Figura 29.**

5.- CONCLUSIONES.

Los resultados obtenidos en las pruebas químicas y reológicas de este estudio mostraron que los materiales empleados (lecitina y crioprotectores) en la formulación de liposomas tienen una buena estabilidad química y mecánica al flujo. Sin embargo, al realizar la fabricación de liposomas con la lecitina comercial (Metarin) y empleando manitol como crioprotector y colesterol, se obtuvo un sistema con mejor estabilidad mecánica al flujo, y con un buen tamaño de partícula (cuasi-modal), índice de polidispersión y potencial Z.

Al momento que se incorporó la Rapamicina a la formulación se logró una mejor estabilidad de las nanopartículas formadas. Pero por la poca solubilidad del fármaco en la fase dispersa donde se encuentra el sistema de liposomas, es poca la cantidad de principio activo que se logró encapsular. Por lo tanto, no se obtuvo una eficiencia de entrapamiento adecuada, con la cual no se alcanzó el efecto terapéutico esperado, mediante estas condiciones de producción.

Se sugiere buscar una mejor solubilidad del fármaco en una emulsión (O/W), y posteriormente atrapar con este sistema de liposomal propuesto para lo que se busca posibles aplicaciones farmacéuticas.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Se obtuvieron liposomas de Rapamicina de tamaño nanométrico que contienen una capa de fosfolípidos que separa la sustancia activa del exterior. Su forma cerrada le confiere una gran estabilidad mecánica al flujo debido a la estructura química de los materiales empleados, pero la capacidad de encapsular en su interior a la sustancia activa es muy baja.

Por lo que es necesario mejorar la suspensión de liposomas hasta obtener un sistema de liberación de efecto prolongado que pueda utilizarse como tratamiento para combatir la enfermedad de ojo seco que afecta a perros y poder desarrollar a futuro, un sistema similar que pueda ser aplicado en humanos para el tratamiento de otras enfermedades retinales.

De acuerdo a las revisiones bibliográficas realizadas por **Urquhart & Eriksen, (2019)** indican que los liposomas con diámetros <150 nm muestran un mejor tiempo de residencia - circulación *in vivo* y los liposomas con diámetros <200 nm pueden ser endocitosados fácilmente por las células. La biodistribución de los liposomas después de una administración intravítrea puede

mejorar con un potencial zeta bajo ($< + 20$ mV) y una modificación en la superficie con polietilenglicol (PEG) porque difunden fácilmente dentro de la retina, mientras que los liposomas sin una modificación en su superficie y con un potencial zeta grande ($> + 20$ mV) quedan atrapados en el humor vítreo. Entonces es de suma importancia considerar esta información para mejorar la calidad de la suspensión de liposomas propuesto en este trabajo.

También es importante señalar que el sistema ocular está bien protegido de materiales extraños y fármacos por varios mecanismos eficientes como: el parpadeo, lacrimación inducida y drenado nasolacrimal, que forman una barrera biológica y física causando un rápido removimiento de sustancias de la superficie ocular. Bajo condiciones normales el ojo humano puede soportar $25 \mu\text{L}$ - $30 \mu\text{L}$ de cualquier solución oftálmica, pero después de un parpadeo, el volumen se reduce de $7 \mu\text{L}$ a $10 \mu\text{L}$. (**Bucolo et al., 2012**). Entonces el éxito de la nueva formulación de liposomas para la administración ocular dependerá de las propiedades hidrofílicas – lipofílicas optimizadas de este sistema de nanopartículas porque tienen que lograr una buena mucoadhesividad, biocompatibilidad y desintegración al interior del ojo.

Además, es importante que la nueva formulación que se elabore, tenga una buena solubilidad del fármaco para alcanzar el efecto de liberación sostenida que se busca y también cuidar que sea lo más cómoda para su administración, no cause irritación, baja toxicidad y no obstruya la vista con el fin de que se pueda tener una buena aceptación de los pacientes (**Buech et al., 2007**), debido a lo anterior es muy importante continuar con las pruebas reológicas con la finalidad de probar materiales que cumplan con los criterios de aceptación y buena estabilidad mecánica a los efectos de deformación por el parpadeo.

Finalmente, por estudios reológicos de **Swindle et al., (2008)** en humor vítreo de cerdo, determinaron por medio de un reómetro capilar Vilastic-3 a una frecuencia de 2 Hz y a una velocidad de deformación de 0.1 s^{-1} que el módulo de almacenamiento (G') es de 3.46 ± 0.30 Pa y el módulo de pérdida (G'') es de 0.71 ± 0.12 Pa (**Figura 30**) lo que significa que su comportamiento es más elástico que viscoso.

Ellos también indican junto con otros autores que las propiedades viscoelásticas del humor vítreo de cerdo son muy semejantes al de un humano, por lo que el desarrollo de la nueva suspensión de liposomas deberá atravesar una barrera con estas características reológicas que la hacen mecánicamente estable al flujo, para garantizar el efecto terapéutico al interior de la cavidad ocular.

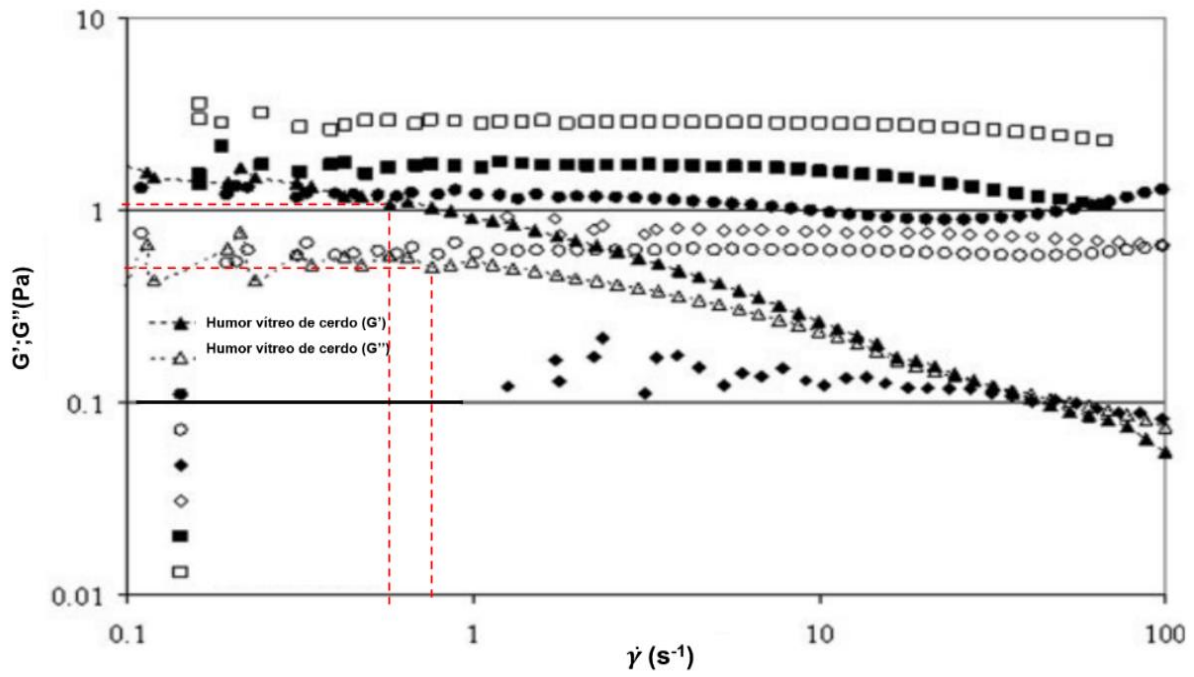


Figura 30.- Velocidad de Deformación Vs G' ; G'' de humor vítreo de cerdo, imagen editada de trabajo de **Swindle et al., 2008** para mostrar solamente la respuesta reológica de este material para este trabajo

Anexo 1.- Caracterización de química de las muestras comerciales de Lecitina.

Para realizar este estudio emplearon las técnicas analíticas de: Cromatografía en placa fina de 2 dimensiones, Índice de acidez, contenido insoluble en acetona, análisis infrarrojo, calorimetría diferencial de barrido y los resultados se presentan a continuación.

De acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos FEUM la lecitina es una mezcla compleja de fosfátidos insolubles en acetona y debe contener no menos del 50.0% de materia insoluble en este solvente, es decir debe de haber un bajo porcentaje que se solubilice y las tres lecitinas cumplen con esta prueba. Sin embargo, para el índice de acidez la monografía nos marca que no sea más de 36, con base en la información anterior la única Lecitina que lo sobrepasó es la marca Sigma Microbiológica. Esto puede ser porque a algunas lecitinas se les añade ácidos grasos libres destilados para que el producto tenga una viscosidad específica (**Van Nieuwenhuyzen, 2010**). Los resultados de las técnicas anteriores se muestran en la **Tabla 15**.

Tabla 15.- Resultados promedio para el índice de acidez y material insoluble en acetona para las 3 marcas diferentes de Lecitina

Lecitina comercial	Índice de acidez	Material insoluble acetona
Metarin	32.60	87.88
Sigma	22.29	95.15
Sigma Microbiológica	64.51	84.30

Luego se realizó la cromatografía en capa fina en 2 dimensiones sobre placa de sílice 0.25 mm, 20 x 20 cm con 2 soluciones, la primera estaba compuesta por Cloroformo, Metanol, Hidróxido de Amonio y la segunda tenía Cloroformo, Metanol, Ácido Acético Glacial y Agua. Para ver cualitativamente, la presencia de Fosfatidicolina (PC), Fosfatidiletanolamina (PE), Fosfatidilinositol (PI), Ácido Fosfátidico (PA), Lisofosfatidilcolina (LPC) y Lisofosfatidilcolina (LPE) que son los compuestos en mayor cantidad e importancia en las muestras comerciales de lecitinas y los resultados de este análisis se reporta en la **Figura 31**.

De acuerdo con la **Figura 31A**, tenemos los estándares de los compuestos mencionados para ver su elución sobre las placas de sílice y obtener un aproximado de la posición final de estos al revelarse con yodo. En la parte superior derecha (**Figura 31B**) vemos que la Lecitina de la marca Sigma tiene un total de 9 bandas reveladas, las 2 bandas que se encuentran mejor definidas, según la imagen de referencia corresponden a PE y PC, además existe la presencia en muy baja cantidad de PA y PI. Del lado inferior izquierdo (**Figura 31C**) la lecitina de la marca Metarin tiene las bandas correspondientes a todas las sustancias de interés que se muestran en la referencia. Por último, del lado inferior derecho (**Figura 31D**) en la lecitina correspondiente a la marca Sigma Microbiológica apenas se alcanza a distinguir 2 bandas de los compuestos de interés (PE y PC) de acuerdo con la posición de los estándares de referencia.

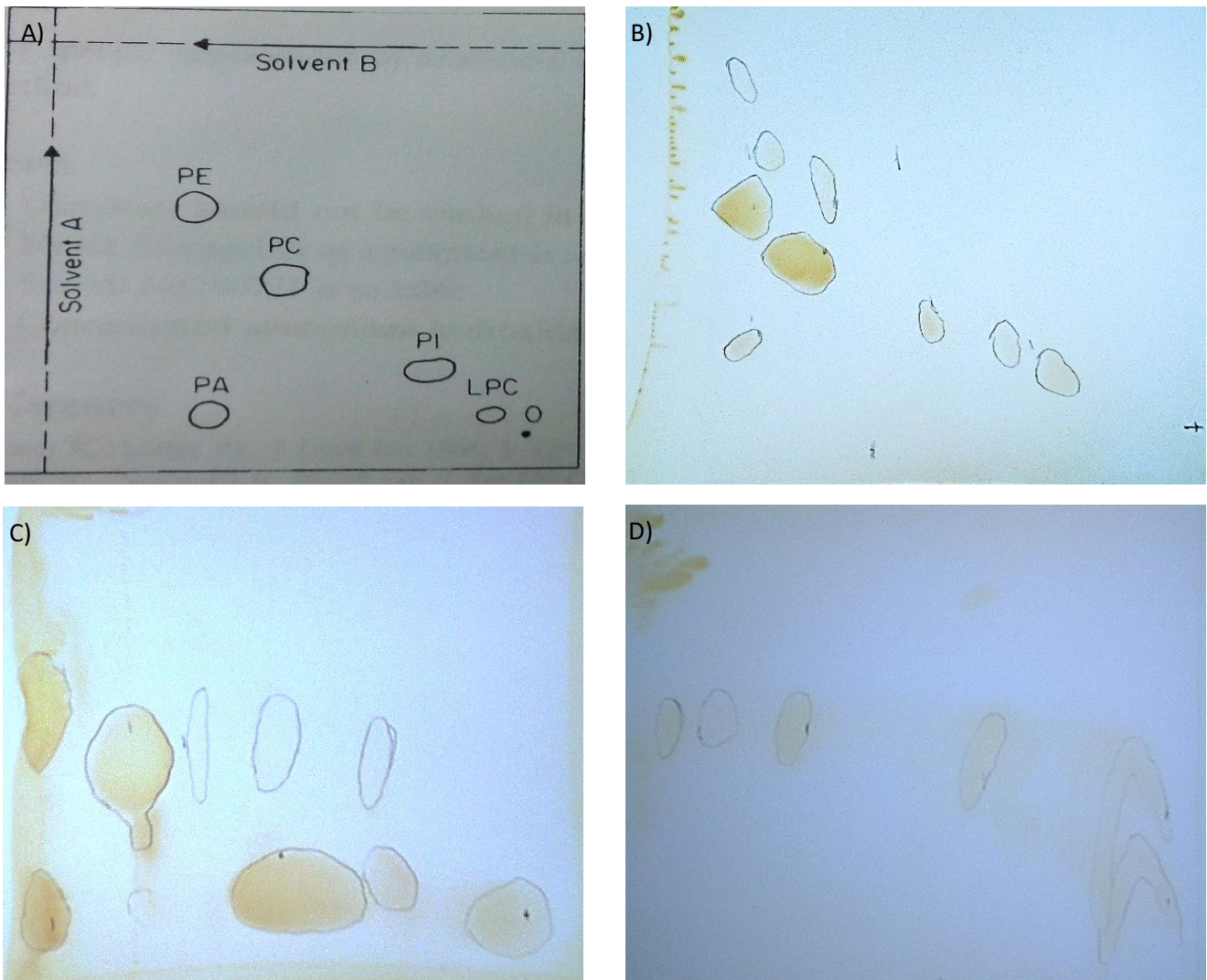


Figura 31.- Cromatografía en capa fina de las 3 muestras comerciales. A) Estándar de referencia obtenido de (*Phospholipids in Lecithin Concentrates by Thin-Layer Chromatography, AOCS Recommended Practice Ja 7-86*). B) Cromatoplaqa de la muestra de Lecitina Sigma. C) Cromatoplaqa de la muestra de Lecitina Metarin. D) Cromatoplaqa de la muestra de Lecitina Sigma Microbiológica.

Para continuar con la caracterización de las 3 marcas de lecitinas y poder obtener una mejor información de su composición químicas, se hizo un estudio de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) para obtener la huella molecular de la muestra, correspondiente a la **Figura 32**.

En el espectro FTIR de las 3 marcas comerciales de lecitina de soya tenemos las siguientes señales importantes y que tiene en común:

- La banda de absorción en la zona de 3350 cm^{-1} a 2900 cm^{-1} indican la presencia de enlaces O – H que corresponde a los alcoholes contenidos en los fosfolípidos y constituyen la parte polar de la estructura.
- El pico de absorción en 2900 cm^{-1} es atribuido al enlace C – H de los alcanos presentes en las cadenas largas y la señal a 2800 cm^{-1} corresponde a una tensión vibracional simétrica por los metilenos ($-\text{CH}_2$) presentes en la estructura.
- Por último, está la señal a 1730 cm^{-1} correspondiente a un enlace C=O por una vibración de estiramiento de los grupos carbonilo, que son los ésteres en los fosfolípidos.
- Las señales del espectro que se encuentran de 1500 cm^{-1} a 500 cm^{-1} corresponden a la región conocida como huella dactilar del compuesto. Esto quiere decir que son solo las señales únicas y características de las lecitinas.

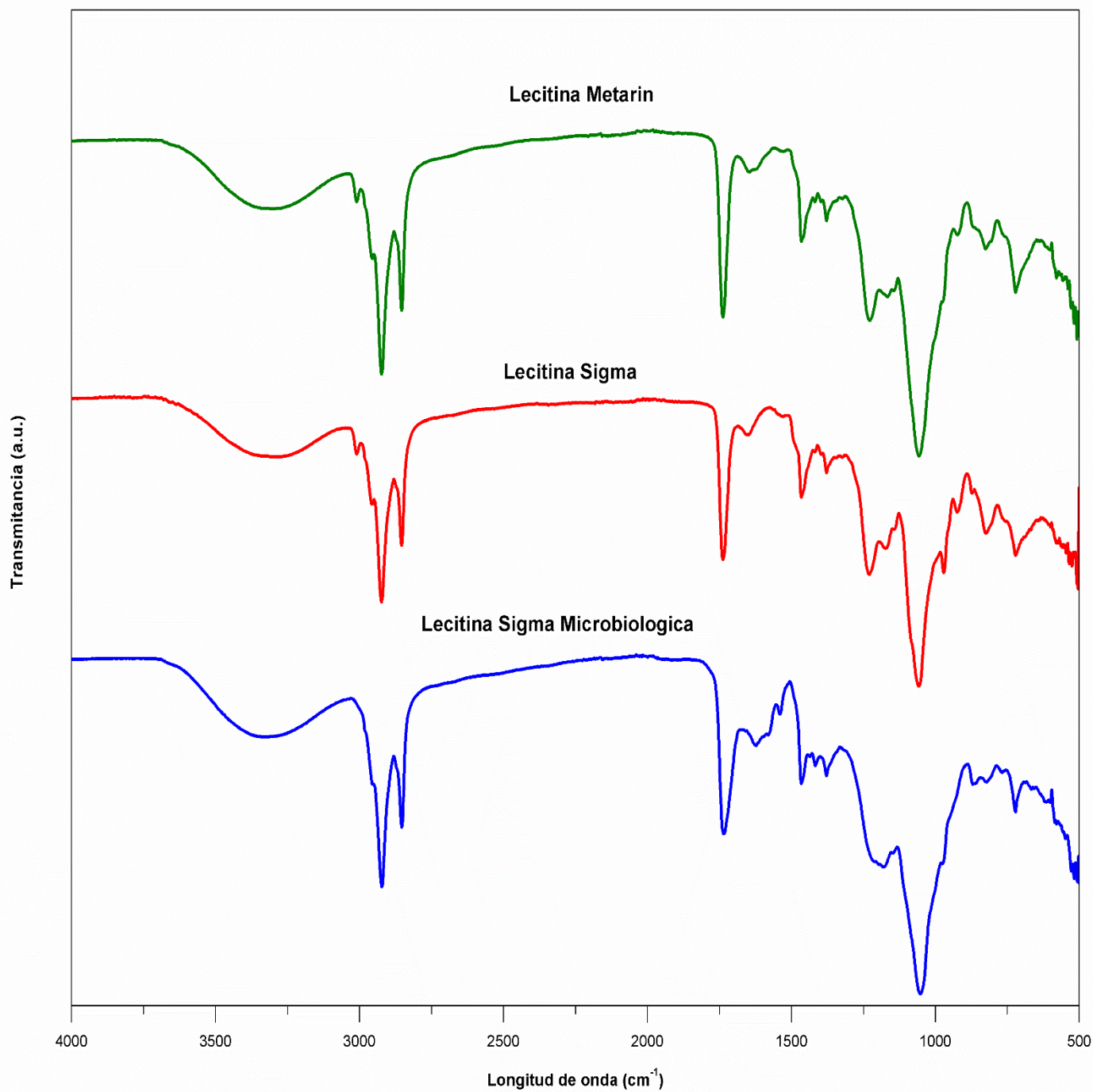


Figura 32.- Espectro FTIR de las diferentes marcas comerciales de Lecitina

Con base en la información obtenida del espectro FTIR (**Figura32**) podemos decir que se trata de la misma sustancia y que las 3 marcas no presentan contaminación o degradación. Esto mismo se comprueba en el estudio de **Ng et al., (2018)** ya que aplicaron la espectroscopia FTIR para caracterizar su lecitina y obtuvieron el espectro de la **Figura 33** que es idéntico al de las 3 marcas comerciales de lecitinas.

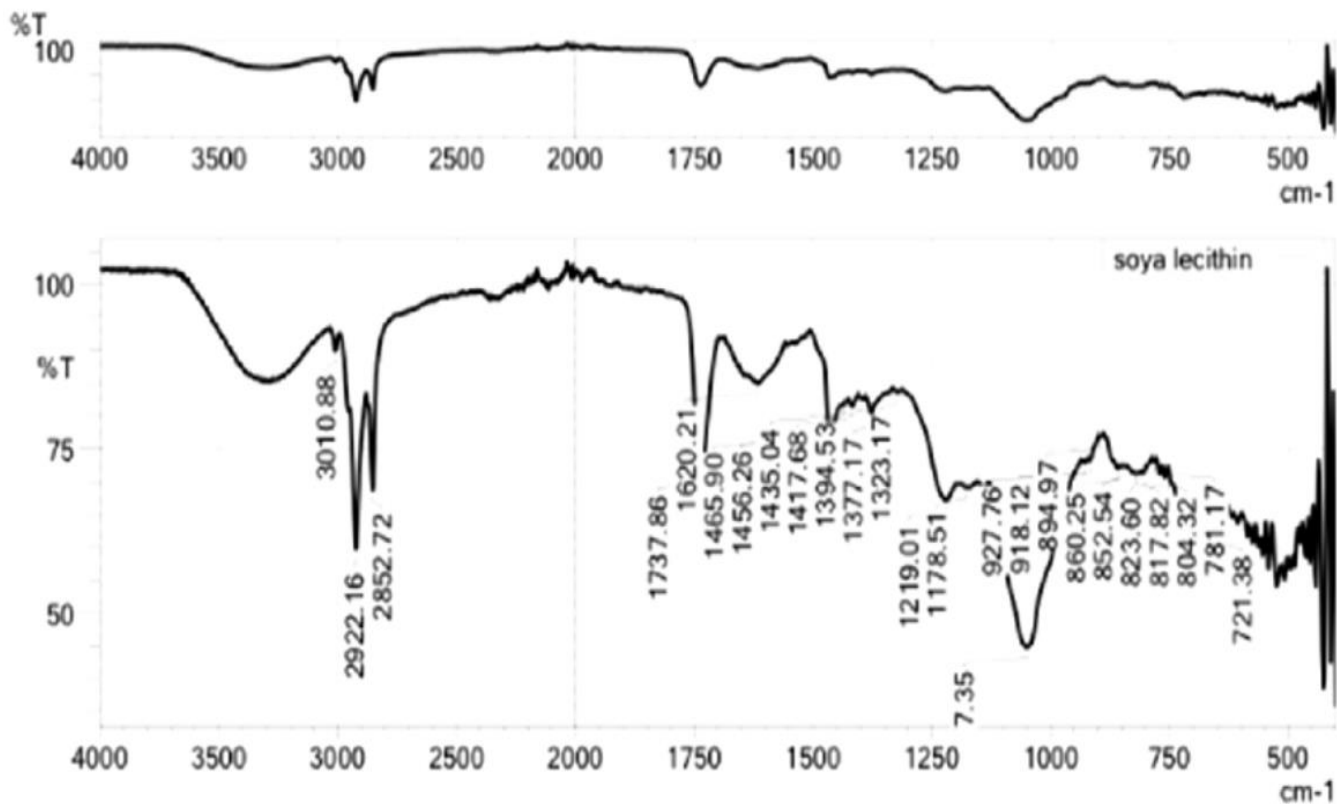


Figura 33.- Espectro FTIR de Lecitina de soya obtenido de **Ng et al., 2018**

Por último, se llevó a cabo la caracterización de la lecitina por medio de la técnica de DSC, como podemos observar en la **Figura 34** las respuestas térmicas de las 3 marcas de liposomas presentan comportamientos diferentes a pesar de tener las mismas estructuras químicas.

De acuerdo con estos gráficos a temperaturas menores a cero grados las 3 muestras pueden presentar el mismo comportamiento debido a que a bajas temperaturas se encuentra la fase sub – gel (L_c) en este estado las cadenas hidrocarbonadas están mayormente ordenadas y tienen un mayor ángulo de inclinación con respecto a la bicapa (**Kranenburg & Smit, 2005**) y a medida que va aumentando la temperatura, observamos una caída en la señal del espectro de DSC que corresponde a la sub - transición (T_s) entre la fase sub – gel y la fase gel relacionado con un desordenamiento en la cadena alifática de los fosfolípidos (**González José, 2016**).

En el rango de temperatura de 20 °C a 75 °C para las Lecitinas Metarin y Sigma presentan un comportamiento muy similar en la medición, porque cuando aumenta la temperatura respecto al flujo de calor se conserva la misma señal. Lo que nos indica que los fosfolípidos que componen a las lecitinas se encuentran en un estado conocido como fase gel (L_β) y en este punto las cadenas hidrocarbonadas todavía presentan un ordenamiento, pero empiezan a desacomodarse porque hay un hidratamiento.

A medida que aumenta la temperatura de 80 °C a 120 °C en la Lecitina Sigma se observa que hay un pico en la señal que indica un evento exotérmico por una cristalización en ese intervalo de temperatura. De acuerdo con **Kranenburg & Smit, (2005)** la fase gel experimenta una transición a la fase líquida cristalina o fase fluida (L_α) en este punto las colas de la cadena hidrocarbonada en los fosfolípidos de la Lecitina Sigma se encuentran desordenados y no presentan alguna inclinación (**Fox et al., 2007**).

Para la señal del barrido de temperatura en el intervalo de temperatura de 80 °C a 120 °C para la lecitina Metarin no se observa una señal que marque algún cambio debido a que posiblemente esta marca de lecitina contiene cadenas hidrocarbonadas con más de 20 átomos de carbono y esto ocasiona que la transición desaparezca por completo o que el intervalo de temperatura entre cada transición es demasiado pequeño para ser observado.

Finalmente, para la lecitina Sigma y Metarin, cuando se alcanza una temperatura de aproximadamente 190 °C se observa una señal en el barrido de medición que indica una descomposición de la muestra.

En cuanto a la lecitina Sigma Microbiológica no se observa que tenga un comportamiento térmico parecido a las otras 2 marcas comerciales de lecitinas que nos indiquen la existencia de algún cambio de fase en los fosfolípidos presentes como los que se mencionaron anteriormente. Sabemos que esta muestra si contiene estructuras fosfolípicas porque el espectro de IR (**Figura 32**) confirman la presencia de los grupos funcionales presentes en estas estructuras químicas. Sin embargo, es muy posible que se encuentren en bajas cantidades o existe la presencia de otros compuestos químicos presentes que bloqueen estas señales en el barrido de DSC. La probabilidad de que lo anterior haya ocurrido es muy alta, porque de acuerdo con la **Figura31D** además de evidenciar la presencia de PE y PC existen otras bandas correspondientes a otros compuestos químicos no identificados.

Lo único que se obtuvo de relevante en esta muestra, fue un evento térmico en el intervalo de 170 °C a 190 °C correspondiente a un punto de fusión de algún compuesto químico para después dar paso a una descomposición.

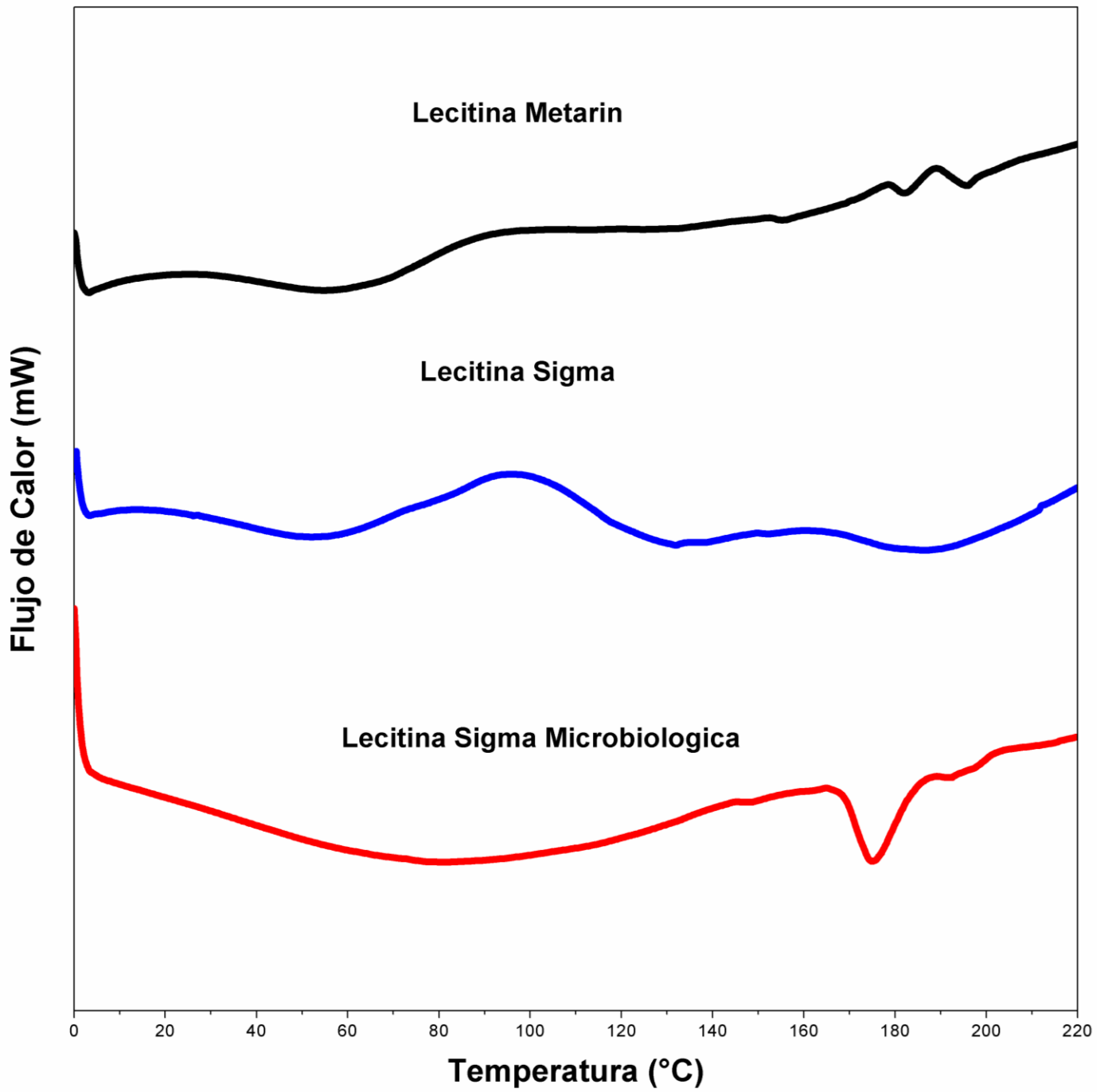


Figura 34.- Termogramas de DSC de las marcas comerciales de Lecitinas

Anexo 2.- Análisis químico de Rapamicina.

La Rapamicina es un macrólido (grupo de antibióticos, que se caracterizan por tener un anillo macrocíclico de lactona) de policétido (metabolito secundario biosintetizados por la polimerización de subunidades acetilo, y propionilo) clínicamente importante producido por fermentación de *Streptomyces hygroscopicus* recolectado de Isla de Pascua con una pobre solubilidad en agua (2.6 µg/mL) y lenta de disolución que limita la velocidad de absorción (Haeri et al., 2018).

Debido a lo anterior, es importante tener una caracterización fisicoquímica del principio activo utilizado en este trabajo. Por lo que se realizó un estudio de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y calorimetría diferencial de barrido para ver si no existe alguna degradación química o contaminación de nuestra con otros compuestos.

El análisis espectroscópico IR de la Rapamicina (**Figura 35**) proporciona información sobre su enlace químico, grupos funcionales y presencia o ausencia de cambios en la estructura cristalina a partir de la frecuencia de las vibraciones que se correlacionan con sus estructuras principales.

Por lo tanto, obtuvimos que:

- La banda de absorción en la zona de 3750 cm^{-1} a 3250 cm^{-1} indican la presencia de enlaces O – H que se encuentran presentes en la molécula.
- En la región de 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} indican la presencia de carbonos con hibridación de tipo sp^3 .
- El pico de absorción en 1700 cm^{-1} corresponde a la tensión C = O
- Otro pico de absorción importante lo podemos localizar a 1200 cm^{-1} que nos indica la interacción C – O
- Las señales del espectro que se encuentran de 1000 cm^{-1} a 500 cm^{-1} corresponden a la región conocida como huella dactilar del compuesto. Esto quiere decir que son solo las señales únicas y características de la Rapamicina.

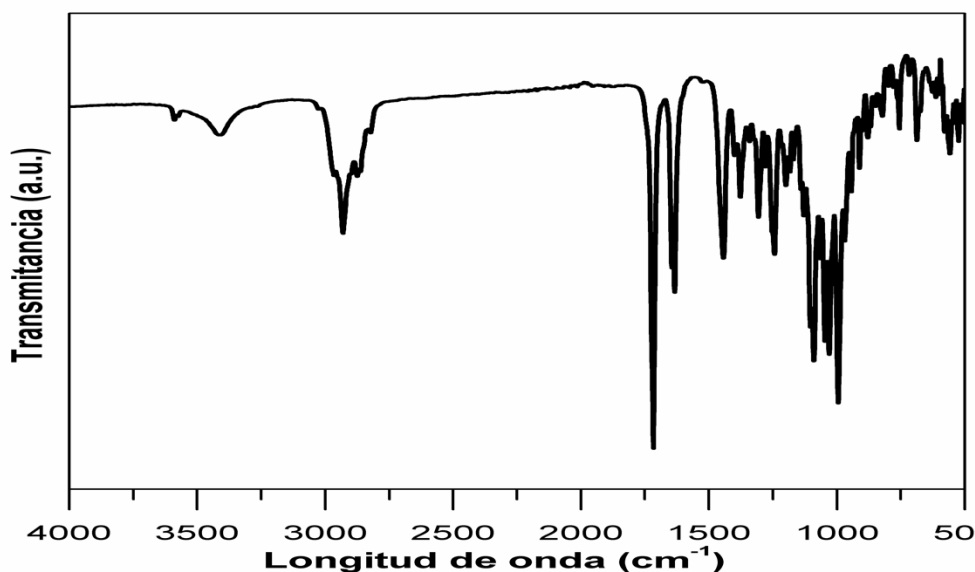


Figura 35.- Espectro FTIR de la Rapamicina

La **Figura 35**, la podemos comparar con los resultados obtenidos de **Chen et al., (2022)** debido a que ellos realizaron la misma caracterización del principio activo por espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (**Figura 36**) en donde llegaron a un espectro semejante al de este experimento, solo que ellos nos indican que las bandas más importantes son las correspondientes a 3412 cm⁻¹ correlacionada con la vibración de estiramiento O-H y la banda de absorción en 1720 cm⁻¹ que confirmó la presencia de C = O en la estructura química del fármaco.

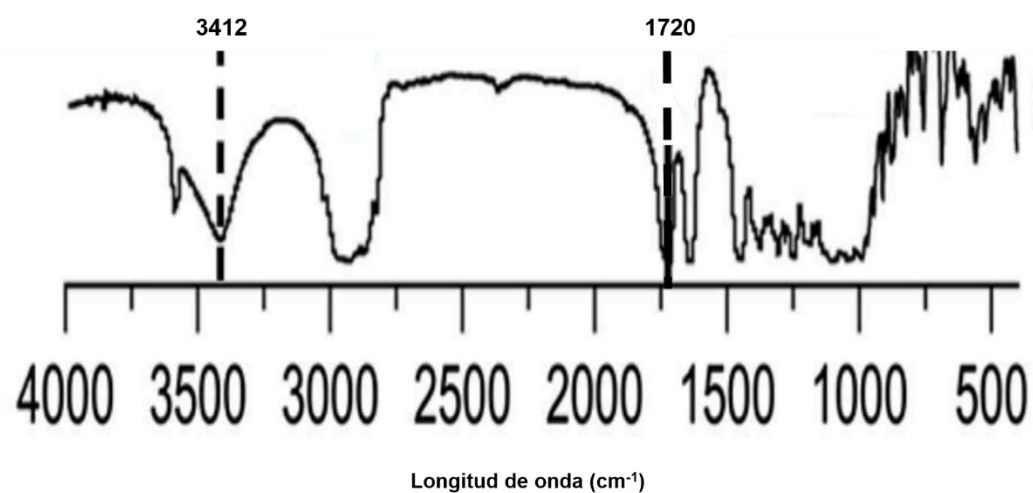


Figura 36. - Gráfico editado del espectro FTIR de Rapamicina obtenido por: Chen et al., 2022.

En el estudio por calorimetría diferencial de barrido se obtiene la **Figura 37** en donde podemos observar que en el barrido de temperatura que va de 0 °C a 220°C se pueden observar 2 eventos térmicos muy importantes que se encuentran a 189.00 °C y 197.17°C que indican los puntos de fusión de la Rapamicina por lo que requiere absorción de energía (proceso endotérmico). Recordemos que en los antecedentes se mencionó que el principio activo en estado sólido se encuentra como una mezcla de dos isómeros no separables, lo que puede explicar estos dos puntos de fusión.

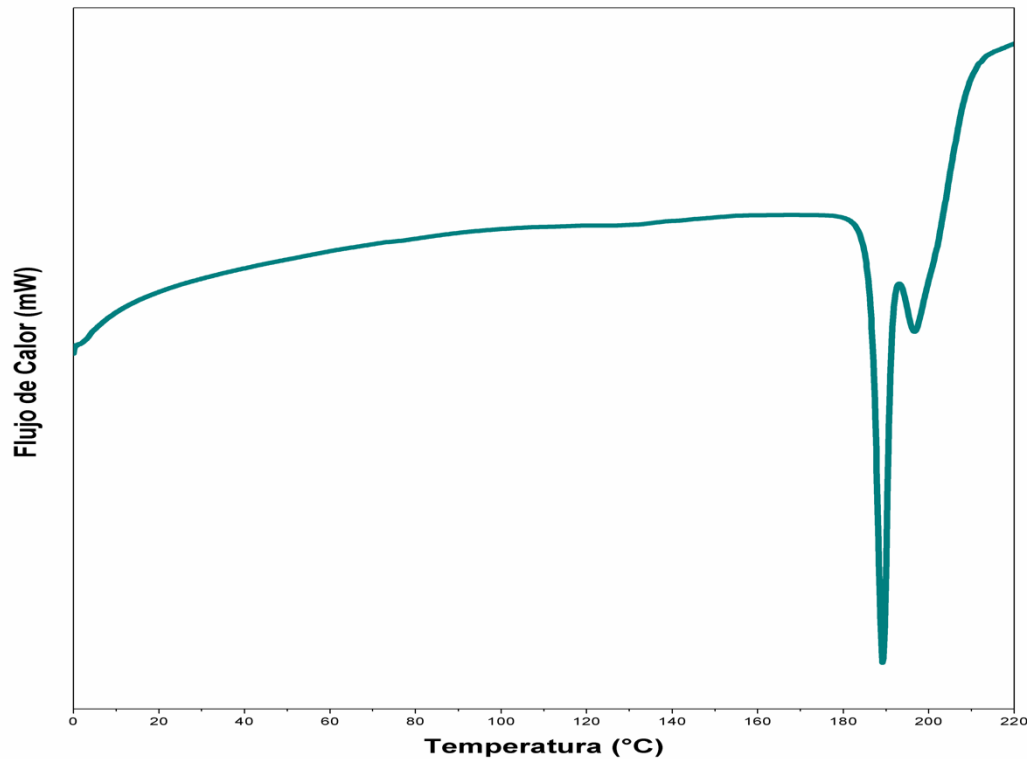


Figura 37.- Termogramas de DSC de la Rapamicina

El comportamiento térmico de la **Figura 37** es similar al que obtuvo **Emami et al., (2014)** porque la Rapamicina que estudiaron muestra los mismos eventos térmicos, solo que a una temperatura de 191.35°C y a 205.27°C pero se conserva la misma forma del termograma (**Figura 38**).

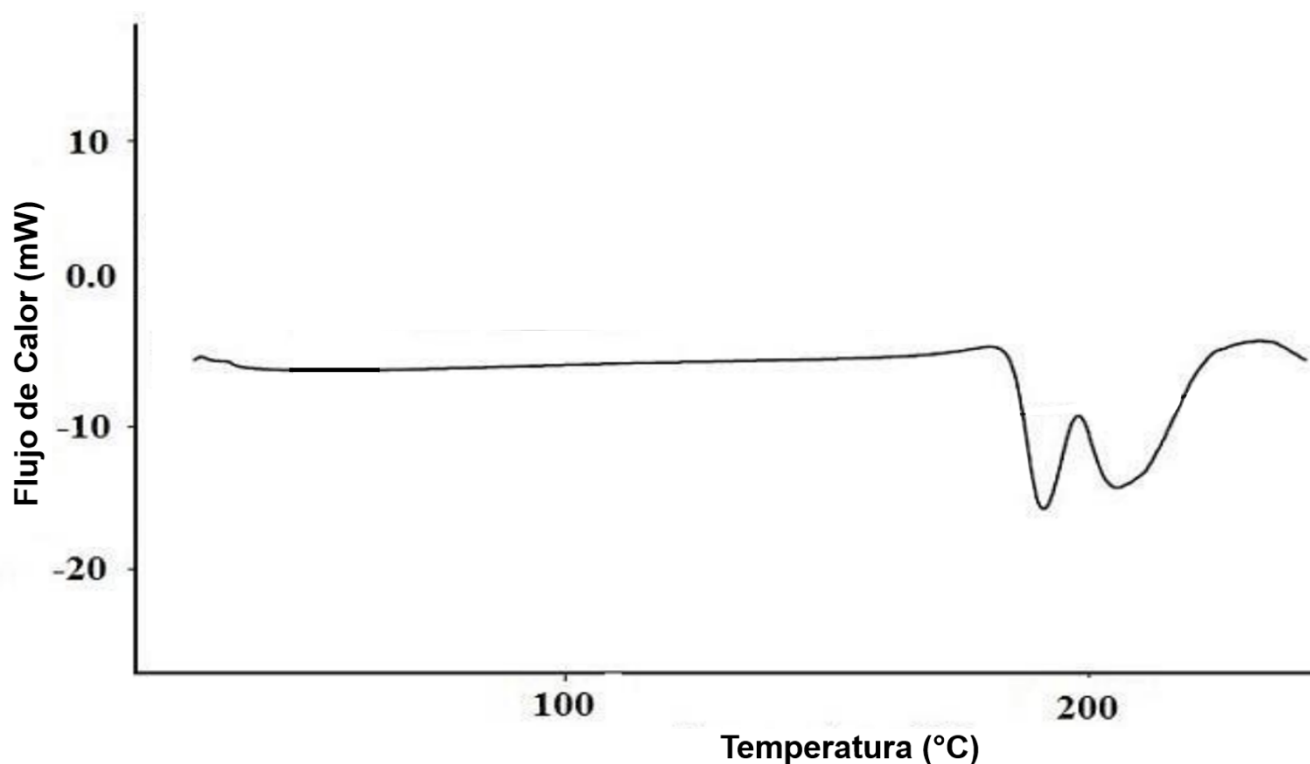


Figura 38.- Termogramas editado de DSC de la Rapamicina obtenido de: Emami et al., 2014.

Anexo 3.- Curvas de Calibración para Lecitina de Soya y Rapamicina.

Para la cuantificación de las sustancias mencionadas, se empleó la técnica de absorción UV - Vis, medimos la absorbancia de concentraciones conocidas de Rapamicina y Lecitina para el trazado de las curvas de calibración.

Los resultados de la curva de calibración para la cuantificación del principio activo se muestran en la **Tabla 16** y el gráfico de la curva de calibración se muestra en la **Figura 39**.

Tabla 16.- Mediciones espectrofotométricas para Rapamicina disuelta en una mezcla de Acetonitrilo/ Agua (40:60) por triplicado a una longitud de onda (λ) de 281.52 nm.

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Desviación estándar
0	0	0	0	0.000	0.000
0.83	0.045	0.044	0.054	0.048	0.006
1.65	0.104	0.106	0.103	0.104	0.002
2.47	0.149	0.146	0.161	0.152	0.008
3.30	0.21	0.196	0.215	0.207	0.010
4.13	0.249	0.249	0.253	0.250	0.002
4.95	0.301	0.315	0.311	0.309	0.007
5.77	0.352	0.354	0.363	0.356	0.006
6.60	0.419	0.419	0.415	0.418	0.002
7.37	0.465	0.455	0.458	0.459	0.005
8.00	0.507	0.516	0.484	0.502	0.017
8.80	0.545	0.542	0.539	0.542	0.003
9.59	0.591	0.592	0.602	0.595	0.006

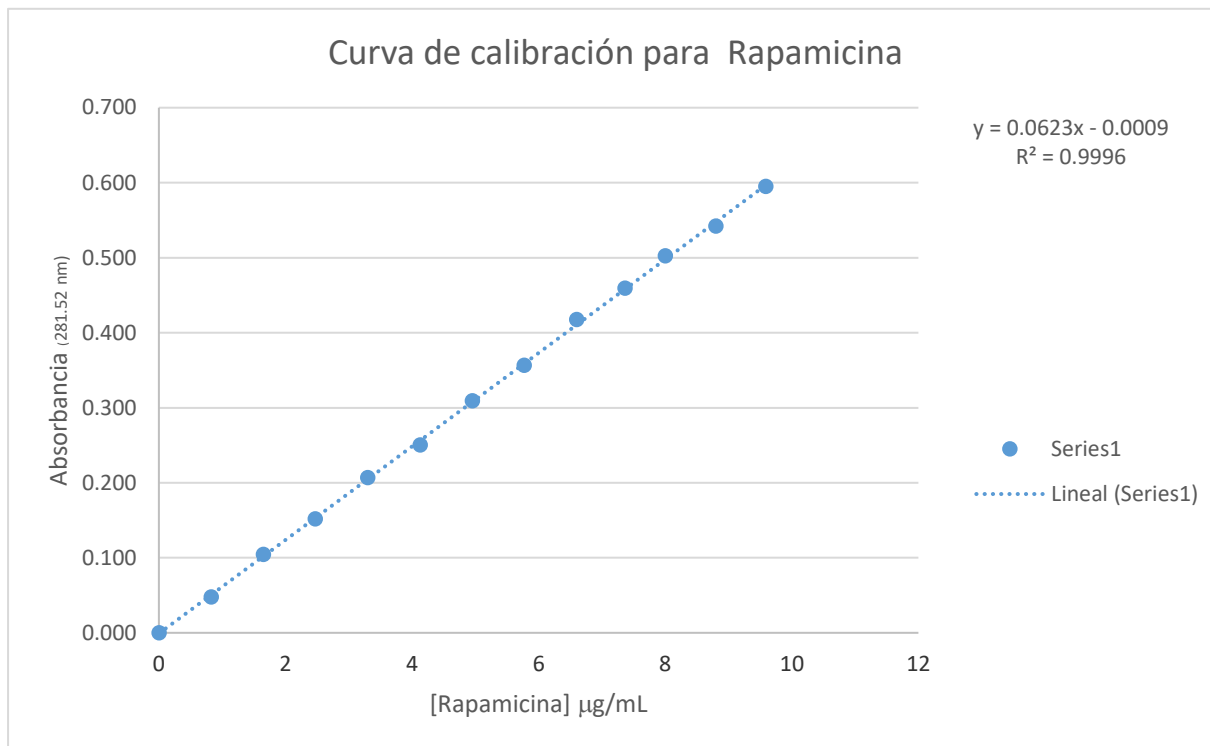


Figura 39.- Curva de calibración de Rapamicina

Posteriormente, tenemos los resultados de la curva de calibración para la cuantificación de la lecitina de soya por medio de una reacción complejométrica de Ferrotiociano de Amonio esta sustancia nos da un compuesto colorido rojo. A medida que aumenta la concentración de Lecitina la coloración es intensa y nos permite cuantificarlo por Uv – Vis. Estos resultados se muestran en la **Tabla 17** y el gráfico de la curva de calibración se muestra en la **Figura 40**.

Tabla 17.- Mediciones espectrofotométricas para Lecitina de Soya por triplicado a una longitud de onda (λ) de 492.23 nm

Concentración (mg/mL)	Medición 1	Medición 2	Medición 3	Promedio	Desviación Estándar
0	0	0	0	0	0
0.01	0.073	0.076	0.051	0.067	0.014
0.02	0.133	0.116	0.102	0.117	0.016
0.03	0.202	0.193	0.185	0.193	0.009
0.04	0.255	0.286	0.231	0.257	0.028
0.05	0.316	0.359	0.283	0.319	0.038
0.06	0.374	0.395	0.373	0.381	0.012
0.07	0.445	0.444	0.466	0.452	0.012
0.08	0.532	0.548	0.503	0.528	0.023
0.09	0.554	0.617	0.617	0.596	0.036
0.1	0.665	0.663	0.662	0.663	0.002

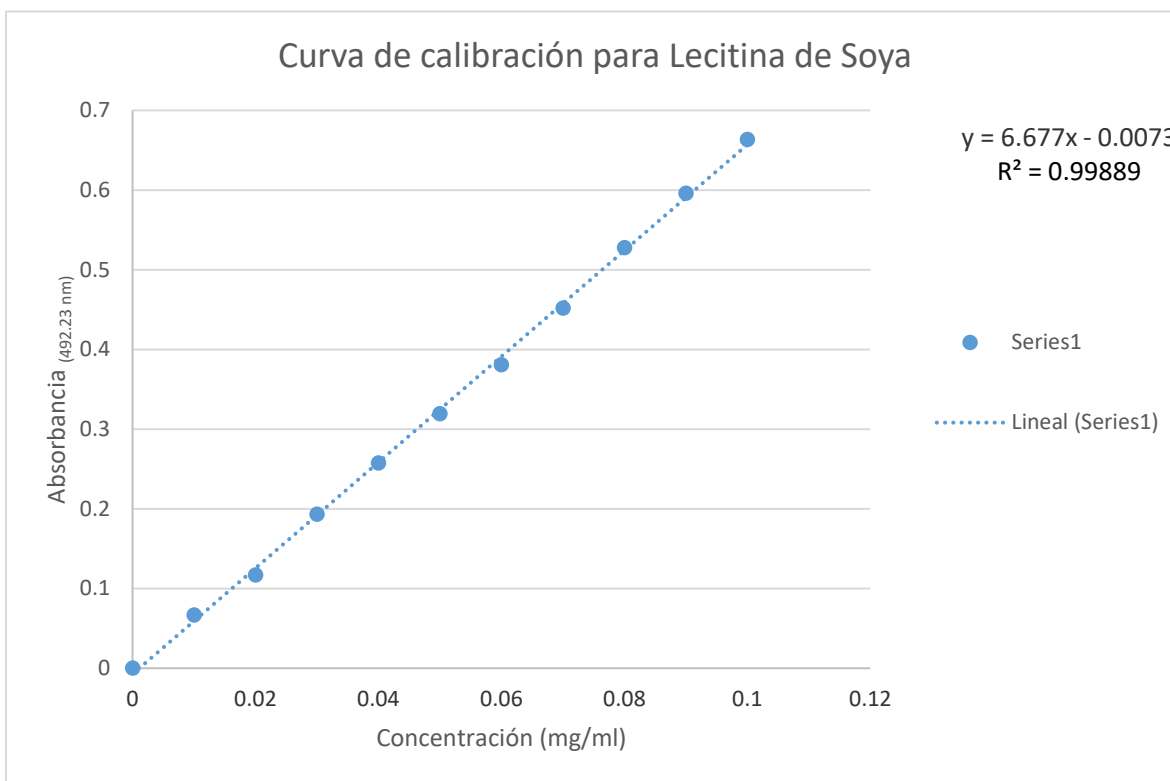


Figura 40.- Curva de calibración de Lecitina

REFERENCIA BIBLIOGRAFICAS.

- M. L. Bruschi, Mathematical models of drug release. (2015). In M. L. Bruschi (Ed.), *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems* (pp. 63-86). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100092-2.00005-9>
- A. Rouf, M., Bilensoy, E., Vural, I., & Hincal, A. (2007). *Determination of stability of rapamycin following exposure to different conditions* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2007.05.099>
- Akbarzadeh, A., Rezaei-Sadabady, R., Davaran, S., Joo, S. W., Zarghami, N., Hanifehpour, Y., . . . Nejati-Koshki, K. (2013). Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Research Letters*, 8(1), 102. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-8-102>
- Amatya, S., Park, E. J., Park, J. H., Kim, J. S., Seol, E., Lee, H., . . . Na, D. H. (2013). Drug release testing methods of polymeric particulate drug formulations. *Journal of Pharmaceutical Investigation*, 43(4), 259-266. <https://doi.org/10.1007/s40005-013-0072-5>
- Arachchige, M. C. M. (2015). Advanced targeted nanomedicine. *Journal of biotechnology*, v. 202, pp. 88-97-2015 v.2202. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.009>
- Berdoulay, A., English, R.V. and Nadelstein, B. (2005), Effect of topical 0.02% tacrolimus aqueous suspension on tear production in dogs with keratoconjunctivitis sicca. *Veterinary Ophthalmology*, 8: 225-232. <https://doi.org/10.1111/j.1463-5224.2005.00390.x>
- Birdi, K. S. (2009). *Surface and Colloid Chemistry: Principles and Applications*. CRC Press.

- Bouarab, L., Maherani, B., Kheirrolomoom, A., Hasan, M., Aliakbarian, B., Linder, M., & Arab-Tehrany, E. (2014). Influence of lecithin–lipid composition on physico-chemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115, 197-204. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.11.034>
- Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). Liposomes as nanomedical devices. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 975-999. <https://doi.org/10.2147/IJN.S68861>
- Bucolo, C., Drago, F., & Salomone, S. (2012). Ocular drug delivery: a clue from nanotechnology [General Commentary]. *Frontiers in Pharmacology*, 3(188). <https://doi.org/10.3389/fphar.2012.00188>
- Buech, G., Bertelmann, E., Pleyer, U., Siebenbrodt, I., & Borchert, H.-H. (2007). Formulation of Sirolimus Eye Drops and Corneal Permeation Studies. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 23(3), 292-303. <https://doi.org/10.1089/jop.2006.130>
- Chen, T., Ma, Z., Qiu, Z., Zhong, Z., Xing, L., Guo, Q., . . . Yuan, T. (2022). Characterization of excipients to improve pharmaceutical properties of sirolimus in the supercritical anti-solvent fluidized process. *International Journal of Pharmaceutics*, 611, 121240. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.121240>
- Colletier, J.-P., Chaize, B., Winterhalter, M., & Fournier, D. (2002). Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnology*, 2(1), 9. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-2-9>
- Costa, P., & Sousa Lobo, J. M. (2001). Modeling and comparison of dissolution profiles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13(2), 123-133. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(01\)00095-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0928-0987(01)00095-1)
- Crowe, J. H., Whittam, M. A., Chapman, D., & Crowe, L. M. (1984). Interactions of phospholipid monolayers with carbohydrates. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 769(1), 151-159. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2736\(84\)90018-X](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0005-2736(84)90018-X)
- Darvell, B. W. (2018). Chapter 4 - Rheology. In *Materials Science for Dentistry (Tenth edition)* (pp. 92-120). Woodhead Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101035-8.50004-3>
- Eloy, J. O., Claro de Souza, M., Petrilli, R., Barcellos, J. P. A., Lee, R. J., & Marchetti, J. M. (2014). Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 123, 345-363. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029>
- Emami, S., Valizadeh, H., Islambulchilar, Z., & Zakeri-Milani, P. (2014). Development and Physicochemical Characterization of Sirolimus Solid Dispersions Prepared by Solvent Evaporation Method [10.5681/apb.2014.054]. *Adv Pharm Bull*, 4(4), 369-374. <https://doi.org/10.5681/apb.2014.054>
- Etheridge, M. L., Campbell, S. A., Erdman, A. G., Haynes, C. L., Wolf, S. M., & McCullough, J. (2013). The big picture on nanomedicine: the state of investigational and approved nanomedicine products. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(1), 1-14. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2012.05.013>
- Faustino, C., Bettencourt, A. F., Alfaia, A., & Pinheiro, L. (2015). Introducing Students to Rheological Classification of Foods, Cosmetics, and Pharmaceutical Excipients Using Common Viscous Materials. *Journal of Chemical Education*, 92(5), 936-939. <https://doi.org/10.1021/ed4008364>
- Findlay, J. A., & Radics, L. (1980). On the chemistry and high field nuclear magnetic resonance spectroscopy of rapamycin. *Canadian Journal of Chemistry*, 58(6), 579-590. <https://doi.org/10.1139/v80-090>
- Florence, A. T. (2015). *Physicochemical Principles of Pharmacy*. Pharmaceutical Press.

- Fox, C. B., Uibel, R. H., & Harris, J. M. (2007). Detecting Phase Transitions in Phosphatidylcholine Vesicles by Raman Microscopy and Self-Modeling Curve Resolution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 111(39), 11428-11436. <https://doi.org/10.1021/jp0735886>
- Gaspar, R., & Duncan, R. (2009). Polymeric carriers: Preclinical safety and the regulatory implications for design and development of polymer therapeutics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(13), 1220-1231. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2009.06.003>
- Ghanbarzadeh, S., Khorrami, A., Mohamed Khosroshahi, L., & Arami, S. (2014). Fusogenic pH sensitive liposomal formulation for rapamycin: Improvement of antiproliferative effect. *Pharmaceutical Biology*, 52(7), 848-854. <https://doi.org/10.3109/13880209.2013.871640>
- Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska, S., & Hincal, A. A. (2005). The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *International Journal of Pharmaceutics*, 291(1), 79-86. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2004.07.045>
- Haeri, A., Osouli, M., Bayat, F., Alavi, S., & Dadashzadeh, S. (2018). Nanomedicine approaches for sirolimus delivery: a review of pharmaceutical properties and preclinical studies. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(sup1), 1-14. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1408123>
- Hayes, S. (2014). Remington: The Science and Practice of Pharmacy, volume I and volume II. Twenty-second edition. *Journal of the Medical Library Association : JMLA*, 102(3), 220-221. <https://doi.org/10.3163/1536-5050.102.3.016>
- Herman, J. (2004). *The Investigation of Factors Contributing to Immunosuppressant Drugs Response Variability in LC-MS/MS Analysis* Thermo Fisher Scientific]. Franklin, MA, USA.
- Hixson, A. W., & Crowell, J. H. (1931). Dependence of Reaction Velocity upon surface and Agitation. *Industrial & Engineering Chemistry*, 23(8), 923-931. <https://doi.org/10.1021/ie50260a018>
- Hunter, R. J. (2001). *Foundations of Colloid Science*. Oxford University Press.
- Hurtado y de la Peña, M., Alvarado, Y. V., Miriam Domínguez-Ramírez, A., & Rosa Cortés Arroyo, A. (2003). Comparison of Dissolution Profiles for Albendazole Tablets Using USP Apparatus 2 and 4. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 29(7), 777-784. <https://doi.org/10.1081/DDC-120021777>
- Ilitchev, Y. (2007). *Degradation of rapamycin and its ring-opened isomer: Role of base catalysis* (Vol. 2007). <https://doi.org/10.3998/ark.5550190.0008.c09>
- Iren Yeeling Wu, Sonali Bala, Nataša Škalko-Basnet, Massimiliano Pio di Cagno, Interpreting non-linear drug diffusion data: Utilizing Korsmeyer-Peppas model to study drug release from liposomes, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 138,2019
- Janagam, D. R., Wu, L., & Lowe, T. L. (2017). Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 122, 31-64. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.04.001>
- Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: Technologies and Analytical Applications. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1(1), 801-832. <https://doi.org/10.1146/annurev.anchem.1.031207.112747>
- Jobling, A. (2007). An introduction to rheology H. A. Barnes, J. F. Hutton and K. Walters, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1989. pp. v + 199, Price \$6050/Dfl 115.00. ISBN 0-444-87469-0. *Polymer International*, 25(1), 61-61. <https://doi.org/10.1002/pi.4990250112>

- Kranenburg, M., & Smit, B. (2005). Phase Behavior of Model Lipid Bilayers. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109(14), 6553-6563. <https://doi.org/10.1021/jp0457646>
- Kulkarni, V. S., & Shaw, C. (2016). Chapter 9 - Rheological Studies. In V. S. Kulkarni & C. Shaw (Eds.), *Essential Chemistry for Formulators of Semisolid and Liquid Dosages* (pp. 145-182). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801024-2.00009-1>
- Li, J., Wang, X., Zhang, T., Wang, C., Huang, Z., Luo, X., & Deng, Y. (2015). A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 10(2), 81-98. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aips.2014.09.004>
- Linares-Alba, M. A., Gómez-Guajardo, M. B., Fonzar, J. F., Brooks, D. E., García-Sánchez, G. A., & Bernad-Bernad, M. J. (2016). Preformulation Studies of a Liposomal Formulation Containing Sirolimus for the Treatment of Dry Eye Disease. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 32(1), 11-22. <https://doi.org/10.1089/jop.2015.0032>
- Lubansky, A. S. (2011). 5.16 - Rheology and Its Applications in Biotechnology A2 - Moo-Young, Murray. In *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)* (pp. 189-201). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00528-6>
- Malkin, A. Y., & Isayev, A. (2017). INTRODUCTION: RHEOLOGY: SUBJECT AND GOALS. In *Rheology (Third Edition)* (pp. 1-8). ChemTec Publishing. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-1-927885-21-5.50006-0>
- Mayer, B. X., Mensik, C., Krishnaswami, S., Derendorf, H., Eichler, H.-G., Schmetterer, L., & Wolzt, M. (1999). Pharmacokinetic-pharmacodynamic profile of systemic nitric oxide-synthase inhibition with L-NMMA in humans [<https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00930.x>]. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 47(5), 539-544. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00930.x>
- Medina-Torres, L., Brito-De La Fuente, E., Torrestiana-Sanchez, B., & Katthain, R. (2000). Rheological properties of the mucilage gum (*Opuntia ficus indica*). *Food Hydrocolloids*, 14(5), 417-424. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(00\)00015-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0268-005X(00)00015-1)
- Moreno, L., Calderas, F., Sanchez-Olivares, G., Medina-Torres, L., Sanchez-Solis, A., & Manero, O. (2015). Effect of cholesterol and triglycerides levels on the rheological behavior of human blood. *Korea-Australia Rheology Journal*, 27, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s13367-015-0001-4>
- Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell Mol Biol Lett*, 10.
- Myers, D. (1999). *Surfaces, interfaces, and colloids: principles and applications*. Wiley-VCH.
- Myers, D. (2002). Liquid-Fluid Interfaces. In *Surfaces, Interfaces, and Colloids* (pp. 140-178). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/0471234990.ch8>
- N Sehgal, S., Baker, H., & VÉZina, C. (1975). *Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization* (Vol. 28). <https://doi.org/10.7164/antibiotics.28.727>
- Napoli, K. L., & Taylor, P. J. (2001). From Beach to Bedside: History of the Development of Sirolimus. *Therapeutic Drug Monitoring*, 23(5), 559-586.
- Ng, Z. Y., Wong, J.-Y., Panneerselvam, J., Madheswaran, T., Kumar, P., Pillay, V., . . . Chellappan, D. K. (2018). Assessing the potential of liposomes loaded with curcumin as a therapeutic intervention in asthma. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 172, 51-59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.08.027>
- Osswald, T., & Rudolph, N. (2015a). 1 - Introduction to Rheology. In *Polymer Rheology* (pp. 1-24). Hanser. <https://doi.org/https://doi.org/10.3139/9781569905234.001>

- Osswald, T., & Rudolph, N. (2015b). 2 - Structure and Properties of Deforming Polymers. In *Polymer Rheology* (pp. 25-58). Hanser. <https://doi.org/https://doi.org/10.3139/9781569905234.002>
- Osswald, T., & Rudolph, N. (2015c). 5 - Viscoelasticity. In *Polymer Rheology* (pp. 143-185). Hanser. <https://doi.org/https://doi.org/10.3139/9781569905234.005>
- Pattni, B. S., Chupin, V. V., & Torchilin, V. P. (2015). New Developments in Liposomal Drug Delivery. *Chemical Reviews*, 115(19), 10938-10966. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00046>
- Petros, R. A., & DeSimone, J. M. (2010). Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications [10.1038/nrd2591]. *Nat Rev Drug Discov*, 9(8), 615-627.
- Ranade, V. V. (2003). Site-specific drug delivery using liposomes as carriers*. In *Drug Delivery Systems, Second Edition*. CRC Press. <https://doi.org/doi:10.1201/9781420040142.sec1>
10.1201/9781420040142.sec1
- Rao, M. A. (1993). Rheological methods in food process engineering: by James F. Steffe, Freeman Press, 1992. \$65.00 (228 pages) ISBN 0 9632036 0 6. *Trends in Food Science & Technology*, 4(9), 316. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0924-2244\(93\)90080-T](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0924-2244(93)90080-T)
- Richard W. Korsmeyer, Robert Gurny, Eric Doelker, Pierre Buri, Nikolaos A. Peppas, Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers, *International Journal of Pharmaceutics*, Volume 15, Issue 1, 1983, Pages 25-35,
- Roper, C. S., Howes, D., Blain, P. G., & Williams, F. M. (1997). Percutaneous penetration of 2-phenoxyethanol through rat and human skin. *Food and Chemical Toxicology*, 35(10), 1009-1016. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915\(97\)00109-9](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0278-6915(97)00109-9)
- Rouf, M. A., Vural, I., Renoir, J. M., & Hincal, A. A. (2009). Development and characterization of liposomal formulations for rapamycin delivery and investigation of their antiproliferative effect on MCF7 cells. *Journal of Liposome Research*, 19(4), 322-331. <https://doi.org/10.3109/08982100902963043>
- Rowe, R. C. (2009). *Handbook of Pharmaceutical Excipients* (6 ed.). Pharmaceutical Press.
- Samad, A., Sultana, Y., & Aqil, M. (2007). *Liposomal Drug Delivery Systems: An Update Review* (Vol. 4). <https://doi.org/10.2174/156720107782151269>
- Santiago-Adame, R., Medina-Torres, L., Gallegos-Infante, J. A., Calderas, F., González-Laredo, R. F., Rocha-Guzmán, N. E., . . . Bernad-Bernad, M. J. (2015). Spray drying-microencapsulation of cinnamon infusions (*Cinnamomum zeylanicum*) with maltodextrin. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 571-577. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.020>
- Sehgal, S. N. (2003). Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplantation Proceedings*, 35(3), S7-S14. [https://doi.org/10.1016/S0041-1345\(03\)00211-2](https://doi.org/10.1016/S0041-1345(03)00211-2)
- Shekunov, B. Y., Chattopadhyay, P., Tong, H. H. Y., & Chow, A. H. L. (2007). Particle Size Analysis in Pharmaceutics: Principles, Methods and Applications. *Pharmaceutical Research*, 24(2), 203-227. <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9146-7>
- Shewry, P. R. (2008). *Journal of Cereal Science*, 48(3), 879. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jcs.2008.02.001>
- Simamora, P., Alvarez, J. M., & Yalkowsky, S. H. (2001). Solubilization of rapamycin. *International Journal of Pharmaceutics*, 213(1), 25-29. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(00\)00617-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-5173(00)00617-7)
- Stewart, J. C. M. (1980). Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Analytical Biochemistry*, 104(1), 10-14. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697\(80\)90269-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0003-2697(80)90269-9)

- Sun, M., Si, L., Zhai, X., Fan, Z., Ma, Y., Zhang, R., & Yang, X. (2011). The influence of co-solvents on the stability and bioavailability of rapamycin formulated in self-microemulsifying drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 37(8), 986-994. <https://doi.org/10.3109/03639045.2011.553618>
- Swindle, K. E., Hamilton, P. D., & Ravi, N. (2008). In situ formation of hydrogels as vitreous substitutes: Viscoelastic comparison to porcine vitreous [<https://doi.org/10.1002/jbm.a.31769>]. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 87A(3), 656-665. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jbm.a.31769>
- Umrethia, M., Ghosh, P. K., Majithya, R., & Murthy, R. S. R. (2007). 6-Mercaptopurine (6-MP) Entrapped Stealth Liposomes for Improvement of Leukemic Treatment without Hepatotoxicity and Nephrotoxicity. *Cancer Investigation*, 25(2), 117-123. <https://doi.org/10.1080/07357900701224862>
- Urquhart, A. J., & Eriksen, A. Z. (2019). Recent developments in liposomal drug delivery systems for the treatment of retinal diseases. *Drug Discovery Today*, 24(8), 1660-1668. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.04.004>
- V Paghdal, K., & A Schwartz, R. (2008). *Sirolimus (rapamycin): From the soil of Easter Island to a bright future* (Vol. 57). <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.05.021>
- van Nieuwenhuyzen, W. (2010). Lecithin and Other Phospholipids. *Surfactants from Renewable Resources*. <https://doi.org/doi:10.1002/9780470686607.ch10>
10.1002/9780470686607.ch10 (Wiley Online Books)
- Varenne, F. (2015). Standardization and validation of a protocol of zeta potential measurements by electrophoretic light scattering for nanomaterial characterization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 486, pp. 218-231-2015 v.2486. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2015.08.044>
- Varenne, F., Botton, J., Merlet, C., Beck-Broichsitter, M., Legrand, F.-X., & Vauthier, C. (2015). Toward a standardization of physico-chemical protocols for nanomedicine characterization: I. Size measurements [10.1051/metrology/20150014002]. *International Congress of Metrology*.
- Varenne, F., Hillaireau, H., Bataille, J., Smadja, C., Barratt, G., & Vauthier, C. (2019). Application of validated protocols to characterize size and zeta potential of dispersed materials using light scattering methods. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 560, 418-425. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2018.09.006>
- Wang, C. P., Chan, K. W., Schiksnis, R. A., Scatina, J., & Sisenwine, S. F. (1994). High Performance Liquid Chromatographic Isolation, Spectroscopic Characterization, and Immunosuppressive Activities of Two Rapamycin Degradation Products. *Journal of Liquid Chromatography*, 17(16), 3383-3392. <https://doi.org/10.1080/10826079408013519>
- Worakul, N., & Robinson, J. R. (1997). Ocular pharmacokinetics/pharmacodynamics. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 44(1), 71-83. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(97\)00064-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0939-6411(97)00064-7)
- Wu, W., He, Z., Zhang, Z., Yu, X., Song, Z., & Li, X. (2016). Intravitreal injection of rapamycin-loaded polymeric micelles for inhibition of ocular inflammation in rat model. *International Journal of Pharmaceutics*, 513(1), 238-246. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.09.013>
- Xu, X., Khan, M. A., & Burgess, D. J. (2012). Predicting hydrophilic drug encapsulation inside unilamellar liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 423(2), 410-418. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.12.019>

- Yamaoka, K., Nakagawa, T., & Uno, T. (1978). Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations. *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 6(2), 165-175. <https://doi.org/10.1007/BF01117450>
- Zhang, H. Y., Arab Tehrany, E., Kahn, C. J. F., Ponçot, M., Linder, M., & Cleymand, F. (2012). Effects of nanoliposomes based on soya, rapeseed and fish lecithins on chitosan thin films designed for tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*, 88(2), 618-627. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.01.007>
- Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., Zou, A., Li, W., Yao, C., & Xie, S. (2010). DDSolver: An Add-In Program for Modeling and Comparison of Drug Dissolution Profiles. *The AAPS Journal*, 12(3), 263-271. <https://doi.org/10.1208/s12248-010-9185-1>
- Zhou Casey, C., Stewart Kent, D., & Dhaon Madhup, K. (2004). An intramolecular ionic hydrogen bond stabilizes a cis amide bond rotamer of a ring-opened rapamycin-degradation product. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 43(1), 41-46. <https://doi.org/10.1002/mrc.1501>