

**MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE LIPOSOMAS MEDIANTE UN POLÍMERO
CATIONICO BIOADHERENTE PARA LA VEHICULIZACIÓN DE AMPICILINA**

Ing. LINA MARCELA ARÉVALO HURTADO

**UNIVERSIDAD ICESI
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN FORMULACIÓN DE PRODUCTOS QUÍMICOS Y DERIVADOS
SANTIAGO DE CALI
2017**

**MODIFICACIÓN SUPERFICIAL DE LIPOSOMAS MEDIANTE UN POLÍMERO
CATIONICO BIOADHERENTE PARA LA VEHICULIZACIÓN DE AMPICILINA**

Ing. LINA MARCELA ARÉVALO HURTADO

**TRABAJO PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN FORMULACIÓN DE
PRODUCTOS QUÍMICOS Y DERIVADOS**

TUTORES:

CONSTAIN SALAMANCA MEJÍA, Ph.D.

Universidad Icesi

CHRISTIAN J. YARCE, MSc.

Universidad Icesi

UNIVERSIDAD ICESI

SANTIAGO DE CALI

2017

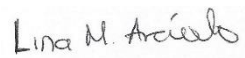
**FIRMAS AVAL DEL CUMPLIMIENTO DE LOS OBJETIVOS DEL PROYECTO
DE GRADO II**

Firma Aval del Asesor:



Constain H. Salamanca, Ph.D.

Firma del estudiante:



Ing. Lina M. Arévalo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a mis tutores, el Dr. Constain Salamanca y el máster en formulación de productos, Christian Yarce, por el tiempo dedicado, la paciencia y el apoyo brindados durante el desarrollo de esta investigación. Por la formación académica y profesional recibida.

Agradezco también a mi familia y amigos por el tiempo, el apoyo y el amor que me han brindado lo largo de esta etapa.

CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
RESUMEN	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
3. MARCO TEÓRICO	14
3.1. Resistencia a antibióticos betalactámicos.....	14
3.2. Vehiculización en sistemas liposomales	15
3.3. Métodos de preparación de liposomas	18
3.4. Estabilidad de liposomas cargados superficialmente	19
3.5. Liposomas funcionalizados	23
3.6. Métodos de modificación superficial de liposomas mediante la técnica capa a capa	24
3.7. Polímeros de la serie Eudragit E (Eudragit E100, E12,5 y EPO).....	25
4. ESTADO DEL ARTE	27
4.1. Modificación superficial de liposomas empleando polielectrolitos	27
5. OBJETIVOS	31
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	32
6.1. Materiales	32
6.2. Métodos	32
6.2.1. Ensayos preliminares	32
6.2.2. Preparación de liposomas	34

6.2.3.	Caracterización de liposomas no recubiertos	34
6.2.4.	Evaluación del efecto del pH sobre el tamaño y el potencial z de los liposomas si recubrir	34
6.2.5.	Cuantificación de ampicilina encapsulada.....	35
6.2.6.	Caracterización fisicoquímica del polímero Eudragit E en solución acuosa..	35
6.2.7.	Funcionalización de los liposomas	36
7.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	37
7.1.1.	Ensayos preliminares	37
7.1.2.	Caracterización de liposomas no recubiertos	40
7.1.3.	Evaluación del efecto del pH sobre la carga superficial de los liposomas	44
7.1.4.	Cuantificación de ampicilina encapsulada.....	45
7.1.5.	Caracterización del sistema polimérico de funcionalización.....	46
7.1.6.	Funcionalización de los liposomas	49
8.	CONCLUSIONES	52
9.	RECOMENDACIONES	53
10.	BIBLIOGRAFÍA	54
	ANEXO 1: Diseño experimental de las pruebas preliminares	62
	ANEXO 2. Curva de calibración para la cuantificación de ampicilina	67
	ANEXO 3: Curva de titulación de los liposomas no recubiertos	69

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Algunos fosfolípidos utilizados para la preparación de liposomas cargados	21
Tabla 2. Literatura reportada sobre copolímeros de la serie Eudragit ® E*.....	29
Tabla 3. Diseño experimental exploratorio.....	33
Tabla 4. Caracterización de liposomas no recubiertos.	41
Tabla 5. Eficiencia de encapsulación de ampicilina trihidratada.	45
Tabla 6. Caracterización soluciones de Eudragit E-100.....	47
Tabla 7. Potencial zeta de soluciones de Eudragit E-100.....	48
Tabla 8. Diseño experimental factorial para pruebas preliminares.	62
Tabla 9. Estándares preparados para la curva de calibración.	67
Tabla 10. Titulación de los liposomas no recubiertos.	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de los liposomas.....	16
Figura 2. Fallas en el desempeño de liposomas convencionales.	18
Figura 3. Diferentes métodos de preparación de liposomas.	19
Figura 4. Proceso de fusión de liposomas neutros.	20
Figura 5. Estructura química del DOPE (a) y DOPC (b).	23
Figura 6. Estructura química del copolímero Eudragit ® E	25
Figura 7. Protocolo de obtención de liposomas mediante inyección de etanol utilizado en las pruebas preliminares.	33
Figura 8. Protocolo completo de preparación de liposomas funcionalizados con Eudragit E-100.	36
Figura 9. Gráfica factorial para el diámetro promedio de liposoma.	37
Figura 10. Gráfica factorial para el índice de polidispersidad.	38
Figura 11. Gráfica factorial para el potencial zeta.	38
Figura 12. Fuerza deshidratación de iones adsorbidos en la superficie.	40
Figura 13. Distribución de tamaños por intensidad para muestra 1.	42
Figura 14. Distribución de tamaños por porcentaje de volumen.	43
Figura 15. Distribución de tamaños por número de partículas.	43
Figura 16. Mediciones de potencial zeta para muestra 1.	44
Figura 17. Carga superficial y tamaño de los liposomas en función del pH.	45
Figura 19. Viscosidad de soluciones de Eudragit E-100 en función de la concentración. ..	47
Figura 20. Potencial zeta de las muestras de Eudragit en función de la concentración.	49
Figura 21. Cambios observados en la funcionalización con Eudragit E al 0,3% (w/v).	50
Figura 22. Cambios observados en la funcionalización con Eudragit E al 0,5% (w/v).	50
Figura 23. Cambios observados en la funcionalización con Eudragit E al 0,7% (w/v).	51
Figura 24. Espectro absorción UV	68
Figura 25. Curva de calibración.	68

RESUMEN

Durante los últimos años se ha evidenciado un incremento de la resistencia de agentes patógenos a medicamentos antimicrobianos, representando una crisis económica y de salud pública mundial cada vez más importante. En este sentido, la vehiculización de antibióticos en sistemas liposomales ha demostrado un gran potencial, ya que pueden evitar la degradación del ingrediente activo frente a factores de desactivación externa, mejorar la farmacocinética del fármaco y su biodistribución.

En este estudio se realizó la modificación superficial de liposomas preparados por la técnica de inyección de etanol, a partir de lecitina de soya, colesterol y dioleoilfosfatodiletanolamina (DOPE), empleando Eudragit® E-100 como agente de recubrimiento, para la vehiculización de ampicilina trihidratada. Estos sistemas fueron caracterizados por técnicas instrumentales de dispersión de luz dinámica (DLS) y movilidad electroforética (Zetasizer, Malvern Instruments). Mientras que la cantidad de ampicilina encapsulada fue determinada por espectroscopia UV.

Se obtuvieron eficiencias de encapsulación de ampicilina trihidratada del $70,4 \pm 4,2$ %, valores que se contrastaron con la literatura disponible. Por otro lado, los liposomas funcionalizados mostraron una dependencia lineal en la distribución de tamaños respecto a la concentración de polímero empleado en el recubrimiento. El mayor espesor de la película polimérica depositada en la superficie (~ 90 nm) se obtuvo con una concentración del 0,7% (w/v) de Eudragit E-100. También se encontró que el rango del potencial zeta permanece estable, independientemente de la concentración de polímero empleada.

Palabras clave: Liposomas funcionalizados, ampicilina trihidratada, método de inyección de etanol.

ABSTRACT

During the last few years, there has been an increase in the resistance of pathogens to antimicrobial drugs, representing an increasingly important global economic and public health crisis. In this way, vehiculization of antibiotics in liposomal systems has shown great potential, since they can avoid the degradation of the active ingredient against external deactivation factors; improve the pharmacokinetics of the drug and its biodistribution.

In this study, surface modification of liposomes prepared by the technique of ethanol injection, from soy lecithin, cholesterol and dioleoylphosphate diletanolamine (DOPE), was performed using Eudragit® E-100 as a coating agent, as a delivery system of ampicillin trihydrate. These systems were characterized by instrumental techniques of dynamic light scattering (DLS) and electrophoretic mobility (Zetasizer, Malvern Instruments). While the ampicillin encapsulated was determined by UV spectroscopy.

Encapsulation efficiencies of ampicillin trihydrate of $70.4 \pm 4.2\%$ were achieved, values that were compared with the available literature. For the coated liposomes, a linear dependence of the size distribution was observed with concentration of polymer used in the coating process. The highest thickness of the polymeric film deposited on the surface ($\sim 90\text{nm}$) was obtained with a concentration of 0.7% (w / v) of Eudragit E-100. It was also found that the zeta potential range remains stable, regardless of the polymer concentration employed.

Keywords: coated liposomes, beta-lactam antibiotics, ethanol injection method.

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas más graves de la medicina actual es el aumento de la resistencia a los medicamentos antimicrobianos, lo que limita la acción terapéutica de diferentes fármacos convencionales (1). Un enfoque alternativo a la administración clásica de terapia antibacteriana consiste en asociar el fármaco a un vehículo de escala *nano*, ocultando y protegiendo así la molécula de la degradación y administrándola a células diana inaccesibles de forma controlada (2). En este sentido, los liposomas han sido considerados como uno de los vectores más versátiles, gracias a la alta biocompatibilidad y biodegradabilidad que presentan. De ahí que hayan sido empleados para la vehiculización de un gran número de fármacos, como antivirales, antimicrobianos, antitumorales, entre otros (3).

Por otro lado, los liposomas son estructuras vesiculares formadas por una o varias bicapas de naturaleza lipídica, que tienen la capacidad de encapsular tanto compuestos hidrofílicos, como compuestos hidrofóbicos. Además de evitar la degradación química de las moléculas encapsuladas y permitir su liberación en un sitio o bajo condiciones específicas (4). Asimismo, se ha demostrado que pueden mejorar el perfil farmacocinético del ingrediente activo, aún en condiciones agresivas, como los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos (2,5–10). Para el caso de los antibióticos β -lactámicos, como la amoxicilina y la ampicilina, se ha encontrado que la bicapa fosfolipídica de los liposomas puede proteger el fármaco de las enzimas betalactamasas, y conjuntamente, mejorar la acumulación en el sitio de acción del fármaco (9,11).

Considerando los antecedentes en el uso de liposomas modificados superficialmente con polímeros para la liberación eficiente compuestos antimicrobianos(9,12–18), y teniendo en cuenta las propiedades estabilizantes y bioadhesivas que presentan los polímeros derivados de N-alkil metil- metacrilatos (19–21), se prepararon liposomas, mediante la técnica de inyección de etanol, funcionalizados con el material polimérico Eudragit® E-100, para la vehiculización de ampicilina trihidratada. Con el objetivo de estudiar una forma farmacéutica potencial que ayude a disminuir el efecto de la resistencia a los antibióticos de tipo β -lactámico, además de mejorar sus características biofarmacéuticas.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La resistencia a los antimicrobianos ha sido considerada como uno de los mayores desafíos en el área de la medicina, según la *Organización Mundial de la Salud (OMS)*, ya que limita la terapia convencional de algunas enfermedades infecciosas, de origen viral, bacteriana, fúngica y parasitaria, que representan un peligro para la salud pública (22,23). Aún en países desarrollados, como los Estados Unidos, más de 2 millones de personas sufren de una infección resistente a los antibióticos, derivando un costo directo de más de \$ 20 mil millones de dólares (24), con más de 23,000 personas que mueren anualmente. La existencia de estadísticas análogas a nivel mundial ha presionado a las comunidades científicas en la búsqueda de alternativas para enfrentar este problema.

Considerando lo anterior, una gran cantidad de investigadores se han dedicado a la búsqueda de nuevos fármacos antimicrobianos. En la actualidad existen varias organizaciones a nivel mundial dedicadas a esta tarea, como por ejemplo el *Centro de Resistencia Antimicrobiana* y el *Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos*, entidades pertenecientes al grupo *CARB-X Global Partnership* (25). Sin embargo, en zonas menos vanguardistas en tecnología y con menores recursos disponibles para I&D, se han desarrollado alternativas que buscan mejorar los medicamentos disponibles actualmente, mediante la implementación de estrategias de diseño y formulación de producto basadas en diversos sistemas de vehiculización, tales como los complejos poliméricos, las nanopartículas lipídicas sólidas (SNL), los liposomas (2,11,26–28), entre otras.

En el caso específico de los liposomas, estos han sido ampliamente estudiados en diferentes industrias como matrices de vehiculización de numerosas moléculas de aplicación funcional, como por ejemplo, biocidas, antioxidantes, saborizantes y otros elementos bioactivos (4,29,30). Además, se han empleado en la dosificación de agentes antimicrobianos, tales como fluoroquinonas, aminoglucósidos y betalactámicos. En estos casos se ha evidenciado una mejora en la farmacocinética, una disminución de los efectos secundarios de toxicidad, aumento de la actividad contra patógenos intracelulares, selectividad target específica, aumento de la actividad contra patógenos extracelulares, y en particular se ha logrado superar la resistencia a los fármacos por parte del agente patógeno (2,5,16,31–33).

Dentro de los diferentes tipos de antibióticos disponibles en el mercado, los betalactámicos siguen siendo los más usados en la práctica clínica a nivel mundial(1), a pesar de la continua disminución en su efectividad a causa de la resistencia bacteriana (34,35). El mecanismo de resistencia más importantes frente a estos fármacos se asocia a la producción de enzimas β -lactamasas (36), limitando la acción terapéutica de compuestos tradicionales, como la ampicilina. Sin embargo, existen estudios que demuestran que esta barrera se puede superar mediante la encapsulación del agente bactericida en sistemas liposomales, ya que estos presentan una tendencia natural a ligarse a membranas celulares, aún en las cepas resistentes a antibióticos más fuertes como la metilina (2,16,37). Recientemente, se ha sugerido que la modificación superficial de estos sistemas, empleando polímeros iónicos, podría ser una vía de estabilización de los mismos y de promover una mejora en la farmacocinética del antibiótico encapsulado, respecto a los liposomas convencionales (17,38,39).

Con el objetivo de contribuir en el desarrollo de formulaciones novedosas útiles frente a este problema, se realizó un estudio correspondiente a la etapa de preformulación y buscando establecer la factibilidad de funcionalizar liposomas tradicionales empleando un polímero bioadherente, como el Eudragit® E-100, los cuales podría permitir el mejoramiento del desempeño terapéutico de fármacos tradicionales, como la ampicilina, que ha perdido su efectividad en la erradicación de cepas resistentes. Esto es el paso inicial para diferentes alternativas en el camino de mitigar los mecanismos de resistencia a antibióticos que presentan ciertos microorganismos, como las cepas β -lactamasas positivas de *S. aureus*(28).

Para este estudio se empleó un método de preparación relativamente simple, y con facilidades de ser escalado a nivel industrial, estableciendo los parámetros básicos y algunos modelos estadísticos predictivos para obtener liposomas de un tamaño deseado, con baja polidispersidad y con una superficie cargada negativamente. Esto permitió esclarecer algunas características de un sistema altamente dinámico en el que intervienen un gran número de factores a considerar.

Es importante destacar que, aunque se ha demostrado la eficacia de estos sistemas de vehiculización desde hace más de 10 años (2,5,18), no se encontraron estudios realizados a nivel nacional con un enfoque similar al de este proyecto.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Resistencia a antibióticos betalactámicos

Los antibióticos betalactámicos tienen un mecanismo de acción ampliamente estudiado correspondiente a la inhibición de la última etapa de la síntesis de la pared celular bacteriana, lo que lleva a un rompimiento de la célula (*“cell lysis”*). Estos antibióticos constituyen una familia de numerosos fármacos, que siguen siendo ampliamente usados en la práctica clínica, a pesar de su reciente disminución en la efectividad (34). Dentro de este grupo se encuentra la ampicilina, un bactericida de amplio espectro, que se utiliza en el tratamiento de una gran variedad de infecciones en tejidos de oído, riñón, vejiga, entre otros. Cabe resaltar que sus características más favorables incluyen la buena tolerancia en los pacientes, pocos efectos adversos severos, comportamiento farmacocinético tiempo-dependiente, buena distribución (34) y su capacidad de penetrar bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas. Mientras que su mayor inconveniente es la creciente resistencia por diversos mecanismos moleculares que poseen las bacterias.

Existe una gran variedad de mecanismos de resistencia a los antibióticos betalactámicos, que se pueden clasificar en tres grupos como se muestra a continuación:

- **Modificación de las proteínas de unión a penicilinas (PBP, por sus siglas en inglés):** Los antibióticos betalactámicos van dirigidos a blancos llamados proteínas de unión de penicilina "PBPs", si el antibiótico es capaz de unirse a ellas provoca la destrucción de la bacteria. Existen algunos microorganismos, como cepas del *S. aureus*, que pueden tener una resistencia intrínseca a causa de diferencias estructurales en las proteínas PBPs, al igual que pueden adquirir esta resistencia por procesos de mutación. La modificación de las proteínas PBP causa una disminución en la capacidad de fijación del antibiótico a éstas (40).

Uno de los casos más preocupantes de este caso es la resistencia de ciertas cepas de *S. aureus* a la meticilina, que es conferida por una proteína PBP adicional denominada PB2' o PBP2a, la cual no está presente en las cepas susceptibles a meticilina (41).

- **Disminución de la permeabilidad de la membrana:** genera que se disminuya o impida la entrada del antibiótico a la célula por medio de modificaciones en las proteínas productoras de porinas, situadas en la membrana citoplasmática (28).
- **Inactivación por producción de betalactamasas:** Las β -lactamasas o penicilinasas son enzimas, producidas por bacterias con peptidoglucano y por algunos hongos, que son utilizadas por la bacteria para sintetizar su pared bacteriana y para defenderse de antibióticos betalactámicos, como la ampicilina, ya que son capaces de hidrolizar el grupo amida en el anillo betalactámico (42), generando ácido peniciloico, un compuesto farmacológicamente ineficaz. Las modificaciones de la información genética para este mecanismo de resistencia pueden ser de tipo cromosómico, donde se alteran los genes de la bacteria que controlan las estructuras sobre las que actúan distintos antibióticos, y se transmiten estas modificaciones a su descendencia hasta por varias generaciones. Por otro lado, la transferencia de material genético puede darse por elementos extracromosómicos, como plásmidos y los trasposones, que transportan el material genético de una célula bacteriana a otra, mediante procesos de conjugación, transformación y transducción (41).

3.2. Vehiculización en sistemas liposomales

Los liposomas son vesículas esféricas compuestas por una o más bicapas de fosfolípidos no tóxicos que se ordenan espontáneamente cuando entran en contacto con una solución acuosa determinada, generando una región hidrófila en el núcleo y una región lipófila en las bicapas (43), como se muestra la Figura 1. Normalmente se componen de lípidos naturales o sintéticos, como la fosfatidilcolina y sus derivados. Se pueden clasificar como unilamelares o multilamelares. A su vez, los liposomas unilamelares pueden dividirse en vesículas pequeñas (SUV, 50-100nm) y vesículas grandes (LUV, 100-250 nm). Actualmente la mayoría de las aplicaciones en la industria farmacéutica que han sido aprobadas por la Agencia de Alimentación y Fármacos (*FDA*, por sus siglas en inglés) se basan en sistemas liposomales de tamaños menores a los 100 nm (44).

Estos sistemas coloidales, gracias a su tamaño, morfología y su alta biocompatibilidad, permiten encapsular tanto compuestos hidrofílicos, como compuestos hidrofóbicos, evitando

la degradación química de las moléculas encapsuladas y con ello, se favorece su liberación en un sitio o bajo condiciones específicas (3). Por esto, se han establecido como uno de los sistemas de vehiculización de fármacos más prometedores (2,45–47) en los últimos años.

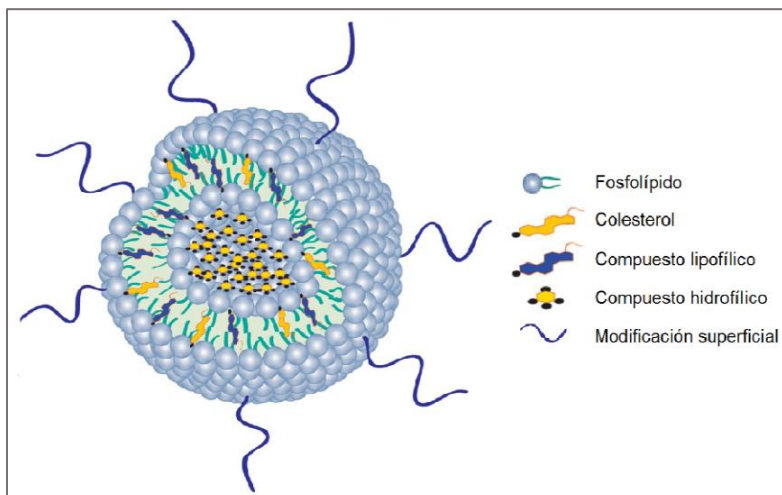


Figura 1. Estructura de los liposomas

(Tomada de: Neves *et al.* (2017). Liposomes in tissue engineering and regenerative medicine. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2014.0459>)

La morfología de los liposomas permite encapsular fármacos hidrofílicos solubilizados en el núcleo acuoso formado al interior del agregado, mientras que se pueden asociar fármacos hidrófobos entre las bicapas lipídicas (43). De este modo, las características del fármaco, así como el coeficiente de partición (LogK_{ow}) juegan un papel importante en la obtención de liposomas. Se ha encontrado que compuestos con $\text{LogK}_{ow} > 5$, como la ciclosporina, son atrapados completamente en la bicapa lipídica de los liposomas. Además, la baja solubilidad en agua permite mantener bajos niveles de pérdidas por fugas del fármaco a través de la bicapa (48). Para sustancias con un coeficiente de partición intermedio, $1.7 < \text{LogK}_{ow} < 4.0$, como la mitomicina, tienden a salir fácilmente de los liposomas. Teniendo en cuenta que la ampicilina presenta un coeficiente de partición de 1.35, se espera que la ampicilina pueda ser atrapada en el núcleo de los liposomas (49).

Otra de las grandes ventajas de los sistemas liposomales en la vehiculización de fármacos, es que las estructuras de la bicapa fosfolipídica forman una barrera protectora en torno al ingrediente activo encapsulado, la cual es resistente a las enzimas presentes en la boca y el estómago, a soluciones alcalinas, jugos gástricos, radicales libres, sales biliares y la flora

intestinal. Así, previenen reacciones de oxidación y degradación del compuesto activo, que disminuyen la efectividad terapéutica de compuestos susceptibles. Por lo tanto, los liposomas desempeñan un papel crucial en la extensión del tiempo de vida media de una variedad de fármacos, p.ej., para la ampicilina, se ha logrado extenderlo hasta a 40 horas en estudios *in vivo* sobre cepas de *Micrococcus luteus*, cuando en formulaciones convencionales tiene un tiempo de vida media de aproximadamente 2 horas (50), por lo que se evidencia un aumento de la efectividad terapéutica del principio activo (API, por sus siglas en inglés).

Las propiedades de los liposomas difieren drásticamente dependiendo de la composición lipídica, carga superficial, tamaño, método de preparación, etc. Se ha encontrado que la selección de los lípidos que componen la bicapa de los liposomas puede determinar la rigidez de esta. Por ejemplo, la fosfatidilcolina insaturada de fuentes naturales (huevo o soya) genera bicapas altamente permeables y menos estables, mientras que los fosfolípidos saturados con cadenas alquílicas largas, como la dipalmitoilfosfatidilcolina, generan bicapas rígidas no permeables (43).

Desde sus orígenes en el año 1964 con el trabajo de Alec Bangham (51), las estructuras liposomales han ido evolucionando para cumplir con nuevas aplicaciones o para mitigar ciertas limitaciones en su desempeño, ya que se ha encontrado que las formulaciones convencionales presentan una serie de fallas, como las resumidas en la Figura 2. Para esto se han incluido en las formulaciones compuestos como el colesterol, que permite disminuir la permeabilidad de la bicapa lipídica y mejorar la estabilidad *in vivo* e *in vitro* (16). Además, se han incluido polímeros biocompatibles, como polietilenglicoles y algunos derivados de quitina, que modifican la superficie del liposoma para estabilizarlos a ciertas condiciones y controlar la liberación del fármaco (4,45,48,52). Incluso, existen modificaciones con anticuerpos específicos que permiten el tratamiento más efectivo en el sitio de acción de enfermedades difíciles como el cáncer (4,47).

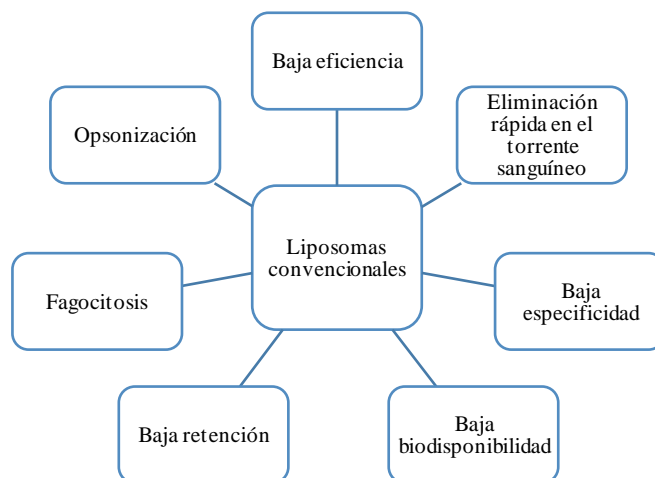


Figura 2. Fallas en el desempeño de liposomas convencionales.

Tomada de: Bangale *et al.* (2014). Stealth liposomes: A novel approach of targeted drug delivery in cancer therapy

3.3. Métodos de preparación de liposomas

Existen diversas técnicas para la preparación de sistemas liposomales (53), la elección correcta del método de preparación depende de parámetros como:

- Las características fisicoquímicas del material a encapsular y de los lípidos seleccionados.
- La naturaleza del medio en el que se dispersan las vesículas lipídicas.
- La concentración efectiva ingrediente activo y su toxicidad potencial.
- Los procesos adicionales implicados durante la aplicación/administración de las vesículas.
- El tamaño óptimo, polidispersidad y tiempo de vida esperado en la aplicación de los liposomas.
- Reproducibilidad de lote a lote y posibilidad de producción a gran escala de productos liposomales seguros y eficientes.

Los métodos de preparación de liposomas se clasifican en diferentes categorías, de acuerdo con los modos de dispersión, p.ej. dispersión solvente y la solubilización con detergentes, como muestra la **Figura 3**.

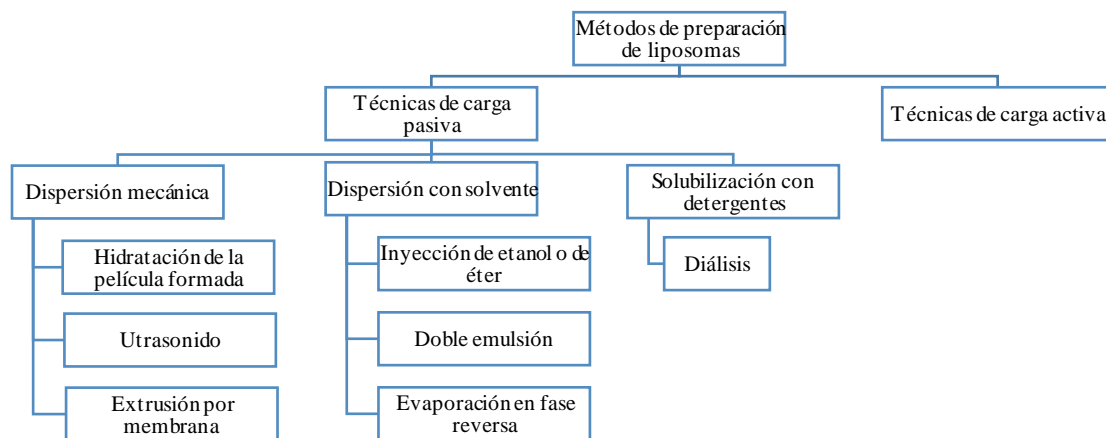


Figura 3. Diferentes métodos de preparación de liposomas.

Adicionalmente, existen métodos para el acondicionamiento de las vesículas, procesos de dispersión mecánica, en donde las características físicas de estas son modificadas (54). En general, las etapas de preparación son similares en la mayoría de los métodos, iniciando con una solubilización de los compuestos lipófilos en un solvente orgánico, seguida por la dispersión de los lípidos en medio acuoso y por último, la purificación de los liposomas (43).

Para la encapsulación de fármacos hidrófilos, se incluye la preparación de una solución acuosa de estos compuestos hidrosolubles, mediante la cual se hace la hidratación de lípidos para la formación de vesículas. Mientras que los fármacos lipófilos se solubilizan en la solución orgánica de lípidos y después se someten a un proceso de evaporación, hasta obtener una película seca que contiene al fármaco, para su posterior hidratación. Estos métodos implican la carga de los ingredientes activos antes o durante la preparación de liposomas, por lo que se conocen como técnicas de carga pasiva. Sin embargo, se pueden introducir ciertos tipos de compuestos con grupos ionizables, y aquellos que presentan solubilidad en lípidos y en agua, en los liposomas después de la formación de vesículas intactas (carga activa).

3.4. Estabilidad de liposomas cargados superficialmente

Los liposomas convencionales presentan algunas desventajas, no sólo en su desempeño, como se mencionó anteriormente, sino en su vida útil (*"Shelf life"*), ya que forman sistemas termodinámicamente inestables, que son susceptibles a fenómenos de agregación por diversos mecanismos, tales como la floculación y la coalescencia, los cuales generan un

cambio drástico en la distribución de tamaños de los sistemas liposomales y con ello, una notable reducción en la encapsulación del ingrediente activo (55). Para el caso de la agregación por floculación, ocurre un proceso reversible, donde las partículas que componen un agregado logran mantener su estructura original, mientras que la agregación por coalescencia o fusión son procesos irreversibles (ver **Figura 4**), ya que los liposomas forman una estructura diferente y no se pueden recuperar mediante la aplicación de energía, p.ej. agitación.



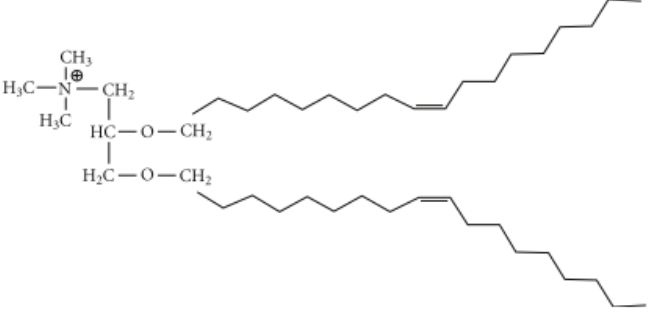
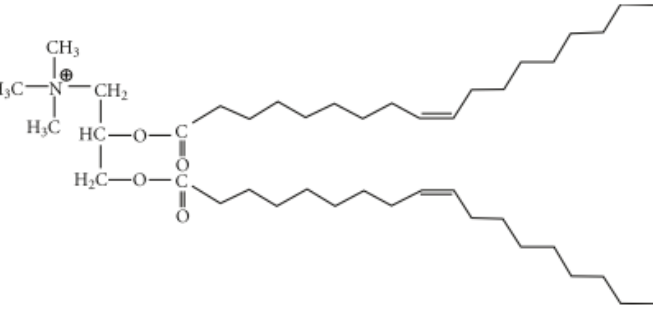
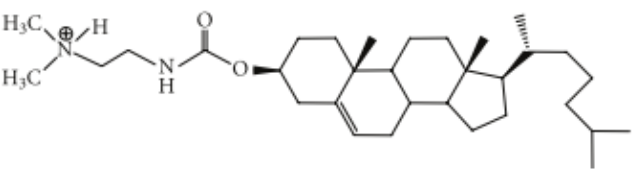
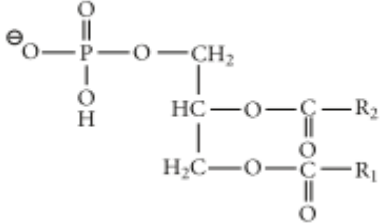
Figura 4. Proceso de fusión de liposomas neutros.

Tomada de: Sabín, J. (2007). Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas.

Los procesos de agregación de liposomas neutros se producen por interacciones de Van der Waals, ya que se presentan de forma natural en este tipo de sistemas coloidales. Sin embargo, este fenómeno puede evitarse, al incluir una carga superficial en las vesículas, que crea un campo eléctrico que permite que la repulsión electrostática entre las partículas sea superior a las fuerzas de Van der Waals existentes entre ellas, como explica la teoría *DLVO* (56).

La carga superficial de los liposomas no sólo determina la estabilidad termodinámica del sistema, sino que afecta a la estructura de la bicapa, a su fluidez y al transporte de moléculas a través de la membrana. Desde este punto de vista, la selección de los lípidos que conforman la bicapa juega un papel importante sobre estos parámetros. De ahí que se implementen fosfolípidos de carácter iónico para incluir cargas en la superficie de liposomas, en la **Tabla 1** se muestran algunos ejemplos de fosfolípidos utilizados en la preparación de liposomas cargados (57).

Tabla 1. Algunos fosfolípidos utilizados para la preparación de liposomas cargados

NOMBRE	ESTRUCTURA*
FOSFOLÍPIDOS CATIÓNICOS	
<p>DOTMA: N-[1-(2,3-dioleyloxy) propyl]- N,N,N-trimethylammonium chloride</p>	
<p>DOTAP: N-(1-(2,3-dioleioiloxy)propyl)-N,N,N-trimethylammonium chloride</p>	
<p>DC-CHOL: 3β[N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl] cholesterol.</p>	
FOSFOLÍPIDOS ANIÓNICOS	
<p>Ácido fosfatídico (pH=7)</p>	
<i>Continúa en página siguiente...</i>	

<i>Viene de página anterior...</i>	
NOMBRE	ESTRUCTURA*
Fosfatidilglicerol (p.ej. Dioléoilfosfatidilglicerol, DOPG)	$ \begin{array}{c} \text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{O} \quad \quad \quad \text{O} \\ \\ \text{H} \quad \quad \quad \ominus \\ \\ \begin{array}{c} \text{HC}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{O} \end{array} \end{array} $
Fosfatidilserina	$ \begin{array}{c} \ominus\text{OOC}-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{NH}_3^+ \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \quad \quad \text{O} \\ \quad \quad \quad \quad \quad \ominus \\ \\ \begin{array}{c} \text{HC}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1 \\ \quad \quad \quad \\ \quad \quad \quad \text{O} \end{array} \end{array} $

*Tomado de: Balazs y Godbey (2011). Liposomes for use in gene delivery (57)

En algunos casos, se emplean lípidos “de ayuda” en combinación con los lípidos cargados, ya que estos por lo general actúan estructuralmente para aportar una mayor estabilidad en la configuración que adopta la bicapa lipídica de las vesículas que se forman (57). Los lípidos más comunes para cumplir esta función estructural son la DOPE (Dioléoilfosfatidiletanolamina) (DOPE) y la dioléoilfosfatidilcolina (DOPC), cuyas estructuras se muestran en la **Figura 5**.

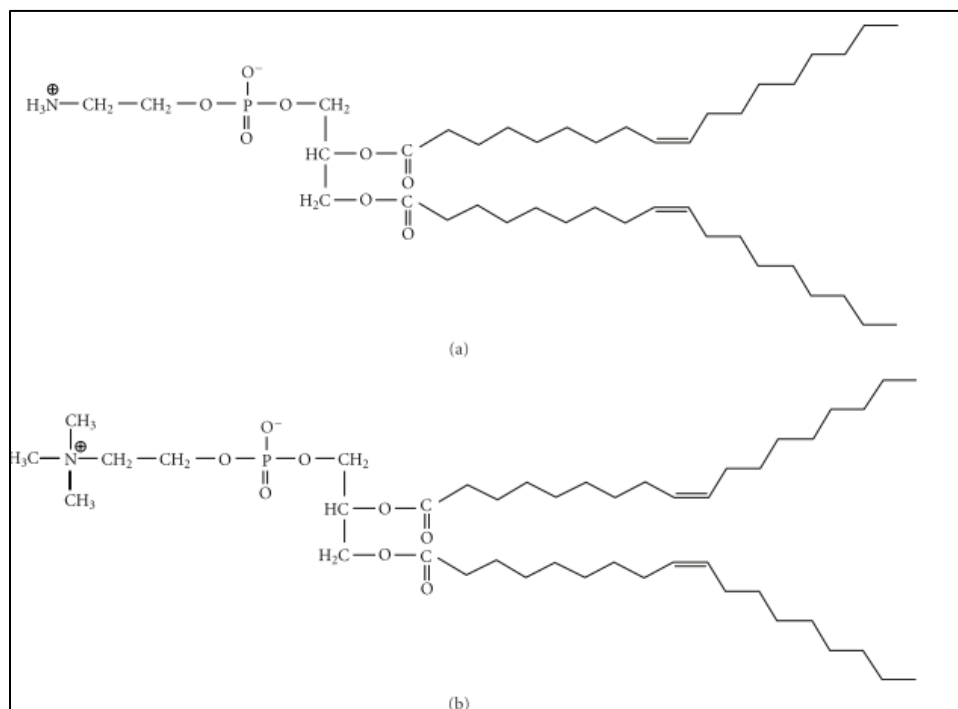


Figura 5. Estructura química del DOPE (a) y DOPC (b).

3.5. Liposomas funcionalizados

En las aplicaciones de liberación “*target*” específica de fármacos, uno de los mayores desafíos es asegurar que los liposomas serán “invisibles” a los mecanismos primarios de eliminación del organismo, particularmente al sistema fagocítico mononuclear (SFM). Esta habilidad por lo general es conferida por la modificación superficial de los liposomas, mediante la formación de estructuras que le proporcionen “propiedades de sigilo” (58). Existen ciertos ligandos que pueden evitar la absorción reticuloendotelial, los cuales pueden ser compuestos naturales como gangliósidos (p.ej. GM1) o polímeros biocompatibles, como los polietilen glicoles (PEGs) de cadena corta asociados a cadenas fosfolipídicas (59–61), polianilina, poliacrilamida o polivinilpirrolidona (6). Estos ligandos permiten reducir las interacciones superficiales entre los liposomas y las proteínas circulantes específicas, encargadas de “marcar” los agentes patógenos para su captación por los fagocitos mononucleares, en el proceso natural de opsonización (62).

A pesar del uso recurrente de estructuras poliméricas, en especial los PEGs, para la preparación de liposomas modificados, se ha encontrado que estos polímeros pueden disminuir las interacciones de los liposomas con las células objetivo (“*target cells*”), ya que forman una región hidrófila circundante al liposoma, que reduce la capacidad de ligarse a sitios de acción, y que además puede dificultar la liberación del fármaco, reduciendo así la efectividad terapéutica del API (63).

3.6. Métodos de modificación superficial de liposomas mediante la técnica capa a capa

La técnica capa a capa (“*Layer-by-layer*”, *LbL*) se basa en la adsorción de polímeros con carga opuesta sobre sistemas liposomales cargados, llevando a una alta versatilidad, simplicidad y reproducibilidad respecto a la técnica convencional de autoensamblaje de monocapa (*SAM*, por sus siglas en inglés). El procedimiento consiste en la adsorción alternada de especies con múltiples cargas catiónicas o aniónicas sobre superficies cargadas de manera opuesta, observándose que cada paso de adsorción conduce a la inversión de la carga superficial inicial, y que una serie de deposiciones consecutivas conducen a un complejo estructurado en multicapas (64). Aunque esta técnica fue desarrollada inicialmente para el recubrimiento polimérico de micro y nano partículas, se han encontrado estudios que comprueban que es una alternativa prometedora en la funcionalización de vesículas liposomales (52,65–68).

Una de las alternativas de esta técnica y que coincide con el propósito de nuestro trabajo, se basa en el fenómeno de interacciones electrostáticas de los grupos polares de los fosfolípidos (cargados negativamente) con los grupos catiónicos (sales de amonio cuaternario) de materiales poliméricos biocompatibles, formando capas superficiales más estables en todo el sistema liposomal. Asimismo, dicha capa puede servir como “plantilla” para la deposición de múltiples capas poliméricas, llevando a la formación de otro tipo de liposomas recubiertos conocidos como “*layersomes*”, los cuales han demostrado una alta eficiencia terapéutica con fármacos como: amoxicilina, paclitaxel y Mitomicin C (9,16,65). Además, se ha evidenciado

un aumento en la estabilidad y biodisponibilidad de compuestos como la curcumina (29,52), extracto de hibisco (69) y ácido elágico (67).

La funcionalización de liposomas mediante polímeros iónicos o polielectrolitos, utilizando la técnica *LbL*, no sólo aporta mayor estabilidad termodinámica a los sistemas liposomales, sino que se ha encontrado que permite una mayor facilidad de liberación del fármaco y reduce la oxidación de lípidos y las pérdidas de *API* a causa de la permeación a través de la bicapa fosfolipídica, lo cual los convierte en una interesante estrategia para la vehiculización de múltiples compuestos con actividad farmacológica (7,9,69,70).

3.7. Polímeros de la serie Eudragit E (Eudragit E100, E12,5 y EPO)

Estos copolímeros, derivados del N-dimetil-etil-metacrilato, butil-metacrilato y metil-metacrilato (Ver Figura 6), se caracterizan por presentar una baja viscosidad en medio acuoso y buena adhesión a las membranas biológicas, p.ej. mucosa, por lo que comúnmente son utilizados en procesos de recubrimiento de medicamentos comprimidos, con el fin de mejorar sus características organolépticas y protegerlos frente a la degradación por condiciones extremas de pH.

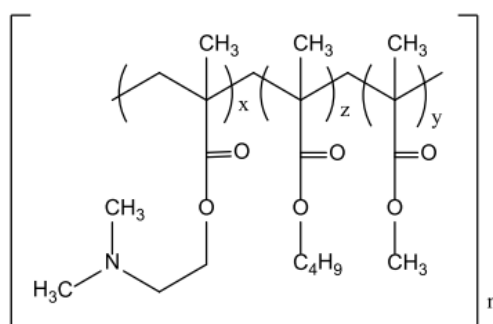


Figura 6. Estructura química del copolímero Eudragit ® E

Estos copolímeros de Eudragit E ® pueden adquirir carga cuando se encuentran en medios acuosos acidulados (pH gástrico, 5.0), lo que les permite generar zonas interfaciales específicas que pueden interactuar electrostáticamente con moléculas iónicas de carga

opuesta o bien con otros sistemas de carga opuesta como los liposomas (45). Adicionalmente, se ha observado que la presencia de dichas cargas en éstos sistema polimérico, pueden conferir un efecto de mayor interacción con membranas celulares y virales, y con ello, corresponde a polímeros prometedores en la liberación *target* específica de fármacos bajo ciertas condiciones. (20,21).

4. ESTADO DEL ARTE

4.1. Modificación superficial de liposomas empleando polielectrolitos

En los últimos años se ha evidenciado un aumento del uso de polielectrolitos para la modificación superficial de liposomas, ya que estos compuestos responden súbitamente a condiciones físicas o químicas del ambiente como cambios pronunciados en la temperatura, fuerza iónica, campos eléctricos, estrés mecánico, pH, iones específicos, agentes químicos y enzimas; lo que permite la liberación controlada de activos con efecto terapéutico potencial, aumentando la estabilidad de los mismos y permitiendo la liberación de estos en sitios específicos en función de las condiciones mencionadas.

Uno de los polímeros más estudiados en la modificación superficial de liposomas es el quitosano, biopolímero catiónico de origen natural que estabiliza las estructuras liposomales por efecto estérico. A este polímero se le han asociado una gran variedad de efectos terapéuticos como el antimicrobiano, antiinflamatorio, antioxidante y antitumoral (30). Además, la habilidad de formar interacciones electrostáticas entre sus grupos amino protonados y las cargas negativas de la glicoproteína mucina le confiere propiedades mucoadhesivas, lo que aumenta el tiempo de permanencia y el contacto entre la membrana y la formulación, permitiendo una liberación del principio activo de forma sostenida en el tiempo (71). Por lo anterior, se ha evidenciado un aumento en la biodisponibilidad y en la efectividad terapéutica de diferentes ingredientes activos, como el diclofenaco, la vancomicina, y la ciprofloxacina (8,72), mediante liposomas recubiertos con quitosano. Se ha encontrado que el recubrimiento de los liposomas con este polímero puede conferir una mayor permeabilidad del fármaco (73), acumulación y mejor comportamiento farmacocinético (9), entre otras ventajas respecto a las formulaciones tradicionales.

También se han evaluado hidrogeles de Carbopol (CP) para el recubrimiento de liposomas, con el objetivo de promover la mucoadherencia de estos y favorecer la efectividad terapéutica de un fármaco. Suriaprabha, Pichandy y Vanchasatya (2009) evaluaron la concentración mínima de Carbopol para estabilizar un sistema liposomal de acetaminofén estabilizado por un surfactante no iónico (Polisorbato 80), demostrando que una concentración de 1.5% de CP otorgaba una mayor resistencia mecánica a los liposomas formados, una estabilidad

considerable que permitía el aumento de la efectividad del medicamento por encima de la observada en la formulación comercial (74). También se ha encontrado que el CP puede aumentar la ventana terapéutica del fármaco encapsulado en sistemas liposomales recubiertos, como demostraron Sangeetha y Karki (2015) con un sistema liposomal de voriconazol y metronidazol recubiertos con Carbopol 934P, con el cual se amplió el espectro de infecciones vaginales que podrían erradicar estos fármacos (75).

La eficiencia de otros hidrogeles en el recubrimiento de liposomas y en el aumento de la efectividad del fármaco encapsulado se ha evaluado con polímeros muy comunes en la industria farmacéutica, como la hidroxipropil celulosa (HPMC). Refai, Hassan y Abdelmonem (2017) evaluaron el efecto del recubrimiento de liposomas de citrato de sildenafil con HPMC y quitosano, en tratamientos de fertilización *in vitro*, donde se obtuvo un mayor aumento de la permeabilidad del fármaco, una liberación prolongada por mayor tiempo, un mayor aumento en el flujo sanguíneo del tejido intravaginal y un aumento en el espesor del endometrio con los liposomas recubiertos con quitosano respecto a los recubiertos con HPMC (76).

Por otro lado, Karn *et al.* (2010) evaluaron la efectividad de cuatro polímeros mucoadherentes (quitosano, Carbopol 974P, Eudragit L100, y Eudragit S100), en el recubrimiento de liposomas preparados por el método de inyección de etanol. Se encontró que la mucoadhesividad de los liposomas modificados con Eudragit S 100 fue mayor, optimizando la liberación del Atenolol administrado por vía oral (77). Adicionalmente, Barea *et al.* (2010) evaluaron el cambio en el comportamiento fármaco cinético de una formulación colónica comercial, donde evidenciaron un cambio en el perfil de liberación del fármaco encapsulado en liposomas recubiertos por Eudragit S 100 (78).

Una revisión bibliográfica sobre copolímeros de la serie Eudragit® E reveló que han sido poco estudiados en la funcionalización de liposomas, sin embargo, han sido empleados en la preparación de sistemas similares, como nanopartículas, micropartículas y complejos poliméricos. En la **Tabla 2** se muestra un resumen de los estudios encontrados en la literatura para estos casos. En el caso particular de funcionalización de liposomas, Hasanovic *et al.*

(2010) encontraron que los liposomas de minoxidil y aciclovir recubiertos con Eudragit EPO tenían una mayor estabilidad fisicoquímica frente a los no recubiertos, y que el polímero confería una mayor permeabilidad del fármaco en la piel, debido a las posibles interacciones de los grupos cargados positivamente con la superficie del estrato córneo cargada negativamente. Además se determinó que las interacciones entre aciclovir y los fosfolípidos presentes en la bicapa liposomal disminuye la estabilidad fisicoquímica del sistema frente al preparado con minoxidil (21).

Teniendo en cuenta lo anterior, se evidencia que la selección del polímero bioadherente que se utiliza en la funcionalización de liposomas es uno de los factores clave en el éxito de la liberación del fármaco y en el perfil farmacocinético que se obtiene, y depende intrínsecamente del sistema estudiado, ya que las interacciones lípido-fármaco, lípido-polímero, liposoma-medio dispersante, entre otros factores, afectan significativamente el comportamiento del sistema (20,21,77).

Tabla 2. Literatura reportada sobre copolímeros de la serie Eudragit ® E*.

Nombre del fármaco	Forma de dosificación / sistema de liberación	Método de preparación	Hallazgos
Eudragit E-100			
Triclosan	Nanopartículas	Emulsificación-Difusión	Mejora en la liberación del fármaco
Carvidilol	Nanopartículas	Nanoprecipitación	Aumento de eficiencia terapéutica .
Ranitidina hidrocloreuro	Microesferas	Evaporación de solvente	Aumento de absorción y biodisponibilidad
Eudragit EPO			
Meloxicam	Nanopartículas	Nanoprecipitación	Aumento del efecto antiinflamatorio respecto a la suspensión tradicional
Andrografólido	Nanopartículas sensibles al pH	Nanoprecipitación	Aumento de la biodisponibilidad

Nombre del fármaco	Forma de dosificación / sistema de liberación	Método de preparación	Hallazgos
Diclofenaco sódico y Teofilina	Complejos poliméricos	Complejo coacervado o poli iónico (IPEC)	Susceptibilidad a pH ácido y neutro

*Tomado de: Niranjana *et al.* (2017). Pharmaceutical significance of Eudragit: A review(19).

5. OBJETIVOS

Objetivo general

Modificar la superficie de liposomas mediante la técnica *layer-by-layer* con el polímero bioadherente, Eudragit® E-100, para vehicular ampicilina de manera target específica.

Objetivos específicos:

- Preparar sistemas liposomales convencionales para la encapsulación de ampicilina trihidratada, a través de la técnica de inyección de etanol.
- Caracterizar los liposomas en medio acuoso (Tamaño y potencial zeta), utilizando técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS).
- Determinar la eficiencia de encapsulación de ampicilina trihidratada en los liposomas modificados.
- Modificar superficialmente los sistemas liposomales mediante el uso del polímero catiónico mucoadherente, Eudragit® E-100, utilizando la técnica de deposición electrostática *layer-by-layer*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Materiales

La ampicilina trihidratada fue proporcionada por laboratorios Tecnoquímicas S.A., junto con su correspondiente certificado de análisis de control de especificaciones de calidad. Los lípidos que se utilizaron para la formación de las vesículas fueron: fosfatidilcolina de soya (Epikuron 200, 92% fosfatidilcolina), dioleoilfosfatodiletanolamina (DOPE) y colesterol de Avanti Polar Lipids, Inc. Para la modificación superficial de los liposomas se utilizó el sistema polimérico Eudragit® E-100 (Evonik). Todos los reactivos que se utilizaron fueron de grado analítico, mientras que el agua utilizada fue ultrapura (pH ~ 6.0 y conductividad de 1µS/cm) obtenida con un sistema Elix Essential Millipore®.

6.2. Métodos

6.2.1. Ensayos preliminares

Se realizó un diseño experimental exploratorio para analizar el efecto de algunos parámetros del proceso de obtención de liposomas mediante el método de inyección de etanol, sobre las características finales del sistema (tamaño promedio de partícula y el potencial zeta). Para esto se realizó una modificación a la técnica empleada por Ukawa *et al.* (2014) en la obtención de liposomas funcionalizados, para la vehiculización de ADN plasmídico (79), donde se empleó una relación molar de 1:1 entre la lecitina y el colesterol para los sistemas liposomales (65).

Inicialmente se disolvieron los lípidos en etanol absoluto, para preparar soluciones de colesterol (Mw= 386 g/mol) a una concentración de 0,64 mg/mL, lecitina (Epikuron 200, Mw= 786 g/mol) a una concentración de 1,3 mg/mL y dioleoilfosfatodiletanolamina (DOPE, Mw=744,03 g/mol) a una concentración de 1,23 mg/mL. Luego, se prepararon 100µL de fase orgánica, compuesta por 42,4 µL de Colesterol, 42,4 µL de Epikuron 200 y 15,2 µL de dioleoilfosfatodiletanolamina (DOPE). Esta fase se inyectó lentamente en 100 µL de la fase acuosa, la cual se agitó por 1 minuto con un sistema vórtex y se dejó en reposo. Posteriormente, se inyectó la mezcla en 300 µL de fase acuosa, y se llevó a centrifugación en tubos eppendorf de ultrafiltración a 9000G (10000 rpm) por 6 minutos. Los liposomas

purificados se inyectaron en 500 μL de fase acuosa y se aforó a 1 mL de volumen final para las mediciones de distribución de tamaño y potencial zeta. La Figura 7 muestra un resumen del protocolo de preparación utilizado en las pruebas.

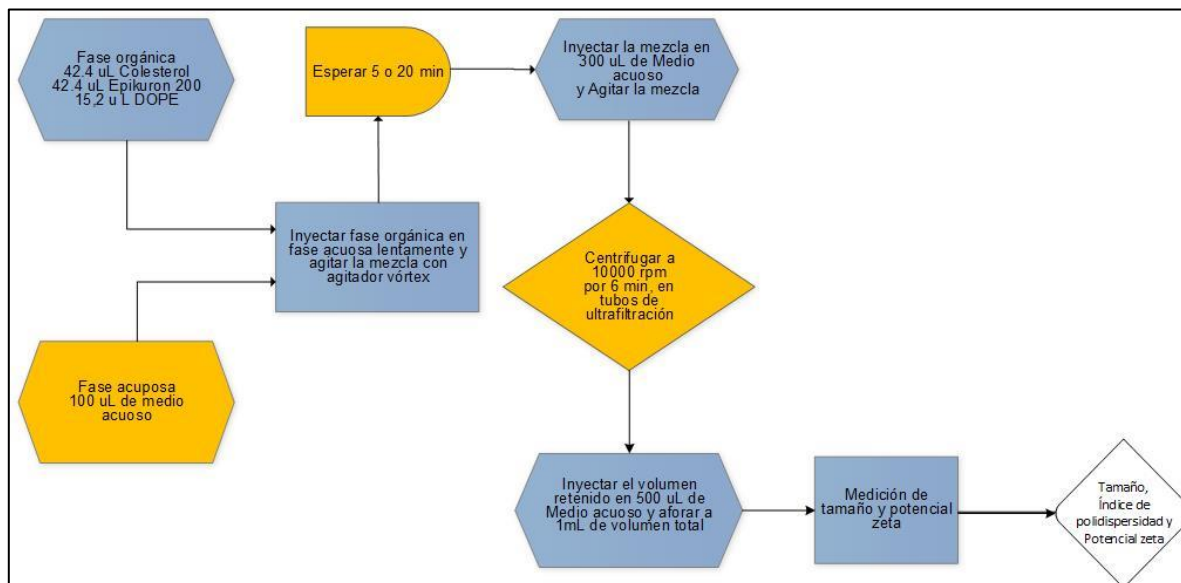


Figura 7. Protocolo de obtención de liposomas mediante inyección de etanol utilizado en las pruebas preliminares.

Se utilizó un diseño factorial completo aleatorizado, con 3 réplicas para cada punto, evaluando el efecto de (i) la fuerza iónica del medio acuoso, (ii) el tiempo de reposo de la mezcla de la fase orgánica y acuosa y (iii) el tamaño del poro del tubo de ultrafiltración que se utilizó en el proceso de purificación (“*Cut-off*”), tal como se muestra en la **Tabla 3**. El análisis estadístico se realizó empleando el software Minitab 17.

Tabla 3. Diseño experimental exploratorio.

FACTORES	NIVELES	VARIABLES RESPUESTA
Fuerza iónica del medio	0 mM (Agua tipo I) 1 mM 10 mM	Tamaño promedio (nm), Índice de polidispersidad y Potencial zeta
Tubo de ultrafiltración “ <i>Cut-off</i> ”	10 kDa 30 kDa	
Tiempo de reposo (“ <i>aging</i> ”)	5 min 20 min	

Para los medios de fuerza iónica 1 mM y 10 mM se prepararon soluciones buffer fosfato de potasio, con un valor de pH de 7,2.

6.2.2. Preparación de liposomas

Para la preparación de liposomas se utilizó el método de inyección de etanol, tal y como se muestra la **Figura 7**, donde se tuvieron en cuenta los resultados de los ensayos preliminares, donde se consideró una fase acuosa con concentración de 6 mg/mL de ampicilina trihidratada en buffer fosfato de pH 7,2 y fuerza iónica 10 mM.

6.2.3. Caracterización de liposomas no recubiertos

Las mediciones de potencial zeta, tamaño promedio e índice de polidispersidad se realizaron utilizando el equipo Zetasizer Nano ZSP (Malvern Instruments) a 25°C. El potencial zeta se determinó midiendo la dirección y la velocidad con que las partículas se movían en el campo eléctrico aplicado, y utilizando la aproximación de Smoluchowski para calcular el potencial zeta a partir de la movilidad medida (66). Para la medición de tamaño se utilizó ángulo de 173° para detectar dispersión de la luz que se genera por el movimiento browniano de las partículas en suspensión, y se empleó la ecuación de Einstein para el cálculo de tamaño promedio (80). El instrumento reporta el diámetro promedio de partícula (promedio-z, “z-average”) y el índice de polidispersidad (PdI), que va desde 0 (monodisperso) a 1 (distribución muy amplia). Cada una de estas mediciones se reportaron como el promedio y la desviación estándar de las mediciones realizadas a partir de tres muestras recién preparadas, con tres lecturas realizadas por muestra.

6.2.4. Evaluación del efecto del pH sobre el tamaño y el potencial z de los liposomas si recubrir

Para determinar la viabilidad del proceso de funcionalización de los liposomas, se analizó la carga superficial de los mismos en función del pH del medio. Para esto se preparó una muestra fresca, y se realizó una curva partiendo del pH inicial, casi neutro, hasta un pH de 4,0. Se realizaron mediciones por duplicado de potencial zeta y tamaño en cada punto, para analizar la susceptibilidad del sistema al pH del polímero de funcionalización.

Se utilizó una solución acuosa de HCl al 0,01 M, el accesorio MPT-2 (Zetasizer ZSP, Malvern Instruments) y una celda desechable tipo DTS1070.

6.2.5. Cuantificación de ampicilina encapsulada

Luego del proceso de ultrafiltración/centrifugación, se tomó una alícuota del filtrado obtenido (fracción en el fondo del tubo) para cuantificar el contenido de ampicilina. Se midió la absorbancia a una longitud de onda de 256nm a 37°C (Shimadzu UV-1800)., y se determinó la cantidad de ampicilina mediante la interpolación de una curva de calibración.

Se construyó una curva de calibración con ecuación $y = 0,005065x + 0,005467$ y $R^2 = 0,999486$ (Ver Anexo 2), teniendo en cuenta las diluciones que se realizan durante el proceso de preparación y la concentración inicial de la solución de ampicilina que se utiliza, que corresponde a 6 mg/mL. Además, se consideró el límite de la linealidad de la ley de Lambert-Beer-Bouger respecto a la absorbancia de la muestra.

Se cuantificó la concentración de ampicilina trihidratada por triplicado para cada muestra, y este valor se empleó en el cálculo de la eficiencia de encapsulación, mediante la ecuación 1.

$$\%EE = \left[\frac{(Amp(total) - Amp(filtrado))}{Amp(total)} \right] \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

6.2.6. Caracterización fisicoquímica del polímero Eudragit E en solución acuosa.

Inicialmente, se prepararon soluciones de Eudragit E-100 en agua ultrapura en un intervalo de concentraciones entre 0,05-2,25% (p/v) ajustando el pH a 4.0, con el fin de favorecer el proceso de solubilización de éste. Además, cada solución fue filtrada con un filtro de nylon de 0.45 μm , con el fin de retener las partículas de polímero no disueltas. Posteriormente se procedió a determinar la viscosidad, la conductividad y el potencial z de dichas soluciones a

25 ° C. Para el caso de las medidas de potencial z se realizaron, tal y como se describió anteriormente; mientras que para las medidas viscosimétricas se utilizó un viscosímetro de flujo (Microvisc de Rheosense) (81).

6.2.7. Funcionalización de los liposomas

Para la funcionalización de los liposomas, se prepararon soluciones de Eudragit® E-100 a pH 4,0 a una concentración del 0,3%, 0,5% y 0,7% (%w/v), las cuales se sometieron a agitación magnética constante de 300 rpm hasta completa solubilización. Luego, sobre 1 mL de dichas soluciones poliméricas, se adicionó 1mL de la suspensión de liposomas (previamente preparada) a una velocidad de 50µL/min. Luego, se dejó la mezcla del sistema liposomal y el polímero en agitación constante a 300 rpm durante 8 horas en un recipiente cerrado. Posteriormente se realizó una centrifugación a 10000 rpm por 2 minutos, utilizando tubos de ultrafiltración de 30kDa, con el fin de eliminar los agregados de polímero y otras estructuras pequeñas, antes de proceder a las mediciones de tamaño y potencial zeta. En la **Figura 8** se muestra un resumen del protocolo completo de preparación de los liposomas funcionalizados.

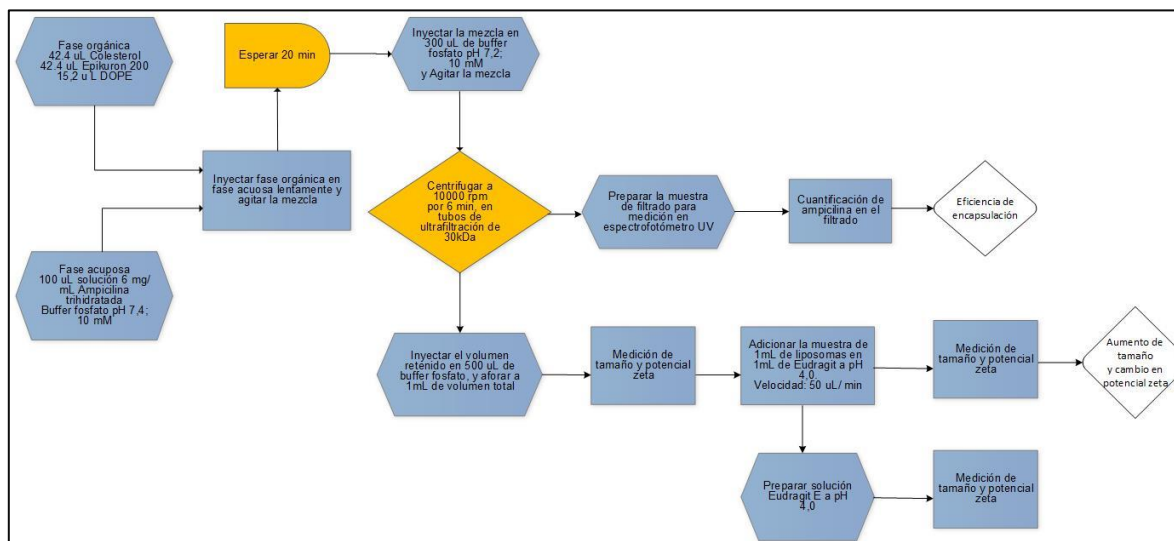


Figura 8. Protocolo completo de preparación de liposomas funcionalizados con Eudragit E-100.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1.1. Ensayos preliminares

Los resultados del análisis estadístico del modelo factorial planteado, mostraron que el factor que afecta en mayor grado el tamaño promedio de partícula (D_H) es el tiempo de reposo (“aging”) cuando se mezclan la fase orgánica y la acuosa, tal y como se puede observar en la **Figura 9**, ya que puede existir una diferencia de hasta 20 nm en el tamaño de las vesículas obtenidas en los dos niveles evaluados.

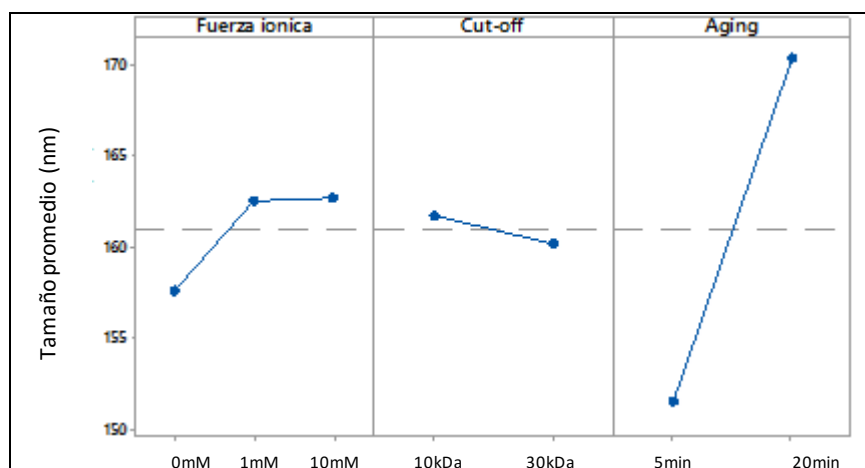


Figura 9. Gráfica factorial para el diámetro promedio de liposoma.

Mientras que, para los otros factores evaluados, este efecto es menos marcado. De acuerdo con lo explicado por Ruano, M. (2013), los sistemas liposomales de baja concentración fosfolipídica (del orden de nM), el proceso de formación de las vesículas estables consta de dos periodos de tiempo (82), un lapso corto, donde los monómeros se mueven fácilmente de los agregados formados, y otro periodo más lento en el que se genera la curvatura de la bicapa lipídica y se estabiliza la vesícula. Así que se espera que para mayores tiempos de reposo se genere una mayor aglomeración de los fosfolípidos en la interfase, generando vesículas de mayor tamaño. Aunque algunos autores resaltan que cada sistema tiene su tiempo de formación, y que puede ir desde algunos minutos hasta días, así que se requeriría evaluar mayor cantidad de niveles para este factor, si se desea establecer un tiempo óptimo de formación de los liposomas.

Por otro lado, la polidispersidad del sistema se ve afectada significativamente no sólo por el tiempo de reposo, sino por la fuerza iónica del medio. Sin embargo, es importante destacar que los valores obtenidos se encuentran todos por debajo de 0,3; lo cual indica que el sistema preparado tiende a ser monodisperso. (Ver **Figura 10**)

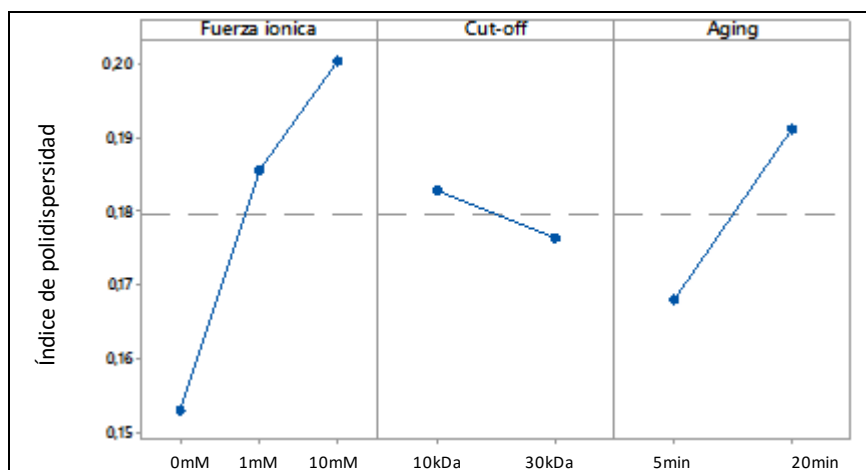


Figura 10. Gráfica factorial para el índice de polidispersidad.

Al analizar el efecto de los factores evaluados sobre la carga superficial de los liposomas preparados, se encuentra que éstos tienen un efecto más marcado, respecto a lo observado en los casos anteriores. Como se puede evidenciar en la Figura 11, los valores de potencial zeta más altos en su valor absoluto corresponden a los sistemas con una menor fuerza iónica en el medio acuoso y los separados con filtros de 30kDa.

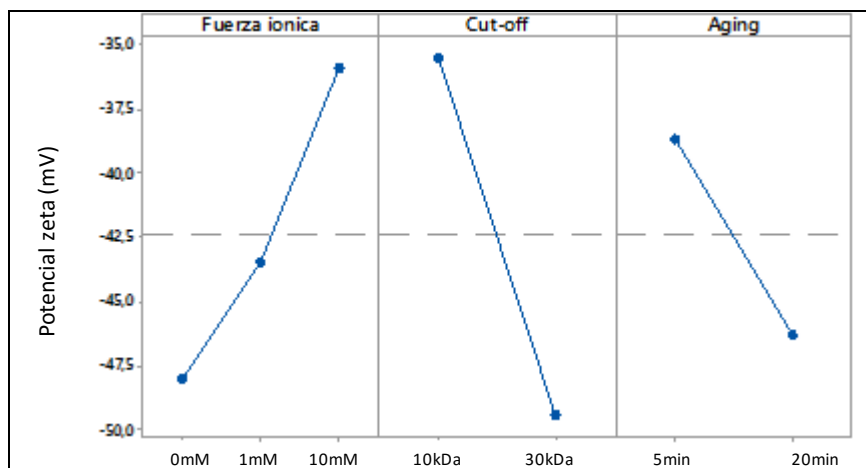


Figura 11. Gráfica factorial para el potencial zeta.

Esto se encuentra de acuerdo con las investigaciones de otros autores, donde teniendo presente la carga superficial negativa existente en la bicapa lipídica, se asume que la formación de una doble capa eléctrica alrededor de cada vesícula de liposoma. Así, el incremento en la concentración de electrolito en el medio acuoso aumentó la concentración de K^+ alrededor de la bicapa, resultando en una compresión de la capa eléctrica. Este efecto termina en una caída del potencial zeta para el sistema evaluado (83).

Considerando el efecto poco marcado del “Cut-off” sobre los otros parámetros, se tomó como criterio de selección el potencial zeta del sistema, por lo que para los ensayos con ampicilina trihidratada se emplearon tubos de ultrafiltración de 30kDa, para obtener sistemas con mayor carga superficial, ya que en la literatura suele relacionarse esta característica como un indicio de la estabilidad termodinámica del sistema coloidal estudiado. Resaltando que los sistemas que se encuentran entre los -11 a -20 mV tienen una mayor probabilidad de agregarse y flocularse (84). Y en general, que los sistemas con valores mayores a los -30mV (en su valor absoluto) son significativamente estables (85).

En relación a la selección de las condiciones para el medio acuoso, se consideró la tendencia a la degradación del principio activo en dicho medio, con lo cual se hace necesario la utilización de soluciones tamponadas, para conservar el medio a pH neutro y disminuir la cinética de degradación de la ampicilina en solución. Adicionalmente, se consideraron los resultados obtenidos por Sabín *et al.* (2006), quienes determinaron que la presencia de iones como el Na^+ y el K^+ adsorbidos en la superficie cargada de los liposomas, estabilizan el sistema al aportar una fuerza de hidratación, relacionada con el radio (Ver **Figura 12**) y la concentración de los iones adsorbidos, presentando una meseta estable en concentraciones cercanas a 10mM (86).

Finalmente, se seleccionó un tiempo de reposo de 5 minutos, con el objetivo de preparar vesículas de menor tamaño (140nm), las cuales estarían más cercanas a las empleadas en el sector farmacéutico de acuerdo con la Agencia de Alimentación y Fármacos (*FDA*, por sus siglas en inglés)(44).

Los resultados completos del análisis estadístico del modelo factorial, y las ecuaciones predictivas obtenidas se encuentran en el Anexo 1.

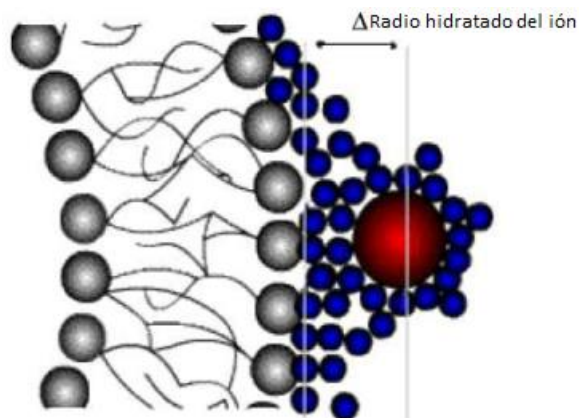


Figura 12. Fuerza deshidratación de iones adsorbidos en la superficie.

(Tomada de: Sabín, J. *et al.* (2006): Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces).

7.1.2. Caracterización de liposomas no recubiertos

Los sistemas obtenidos presentaron un tamaño promedio de $145,1 \pm 4,8$ nm, con una polidispersidad promedio de $0,209 \pm 0,01$. Indicando que los sistemas cargados con ampicilina siguen conservando la tendencia observada en las pruebas preliminares con los liposomas sin el principio activo, dando lugar a sistemas medianamente polidispersos, con tamaños entre los 124 nm y los 171 nm. Los valores de tamaño promedio, índice de polidispersidad y potencial zeta se reportan en la **Tabla 4**.

El software calcula el parámetro “z-average”, que usualmente es muy utilizado como el tamaño promedio de partícula en sistemas monoméricos u homogéneos (87). En este caso,

las distribuciones de tamaño que se observaron fueron muy amplias, tal y como muestra la

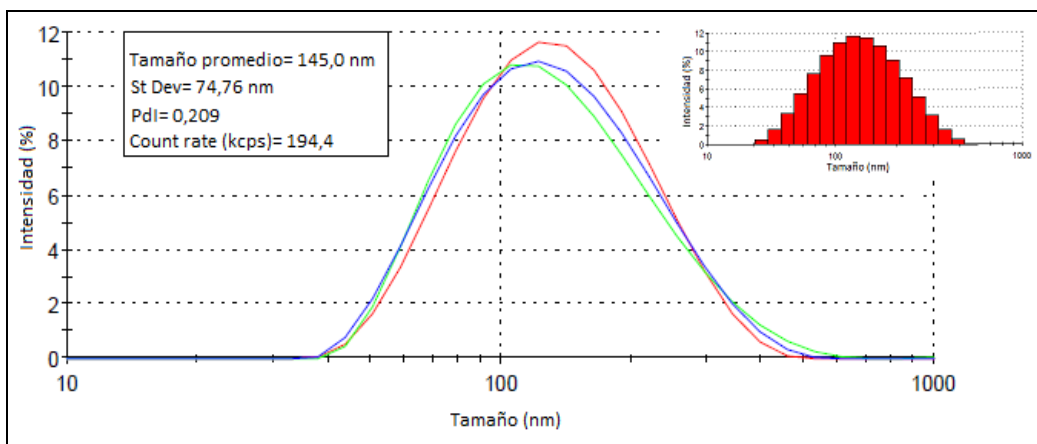


Figura 13, con anchos de distribución de hasta 80 nm. Por lo que el tamaño promedio que se tomó fue el correspondiente a la señal con mayor intensidad en la medición.

Tabla 4. Caracterización de liposomas no recubiertos.

Muestra	Tamaño promedio (nm)	Desviación estándar (nm)	PdI Promedio	Desviación estándar	Potencial z (mV)	Desviación estándar (mV)
1	148,1	3,0	0,215	0,013	-37,8	3,0
2	144,6	3,1	0,206	0,002	-38,3	1,5
3	145,5	0,5	0,213	0,003	-37,4	2,4
4	138,2	9,8	0,239	0,013	-32,3	0,3
5	124,4	11,6	0,234	0,012	-45,8	0,7
6	137,8	1,2	0,221	0,008	-45,1	3,6
7	139,1	5,0	0,195	0,015	-36,4	3,0
8	142,3	2,7	0,189	0,006	-38,2	1,6
9	143,6	4,7	0,201	0,004	-36,8	1,1
10	148,8	5,3	0,245	0,014	-41,4	5,9
11	171,1	8,0	0,189	0,008	-32,7	2,9
12	147,8	1,4	0,161	0,009	-36	2,2
13	165,0	7,3	0,238	0,012	-31	2,1
14	135,1	3,9	0,189	0,006	-30,2	0,5
15	145,5	4,4	0,207	0,013	-35,6	3,0

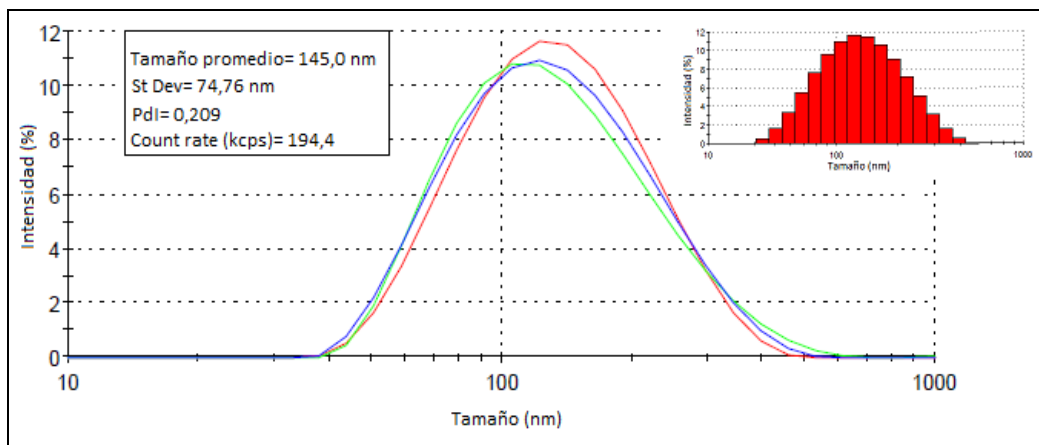


Figura 13. Distribución de tamaños por intensidad para muestra 1. La línea roja, azul y verde corresponden a las tres mediciones de tamaño que se realizaron para la muestra. Los valores mostrados en la tabla corresponden a la primera medición.

Se debe tener en cuenta que, el software hace un cálculo de la desviación estándar (“*St Dev*”) basado en el ancho de la distribución obtenida en el histograma de intensidades, donde el centro de la curva corresponde a la media. Este valor se relaciona con el índice de polidispersidad de la señal, de manera que éste se calcula a partir del promedio sobre la desviación estándar al cuadrado (88).

También se encontró que, aunque la distribución de tamaños por intensidad fue bastante simétrica, cuando se analizan las distribuciones por volumen y número de partículas, las curvas son menos simétricas, mostrando una mayor tendencia a la formación de vesículas de menor tamaño, tal y como se puede apreciar en las **Figura 14** y **15** para la primera medición de la muestra 1.

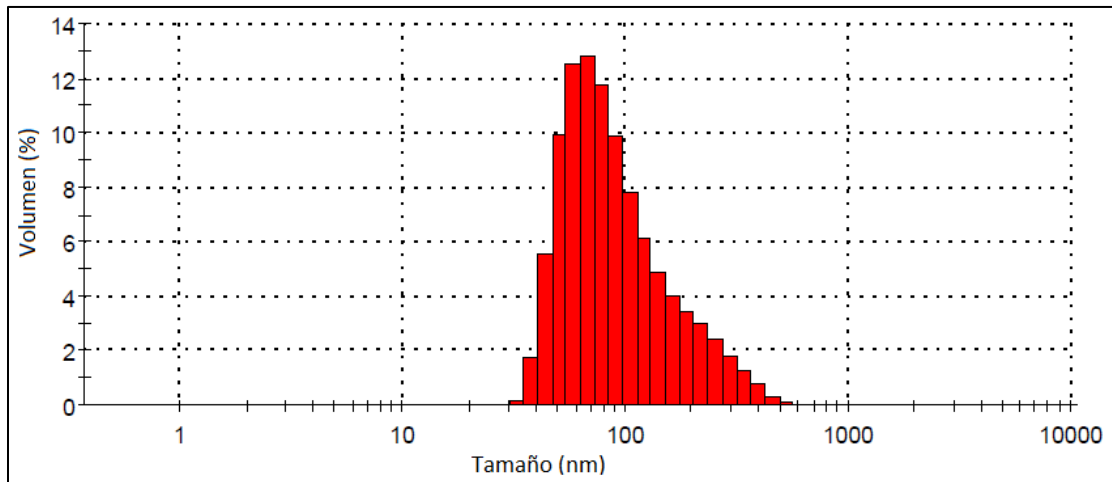


Figura 14. Distribución de tamaños por porcentaje de volumen.

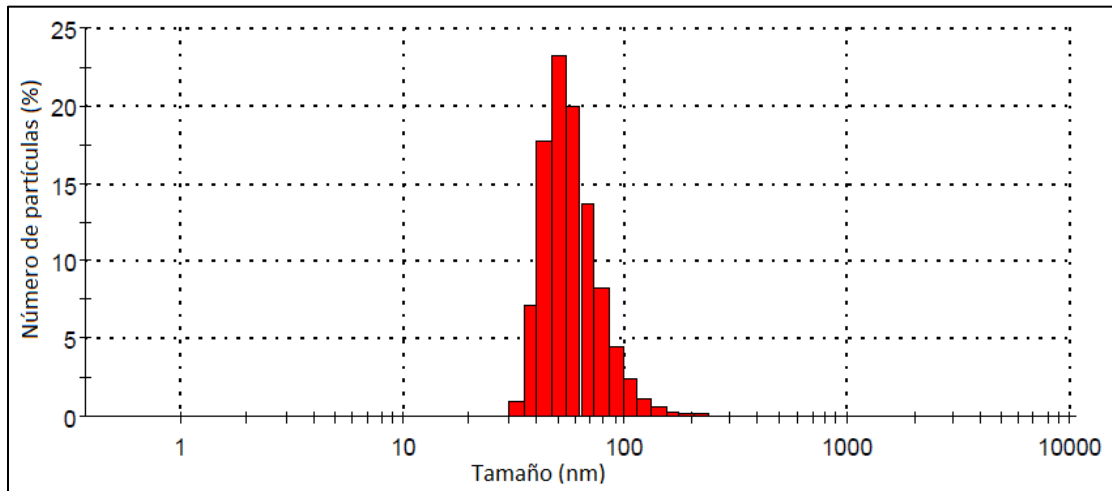


Figura 15. Distribución de tamaños por número de partículas.

Estos resultados muestran que la mayor cantidad de liposomas, tanto en volumen como en número, se encuentran por debajo de los 100 nm, a pesar de que las señales con mayor intensidad se encuentran cerca de los 145 nm. También, a partir de estas figuras de los histogramas de las distribuciones resulta más sencillo evidenciar la polidispersidad de la muestra, ya que existen más de 10 poblaciones de diferentes tamaños, lo que conlleva a índices de polidispersidad de 0,2.

Por otro lado, los valores de potencial zeta fueron de $-37,0 \pm 2,3$ mV, lo cual indica la presencia de cargas negativas en la superficie de los liposomas. Esto es un fenómeno común en los liposomas formado a partir de lecitina, cuyo componente principal es la fosfatidilcolina

que generan dicha polarización (89). En algunos casos se evidenciaron dos señales en la distribución del potencial zeta, uno cercano a los -36mV y otro cercano a los -24 mV, como se muestra la **Figura 16**. Esto puede deberse a las diferentes poblaciones de liposomas que se observaron en la distribución de tamaños, las cuales pueden estar cargadas superficialmente de diferente manera.

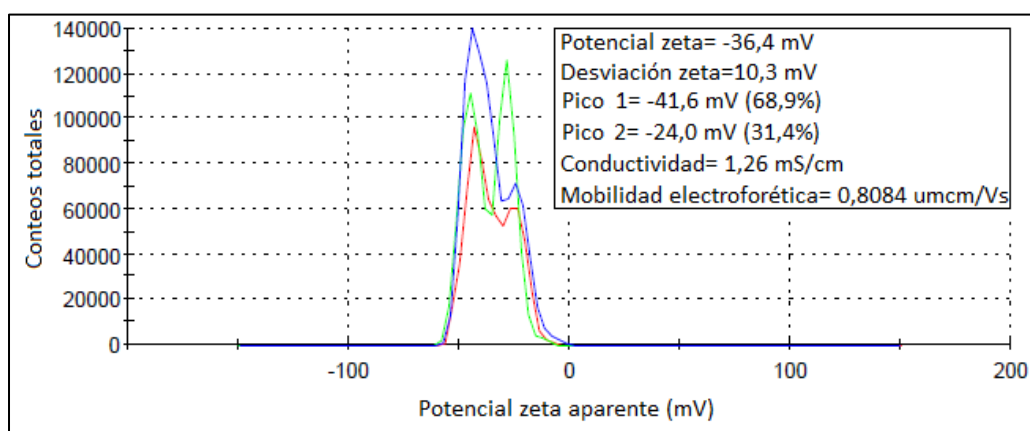


Figura 16. Mediciones de potencial zeta para muestra 1.

La línea roja, azul y verde corresponden a las tres mediciones de tamaño, en orden consecutivo, que se realizaron para la muestra. Los valores mostrados en la tabla corresponden a la primera medición.

7.1.3. Evaluación del efecto del pH sobre la carga superficial de los liposomas

Los resultados completos de la titulación del sistema liposomal no recubierto se muestran en el Anexo 3. Se pudo observar que la adición de HCl al medio disminuye el valor absoluto del potencial zeta (Ver **Figura 17**), esto demuestra lo planteado previamente por Kotynska y Figaszewski (2005) con liposomas formados por fosfatidilcolina, para los cuales se encontró que en medio ácido los iones H^+ tienden a cubrir los grupos PO_4^{-3} de la fosfatidilcolina, dejando así los grupos $-N^+(CH_3)_3$ descubiertos, lo que indica una adsorción de iones cloruro (90).

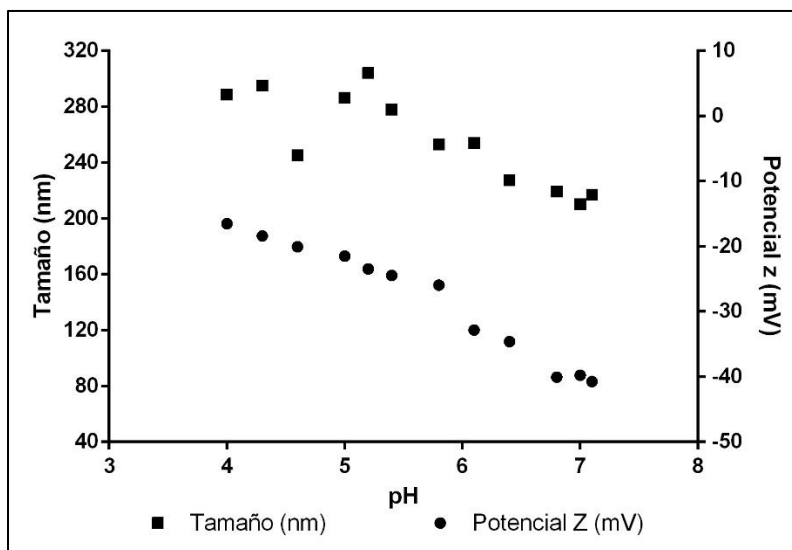


Figura 17. Carga superficial y tamaño de los liposomas en función del pH.

Aunque los valores medidos del tamaño promedio no se encuentran dentro del intervalo estimado, se tomaron como un indicativo de poca susceptibilidad a la agregación de partículas, ya que los tamaños se mantuvieron en el mismo rango durante todo el proceso de titulación, como puede observarse en la **Figura 17**.

Se determinó que la superficie de los liposomas sigue cargada negativamente, aún a condiciones muy alejadas del pH neutro de preparación inicial, por lo que se consideró que el sistema era apto para el recubrimiento polimérico por el método *Layer-by-Layer*.

7.1.4. Cuantificación de ampicilina encapsulada

Se obtuvo una eficiencia de encapsulación promedio del $70,38 \pm 4,17\%$, correspondiente a una concentración de $844 \mu\text{g/mL}$, con un coeficiente de variación significativamente bajo (del 6%), lo que comúnmente se asocia a datos homogéneos y con un error bajo de muestreo (91).

Tabla 5. Eficiencia de encapsulación de ampicilina trihidratada.

Muestra*	% Eficiencia de encapsulación	Concentración de ampicilina encapsulada ($\mu\text{g/mL}$)
NCL 1	73,688	884,3

NCL 2	70,170	842,0
NCL 3	64,678	776,1
NCL 4	69,579	834,9
NCL 5	69,948	839,4
NCL 6	70,002	840,0
LRE 1	71,219	854,6
LRE 2	62,576	750,9
LRE 3	64,883	778,6
LRE 4	68,089	817,1
LRE 5	73,773	885,3
LRE 6	78,525	942,3
LRE 7	73,911	886,9
LRE 8	70,857	850,3
LRE 9	73,773	885,3

*NCL: Liposomas no recubiertos

LRE 1, 2 y 3: Liposomas recubiertos con Eudragit E-100 al 0,3% (w/v)

LRE 4, 5 y 6: Liposomas recubiertos con Eudragit E-100 al 0,5% (w/v)

LRE 7, 8 y 9: Liposomas recubiertos con Eudragit E-100 al 0,7% (w/v)

Los resultados obtenidos para la eficiencia de encapsulación son significativamente altos, y muy similares a los hallados por Schumacher y Margalit (1996), quienes encapsularon ampicilina en liposomas de lecitina de soya con una eficiencia mayor al 50%. Mientras que Menikarachchi *et al.* (2016), encapsularon amoxicilina en liposomas formados por lecitina de huevo y colesterol mediante la evaporación de solvente, donde obtuvieron una eficiencia promedio de 52%. Sin embargo, no es posible determinar el desempeño exitoso de una formulación a partir de este parámetro, ya que existen casos en los que a pesar que la eficiencia de encapsulación es mucho menor, como en el ensayo con clorhidrato de vancomicina que realizaron Yang *et al.* (20015), con un valor del 32%, el desempeño farmacocinético de la formulación superó la expectativas en cuando a la efectividad terapéutica y la liberación modificada del fármaco (8).

7.1.5. Caracterización del sistema polimérico de funcionalización

Se observó que las soluciones de Eudragit® E-100 solubilizaron completamente a pH cercano a 4, aunque teóricamente a pH 5 empiezan a solubilizar (19). En general no se

observó un cambio significativo en la viscosidad de las soluciones, en especial por debajo de una concentración del 1% (w/v), ya que, por encima de este valor, tanto el valor promedio como la desviación estándar de los datos aumenta (Ver **Figura 18**), por lo que se asumió que presentaban agregados poliméricos que no fueron retenidos por el filtro de nylon, y que causan cambios abruptos en el diferencial de presión que mide el equipo. Sin embargo, la presencia de éstos agregados no limitaría el proceso de recubrimiento de los liposomas, por lo que estas concentraciones no fueron consideradas en la selección de los niveles a evaluar en la preparación de los liposomas funcionalizados. Los valores registrados para las variables evaluadas en cada muestra de Eudragit E-100 se reportan en la

Tabla 6. Al igual que la viscosidad, la conductividad de las muestras tuvo un comportamiento relativamente estable por debajo de la concentración del 1% (w/v).

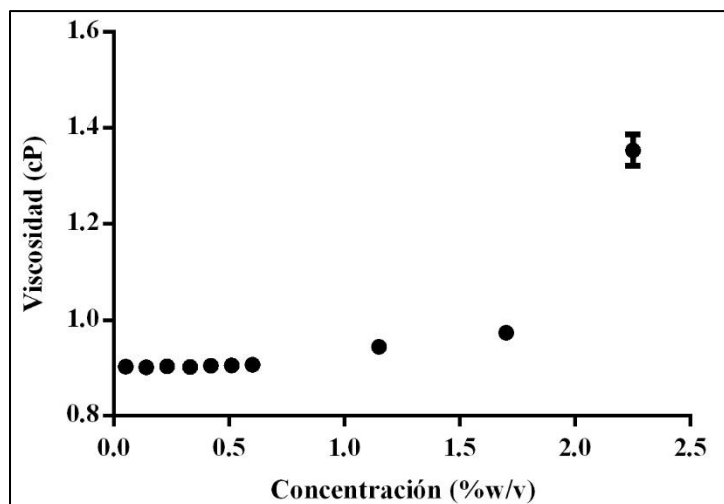


Figura 18. Viscosidad de soluciones de Eudragit E-100 en función de la concentración.

Tabla 6. Caracterización soluciones de Eudragit E-100.

Concentración (%w/v)	Viscosidad promedio (mPa.s)	St dv (mPa.s)	pH inicial	Conductividad (µS/cm)

0,05	0,903	0,0036	5,85	35,8
0,14	0,902	0,0012	5,60	24,0
0,23	0,904	0,0022	5,38	36,5
0,33	0,903	0,0017	5,19	36,1
0,42	0,905	0,0010	4,70	36,7
0,51	0,906	0,0021	4,51	38,1
0,60	0,907	0,0012	4,54	41,7
1,15	0,944	0,0116	4,19	51,3
1,70	0,974	0,0140	4,12	81,0
2,25	1,354	0,0267	4,08	98,5

Las mediciones de potencial zeta mostraron la formación de una superficie con carga positiva en las cadenas poliméricas (Ver **Tabla 7**), tal y como se esperaba de acuerdo a la estructura química de las mismas. El potencial zeta de las soluciones estuvo entre 30 mV y 67 mV, sin embargo, no se encontró una tendencia asociada al incremento de la concentración de polímero.

Tabla 7. Potencial zeta de soluciones de Eudragit E-100.

Concentración (%w/v)	Potencial zeta promedio (mV)	Desv. Estándar (mV)
0,05	62,4	7,8
0,14	52,2	1,4
0,19	43,8	3,1
0,25	45,9	1,5
0,32	46,0	3,7
0,39	47,1	3,1
0,46	53,0	2,7
0,53	48,8	2,2
0,59	39,4	1,6
0,66	70,7	0,8
0,73	57,4	0,6
0,80	51,2	3,7
0,86	44,5	0,8
0,93	46,9	0,7
1,00	57,5	2,9

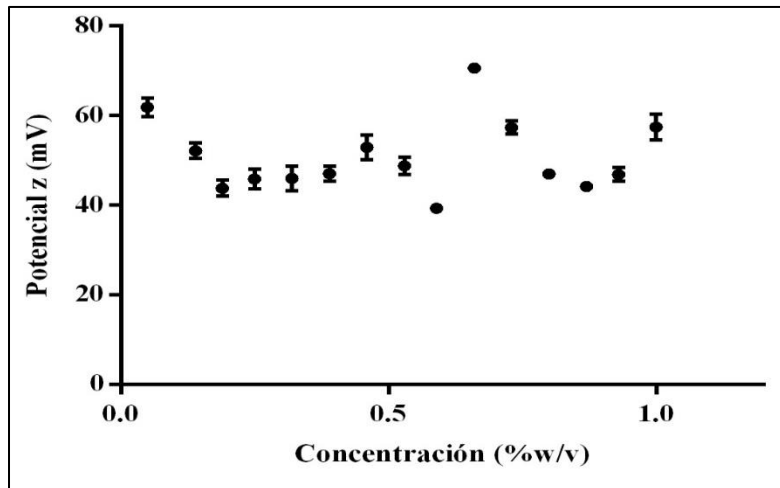


Figura 19. Potencial zeta de las muestras de Eudragit en función de la concentración.

De acuerdo con lo anterior, se eligieron tres niveles de concentración de polímero a evaluar en la funcionalización de los liposomas preparados; 0,3%, 0,5% y 0,7% (w/v).

7.1.6. Funcionalización de los liposomas

Se observó un cambio marcado en el tamaño y el potencial zeta de los liposomas preparados al someterlos al proceso de funcionalización con Eudragit® E-100. Los tamaños promedio, antes de un valor de $145,1 \pm 4,8$ nm, pasaron a estar en valores de $219,9 \pm 10,3$ nm, con una distribución de tamaños más heterogénea ($PdI = 0,447 \pm 0,041$).

Se determinó la eficiencia en el proceso de funcionalización mediante la medición del cambio en el diámetro de las vesículas, valor correspondiente al espesor de la capa polimérica depositada en la superficie. Se evidenció que el espesor de la capa polimérica formada aumenta con la concentración de polímero. Así, para los sistemas preparados con una concentración de Eudragit E-100 de 0,7% (w/v) se tuvo un aumento promedio en el tamaño de partícula de 91 nm, mientras que en los sistemas en los que se utilizó el polímero al 0,3%, los cambios en el tamaño fueron de 44 nm (Ver **Figura 20** y **Figura 22**). Estos resultados fueron contrastados con los obtenidos por Hasanovic *et al.* (2010), quienes encontraron la misma tendencia en el proceso de estabilización de liposomas de minoxidil y aciclovir empleando Eudragit EPO (21).

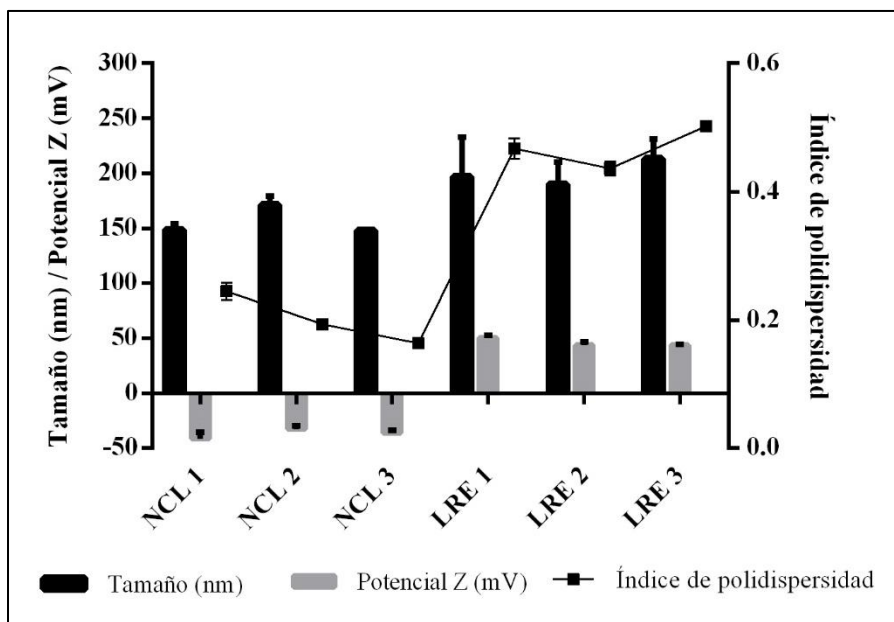


Figura 20. Cambios observados en la funcionalización con Eudragit E al 0,3% (w/v).
NCL: Liposomas no recubiertos. LRE: Liposomas recubiertos con Eudragit E-100

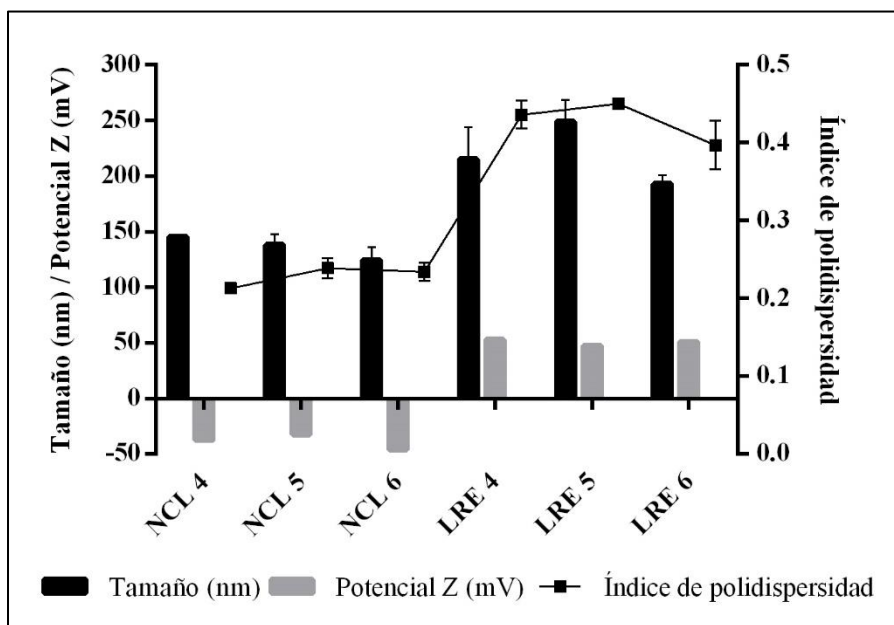


Figura 21. Cambios observados en la funcionalización con Eudragit E al 0,5% (w/v).
NCL: Liposomas no recubiertos. LRE: Liposomas recubiertos con Eudragit E-100

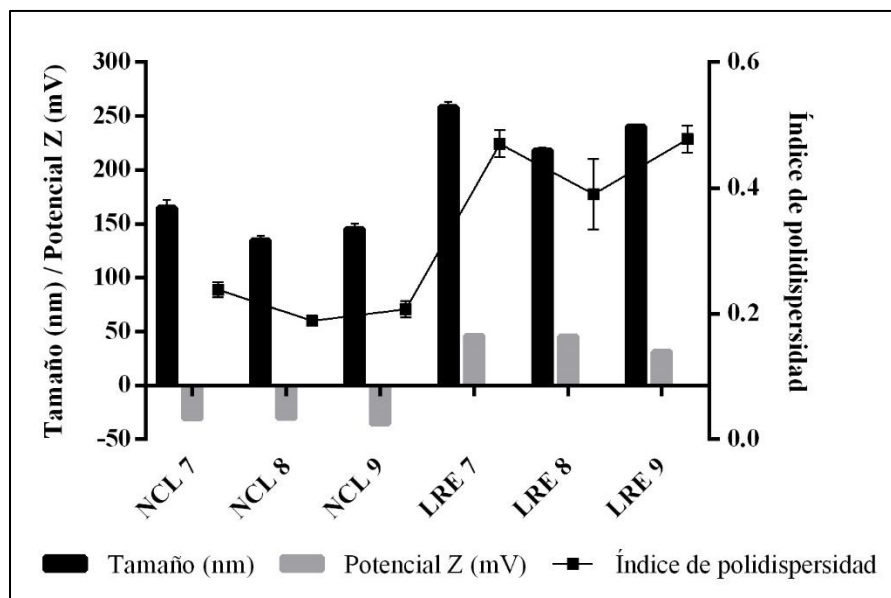


Figura 22. Cambios observados en la funcionalización con Eudragit E al 0,7% (w/v). NCL: Liposomas no recubiertos. LRE: Liposomas recubiertos con Eudragit E-100

Se observó un aumento marcado de la polidispersidad del sistema para todas las concentraciones de Eudragit evaluadas, que puede ser favorecido por la heterogeneidad de las poblaciones de liposomas sin recubrir, una característica muy común en los liposomas obtenidos por inyección de etanol (77).

Igualmente se evidenció un cambio drástico en la carga superficial de las partículas, como se esperaba, lo que implicaría la interacción química por medio de puentes de hidrógeno entre el polímero y las cabezas de los fosfolípidos en la superficie de las vesículas (21,92). Así se obtuvo un potencial zeta promedio de los liposomas recubiertos por Eudragit-E (LRE) de $45,9 \pm 2,0$ mV, los valores registrados de potencial zeta estuvieron en el mismo rango, independientemente de la concentración de polímero.

Algunos autores resaltan que la interacción entre los liposomas y el polímero que los recubre estabiliza termodinámicamente el sistema, previniendo la agregación de las vesículas en suspensión y la separación de fases (21,82). Sin embargo, este efecto no se comprobó durante este estudio.

8. CONCLUSIONES

- Se logró preparar sistemas liposomales convencionales para la encapsulación de ampicilina trihidratada, a través de la técnica de inyección de etanol. Empleando lecitina de soya, colesterol y dioleoilfosfatodiletanolamina (DOPE). Y, encontrando las condiciones adecuadas de proceso para obtener vesículas de un tamaño cercano a los 140 nm y cargadas negativamente en su superficie.
- Se caracterizaron las suspensiones de liposomas preparadas (Tamaño y potencial zeta), utilizando técnicas de dispersión de luz dinámica (DLS). Encontrando que el tamaño de los liposomas vacíos y cargados son muy similares, algo que han reportado algunos autores (77) es bastante común para el método de inyección de etanol.
- Se determinó la eficiencia de encapsulación de ampicilina trihidratada en los sistemas evaluados, con un valor promedio del 70%, correspondiente a una concentración de 844 µg/mL del API, mediante un método que anteriormente ya ha demostrado su reproducibilidad y confiabilidad (93).
- Se modificaron superficialmente los sistemas liposomales preparados mediante el uso del polímero mucoadherente (Eudragit E-100), utilizando los fundamentos de la técnica de deposición electrostática *layer-by-layer*. Comprobando la formación de una película polimérica con un espesor dependiente de la concentración de polímero en solución.
- Se espera que los liposomas preparados puedan servir para investigaciones futuras, que permitan verificar el desempeño del sistema recubierto por Eudragit E-100, en la vehiculización target específica del ingrediente activo. Lo cual es altamente probable, si se tienen en cuenta los antecedentes de este estudio en la literatura (2,5,37,94).

9. RECOMENDACIONES

- Verificar los resultados obtenidos en este estudio mediante técnicas que permitan visualizar la morfología de las vesículas preparadas, como microscopía de transmisión electrónica (TEM).
- Evaluar las interacciones entre el fármaco y la bicapa lipídica de los liposomas preparados, ya que esto puede afectar significativamente la estabilidad del ingrediente activo y la cinética de liberación del mismo. Estas interacciones pueden ser estudiadas mediante técnicas instrumentales como espectrometría infrarroja por Transformadas de Fourier (FITR) o la calorimetría diferencial de barrido (DSC) (21).
- Verificar el efecto estabilizante del polímero Eudragit E-100, lo cual puede hacerse mediante el seguimiento del potencial zeta en función de los días de almacenamiento de la suspensión.
- Realizar la evaluación in-vivo, para comprobar el efecto mucoadherente del polímero Eudragit E-100 en los sistemas preparados, y si estos pueden superar la barrera de los mecanismos de resistencia antimicrobiana de algunas cepas betalactamasa positivas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Brooks BD, Brooks AE. Therapeutic strategies to combat antibiotic resistance. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2014;78:14–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2014.10.027>
2. Pinto-Alphandary H, Andremont A, Couvreur P. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: Research and applications. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;13(3):155–68.
3. Gregoriadis G. Liposome technology, Vol II Entrapment of drugs and other materials into liposomes [Internet]. Third edit. Vol. I. Informa Healthcare USA Inc.; 1984. Available from: <http://www.crcnetbase.com.ezlibproxy1.ntu.edu.sg/isbn/978-0-8493-8828-6>
4. Marianecchi C, Petralito S, Rinaldi F, Hanieh PN, Carafa M. Some recent advances on liposomal and niosomal vesicular carriers. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2016;32:256–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2015.10.008>
5. Drulis-Kawa Z, Dorotkiewicz-Jach A. Liposomes as delivery systems for antibiotics. *Int J Pharm* [Internet]. 2010;387(1–2):187–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.11.033>
6. Bangale GS, Rajesh KS, Shinde GV. Stealth Liposomes: A Novel Approach of Targeted Drug Delivery In Cancer Therapy. *Int J Pharma Sci Res*. 2014;5(11):750–9.
7. Ciobanu M, Heurtault B, Schultz P, Ruhlmann C, Muller CD, Frisch B. Layersome: Development and optimization of stable liposomes as drug delivery system. *Int J Pharm*. 2007;344(1–2):154–7.
8. Yang Z, Liu J, Gao J, Chen S, Huang G. Chitosan coated vancomycin hydrochloride liposomes: Characterizations and evaluation. *Int J Pharm*. 2015;495(1):508–15.
9. Menikarachchi MASK, Katuwavila KANP, Ekanayake EWMA, Thevanesam V, Karunaratne V, Karunaratne DN. Release behaviour of amoxicillin from chitosan coated liposomes derived from eggs. *J Natl Sci Found Sri Lanka*. 2016;44(2):167–73.
10. Fattal E, Rojas J, Youssef M, Couvreur P, Andremont A. Liposome-Entrapped Ampicillin in the Treatment of Experimental Murine Listeriosis and Salmonellosis. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1991 [cited 2017 May 17];770–2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC245097/pdf/aac00049-0192.pdf>
11. Bakker-Woudenberg IA, Lokerse AF, Vink-van den Berg JC, Roerdink FH, Michel MF. Effect of liposome-entrapped ampicillin on survival of *Listeria monocytogenes* in murine peritoneal macrophages. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1986 Aug [cited 2017 May 18];30(2):295–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3094440>
12. Haeri A, Alinaghian B, Daeihamed M, Dadashzadeh S. Preparation and characterization of stable nanoliposomal formulation of fluoxetine as a potential adjuvant therapy for drug-resistant tumors. *Iran J Pharm Res*. 2014;13(Suppl):3–14.

13. Urushibara T, Hicks R. Effect of Liposome Surface Charge and Peptide Side Chain Charge Density on Antimicrobial Peptide-Membrane Binding as Determined by Circular Dichroism. *J Membr Sci Technol*. 2013;3(3).
14. Schumacher I, Margalit R. Liposome-encapsulated ampicillin: Physicochemical and antibacterial properties. *J Pharm Sci*. 1997;86(5):635–41.
15. Rukavina Z, Vanić Ž. Current Trends in Development of Liposomes for Targeting Bacterial Biofilms. *Pharmaceutics*. 2016;8(18):1–26.
16. Eloy JO, Claro de Souza M, Petrilli R, Barcellos JPA, Lee RJ, Marchetti JM. Liposomes as carriers of hydrophilic small molecule drugs: Strategies to enhance encapsulation and delivery. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2014;123:345–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.09.029>
17. Dong D, Thomas N, Thierry B, Vreugde S, Prestidge CA, Wormald P-J. Distribution and Inhibition of Liposomes on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm. *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2017 May 18];10(6):e0131806. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26125555>
18. Kohno S, Tomono K, Maesaki S. Drug Delivery Systems for Infection: Liposome-Incorporating Antimicrobial Drugs. *J Infect Chemother* [Internet]. 1998;4(4):159–73. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1341321X98713844>
19. Patra CN, Priya R, Swain S, Kumar Jena G, Panigrahi KC, Ghose D. Pharmaceutical significance of Eudragit: A review. *Futur J Pharm Sci* [Internet]. 2017;3(1):33–45. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2314724516301273>
20. Alasino R V., Leonhard V, Bianco ID, Beltramo DM. Eudragit E100 surface activity and lipid interactions. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2012;91(1):84–9.
21. Hasanovic A, Hollick C, Fischinger K, Valenta C. Improvement in physicochemical parameters of DPPC liposomes and increase in skin permeation of aciclovir and minoxidil by the addition of cationic polymers. *Eur J Pharm Biopharm* [Internet]. 2010;75(2):148–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.03.014>
22. World Health Organization. Antimicrobial resistance. Global Report on Surveillance. Geneva, Switzerland; 2014.
23. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2010 Sep;74(3):417–33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805405>
24. Roberts RR, Hota B, Ahmad I, Scott II RD, Foster SD, Abbasi F, et al. Hospital and Societal Costs of Antimicrobial-Resistant Infections in a Chicago Teaching Hospital: Implications for Antibiotic Stewardship. *Clin Infect Dis* [Internet]. 2009;49(8):1175–84. Available from: <https://academic.oup.com/cid/article-lookup/doi/10.1086/605630>
25. McKenna M. Millions Injected Into Push for New Antibiotics [Internet]. *National geographic*. 2016 [cited 2017 May 18]. Available from: <http://news.nationalgeographic.com/2016/07/funding-new-antibiotic-development->

to-fight-resistance/

26. Bergers JJ, ten Hagen TL, van Etten EW, Bakker-Woudenberg IA. Liposomes as delivery systems in the prevention and treatment of infectious diseases. *Pharm World Sci* [Internet]. 1995 Jan 27 [cited 2017 May 18];17(1):1–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7719272>
27. Schiffelers R, Storm G, Bakker-Woudenberg I. Liposome-encapsulated aminoglycosides in pre-clinical and clinical studies. *J Antimicrob Chemother* [Internet]. 2001 Sep [cited 2017 May 18];48(3):333–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11532996>
28. Barajas S. Evaluación del efecto antimicrobiano producido por el polímero anfífilico PAM -18 Na asociado a ampicilina en cepas de *Staphylococcus aureus*. Trabajo de grado para optar al título de químico farmacéutico. Facultad de ciencias Naturales. Universidad Icesi; 2014.
29. Peng S, Zou L, Liu W, Li Z, Liu W, Hu X, et al. Hybrid liposomes composed of amphiphilic chitosan and phospholipid: Preparation, stability and bioavailability as a carrier for curcumin. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2017;156:322–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.09.060>
30. Alavi S, Haeri A, Dadashzadeh S. Utilization of chitosan-caged liposomes to push the boundaries of therapeutic delivery. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2017;157:991–1012. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.10.063>
31. Della Giovampaola C, Capone A, Ermini L, Lupetti P, Vannuccini E, Finetti F, et al. Formulation of liposomes functionalized with Lotus lectin and effective in targeting highly proliferative cells. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* [Internet]. 2017 [cited 2017 May 17];1861(4):860–70. Available from: <http://nebulosa.icesi.edu.co:2621/science/article/pii/S0304416517300156>
32. Briones E, Isabel Colino C, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *J Control Release*. 2008;125(3):210–27.
33. Smith AW. Biofilms and antibiotic therapy: Is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(10):1539–50.
34. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2009 Feb [cited 2017 May 19];27(2):116–29. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X08000323>
35. Van Boeckel TP, Gandra S, Ashok A, Caudron Q, Grenfell BT, Levin SA, et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 2014;14(8):742–50. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)
36. Morejón García M, W Florey FH. Betalactamasas de espectro extendido. Hospital Universitario “Manuel Fajardo” [Internet]. [cited 2017 May 16]; Available from: <http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/apua-cuba/b1->

betalactamasas_de_espectro_extendido.pdf

37. Kim HJ, Michael Gias EL, Jones MN. The adsorption of cationic liposomes to *Staphylococcus aureus* biofilms. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 1999;149(1–3):561–70.
38. Kim H, Jones MN. The Delivery of Benzyl Penicillin to *Staphylococcus aureus* Biofilms by Use of Liposomes. *J Liposome Res* [Internet]. 2004 Jan 29 [cited 2017 May 18];14(3–4):123–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15676122>
39. Huang C-M, Chen C-H, Pornpattananankul D, Zhang L, Chan M, Hsieh M-F, et al. Eradication of drug resistant *Staphylococcus aureus* by liposomal oleic acids. *Biomaterials* [Internet]. 2011 Jan [cited 2017 May 18];32(1):214–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20880576>
40. Lambert PA. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2005 [cited 2017 May 19];57(10):1471–85. Available from: <http://nebulosa.icesi.edu.co:2621/science/article/pii/S0169409X05000992>
41. González C. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. *Kasmera* [Internet]. 2010;38(1):18–35. Available from: http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0075-52222010000100003
42. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NCJ. β -Lactam antibiotic resistance: A current structural perspective. *Curr Opin Microbiol*. 2005;8(5):525–33.
43. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N, Hanifehpour Y, et al. Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett*. 2013;8(1):102.
44. Felice B, Prabhakaran MP, Rodríguez AP, Ramakrishna S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Mater Sci Eng C* [Internet]. 2014 [cited 2017 May 22];41:178–95. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493114002410>
45. Hua S. Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. *Front Pharmacol* [Internet]. 2015 [cited 2017 May 15];6:219. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26483690>
46. Fan Y, Zhang Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2013;8(2):79–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2013.07.010>
47. Fan Y, Zhang Q. Development of liposomal formulations: From concept to clinical investigations. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2013 [cited 2017 May 19];8(2):81–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1818087613000111>
48. Gulati M, Grover M, Singh S, Singh M. Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int J Pharm*. 1998;165(2):129–68.

49. Mitchell SM, Ullman JL, Teel AL, Watts RJ. PH and temperature effects on the hydrolysis of three β -lactam antibiotics: Ampicillin, cefalotin and cefoxitin. *Sci Total Environ* [Internet]. 2014;466–467:547–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.06.027>
50. Schumacher I, Margalit R. Liposome-Encapsulated Ampicillin: Physicochemical and Antibacterial Properties. *J Pharm Sci*. 1997;86(5):635–41.
51. Düzgüneş N, Gregoriadis G. Introduction: The origins of liposomes: Alec Bangham at Babraham. *Methods Enzymol*. 2005;391(SPEC. ISS.):1–3.
52. Karewicz A, Bielska D, Loboda A, Gzyl-Malcher B, Bednar J, Jozkowicz A, et al. Curcumin-containing liposomes stabilized by thin layers of chitosan derivatives. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* [Internet]. 2013;109:307–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.03.059>
53. J.S. Dua, Prof. A. C. Rana D a. KB. Liposome: Methods of preparation and applications. *Int J Pharm*. 2012;III(II):7.
54. Andr J, Arias S. Diseño y caracterización de un sistema liposomal para la administración transdérmica de un péptido sintético con fines cosméticos. Universidad Nacional de Colombia; 2015.
55. Yadav A V., Murthy MS, Shete AS, Sakhare S. Stability aspects of liposomes. *Indian J Pharm Educ Res*. 2011;45(4):402–13.
56. Sabín Fernández JD. Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas. 2007;299. Available from: <http://www.tesisenred.net/handle/10803/36382>
57. Balazs DA, Godbey W. Liposomes for Use in Gene Delivery. *J Drug Deliv* [Internet]. 2011;2011:1–12. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdd/2011/326497/>
58. Pasut G, Paolino D, Celia C, Mero A, Joseph AS, Wolfram J, et al. Polyethylene glycol (PEG)-dendron phospholipids as innovative constructs for the preparation of super stealth liposomes for anticancer therapy. *J Control Release*. 2015;199:106–13.
59. Mori A, Klibanov AL, Torchilin VP, Huang L. Influence of the steric barrier activity of amphipathic poly(ethylene glycol) and ganglioside GM1 on the circulation time of liposomes and on the target binding of immunoliposomes in vivo. *FEBS Lett*. 1991;284(2):263–6.
60. Maruyama K, Takizawa T, Yuda T, Kennel SJ, Huang L, Iwatsuru M. Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol) s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. *BBA - Biomembr*. 1995;1234(1):74–80.
61. Klibanov AL, Maruyama K, Beckerleg AM, Torchilin VP, Huang L. Activity of amphipathic poly(ethylene glycol) 5000 to prolong the circulation time of liposomes depends on the liposome size and is unfavorable for immunoliposome binding to target. *Biochim Biophys Acta - Biomembr* [Internet]. 1991 Feb [cited 2017 May 22];1062(2):142–8. Available from:

<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000527369190385L>

62. Nag OK, Awasthi V. Surface engineering of liposomes for stealth behavior. *Pharmaceutics*. 2013;5(4):542–69.
63. Amoozgar Z, Park J, Lin Q, Yeo Y. Low molecular-weight chitosan as a pH-sensitive stealth coating for tumor-specific drug delivery. *Mol Pharm*. 2012;9(5):1262–70.
64. De Villiers MM, Otto DP, Strydom SJ, Lvov YM. Introduction to nanocoatings produced by layer-by-layer (LbL) self-assembly. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2011;63(9):701–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.05.011>
65. Chen MX, Li BK, Yin DK, Liang J, Li SS, Peng DY. Layer-by-layer assembly of chitosan stabilized multilayered liposomes for paclitaxel delivery. *Carbohydr Polym*. 2014;111:298–304.
66. Chun JY, Choi MJ, Min SG, Weiss J. Formation and stability of multiple-layered liposomes by layer-by-layer electrostatic deposition of biopolymers. *Food Hydrocoll*. 2013;30(1):249–57.
67. Madrigal-Carballo S, Lim S, Rodriguez G, Vila AO, Krueger CG, Gunasekaran S, et al. Biopolymer coating of soybean lecithin liposomes via layer-by-layer self-assembly as novel delivery system for ellagic acid. *J Funct Foods*. 2010;2(2):99–106.
68. Yan Y, Such GK, Johnston APR, Lomas H, Caruso F. Toward therapeutic delivery with layer-by-layer engineered particles. *ACS Nano*. 2011;5(6):4252–7.
69. Gibis M, Zeeb B, Weiss J. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2014;38:28–39. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.11.014>
70. Kashcooli Y, Park K, Bose A, Greenfield M, Bothun GD. Patchy Layersomes Formed by Layer-by-Layer Coating of Liposomes with Strong Biopolyelectrolytes. *Biomacromolecules*. 2016;17(11):3838–44.
71. Expósito Harris R. Quitosano, un biopolímero con aplicaciones en sistemas de liberación controlada de fármacos [Internet]. Universidad Complutense de Madrid; 2010. Available from: <http://revistas.um.es/index.php/medievalismo/article/view/52081>
72. Jennings JA, Bumgardner JD. Chitosan Based Biomaterials. Volume 2, Tissue engineering and therapeutics.
73. Vural I, Sarisozen C, Olmez SS. Chitosan coated furosemide liposomes for improved bioavailability. *J Biomed Nanotechnol* [Internet]. 2011 Jun [cited 2017 Jun 8];7(3):426–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21830483>
74. Suriaprabha K, Pichandy M, Vanchasatya V. Effect of carbopol gel in stable liposomes and their enhanced antipyretic effect. *Asian J Pharm* [Internet]. 2009 [cited 2017 Oct 18];July-September. Available from: <http://asiapharmaceutics.info/index.php/ajp/article/viewFile/287/134>
75. Sangeetha SS, Karki R. Formulation and evaluation of liposomes in carbopol gels for

- mixed vaginal infections. *Der Pharm Lett.* 2015;7(5):291–9.
76. Refai H, Hassan D, Abdelmonem R. Development and characterization of polymer-coated liposomes for vaginal delivery of sildenafil citrate. *Drug Deliv.* 2017;24(1):278–88.
 77. Karn PR, Vanić Z, Pepić I, Skalko-Basnet N. Mucoadhesive liposomal delivery systems: the choice of coating material. *Drug Dev Ind Pharm* [Internet]. 2011;37(4):482–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20961263>
 78. Barea MJ, Jenkins MJ, Gaber MH, Bridson RH. Evaluation of liposomes coated with a pH responsive polymer. *Int J Pharm* [Internet]. 2010;402(1–2):89–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.09.028>
 79. Ukawa M, Akita H, Hayashi Y, Ishiba R, Tange K, Arai M, et al. Neutralized nanoparticle composed of SS-cleavable and pH-activated lipid-like material as a long-lasting and liver-specific gene delivery system. *Adv Healthc Mater.* 2014;3(8):1222–9.
 80. Shaw R. Achieving reliable nano particle sizing. In: *Dynamic Light Scattering Training* [Internet]. [cited 2017 Oct 5]. Available from: <http://149.171.168.221/partcat/wp-content/uploads/Malvern-Zetasizer-LS.pdf>
 81. Rheosense. Microvisc TM- How it works [Internet]. Official web page. [cited 2017 Oct 5]. Available from: <http://www.rheosense.com/products/viscometers/microvisc/how-it-works>
 82. Aldea MR. *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas.* Universidad Complutense de Madrid; 2013.
 83. Carrión FJ, De la Maza A, Parra JL. La influencia de la fuerza iónica y la carga de la bicapa lipídica en la estabilidad de liposomas. *J Colloid Interface Sci.* 1994;164:78–87.
 84. Lu GW, Gao P. Emulsions and Microemulsions for Topical and Transdermal Drug Delivery. In: *Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems* [Internet]. Elsevier; 2010 [cited 2017 Oct 25]. p. 59–94. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780815520252100034>
 85. Sharma S, Shukla P, Misra A, Mishra PR. Interfacial and colloidal properties of emulsified systems. In: *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2017 Oct 25]. p. 149–72. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444626141000089>
 86. Sabín J, Prieto G, Ruso JM, Hidalgo-Álvarez R, Sarmiento F. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. *Eur Phys J E.* 2006;20(4):401–8.
 87. Malm A. How standard deviation is calculated by DLS software? [Internet]. Malvern Instruments. [cited 2017 Oct 5]. Available from: https://www.researchgate.net/post/How_standard_deviation_is_calculated_by_DLS_software

88. Malvern Instruments. Can one calculate a PDI value for an individual peak in DLS? [Internet]. Materials talks. [cited 2017 Oct 5]. Available from: <http://www.materials-talks.com/blog/2015/03/31/pdi-from-an-individual-peak-in-dls/>
89. Yandrapati RK. Effect of lipid composition on the physical properties of liposomes: a light scattering study [Internet]. Missouri University of science and technology; 2012 [cited 2017 Oct 5]. Available from: http://scholarsmine.mst.edu/masters_theses
90. Kotyńska J, Figaszewski ZA. Adsorption equilibria between liposome membrane formed of phosphatidylcholine and aqueous sodium chloride solution as a function of pH. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2005;1720(1–2):22–7.
91. Cox N. How to interpret the coefficient of variation? [Internet]. [cited 2017 Oct 5]. Available from: <https://stats.stackexchange.com/questions/118497/how-to-interpret-the-coefficient-of-variation>
92. Perugini P, Genta I, Pavanetto F, Conti B, Scalia S, Baruffini A. Study on glycolic acid delivery by liposomes and microspheres. *Int J Pharm.* 2000;196(1):51–61.
93. Sanín PÁ, María A, Rojas F, De P, Asesor G, Constain :, et al. Diseño y formulación de potenciales formas farmacéuticas de antibióticos beta-lactámicos útiles frente a microorganismos resistentes, caracterización fisicoquímica de la formación de complejos de asociación polimérica entre el antibiótico ampicilina trihi. Universidad Icesi; 2013.
94. Bakker-Woudenberg IA, Lokerse AF. Liposomes and lipid carriers in the treatment of microbial infections. *Scand J Infect Dis Suppl* [Internet]. 1990 [cited 2017 May 18];74:34–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2097717>
95. Baeza A. Fuentes de desviación causal a la ley de Lambert-Beer-Bouger [Internet]. Precisión en espectrofotometría. 2006 [cited 2017 Oct 5]. Available from: http://microelectrochemalexbaeza.com/wp-content/uploads/2015/04/Documento_de_Apoyo-_Precision_en_espectrofotometria_2598.pdf

ANEXO 1: Diseño experimental de las pruebas preliminares

El modelo factorial completo utilizado en las pruebas preliminares se muestra en la Tabla 8. A partir de los valores de tamaño promedio de partícula, índice de polidispersidad y potencial zeta obtenidos en cada punto, se estableció un modelo estadístico predictivo que reporta más adelante.

Tabla 8. Diseño experimental factorial para pruebas preliminares.

Orden Corrida	Fuerza iónica (mM)	“Cut-off”	Tiempo de reposo (min)
1	1	30kDa	5
2	0	30kDa	20
3	1	10kDa	5
4	1	30kDa	20
5	10	10kDa	5
6	1	10kDa	20
7	10	10kDa	5
8	10	10kDa	5
9	0	30kDa	5
10	1	30kDa	20
11	10	10kDa	20
12	0	30kDa	5
13	10	30kDa	20
14	1	30kDa	5
15	10	30kDa	5
16	1	10kDa	5
17	0	10kDa	20
18	0	10kDa	5
19	10	10kDa	20
20	10	30kDa	5
21	10	30kDa	5
22	0	10kDa	20
23	10	30kDa	20
24	10	10kDa	20
25	1	10kDa	5
26	1	30kDa	20
27	0	10kDa	5
28	1	10kDa	20
29	1	10kDa	20

Continúa en la siguiente página...

<i>Viene de página anterior...</i>			
Orden Corrida	Fuerza iónica (mM)	“Cut-off”	Tiempo de reposo (min)
30	0	10kDa	5
31	0	30kDa	5
32	10	30kDa	20
33	1	30kDa	5
34	0	10kDa	20
35	0	30kDa	20
36	0	30kDa	20

El análisis de varianza y el modelo de regresión lineal obtenidos en Minitab 17, para el tamaño promedio de liposomas se muestra a continuación:

· Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	18223,8	1656,71	332,15	0,000
Lineal	4	3405,6	851,40	170,70	0,000
Fuerza ionica	2	197,5	98,74	19,80	0,000
Cut-off	1	19,7	19,65	3,94	0,059
Aging	1	3188,5	3188,48	639,26	0,000
Interacciones de 2 términos	5	11479,3	2295,86	460,30	0,000
Fuerza ionica*Cut-off	2	2977,9	1488,94	298,52	0,000
Fuerza ionica*Aging	2	8475,4	4237,72	849,62	0,000
Cut-off*Aging	1	26,0	26,01	5,21	0,032
Interacciones de 3 términos	2	3338,9	1669,43	334,70	0,000
Fuerza ionica*Cut-off*Aging	2	3338,9	1669,43	334,70	0,000
Error	24	119,7	4,99		
Total	35	18343,5			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2,23333	99,35%	99,05%	98,53%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante	160,978	0,372	432,48	0,000	
Fuerza ionica					
0	-3,311	0,526	-6,29	0,000	1,33
1	1,581	0,526	3,00	0,006	1,33
Cut-off					
10Kda	0,739	0,372	1,99	0,059	1,00
Aging					
5	-9,411	0,372	-25,28	0,000	1,00
Fuerza ionica*Cut-off					
0 10Kda	11,244	0,526	21,36	0,000	1,33
1 10Kda	-0,214	0,526	-0,41	0,688	1,33
Fuerza ionica*Aging					
0 5	14,944	0,526	28,39	0,000	1,33
1 5	6,153	0,526	11,69	0,000	1,33
Cut-off*Aging					
10Kda 5	-0,850	0,372	-2,28	0,032	1,00
Fuerza ionica*Cut-off*Aging					
0 10Kda 5	-12,767	0,526	-24,25	0,000	1,33
1 10Kda 5	10,492	0,526	19,93	0,000	1,33

El análisis de varianza y el modelo de regresión lineal obtenidos en Minitab 17, para el índice de polidispersidad de los liposomas se muestra a continuación:

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	0,112825	0,010257	85,87	0,000
Lineal	4	0,019271	0,004818	40,33	0,000
Fuerza ionica	2	0,014132	0,007066	59,16	0,000
Cut-off	1	0,000355	0,000355	2,97	0,098
Aging	1	0,004784	0,004784	40,05	0,000
Interacciones de 2 términos	5	0,064151	0,012830	107,42	0,000
Fuerza ionica*Cut-off	2	0,043074	0,021537	180,31	0,000
Fuerza ionica*Aging	2	0,016917	0,008458	70,81	0,000
Cut-off*Aging	1	0,004160	0,004160	34,83	0,000
Interacciones de 3 términos	2	0,029403	0,014702	123,08	0,000
Fuerza ionica*Cut-off*Aging	2	0,029403	0,014702	123,08	0,000
Error	24	0,002867	0,000119		
Total	35	0,115692			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0,0109291	97,52%	96,39%	94,42%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante	0,17969	0,00182	98,65	0,000	
Fuerza ionica					
0	-0,02669	0,00258	-10,36	0,000	1,33
1	0,00597	0,00258	2,32	0,029	1,33
Cut-off					
10Kda	0,00314	0,00182	1,72	0,098	1,00
Aging					
5	-0,01153	0,00182	-6,33	0,000	1,00
Fuerza ionica*Cut-off					
0 10Kda	0,04453	0,00258	17,29	0,000	1,33
1 10Kda	-0,03981	0,00258	-15,45	0,000	1,33
Fuerza ionica*Aging					
0 5	0,01869	0,00258	7,26	0,000	1,33
1 5	0,01169	0,00258	4,54	0,000	1,33
Cut-off*Aging					
10Kda 5	-0,01075	0,00182	-5,90	0,000	1,00
Fuerza ionica*Cut-off*Aging					
0 10Kda 5	0,02025	0,00258	7,86	0,000	1,33
1 10Kda 5	-0,04042	0,00258	-15,69	0,000	1,33

El análisis de varianza y el modelo de regresión lineal obtenidos en Minitab 17, para el potencial zeta de los liposomas se muestra a continuación:

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Modelo	11	4150,82	377,35	101,96	0,000
Lineal	4	3191,07	797,77	215,55	0,000
Fuerza ionica	2	903,94	451,97	122,12	0,000
Cut-off	1	1761,20	1761,20	475,86	0,000
Aging	1	525,94	525,94	142,10	0,000
Interacciones de 2 términos	5	734,03	146,81	39,67	0,000
Fuerza ionica*Cut-off	2	32,87	16,43	4,44	0,023
Fuerza ionica*Aging	2	37,24	18,62	5,03	0,015
Cut-off*Aging	1	663,92	663,92	179,38	0,000
Interacciones de 3 términos	2	225,72	112,86	30,49	0,000
Fuerza ionica*Cut-off*Aging	2	225,72	112,86	30,49	0,000
Error	24	88,83	3,70		
Total	35	4239,65			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1,92383	97,90%	96,94%	95,29%

Coefficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	VIF
Constante	-42,444	0,321	-132,38	0,000	
Fuerza ionica					
0	-5,572	0,453	-12,29	0,000	1,33
1	-1,006	0,453	-2,22	0,036	1,33
Cut-off					
10Kda	6,994	0,321	21,81	0,000	1,00
Aging					
5	3,822	0,321	11,92	0,000	1,00
Fuerza ionica*Cut-off					
0 10Kda	-0,511	0,453	-1,13	0,271	1,33
1 10Kda	1,339	0,453	2,95	0,007	1,33
Fuerza ionica*Aging					
0 5	1,094	0,453	2,41	0,024	1,33
1 5	-1,356	0,453	-2,99	0,006	1,33
Cut-off*Aging					
10Kda 5	4,294	0,321	13,39	0,000	1,00
Fuerza ionica*Cut-off*Aging					
0 10Kda 5	3,056	0,453	6,74	0,000	1,33
1 10Kda 5	0,022	0,453	0,05	0,961	1,33

Se observa que los factores evaluados afectan significativamente las variables respuesta, y que presentan interacción entre ellos. En general, los modelos ajustados presentan un buen coeficiente de correlación, lo que permite predecir con confianza alguna condición deseada a partir de ellos.

ANEXO 2. Curva de calibración para la cuantificación de ampicilina

Considerando el límite de linealidad de la ley de Lambert-Beer-Bouger (95) respecto a la absorbancia de la muestra, se prepararon se prepararon soluciones estándares de ampicilina trihidratada, a concentraciones que tuvieran una absorbancia menor a 0,8, en buffer fosfato potasio de pH 7,2 y fuerza iónica 10mM, como muestra la Tabla 9.

Tabla 9. Estándares preparados para la curva de calibración.

Porcentaje de pérdida de ampicilina (%)	Concentración mg/mL
150	0,085
125	0,071
100	0,056
75	0,042
50	0,028
25	0,014

Teniendo en cuenta que la concentración de partida es de 6 mg/mL, y considerando las diluciones del sistema para la formación de los liposomas, se plantea que el 0% de encapsulación del *API* corresponde a 1,2 mg/mL, y partiendo de este valor se plantean diluciones del filtrado recuperado para que se encuentre dentro del rango de la curva de calibración.

Posteriormente se realizó un barrido entre 400 y 200 nm a 37°C, utilizando un espectrofotómetro marca Shimadzu UV-1800 con una termocupla acoplada, para determinar la longitud de onda de óptima absorción (Ver **Figura 23**), utilizando como muestra “blanco” la solución buffer fosfato.

De acuerdo con el espectro obtenido, se realizó la cuantificación de ampicilina en los estándares a una longitud de onda de 256nm. Obteniendo la curva de calibración que muestra la **Figura 24**.

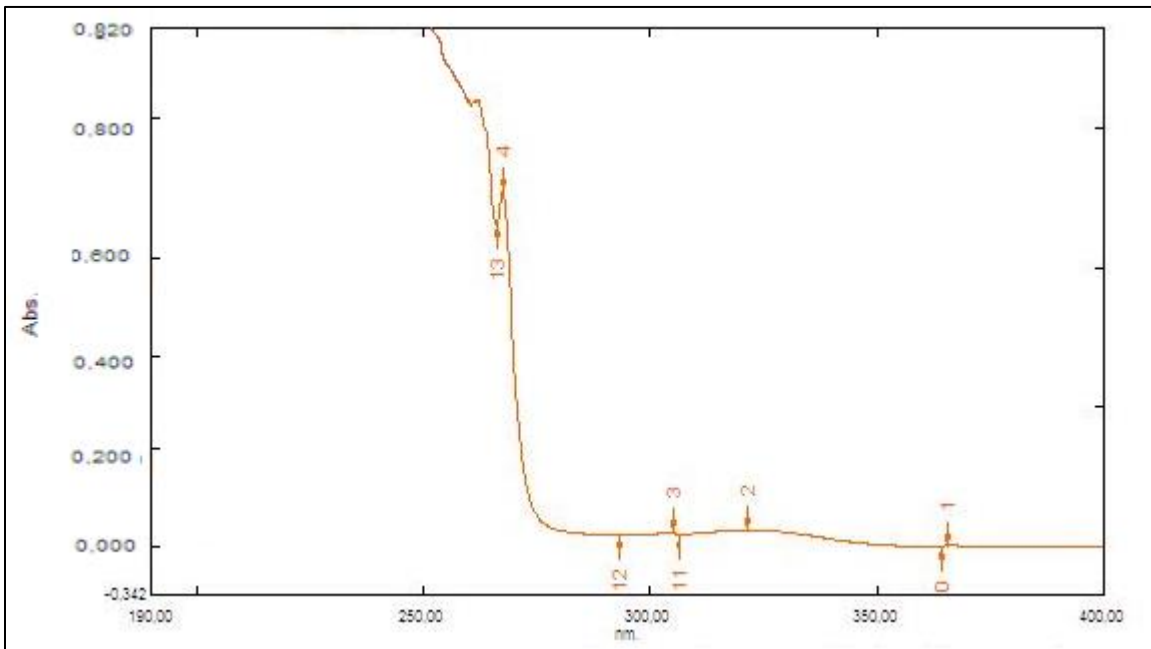


Figura 23. Espectro absorción UV

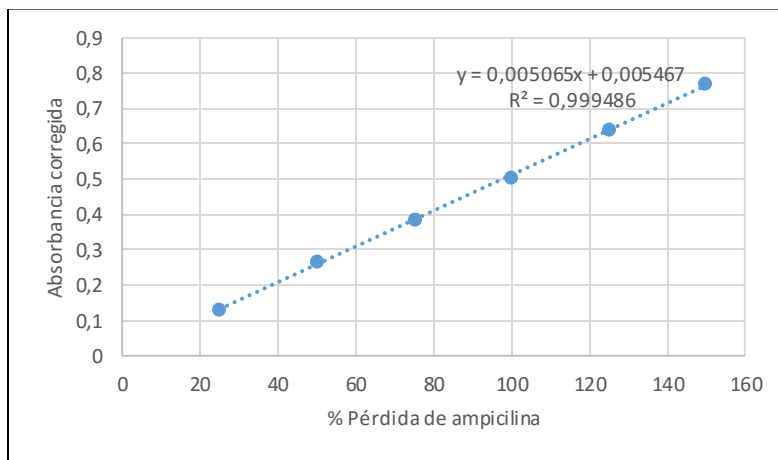


Figura 24. Curva de calibración.

ANEXO 3: Curva de titulación de los liposomas no recubiertos

La curva que se construyó para evaluar el efecto del pH sobre la carga superficial de los liposomas no recubiertos se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Titulación de los liposomas no recubiertos.

pH Muestra	Potencial Zeta (mV)	Potencial Zeta promedio (mV)	Tamaño (nm)	Tamaño promedio (nm)
7,1	-42,2	-40,8	217,6	217,0
	-39,3		216,4	
7,0	-40,1	-39,7	210,4	210,3
	-39,4		210,2	
6,8	-40,2	-40,1	221,4	219,4
	-39,9		217,4	
6,4	-35,8	-34,6	228,6	227,4
	-33,4		226,2	
6,1	-32,5	-32,9	254,3	254,0
	-33,2		253,7	
5,8	-28,4	-26,0	254,3	253,1
	-23,5		251,9	
5,4	-25,1	-24,5	278,7	278,0
	-23,8		277,3	
5,2	-22,1	-23,5	305,8	304,0
	-24,8		302,2	
5,0	-22,0	-21,5	287,0	286,4
	-21,0		285,8	
4,6	-19,9	-20,1	243,9	245,3
	-20,2		246,7	
4,3	-17,9	-18,4	297,7	295,1
	-18,9		292,5	
4,0	-16,4	-16,5	287,3	288,8
	-16,6		290,3	