

DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE DOXICICLINA
A PARTIR DE DOS PROTOTIPOS DE ENCAPSULACIÓN: SECADO POR ASPERSIÓN
Y LIPOSOMAS

VANESSA GALLEGO LONDOÑO



Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Maestría en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín

Diciembre de 2017

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE
DOXICICLINA A PARTIR DE DOS PROTOTIPOS DE ENCAPSULACIÓN:
SECADO POR ASPERSIÓN Y LIPOSOMAS**

VANESSA GALLEGO LONDOÑO

Trabajo de investigación para optar al título de magíster en Ciencias Farmacéuticas y
Alimentarias

COMITÉ TUTORIAL

Tutor:	Julián Londoño Londoño. Químico Farmacéutico. Doctor en Ciencias Químicas.
Miembro comité	Claudio Jiménez Cartagena. Químico Farmacéutico. Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas-Bioquímica. Doctor en Ingeniería Ambiental.
Miembro comité	Santiago Monsalve Buriticá. Médico Veterinario y Zootecnista. Magíster en Ciencias Ambientales.
Miembro comité	Maritza Andrea Gil Garzón. Ingeniera de Alimentos. Magíster en Ciencias - Química.

Universidad de Antioquia

Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Maestría en Ciencias Farmacéuticas y Alimentarias

Medellín

Diciembre de 2017

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE
DOXICICLINA A PARTIR DE DOS PROTOTIPOS DE ENCAPSULACIÓN:
SECADO POR ASPERSIÓN Y LIPOSOMAS**

VANESSA GALLEGO LONDOÑO

Prohibida la reproducción sin la autorización expresa del autor

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

Medellín

2017

AGRADECIMIENTOS

Agradezco en primer lugar a Dios por haber cumplido el anhelo de mi corazón de seguir estudiando, además fue él quien abrió las puertas para desarrollar este proyecto de investigación y puso personas en mi camino para ayudarme con la ejecución del trabajo.

A mis padres y hermano por su apoyo constante en todos los proyectos que he emprendido durante mi camino de vida. A ellos agradezco su amor, dedicación y esfuerzo con el que me han acompañado en mi formación personal y profesional.

A mi compañero de vida Andrés Felipe Giraldo, quién abrió su corazón para aprender sobre un área nueva de conocimiento. Por su compañía y largos tramos, por tomar de mi mano fuertemente y darme fortaleza durante este proceso.

A mi orientador, Dr. Julián Londoño por los conocimientos transmitidos.

A la profesora Andrea Gil, quién se convirtió en mi “madre académica”. De forma generosa me guio, me regaló valiosos conocimientos y me incentivó en mi crecimiento profesional y humano.

A la directora del grupo de investigación Grial, Dra. Luz María Alzate, por su apoyo incondicional, por su disposición de escucha y constante ayuda en el desarrollo del proyecto de investigación.

A la profesora Vania Rodrigues de Lima, por aceptar la invitación a la Corporación Universitaria Lasallista, por sus valiosos aportes científicos y compañía.

A los profesores de maestría, por entregarme bondadosamente sus conocimientos, los cuales sirvieron para completar este proyecto de investigación.

A la profesora Natalia Cadavid, quién vio potencial en mí y abrió el camino para que pudiera realizar mi maestría.

Al profesor Andrés Londoño, por sus sabios consejos, orientación y disposición de ayuda.

A mis colegas de trabajo Carolina C., Nataly S., María Victoria A., Carolina B., Camilo V., Yamilé G., Lizeth G., Miller P., Lizeth Q., Jessica F., Sandra Ll., Sara H., Ana María M., David G., Yamile G., Elsa M., Marcela G., Carlos R., Arturo D., y Luisa A. Por su voz de aliento, aporte científico y cariño brindado.

Al Dr. Oscar Lara Guzmán, por el apoyo proporcionado en los estudios con la línea celular y microscopía confocal láser de barrido.

A la profesora Catalina Martínez, por extenderme su mano y transmitirme sus conocimientos durante la evaluación de la capacidad de incorporación de las formulaciones liposomales en la línea celular.

Al grupo de investigación Centauro de la U. de A., especialmente al profesor Esteban Arroyave, por la donación de la línea celular DH82 y el entrenamiento llevado a cabo para el manejo de cultivos celulares.

Al director del Posgrado Camilo Patiño y a Claudia López, por siempre buscar una solución, por su apoyo y todo su aporte en mejora del programa académico.

A mi alma mater Universidad de Antioquia, que me brindó la oportunidad de estudiar, formarme como profesional y continuar con mis estudios.

A la Corporación Universitaria Lasallista que me acogió y otorgo las herramientas para completar mi formación.

A Colciencias por el apoyo financiero y a cada una de las personas que me apoyaron de alguna u otra manera para realizar este trabajo de investigación.

TABLA DE CONTENIDO

TABLA DE CONTENIDO	v
LISTA DE TABLAS	viii
LISTA DE FIGURAS	x
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN.....	xv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	6
2. OBJETIVOS	8
Objetivo general	8
Objetivos específicos.....	8
3. ENCAPSULACIÓN DE DOXICICLINA POR SECADO POR ASPERSIÓN CON APLICACIÓN FARMACÉUTICA	9
3.1. MARCO CONCEPTUAL	9
3.1.1. Sistemas de liberación controlada para uso oral	9
3.1.2. Microencapsulación por secado por aspersion.....	10
3.1.2.1. Condiciones operativas..	12
3.1.2.2. Agentes encapsulantes	14
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
3.2.1. Reactivos	16
3.2.2. Obtención de la suspensión de alimentación.....	16
3.2.2.1. Optimización.....	16
3.2.2.2. Incorporación de CMC	18
3.2.3. Caracterización de la suspensión de alimentación	19
3.2.4. Secado por aspersion.....	20
3.2.5. Caracterización micropartículas	21
3.2.5.1. Contenido de humedad	21
3.2.5.2. Actividad de agua (a_w).....	21
3.2.5.3. Tamaño de partícula y potencial ζ	21

3.2.5.4.	Humectabilidad	22
3.2.5.5.	Solubilidad	22
3.2.5.6.	Ángulo de reposo	23
3.2.5.7.	Densidad aparente (aireada) y compactada.....	23
3.2.5.8.	Rendimiento de encapsulación	24
3.2.5.9.	Análisis de micropartículas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) ..	24
3.2.6.	Eficiencia de encapsulación y liberación <i>in vitro</i>	25
3.2.6.1.	Cuantificación doxiciclina por HPLC.....	25
3.2.6.2.	Eficiencia de encapsulación	25
3.2.6.3.	Eficiencia de encapsulación total.....	26
3.2.6.4.	Estudio de liberación <i>in vitro</i>	27
3.2.7.	Diseño experimental.....	28
3.2.7.1.	Optimización suspensión de alimentación.....	28
3.2.7.2.	Incorporación de CMC	30
3.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	32
3.3.1.	Suspensión de alimentación	32
3.3.1.1.	Análisis por superficie de respuesta.....	33
3.3.1.2.	Diseño de mezclas D-optimal	41
3.3.2.	Caracterización de las micropartículas.....	45
3.3.2.1.	Contenido de humedad y actividad de agua	45
3.3.2.2.	Tamaño de partícula y potencial ζ	48
3.3.2.3.	Humectabilidad y solubilidad	49
3.3.2.4.	Ángulo de reposo, densidad aparente y compactada	51
3.3.2.5.	Morfología de las micropartículas	53
3.3.3.	Rendimiento y eficiencia de encapsulación	55
3.3.4.	Liberación <i>in vitro</i>	57
3.4.	CONCLUSIONES.....	62
4.	ENCAPSULACIÓN DE DOXICICLINA EN UN SISTEMA LIPOSOMAL: APROXIMACIÓN A UNA FORMULACIÓN CON LIBERACIÓN INTRACELULAR.....	64
4.1.	MARCO CONCEPTUAL	64
4.1.1.	Vectorización de medicamentos para el tratamiento de infecciones intracelulares .	64
4.1.2.	Liposomas como sistema de transporte de fármacos	65
4.1.2.1.	Composición de los liposomas.....	66

4.1.2.2.	Clasificación de los liposomas.....	70
4.1.2.3.	Métodos de preparación.....	72
4.1.3.	Direccionamiento de liposomas hacia macrófagos	74
4.2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
4.2.1.	Reactivos	78
4.2.2.	Preparación de liposomas.....	78
4.2.2.1.	Efecto de la solución de hidratación sobre el tamaño y carga superficial de liposomas vacíos	78
4.2.2.2.	Efecto de DMPS sobre tamaño y potencial ζ de las vesículas.....	79
4.2.2.3.	Capacidad de encapsulación de doxiciclina en vesículas lipídicas.....	80
4.2.3.	Caracterización formulación liposomal	81
4.2.3.1.	Tamaño y potencial ζ	81
4.2.3.2.	Eficiencia de encapsulación.....	81
4.2.4.	Incorporación de doxiciclina liposomal en macrófagos.....	81
4.2.4.1.	Cultivo celular.....	81
4.2.4.2.	Fase 1	83
4.2.4.3.	Fase 2	84
4.2.5.	Análisis estadístico.....	85
4.3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	86
4.3.1.	Preparación de liposomas.....	86
4.3.1.1.	Efecto de la solución de hidratación en el potencial ζ y el tamaño del liposoma.....	86
4.3.1.2.	Efecto de DMPS sobre tamaño y potencial ζ de las vesículas.....	89
4.3.1.3.	Capacidad de encapsulación de doxiciclina en vesículas lipídicas.....	91
4.3.2.	Incorporación de doxiciclina liposomal en macrófagos.....	100
4.3.2.1.	Fase 1	102
4.3.2.2.	Fase 2	104
4.4.	CONCLUSIONES.....	109
5.	CONCLUSIONES GENERALES.....	111
6.	PERSPECTIVAS.....	112
	BIBLIOGRAFÍA.....	114

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Interrelaciones mutuas entre parámetros de secado por aspersion.....	13
Tabla 2. Agentes encapsulantes naturales y sintéticos	15
Tabla 3. Proporción de los componentes de la suspensión de alimentación (agentes encapsulantes, doxiciclina y agua) en los tratamientos del DCC.....	17
Tabla 4. Porcentaje de los agentes encapsulantes en los tratamientos del diseño D-optimal	19
Tabla 5. Diseño de experimentos para optimizar la suspensión de alimentación	29
Tabla 6. Restricciones de las proporciones de los componentes.....	31
Tabla 7. Valor óptimo y nivel de importancia de las variables estudiadas	32
Tabla 8. Coeficiente de regresión, coeficiente de determinación y valor-P de los modelos polinomiales de segundo grado para las variables respuesta del DCC	34
Tabla 9. Resultados de las variables respuesta (viscosidad, tamaño y potencial ζ) del DCC	35
Tabla 10. Resultados experimentales y estimados de la suspensión de alimentación a partir de las condiciones óptimas: sólidos totales (33%) y velocidad de homogeneización (6000 rpm).....	40
Tabla 11. Resultados obtenidos de las variables respuesta (viscosidad, tamaño de partícula y potencial ζ) del diseño de mezclas D-optimal.....	42
Tabla 12. Coeficiente de regresión, coeficiente de determinación y valor-P del modelo cúbico especial ajustado a los datos experimentales en el diseño de mezclas D-optimal para viscosidad, tamaño de partícula y potencial ζ	44
Tabla 13. Comparación entre las respuestas predichas y ajustadas por el modelo cúbico especial	45

Tabla 14. Contenido de humedad y actividad de agua (a_w) de las micropartículas (media + SD, n = 3).....	46
Tabla 15. Tamaño de partícula y potencial ζ de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión (media + SD, n = 3).....	48
Tabla 16. Humectabilidad y solubilidad de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión (media + SD, n = 3).....	50
Tabla 17. Propiedades de fluidez de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión (media + SD, n = 3).....	51
Tabla 18. Parámetros cinéticos de liberación de doxiciclina (primer orden), coeficiente de determinación (R^2) y suma de cuadrados de los residuos (SCE)	58
Tabla 19. Formulaciones liposomales aprobadas para uso humano	65
Tabla 20. Composición de ácidos grasos de fosfatidilcolina extraída de yema de huevo y aceite de soja	68
Tabla 21. Temperatura de transición principal de fase de fosfolípidos	70
Tabla 22. Fosfolípidos comúnmente usados y su carga neta a pH 7,0.....	72
Tabla 23: Métodos de preparación de liposomas	73
Tabla 24. Empleo de liposomas en el tratamiento de enfermedades que involucran macrófagos	77
Tabla 25. Efecto de la solución de hidratación en la carga y tamaño de liposomas vacíos tipo LUV, (media + SD, n = 3)	87
Tabla 26. Incorporación de doxiciclina en liposomas neutros y aniónicos, (media + SD, n = 3)	96
Tabla 27. Liposomas como sistemas de encapsulación de doxiciclina en publicaciones indexadas	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Superficie de respuesta y ecuación estimada para: A) Viscosidad; B) Tamaño.....	37
Figura 2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión: (A) F1 Gel: Sac (B) F2 Gel: Sac: CMC.....	53
Figura 3. (A) Rendimiento y eficiencia de encapsulación en el proceso de microencapsulación de doxiciclina por secado por aspersión (B) Cantidad total de doxiciclina por cada 100 g de polvo.....	56
Figura 4. Perfil de liberación de doxiciclina libre y micropartículas obtenidas por secado por aspersión: (A) pH 1,2 (B) pH 6,8.....	60
Figura 5. Estructura general de un fosfolípido.....	67
Figura 6. Efecto de la composición de fosfolípidos (DMPC:DMPS) sobre la carga superficial y el tamaño de liposomas vacíos.....	90
Figura 7. Efecto de la incorporación de cantidades crecientes de doxiciclina sobre el tamaño de liposomas compuestos de DMPC y DMPC:DMPS 1:1	92
Figura 8. Efecto de la incorporación de cantidades crecientes de doxiciclina sobre la carga superficial de liposomas compuestos de DMPC y DMPC:DMPS 1:1.....	93
Figura 9. (A) Estructura química de doxiciclina; (B) Ionización de doxiciclina a pH 7,4.	94
Figura 10. Doxiciclina incorporada en liposomas construidos con DMPC y DMPC:DMPS 1:1	97
Figura 11. Captación de doxiciclina liposomal DiO-PCPS-DOX en macrófagos de la línea celular DH82 evaluados por microscopía de fluorescencia luego de 1 hora de incubación.....	101

Figura 12. Imágenes de microscopia confocal láser de barrido (CLSM) de células DH82 incubadas con doxiciclina liposomal DiO-PCPS-DOX a cuatro diferentes tiempos (15 min, 30 min, 1 h y 2 h). 103

Figura 13. Análisis comparación de internalización entre las formulaciones liposomales DMPC-DOX y PCPS-DOX en células DH82, luego de 1 hora de incubación. 105

ABREVIATURAS

AUC: Área Bajo la Curva, del inglés *Area Under the Curve*

a_w: Actividad acuosa, del inglés *activity water*

Chol: Colesterol

CLSM: Microscopía Confocal Láser de Barrido, del inglés *Confocal Laser Scanning Microscopy*

CMC: Carboximetilcelulosa de sodio

cP: Centipoise

Dcha.: Derecha

DCC: Diseño Central Compuesto

DOX: Doxiciolina

DiO: Perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina

DiO-DMPC-DOX: formulación liposomal de doxiciolina preparada con DMPC a 6mg/mL y doxiciolina hiclato a una concentración 10 mM y marcada con el fluoróforo DiO

DiO-PCPS-DOX: formulación liposomal de doxiciolina preparada con DMPC y DMPS en una relación molar 1:1 y en concentración de 6 mg/mL, y doxiciolina hiclato a una concentración 10 mM. Esta formulación es marcada con el fluoróforo DiO

DMPC: Dimiristoilfosfatidilcolina (1,2- dimiristoil – *sn*- glicero-3-fosfatidilcolina) por su nombre en inglés *Dimyristoylphosphatidylcholine*

DMPC-DOX: formulación liposomal de doxiciolina preparada con DMPC a 6mg/mL y doxiciolina hiclato a una concentración 10 mM

DMPS: Dimiristoilfosfatidilserina (1,2- dimiristoil – *sn*- glicero-3-fosfatidilserine) por su nombre en inglés *Dimyristoylphosphatidylserine*

F1: Formulación compuesta por gelatina y sacarosa en una relación 3:7

F2: Formulación compuesta por gelatina (13,64 %), sacarosa (85,86 %) y CMC (0,50 %)

FBS: Suero Fetal Bovino, por su nombre en inglés *Fetal Bovine Serum*

FTIR: Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier, por su nombre en inglés, *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*

Gel: Gelatina

HEPES: Buffer 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico

HPLC: Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia, por su nombre en inglés *High Performance Liquid Chromatography*

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

Izq.: Izquierda

LUVs: Vesículas Unilamelares Grandes, por sus siglas en inglés *Unilamellar Large Vesicles*.

NTC: Norma Técnica Colombiana

PA: Ácido fosfatídico

PC: Fosfatidilcolina

PCPS: suspensión de liposomas preparados a una concentración de fosfolípidos de 6mg/mL y compuesta por DMPC y DMPS en una relación molar 1:1

PCPS-DOX: formulación liposomal de doxíciclina preparada con DMPC y DMPS en una relación molar 1:1 y en concentración de 6 mg/mL, y doxíciclina hiclato a una concentración 10 mM

PE: Fosfatidiletanolamina

PS: Fosfatidilserina

REV: Evaporación en Fase Reversa, por sus siglas en inglés *Reverse-phase Evaporation Vesicle*

RFU: Unidad Relativa de Fluorescencia, por sus siglas en inglés *Relative Fluorescence Unit*

Sac: Sacarosa comercial

SD: Desviación estándar, por sus siglas en inglés *Standard Deviation*

SEM: Microscopia Electrónica de Barrido, por sus siglas en inglés *Scanning Electron Microscopy*

SUVs: Vesículas Unilamelares Pequeñas, por sus siglas en inglés *Small Unilamellar Vesicles*

T_m: Transición principal de fase

USP: Farmacopea de Estados Unidos, por sus siglas en inglés *United States Pharmacopeia*

W/O: emulsión simple de Agua en Aceite, por sus siglas en inglés *Water in Oil*

RESUMEN

Los sistemas de liberación controlada son una prometedora alternativa para el tratamiento de infecciones intracelulares por su capacidad para modificar el perfil de liberación de un principio activo e, incluso, vectorizar su distribución a nivel celular. En esta investigación se desarrollaron dos sistemas de liberación de doxiciclina utilizando micropartículas y liposomas, elaborados por secado por aspersión y evaporación en fase reversa, respectivamente. Las micropartículas fueron preparadas con dos diferentes relaciones de agentes encapsulantes: una primera relación gelatina y sacarosa, en proporción 70:30 y una segunda, compuesta por gelatina, sacarosa y carboxitemilcelulosa en proporciones 13,64:85,86:0,50; las cuales se caracterizaron en términos de humedad, actividad acuosa, propiedades de fluidez, tamaño, potencial ζ , rendimiento, eficiencia y liberación *in vitro*. Se diseñaron dos tipos de liposomas: neutros DMPC y aniónicos DMPC:DMPS en proporción 1:1, utilizando una concentración de fosfolípido 6 mg/mL. Se estudió el efecto de adición de DMPS en el tamaño y carga superficial de liposomas de DMPC, la capacidad de incorporación de doxiciclina en los dos sistemas y la internalización de los liposomas en células DH82, evaluada por microscopía confocal. El sistema microparticulado compuesto por gelatina:sacarosa:carboxitemilcelulosa presentó mejores características en términos de Índice de Carr (23,33%), Relación Hausner (1,30), morfología suave y superficie externa lisa, eficiencia de encapsulación (57,91%) y menor cantidad de principio activo liberado a pH ácido. En cuanto a los liposomas, aquellos compuestos por DMPC:DMPS 1:1 mostraron ser mayormente internalizados de acuerdo con el perfil de intensidad de fluorescencia.

Los resultados indicaron que las dos formulaciones, microparticulada y liposomal, tienen potencial de ser implementadas en el tratamiento de enfermedades intracelulares en las que la doxiciclina tenga una acción terapéutica.

Palabras clave: infecciones intracelulares, doxiciclina, sistemas de liberación controlada, secado por aspersion, liposomas, macrófagos, liberación *in vitro*.

ABSTRACT

Drug delivery systems are a promising alternative for intracellular infections treatments due to their capability to modify drug release profiles and even vectorize in a cellular level. Two drug delivery systems of doxycycline were developed in this research with microparticles and liposomes, the first one elaborated by spray drying and the second with reverse-phase evaporation vesicle. Microparticles were prepared with two different wall material mixtures: gelatin:sucrose 70:30 and gelatin:sucrose:carboxymethyl cellulose 13.64:85.86:0.50, and were evaluated in terms of moisture, water activity, flow properties, size, zeta potential, yield, efficiency and in vitro release. Two different types of liposomes were designed: neutral DMPC and anionic DMPC:DMPS 1:1, each one with 6 mg/mL of phospholipid. The DMPS addition effect on DMPC liposomes was studied by its size and surface charge, as well as the doxycycline incorporation capacity on the two systems and the liposomes internalization in DH82 cells by confocal microscopy. The microparticulate system, composed by gelatin:sucrose:carboxymethyl cellulose showed better characteristics in terms of Carr's Index (23.33%), Hausner Ratio (1.30), soft morphology and smooth external surface, encapsulation efficiency (57.91%) and lower quantity of active ingredient released at acid pH. Regarding liposomes, those composed by DMPC:DMPS 1:1 showed to be mainly uptake according to the data provided by the fluorescence intensity profile.

Results suggested that both formulations, microparticles and liposomes, have potential to be used in the intracellular diseases treatments in which doxycycline has therapeutical effect.

Key words: intracellular infections, doxycycline, drug delivery systems, spray drying, liposomes, macrophages, *in vitro* release.

1. INTRODUCCIÓN

Los patógenos intracelulares han sido responsables de un alto número de muertes en la historia, por ejemplo, la lepra (*Mycobacterium leprae*) y pandemias como la peste negra (*Yersinia pestis*) (1). Es tal su impacto que la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que enfermedades como la tuberculosis (bacteria *Mycobacterium tuberculosis*), representó solo en 2015 un total de 10,4 millones de casos nuevos y la malaria (parásito del género *Plasmodium*) 212 millones (2,3).

Para protegerse del sistema inmune y de la acción terapéutica de los agentes antimicrobianos, los microorganismos han desarrollado mecanismos para invadir, colonizar y sobrevivir en las células del huésped de forma activa o latente por largos periodos de tiempo (1, 4). De esta manera, es común que antibióticos que muestran un efecto sobre microorganismos en ensayos *in vitro*, pierden efectividad cuando son utilizados para tratar infecciones en las cuales el mismo patógeno se aloja al interior de las células (5).

El tratamiento de infecciones intracelulares se dificulta por factores como: a) penetración limitada del fármaco a las células; b) compartimentación celular inadecuada de los antibióticos; c) inactivación intracelular del principio activo, en especial por el pH ácido del medio o la unión de componentes celulares y d) disminución de la susceptibilidad de los patógenos intracelulares (5).

Para superar estas barreras, se administran altas concentraciones del fármaco que generan efectos adversos y toxicidad; asimismo, se aumenta la frecuencia de dosificación, que conduce a la falta de adherencia del paciente a un régimen de fármaco prescrito, lo que puede conducir a

concentraciones subóptimas del principio activo y la eventual aparición de resistencias a los antibióticos (4,6).

Dentro de los fármacos que cuentan con propiedades fisicoquímicas para ser usados en infecciones intracelulares, se encuentra la doxiciclina, que por su lipofilicidad puede alcanzar niveles de concentración terapéutica al interior de las células, característica que le permite ser un tratamiento de primera línea en infecciones de humanos y otros mamíferos, causadas por *Rickettsia* spp., *Chlamydia* spp., *Ehrlichia* spp. y *Mycoplasma* spp. (7–9). Sin embargo, su uso conlleva al mismo tipo de problemas de los tratamientos convencionales anteriormente descritos y a la aparición de efectos no deseados, además de los prolongados tiempos de terapia (10, 11). Por lo anterior, cobra importancia el desarrollo de investigaciones para establecer estrategias que optimicen su actividad biológica, como los sistemas de liberación controlada.

Estos mecanismos de liberación ofrecen ventajas relacionadas con aumentar la absorción intestinal, mejorar la biodisponibilidad, reducir las dosis requeridas, liberar el principio activo dentro del rango terapéutico, disminuir los efectos adversos sistémicos, proteger el fármaco contra la degradación y metabolización, controlar la liberación e incluso dirigir su distribución a nivel celular (12, 13).

El presente estudio tiene como propósito el desarrollo de dos sistemas de liberación controlada de doxiciclina como alternativa al tratamiento de infecciones intracelulares en las que tiene acción terapéutica. En la primera parte se presenta el proceso de encapsulación de doxiciclina mediante secado por aspersión, enfocado hacia la optimización de la suspensión de alimentación; asimismo, se expone la evaluación de las propiedades fisicoquímicas y la morfología de las micropartículas;

y, por último, se describe la liberación de la doxiciclina del sistema microparticulado en un ensayo *in vitro*.

En la segunda parte se plantea una aproximación al desarrollo de una formulación liposomal con liberación selectiva hacia macrófagos. Se proponen dos sistemas liposomales, neutro y aniónico, y se estudia la capacidad de cada uno para incorporar doxiciclina. Finalmente, se evalúa la liberación intracelular en una línea celular de macrófagos.

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los patógenos intracelulares presentan un riesgo para la salud del huésped debido a su capacidad innata de evadir el aclaramiento. Además, su estratégica ubicación al interior de las células, les permite usarlas como reservorios y, de esta forma, estos microorganismos establecen focos infecciosos secundarios, lo que finalmente da lugar a la aparición de infecciones crónicas (1, 6).

De forma general, la introducción de los antibióticos en las terapias microbianas, ha contribuido a la reducción de la morbilidad y mortalidad mundial humana; no obstante, en el caso puntual de las infecciones intracelulares, para asegurar que el antibiótico se concentre lo suficiente en el sitio de residencia microbiana y mantenga su actividad en el medio intracelular, es necesario administrar altas concentraciones del fármaco durante prolongados tiempos de terapia, lo que finalmente se refleja en la aparición de efectos no deseados (4, 6).

El descubrimiento de nuevas moléculas con actividad antimicrobiana es una alternativa para atender este problema, sin embargo, hay varios desafíos que complican la implementación de esta solución, lo que lleva a buscar otras estrategias que optimicen la acción de los antibióticos existentes, como por ejemplo los sistemas de liberación controlada (1).

Uno de los antibióticos que son especialmente susceptibles de incorporarse en un sistema de liberación controlada es la doxiciclina, una tetraciclina empleada por su alta lipofilicidad en el tratamiento de diversas infecciones intracelulares (7–9), pero que su uso continuo genera varios de los efectos secundarios anteriormente descritos (10).

Para lograr tratamientos eficaces y seguros, se han desarrollado diversos sistemas de liberación controlada de doxiciclina, pero muy pocos enfocados en tratar infecciones intracelulares (14–24); con excepción de una investigación de Franklin y colaboradores (2015) que se basó en el desarrollo de un prototipo liposomal para el tratamiento de la bacteria *Mycobacterium smegmatis* (11).

Por todo lo anterior, esta investigación se propuso desarrollar dos prototipos de formulación para la liberación controlada de doxiciclina a partir de micropartículas y liposomas, utilizando materiales biodegradables, para mejorar la efectividad de la terapia y reducir su toxicidad. Estos prototipos fueron caracterizados para revisar que sus propiedades fisicoquímicas les permitieran tratar infecciones intracelulares en las que la doxiciclina tiene una acción terapéutica.

Ahora bien, en el caso de las micropartículas, el desarrollo del sistema buscó un cambio en la liberación del fármaco, para aumentar su biodisponibilidad, a través de una vía de administración oral. En cuanto a los liposomas, se diseñó un transporte dirigido hacia la célula diana a través de una administración parenteral.

1.2. JUSTIFICACIÓN

Los tratamientos enfocados a atacar infecciones intracelulares tienen como principal reto internalizar el principio activo a la célula diana y lograr que la concentración alcanzada actúe sobre el microorganismo allí alojado. Sin embargo, este tipo de tratamientos convencionales presenta un inconveniente: la poca afinidad que tiene el medicamento para alcanzar las células infectadas (4).

En el caso de infecciones intracelulares tratadas con doxiciclina, al tener alta lipofilia, el fármaco ingresa con facilidad a las células. Pero para garantizar que llegue la concentración adecuada a la célula diana, se dan altas concentraciones del medicamento, razón por la cual se presentan efectos no deseados (25).

Entre las estrategias encaminadas a mejorar la efectividad de la terapia de las infecciones intracelulares, se encuentran los sistemas orales de liberación controlada, los cuales además de presentar las ventajas que ofrece la vía de administración oral como mayor aceptabilidad y cumplimiento por parte del paciente, también ejercen un cambio en la liberación del fármaco que se refleja en un aumento de su biodisponibilidad (12).

Por otro lado, el progreso en nanomedicina condujo al descubrimiento de nanovehículos capaces de incorporar y transportar el fármaco desde el sitio de la administración hasta el sitio de la infección, como es el caso de los liposomas (1).

Hasta el momento, han sido desarrollados diferentes sistemas de liberación que incorporan doxiciclina para el tratamiento de infecciones intracelulares como: microesferas, matrices

poliméricas y geles *in situ* (15, 16, 18). Sin embargo, solo unos pocos emplean la técnica de secado por aspersión, pero su liberación es local y algunos de estos emplean polímeros sintéticos no biodegradables (22–24, 26). Y aquellos que usaron liposomas, fueron encaminados hacia otro tipo de enfermedades o su liberación fue pulmonar (11, 19).

Hay estudios que se aproximan a las formulaciones que se proponen en este trabajo. En el caso de micropartículas, el trabajo de Shukla y colaboradores, involucró la encapsulación de doxiciclina con quitosano por secado por aspersión, seguido de un entrecruzamiento con alginato y fue diseñado como sistema de liberación controlada para administración oral (21). En cuanto a los liposomas, dos trabajos presentan relación, pero no cuentan con estudios biológicos que demuestren su direccionamiento (27, 28). Estos desarrollos son una evidencia más de la importancia de optimizar o dirigir un principio activo para el tratamiento de infecciones de difícil acceso

Todo lo anterior, soporta la viabilidad de desarrollar prototipos de formulación con sistemas nano y micro particulados que permitan modificar el perfil farmacocinético, la biodistribución y la selectividad de la doxiciclina como alternativa para el tratamiento de infecciones intracelulares en las que este fármaco tenga acción terapéutica y, que además puedan sentar las bases para el diseño de otros tratamientos intracelulares.

2. OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar un sistema de liberación controlada de doxiciclina a partir de dos prototipos de encapsulación.

Objetivos específicos

- Diseñar una formulación microparticulada de doxiciclina por secado por aspersion con aplicación farmacéutica.
- Desarrollar un sistema nanoparticulado de doxiciclina a partir de liposomas para la liberación intracelular.

3. ENCAPSULACIÓN DE DOXICICLINA POR SECADO POR ASPERSIÓN CON APLICACIÓN FARMACÉUTICA

3.1. MARCO CONCEPTUAL

3.1.1. Sistemas de liberación controlada para uso oral

La vía oral es atractiva para la administración de medicamentos porque presenta ventajas como aceptabilidad del paciente, comodidad, autoadministración, flexibilidad en el régimen de dosificación, condiciones de producción menos estrictas y costos más bajos (12, 29). Sin embargo, muchos fármacos presentan una baja biodisponibilidad cuando son administrados por esta vía, ya que no cuentan con adecuadas propiedades fisicoquímicas (solubilidad y estabilidad) y biofarmacéuticas (permeabilidad) (29).

La doxiciclina no exhibe este tipo de problemas, por el contrario, en la forma hiclato comúnmente usada en producción farmacéutica, tiene una solubilidad en agua de 50 mg/mL y además posee una mayor liposolubilidad que otras tetraciclinas (16, 30); sin embargo, cuando es administrada por vía oral produce irritación de la mucosa gástrica e induce a esofagitis debido al pH ácido que causa cuando se disuelve (31).

Una estrategia para mejorar la eficacia y seguridad de este fármaco, es el diseño de sistemas de liberación que maximicen la efectividad de la terapia farmacológica al mismo tiempo que

minimicen los efectos adversos (32). Algunos de los sistemas de liberación que se han desarrollado son: micelas, liposomas, ciclodextrinas, micropartículas e hidrogeles, entre otros (33).

En cuanto a las micropartículas, puede afirmarse que son útiles para proteger el agente de factores externos y brindar estabilidad. Dentro de los numerosos métodos de microencapsulación, la técnica de secado por aspersión ha mostrado ventajas y ha sido de gran utilidad en la industria farmacéutica (34).

3.1.2. Microencapsulación por secado por aspersión

El proceso de secado por aspersión ha sido ampliamente usado en la industria química y de alimentos. Sin embargo, se ha expandido a otras industrias como cosméticos, textiles y farmacéutica. Esta técnica de secado lleva varios años en uso; de hecho la primera patente que incluyó este proceso tiene más de 140 años y desde entonces ha experimentado un constante desarrollo y evolución (35, 36).

En un primer momento, el secado por aspersión fue empleado en el campo farmacéutico para la obtención de extractos secos de plantas. También se ha utilizado con otros fines: 1) mejorar las propiedades de compresión de los polvos para producir materias primas con una buena plasticidad durante el proceso de tableteo directo; 2) aumentar la solubilidad acuosa del principio activo; 3) producir partículas con una liberación modificada o retardada y 4) desarrollar partículas de adecuadas propiedades aerodinámicas para su uso como polvo de inhalación (37).

La microencapsulación es definida como un proceso en el cual pequeñas partículas o gotas de líquido son rodeadas por un recubrimiento; la matriz que recubre es conocida como pared y el

material interno es denominado núcleo, el cual puede estar formado por uno o varios componentes (38).

En el método de secado por aspersión un producto líquido es atomizado en una corriente de gas caliente (generalmente aire) para obtener un polvo (38). Los pasos que involucra este proceso son: 1) preparación del líquido de alimentación (solución, suspensión o emulsión), el cual es bombeado al interior de la cámara de secado por medio de una boquilla o un disco rotatorio; 2) atomización del líquido al entrar por la boquilla y las gotas formadas entran en contacto con el gas caliente donde tiene lugar la transferencia de masa y calor entre el líquido y el aire seco; y 3) separación del material seco de la cámara de secado por medio de un ciclón y, por último, el polvo es atrapado en un colector (35).

El producto sólido obtenido, luego del proceso, tiene la ventaja de presentar una mayor estabilidad física y química comparada con formulaciones líquidas. Adicionalmente, puede ser usado como precursor de otras formas farmacéuticas como cápsulas o tabletas (34).

Con el propósito de lograr un proceso de encapsulación eficiente, es necesario controlar aspectos como las condiciones de operación y la selección de los agentes encapsulantes. Varios estudios se han enfocado en determinar cómo las variables del proceso (temperatura de entrada, flujo de alimentación, flujo del aire entre otros) pueden afectar las propiedades fisicoquímicas de las micropartículas (39–42). Asimismo, se ha investigado mezclas de materiales de pared y su efecto en el producto final (43–45).

3.1.2.1. Condiciones operativas. Las condiciones de funcionamiento sobre las que el operador tiene influencia directa son: 1) temperatura de alimentación; 2) temperatura de entrada del aire de secado; 3) velocidad de flujo del aire de secado; 4) flujo de alimentación; 5) presión de aire de atomización; 6) porcentaje de aspiración y 7) tipo de gas (34, 36).

En cuanto al efecto de estos parámetros, se encuentra que la temperatura de alimentación modifica la viscosidad del líquido, su fluidez y capacidad de ser atomizado homogéneamente. Cuando se incrementa, disminuye la viscosidad y el tamaño de partícula, pero se debe tener cuidado con los materiales termolábiles. De otro lado, la velocidad de alimentación del líquido se debe ajustar de forma tal que se asegure un nivel de secado deseado de la gota (38).

Por su parte, la temperatura de entrada influye en la cantidad de solvente que puede ser removido por unidad de tiempo. Esta es proporcional a la velocidad de secado de la micropartícula y el contenido final de agua (36, 38).

La Tabla 1 muestra la relación entre las condiciones ajustables por el operador y los parámetros que se ven directamente afectados por estas (temperatura de salida, tamaño de partícula, humedad del polvo y rendimiento). Sin embargo, la información de la tabla no puede tomarse como una lista de instrucciones para secar, ya que la heterogeneidad del comportamiento de las sustancias está sujeto al proceso de secado y muchas veces se debe optar por la regla ensayo-error (36).

Tabla 1. Interrelaciones mutuas entre parámetros de secado por aspersión

Parámetros	Temperatura de salida	Tamaño de partícula	Humedad final de producto	Rendimiento
Velocidad del flujo de aire (↑)	↑↑ menor pérdida de calor	—	↓↓ baja presión parcial de vapor de agua	↑↑ mejor separación en ciclón
Humedad del aire (↑)	↑ mayor energía contenida en la humedad	—	↑↑ mayor presión parcial del aire de secado	↓ mayor humedad conduce a la adherencia del producto a las paredes de la cámara
Temperatura de entrada (↑)	↑↑↑ relación proporcional	—	↓↓ menor humedad relativa del aire	↑ un producto seco previene la adherencia
Flujo de alimentación (↑)	↓↓ mayor cantidad de solvente para evaporar	↑ más líquido para ser dispersado	↑↑ mayor cantidad de agua que conduce a una mayor presión parcial	↑↓ depende de la aplicación
Concentración de sólidos en líquido de alimentación (↑)	↑↑ menor cantidad de agua para evaporar	↑↑↑ mayor cantidad de sólidos disponibles para la formación de la partícula	↓ menor cantidad de agua, menor presión parcial	↑ partículas más grandes más fáciles de separar en el ciclón

Tomado de Ref. (36).

Otra variable que es importante mencionar y que no hace parte de las condiciones de funcionamiento, es el líquido de alimentación y sus propiedades. El líquido inicial que alimenta al secador puede ser una solución, suspensión o emulsión y su preparación va a

depender de la solubilidad del activo a encapsular y las propiedades de los materiales de pared (34).

Dentro de los factores importantes para lograr suspensiones de alimentación homogéneas o emulsiones uniformes se encuentran: el proceso para agregar de forma adecuada los aditivos para no formar espuma, el uso correcto de agitadores y la velocidad de los rotores o el empleo de homogeneizadores de alta presión (46).

3.1.2.2. Agentes encapsulantes. En la actualidad existe un gran número de compuestos que son utilizados como agentes encapsulantes para ser utilizados en secado por aspersión. Hay dos grandes tipos de agentes que generalmente se clasifican según su origen: los naturales y los sintéticos (47). A continuación, se relacionan algunos de ellos (Tabla 2):

Tabla 2. Agentes encapsulantes naturales y sintéticos

Nombre	Tipo	Ventajas	Desventajas	Ref.
Gelatina	Natural	- Buenas propiedades emulsificantes, solubilidad en agua (> 40 °C). -Formación de película. Durante secado produce una red densa alrededor del núcleo. -Protección contra transferencia de oxígeno y posible deterioro.	-Agente viscosante, se limita su concentración de uso.	(38, 48)
Sacarosa		-Actúa como plastificante y aumenta la fuerza de adhesión entre el material de pared y el núcleo. -Material secundario o de relleno, que a altas concentraciones exhibe bajas viscosidades. -Alta solubilidad en agua.	-No forma pared o piel densa durante el secado. -Propiedades de cristalización que en secado puede obstruir la boquilla.	(38, 48, 49)
Maltodextrina		-Forma piel densa durante secado. Protección del núcleo. -Alta solubilidad y exhibe baja viscosidad a altas concentraciones.	-Baja capacidad emulsificante y estabilidad en emulsiones.	(38)
Carboximetilcelulosa		-Se dispersa fácilmente en agua a altas temperaturas y forma solución coloidal clara. -Agente emulsificante (concentración 0,25-1%). -Protección pH ácido.	-Alta viscosidad. Solución a 1% (m/v) viscosidad entre 5 a 2000 cP.	(50, 51)
Goma acacia (goma arábiga)		-Excelentes propiedades emulsificantes por su contenido de proteína (1-2%). -Alta solubilidad y baja viscosidad en sistemas acuosos. -Estable en amplio rango de pH.	-Alto costo y suministro limitado. -Actúa como membrana semipermeable. Afecta vida útil por permeabilidad de oxígeno.	(38, 52)
Polímeros de ácido metacrílico	Sintético	-Solubilidad depende del pH (varía por tipo de metacrilato). -Formador de pared y exhibe una baja permeabilidad. -Inerte y no es tóxico.	-Baja solubilidad en agua. -No es biodegradable.	(51, 53, 54)
Ácido Poli (Láctico-co-Glicólico) (PLGA)		-Biodegradable. -En agua se degrada por hidrólisis y se emplea para liberación sostenida de fármacos.	-Baja solubilidad en agua.	(55)

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Reactivos

Se empleó doxiciclina hiclato comercial con 97,4% de pureza (Arshine Pharmaceutical Co., Ltd, Changsha, Hunan, China) y estándar de doxiciclina hiclato con pureza de 98,7% (Dr. Ehrenstorfer GmbH, Augsburg, Alemania). Los agentes encapsulantes utilizados fueron sacarosa comercial (Incauca SAS, Colombia), gelatina (Merck, Alemania) y carboximetilcelulosa de sodio 3000 cP (Bell Chem Internacional SA, Colombia).

Los compuestos químicos usados para la caracterización fueron agua ultrapura con resistividad de 18,2 M Ω .cm (Purelab Ultra ELGA, Alemania), etanol y ácido acético glacial grado analítico y, acetonitrilo y metanol grado HPLC (Merck, Alemania).

3.2.2. Obtención de la suspensión de alimentación

3.2.2.1. Optimización. La optimización de la suspensión de alimentación se realizó por la evaluación de 12 tratamientos establecidos por un diseño central compuesto (DCC), empleado para evaluar el efecto del porcentaje de sólidos y la velocidad de homogeneización sobre la suspensión.

Las formulaciones fueron preparadas con los agentes encapsulantes gelatina y sacarosa en una relación 3:7 de acuerdo con estudios previos (56).

Cada mezcla de los agentes encapsulantes consistió en 150 g totales con un porcentaje de sólidos sólidos entre el 20% y 40% y la cantidad de doxiciclina se fijó en un 10% del porcentaje de sólidos

(

Tabla 3).

Tabla 3. Proporción de los componentes de la suspensión de alimentación (agentes encapsulantes, doxiciclina y agua) en los tratamientos del DCC

Tratamiento	Variables del proceso		Agentes encapsulantes		Doxiciclina (g)	Agua destilada (g)
	Sólidos totales (%)	Velocidad de homogeneización (rpm)	Gelatina (g)	Sacarosa (g)		
1	30	2000	12,15	28,35	4,50	105,00
2	30	4000	12,15	28,35	4,50	105,00
3	40	4000	16,20	37,80	6,00	90,00
4	30	6000	12,15	28,35	4,50	105,00
5	20	4000	8,10	18,90	3,00	120,00
6	30	4000	12,15	28,35	4,50	105,00
7	20	2000	8,10	18,90	3,00	120,00
8	40	6000	16,20	37,80	6,00	90,00
9	40	2000	16,20	37,80	6,00	90,00
10	30	4000	12,15	28,35	4,50	105,00
11	30	4000	12,15	28,35	4,50	105,00
12	20	6000	8,10	18,90	3,00	120,00

La cantidad total de los componentes en la mezcla (gelatina, sacarosa, doxiciclina y agua) es 150 g. La diferencia en las proporciones se debe al porcentaje de sólidos totales: para 20% es 30 g, para 30% es 45 g y para 40% es 60 g de sólidos.

Los componentes de la formulación fueron disueltos separadamente en agua destilada a 60 °C con agitación magnética en plancha de calentamiento. Cada uno fue preparado utilizando diferentes proporciones de agua. Para doxiciclina se empleó el 11% del agua de la

formulación y para los agentes encapsulantes se usó agua en una relación gelatina:sacarosa 81:19.

Luego, la solución de sacarosa y doxiciclina fue homogeneizada en un Ultraturrax (Modelo T50 Basic, IKA, Brasil) a la velocidad designada para cada tratamiento (2000 rpm, 4000 rpm o 6000 rpm) durante 1 min (

Tabla 3). Posteriormente, sobre esta preparación se adicionó la solución de gelatina y se homogeneizó nuevamente en 10 ciclos, cada uno con una duración de 1 min de agitación y otro minuto de pausa.

Finalmente, los grados Brix de cada mezcla fueron cuantificados por medio de un refractómetro digital (HI96801, Hanna Instruments, España).

3.2.2.2. Incorporación de CMC. Se prepararon 14 formulaciones mezclando carboximetilcelulosa de sodio (CMC), gelatina y sacarosa en agua destilada en rango de 0,1% a 0,5%; 9,5% a 34,9% y 65% a 90%, respectivamente. El número de mezclas y la combinación de los componentes fue determinado por el diseño de mezclas D-optimal utilizado para incorporar CMC a la formulación (Tabla 4).

El porcentaje de sólidos en la suspensión de alimentación se estableció en 33% y el contenido de doxiciclina en la suspensión para 150 g totales fue de 4,95 g (10% de los sólidos totales), valor fijado en todos los tratamientos del diseño.

Cada componente fue solubilizado independientemente en agua destilada bajo agitación magnética a 60 °C. La proporción de agua empleada para solubilizar los agentes encapsulantes fue gelatina:sacarosa:carboximetilcelulosa 53:21:26.

La solución de doxiciclina y sacarosa fueron mezcladas y homogeneizadas en Ultraturrax a 6000 rpm por 1 min. Sobre esta última se adicionó la mezcla de CMC y gelatina, previamente hidratada y se homogeneizó en 10 ciclos, cada uno a 6000 rpm por un minuto, con pausas entre ciclos de 1 min. A la suspensión obtenida se le midió los grados Brix.

Tabla 4. Porcentaje de los agentes encapsulantes en los tratamientos del diseño D-optimal

Tratamiento	Gelatina (%)	Sacarosa (%)	CMC (%)
1	9,77	90,00	0,23
2	26,57	73,33	0,10
3	34,50	65,00	0,50
4	22,10	77,50	0,40
5	9,77	90,00	0,23
6	34,70	65,00	0,30
7	34,70	65,00	0,30
8	18,23	81,67	0,10
9	26,17	73,33	0,50
10	9,50	90,00	0,50
11	17,83	81,67	0,50
12	15,95	83,75	0,30
13	22,10	77,50	0,40
14	28,55	71,25	0,20

3.2.3. Caracterización de la suspensión de alimentación

La suspensión se caracterizó en cuanto a viscosidad, tamaño de partícula y potencial ζ . Para la viscosidad de las suspensiones se usó un reómetro VISCO BASIC Plus L (V60003, Fungilab, España) a 50 °C, con huso L2 y velocidad de corte de 100 rpm.

El tamaño y el potencial ζ de las suspensiones se determinó utilizando un equipo zeta/nano NanoPlus-3 (Micromeritics Instrument Corp, Norcross, GA, USA). Previo a las mediciones, se calibró el equipo con perlas de látex (Otsuka Electronics Co., Ltd, Japón).

El tamaño se midió con la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés) que tiene en cuenta la variación de la intensidad de dispersión en el tiempo y estas fluctuaciones son analizadas utilizando una función de autocorrelación (ACF por sus siglas en inglés) (57).

Las medidas de potencial ζ se evaluaron con la técnica de dispersión de luz electroforética (ELS por sus siglas en inglés) que mide la movilidad electroforética de las partículas y es convertida a potencial ζ por la ecuación de Smoluchowski incorporada en el software del Nanoplus-3.

Para efectuar la medición, se tomó una alícuota de 100 μL de la muestra y se llevó a 10 mL con agua ultrapura (Milli Q, 18,2 M Ω .cm), se agitó en vórtex (Fisher Scientific, Estados Unidos) a 3000 rpm por 1 min y por último se procedió a realizar la lectura en el equipo, cambiando el tipo de celda según la característica a evaluarse (58).

3.2.4. Secado por aspersión

Las suspensiones óptimas de cada diseño (DCC y D-optimal) preparadas por triplicado, fueron alimentadas a un equipo de secado por aspersión Mini B-290 (Buchi, Suiza). La temperatura de entrada fue $150\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la temperatura de salida $80\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$; la velocidad de alimentación y el porcentaje de aspiración fueron 4 mL/min y 85% respectivamente. Durante el proceso de secado, la mezcla se mantuvo bajo agitación magnética constante a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Las micropartículas obtenidas fueron colectadas en un empaque de polietileno autosellable y almacenadas en un cuarto con humedad y temperatura controlada a 45% y $20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.5. Caracterización micropartículas

3.2.5.1. Contenido de humedad. El contenido de humedad de las micropartículas fue determinado gravimétricamente por el método de secado en estufa. 1 g de muestra se sometió a calentamiento en estufa de secado por convección natural (Memmert UN55, Schwabach, Alemania) a $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se pesó en balanza analítica Adventurer™ (Ohaus, China) hasta alcanzar peso constante. Cada muestra se evaluó por triplicado y se registró un promedio de tres mediciones de pérdida de peso.

3.2.5.2. Actividad de agua (a_w). La actividad acuosa de las micropartículas se determinó en un higrómetro de punto de rocío (Aqualab, Decagon Devices, Series 3 TE, USA). Aproximadamente 1 g de cada muestra fue analizado por triplicado y el valor de a_w se reportó como la media de los resultados obtenidos.

3.2.5.3. Tamaño de partícula y potencial ζ . El tamaño y el potencial ζ de las micropartículas se determinaron por el método descrito en la sección 3.2.3. Para todas las muestras se halló el tamaño promedio ($n=3$) en μm , con una serie de 30 mediciones por lectura y el potencial ζ fue evaluado por triplicado.

La preparación de la muestra para los dos análisis consistió en la dispersión de aproximadamente 10 mg de polvo microparticulado en agua ultrapura (MilliQ, 18,2 M Ω .cm), luego se agitó en vórtex a 3000 rpm por 30 segundos y, finalmente, se procedió a realizar la lectura en el equipo.

3.2.5.4. Humectabilidad. La humectabilidad del polvo microparticulado se llevó a cabo según el método reportado por Westergaard (59). 1 g \pm 0,1 g de polvo fueron vertidos sobre la superficie de 100 mL de agua destilada contenidos en un beaker de 250 mL. El tiempo necesario para la humectación total del polvo fue registrado.

3.2.5.5. Solubilidad. La solubilidad fue determinada según el método reportado por Cano-Chauca y colaboradores (60). 1 g \pm 0,0001 g de polvo de las micropartículas y 50 mL de agua destilada fueron adicionados en un tubo Falcon (W_1), luego se homogeneizó en vórtex a 3000 rpm durante 5 min y se centrifugó a 5000 rpm por 20 min (Centrífuga Z326K, HERMLE Labotechnik, Alemania). Una alícuota de 25 mL del sobrenadante se transfirió a una caja de Petri previamente pesada (W_2) para ser calentada en una estufa convectiva a 105 °C por 5 h y el peso final fue registrado como (W_3). El porcentaje de solubilidad se calculó según la

3.2.5.6. Ecuación 1.

Ecuación 1

$$\%Solubilidad = \frac{W_3 - W_2}{W_1} \times 100$$

3.2.5.7. Ángulo de reposo. El ángulo de reposo se llevó a cabo siguiendo la norma internacional ASTM C 1444-00 con algunas modificaciones. Un embudo con capacidad de 500 g fue ubicado sobre una base metálica a 6 cm, en el cual se agregó el producto a una velocidad similar de vaciado. Una vez el polvo se acumuló en la abertura del embudo, cesó el flujo y se midió el diámetro (D) y la altura del cono (h) para calcular el ángulo de reposo (α), según Ecuación 2. Este procedimiento se realizó por triplicado para cada formulación.

Ecuación 2

$$\alpha = \tan^{-1} \left(\frac{h}{D/2} \right)$$

3.2.5.8. Densidad aparente (aireada) y compactada. La densidad aparente y compactada se llevó a cabo según el método III de la USP 38 NF33 <616> con algunas modificaciones (61). El polvo fue cargado hasta llenar un embudo con una capacidad de 500 g. Luego fue sometido a vibración manual hasta dejar caer libremente la muestra en una taza de sujeción de 100 mL. El polvo fue nivelado suavemente con una espátula y se registró su peso restando la masa previamente determinada del recipiente. La densidad aireada (ρ_{aireada}) se determinó por el cociente entre el peso y volumen (g/mL). El contenedor del polvo

microparticulado se golpeó varias veces, levantándolo y dejándolo caer por su propio peso y se añadió más muestra para ajustar nuevamente el nivel de la taza. Después, el peso se midió de nuevo y se calculó la densidad compactada ($\rho_{compactada}$).

A partir de los dos parámetros calculados se determinó la fluidez en términos del índice Carr (IC) (Ecuación 3) y de la Relación Hausner (RH) (Ecuación 4).

Ecuación 3

$$IC = 100 \times \left(1 - \frac{\rho_{aireada}}{\rho_{compactada}} \right)$$

Ecuación 4

$$RH = \left(\frac{\rho_{compactada}}{\rho_{aireada}} \right)$$

3.2.5.9. Rendimiento de encapsulación. El rendimiento de encapsulación fue calculado como la relación entre la masa de micropartículas obtenidas al final del proceso de secado y la masa de sólidos secos totales en la suspensión de alimentación (Ecuación 5).

Ecuación 5

$$\text{Rendimiento de encapsulación (\%)} = \frac{\text{Masa micropartículas obtenidas en el secado}}{\text{Masa sólidos secos totales en suspensión de alimentación}} \times 100$$

3.2.5.10. Análisis de micropartículas por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). La estructura externa de las micropartículas obtenidas fue analizada mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). Las muestras fueron previamente fijadas en cinta de grafito

y recubiertas con plata usando un equipo de vacío Denton Vacuum (Desk IV, Estados Unidos) y posteriormente analizadas en un microscopio electrónico de barrido (Jeol, modelo JSM-6490 LV, Japón) con detector de electrones secundario, operado a 20 kV de corriente eléctrica y a 25 Pa de vacío.

3.2.6. Eficiencia de encapsulación y liberación *in vitro*

3.2.6.1. Cuantificación doxiciclina por HPLC. Se implementó una metodología cromatográfica para la cuantificación de doxiciclina. Para esto, se empleó un cromatógrafo líquido de alta eficiencia HPLC UltiMate™ 3000 (Dionex, Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) acoplado a un detector de arreglo de diodos DAD-3000RS. Los datos cromatográficos fueron registrados y analizados con el software Chromeleon versión 7,2. Se usó una columna Acclaim™ 120 C₁₈ (4,6 mm x 150 mm, 5 µm).

Las condiciones cromatográficas se basaron en el procedimiento descrito por Ruz y colaboradores con algunas modificaciones (62). La fase móvil empleada fue solución acuosa de ácido acético al 5% (A), metanol (B) y acetonitrilo (C). La temperatura de la columna se mantuvo a 25 °C y el volumen de inyección se estableció en 10 µL. El flujo de la fase móvil fue de 1 mL/min y para la elución se usó un programa de gradiente: 0-7 min: 55% A 20% B 25% C; 7-9 min: disminución lineal a 50% A 20% B 30% C; 9-11 min: incremento lineal a 55% A 20% B 25% C.

El análisis se realizó a una longitud de onda de 342 nm y la cuantificación de doxiciclina por curva de calibración con estándar externo, en un rango de concentración entre 5 ppm - 100 ppm (coeficiente de determinación (R^2) mayor a 0,99 y residuales por debajo del 20%).

3.2.6.2. Eficiencia de encapsulación. La eficiencia de encapsulación fue calculada como la relación entre la masa de doxiciclina en las micropartículas y la masa teórica encapsulada (cantidad inicial adicionada a suspensión) (Ecuación 6). Para determinar el contenido de doxiciclina en las micropartículas, se pesaron 25 mg del producto microencapsulado en microtubo de 2 mL. Primero se eliminó la doxiciclina libre por la adición de 500 μ L de etanol previamente enfriado a 8 °C, se sometió a agitación mecánica a 3000 rpm por 1 min en vórtex, se procedió a centrifugar a 8000 rpm por 3 min (Mikro 120, Hettich, Alemania) y se eliminó el sobrenadante. Posterior al lavado, el precipitado se disolvió en 1 mL de la mezcla compuesta por solución de ácido acético 5%:metanol:acetonitrilo 55:20:25 (en una relación en porcentaje). Luego, la solución se agitó en vórtex a 3000 rpm por 5 min y se sonicó durante 30 min a 59 kHz, 99% de potencia y 25 °C en ultrasonido (serie DTY, Scientz, Ningbo, China). Finalmente, la doxiciclina en la solución fue cuantificada por HPLC-DAD, método descrito en la sección anterior.

Ecuación 6

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{\text{Masa doxiciclina en micropartículas}}{\text{Masa teórica encapsulada}} \times 100$$

3.2.6.3. Eficiencia de encapsulación total. La eficiencia de encapsulación total fue calculada como la relación entre la masa de doxiciclina en el producto final y la masa teórica (

3.2.6.4. Ecuación 7). Para la cuantificación de doxiciclina en el producto final, se pesaron 25 mg del polvo microparticulado y se disolvió en 1500 µL de la mezcla compuesta por solución de ácido acético 5%:metanol:acetonitrilo 55:20:25 (en una relación en porcentaje v/v). Posteriormente, la solución se agitó en vórtex a 3000 rpm por 5 min y se sonicó durante 30 min a 59 kHz, 99% de potencia y 25 °C. Por último, el contenido final de doxiciclina en la solución obtenida fue analizado por HPLC-DAD, según método descrito en apartado 3.2.6.1.

Ecuación 7

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{\text{Masa doxiciclina en producto final}}{\text{Masa teórica encapsulada}} \times 100$$

3.2.6.5. Estudio de liberación *in vitro*. La evaluación de la liberación de doxiciclina encapsulada en el sistema microparticulado, se realizó por un estudio *in vitro* con el método *sample-and-separate* bajo las condiciones descritas por Shen y colaboradores (63).

El análisis se hizo a condiciones de pH ácido y básico, para lo cual se utilizó una solución de HCl 0,1 N a pH 1,2 y solución de buffer fosfato 10 mM pH a 6,8. Estas soluciones fueron preparadas según la USP (61).

Para el ensayo, 9 mg de doxiciclina sin excipientes (libre) y la cantidad de micropartículas equivalente a 9 mg de doxiciclina, fueron dispersados en 20 mL de la solución amortiguadora respectiva (según pH de estudio) previamente calentada a 37 °C en Erlenmeyer de 50 mL. La dispersión se incubó en un shaker (MAXQ 4000,

ThermoScientific, Estados Unidos) a 37 °C y 50 rpm. A intervalos de tiempo determinados se tomó 1 mL de muestra y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue separado en un microtubo de 2 mL para su posterior análisis por HPLC-DAD (sección 3.2.6.1) y el botón fue resuspendido con nueva solución y transferido nuevamente al Erlenmeyer.

Por último, se calculó la concentración de doxíciclina acumulada en el tiempo y los datos de liberación fueron analizados usando un modelo cinético de primer orden.

3.2.7. Diseño experimental

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graph Prad Prism 6.01 (GraphPad InStat software, CA, Estados Unidos). Las diferencias significativas de cada propiedad fisicoquímica de las micropartículas, descritas en la sección 3.2.5., obtenidas a partir de dos diferentes suspensiones de alimentación, fueron determinadas usando la prueba t de Student. Adicionalmente, para el estudio del perfil de liberación, se realizó un análisis de varianza ANOVA de dos factores (multifactorial) para estudiar simultáneamente los efectos de dos fuentes de variación (tiempo y tipo de formulación), seguido del pos-test Bonferroni. Los datos se consideraron significativos para un valor $p < 0,05$.

3.2.7.1. Optimización suspensión de alimentación. La metodología de superficie de respuesta fue usada para determinar la influencia de dos variables independientes que afectan la preparación de la suspensión de alimentación. La matriz del diseño de experimentos, el

análisis de datos y el proceso de optimización fueron realizados con el paquete estadístico Statgraphics Centurion XV (Statpoint Technologies, Inc., Estados Unidos).

El diseño experimental implementado fue un diseño central compuesto (DCC) con dos factores, cada uno con dos niveles. Las dos variables independientes estudiadas fueron el porcentaje de sólidos totales (%) (X1) y la velocidad de homogeneización (rpm) (X2). El nivel mínimo y máximo de las variables fueron 20% y 40%, 2000 rpm y 6000 rpm, respectivamente. El diseño de experimentos consistió en 12 tratamientos con cuatro réplicas al centro, el cual fue realizado de forma aleatorizada (Tabla 5; **Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Tabla 5. Diseño de experimentos para optimizar la suspensión de alimentación

Tratamiento	Variable codificada		Variables del proceso	
	X1	X2	Sólidos totales (%)	Velocidad de homogeneización (rpm)
1	0	-1	30	2000
2 (c)	0	0	30	4000
3	+1	0	40	4000
4	0	+1	30	6000
5	-1	0	20	4000
6 (c)	0	0	30	4000
7	-1	-1	20	2000
8	+1	+1	40	6000
9	+1	-1	40	2000
10 (c)	0	0	30	4000
11 (c)	0	0	30	4000
12	-1	+1	20	6000

(c) punto central. El porcentaje de sólidos totales está basado en la cantidad de sólidos (agentes encapsulantes y doxiciclina) que se adicionan a la suspensión de alimentación en una relación de masa.

Las variables de respuesta evaluadas fueron la viscosidad, el tamaño de partícula y el potencial ζ . La ecuación general del modelo de regresión para cada una de las variables respuesta es dada por la Ecuación 8 (64).

Ecuación 8

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \varepsilon$$

Donde Y es la variable respuesta; β_0 es la constante de regresión; β_i , β_{ii} y β_{ij} corresponden al coeficiente lineal, cuadrático y de interacción respectivamente; ε representa los residuos y X_1 y X_2 son las variables independientes.

Para determinar si el modelo se ajusta y describe la variable dependiente, se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANOVA) con una distribución de Fisher (F-test). Los coeficientes no significativos ($p > 0,05$) fueron eliminados del modelo de regresión y la eficiencia de este fue estudiada según el valor-P de la ecuación de regresión y el valor del coeficiente de determinación (R^2).

Las condiciones óptimas de preparación de la suspensión de alimentación se determinaron por el análisis de resultados de las variables dependientes, que fueron estadísticamente afectadas por los factores estudiados. Para esto, se hizo uso de la función de deseabilidad con valores entre 0 a 1 de acuerdo a la aproximación de la respuesta a su valor objetivo (65).

Finalmente, la suspensión de alimentación, bajo las condiciones óptimas halladas, fue preparada por triplicado y caracterizada con el fin de determinar qué tan predecible resultó el modelo.

3.2.7.2. Incorporación de CMC. La incorporación de CMC a la suspensión compuesta por gelatina y sacarosa, se realizó por un diseño de mezclas D-optimal, el cual permite asignar restricciones a los componentes cuando estos están acotados entre valores de máximo y mínimo diferentes de 1 y 0, respectivamente (66). La creación del diseño de experimentos, el análisis de datos y la optimización se realizaron por el programa estadístico Design Expert 6 (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA).

En este estudio se definieron 14 tratamientos con un rango experimental de los componentes entre 0% y 100% (m/m). De estos tratamientos, 8 son diferentes y 6 fueron replicados (tres corridas cada una con réplica). Las variables experimentales del diseño fueron CMC, gelatina y sacarosa, a las cuales se les aplicó restricciones en las proporciones de cada una en la mezcla (Tabla 6).

Tabla 6. Restricciones de las proporciones de los componentes

Componente	Restricción de proporciones (% p/p)
X₁ CMC	$0,1 < X_1 < 0,5$
X₂ Gelatina	$9,5 < X_2 < 34,9$
X₃ Sacarosa	$65 < X_3 < 90$

Se escogió un modelo cúbico especial en el diseño de mezclas expresado mediante la Ecuación 9. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar la significancia del modelo estadístico (67).

Ecuación 9

$$Y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_4 X_1 X_2 + \beta_5 X_1 X_3 + \beta_6 X_2 X_3 + \beta_7 X_1^2 X_2 X_3 + \beta_8 X_1 X_2^2 X_3 + \beta_9 X_1 X_2 X_3^2 + \varepsilon$$

Las variables de respuesta tomadas en cuenta en el diseño fueron la viscosidad, el tamaño de partícula y el potencial ζ . La optimización de las variables se realizó maximizando la función de “deseabilidad”, con el fin de encontrar la combinación de los encapsulantes que se ajustara a los límites deseados descritos en la Tabla 7 para cada uno de los atributos. A cada uno de los componentes de la mezcla y los parámetros evaluados se les dio un nivel de importancia desde 1 hasta 5.

Tabla 7. Valor óptimo y nivel de importancia de las variables estudiadas

Variable	Objetivo	Límite inferior	Límite superior	Importancia
Gelatina (%)	Minimizar	9,5	34,9	1
Sacarosa (%)	En el rango	65	90	3
CMC (%)	En el rango	0,1	0,5	3
Viscosidad (cP)	En el rango	216,7	350,0	1
Tamaño (μm)	Minimizar	0,3165	0,6093	3

Potencial ζ (mV)	En el rango	19,39	22,92	5
------------------------	-------------	-------	-------	---

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Suspensión de alimentación

Como se explicó en la sección 3.1.2.1. la estabilidad de la suspensión de alimentación es una de las diferentes variables del proceso de secado por aspersion que tienen efecto sobre las propiedades físicas, el rendimiento y la eficiencia del producto final. Por esta razón es importante establecer sus condiciones óptimas de preparación, para garantizar desde el punto de partida un buen desempeño durante el secado.

3.3.1.1. Análisis por superficie de respuesta. La Tabla 8 muestra los coeficientes de regresión de la ecuación polinómica para las tres variables de respuesta evaluadas (viscosidad, tamaño y potencial ζ), el valor-P de cada uno de los términos y el coeficiente de determinación (R^2) de cada modelo. Algunos términos estadísticamente no significativos fueron eliminados y la ecuación resultante fue evaluada nuevamente por análisis de varianza (ANOVA). Los modelos polinomiales de segundo grado se ajustan y representan adecuadamente las variables de viscosidad y tamaño de partícula, con bajos residuales y valores de coeficiente de determinación R^2 de 88,01% y 90,84%, respectivamente. Estas ecuaciones explican la influencia de las variables independientes (sólidos totales y velocidad de homogeneización) en estos dos parámetros.

En cuanto al potencial ζ , esta variable no se ve afectada estadísticamente en los rangos estudiados de los factores ni por las interacciones entre estos, ya que ningún dato arrojó un

valor-P menor a 0,05. Además, el modelo de regresión no explica la variación de esta respuesta.

Tabla 8. Coeficiente de regresión, coeficiente de determinación y valor-P de los modelos polinomiales de segundo grado para las variables respuesta del DCC

Coeficiente de regresión	Variables respuesta					
	Viscosidad	Valor-P	Tamaño	Valor-P	Potencial ζ	Valor-P
β_0	170,9500		-0,07017		5,81333	
β_1	-46,8483 ***	0,0005	0,01431 *	0,0328	0,58033 ns	0,2193
β_2	0,18081 ns	0,4537	0,00016 **	0,0057	0,00113 ns	0,2600
β_{11}	1,6940 *	0,0344	0,00092 ns	0,2108	-0,0091 ns	0,6114
β_{22}	---	---	2,19391E-8 ns	0,2314	-1,6625E-7 ns	0,7090
β_{12}	-0,00663 *	0,0497	-1,43962E-5 **	0,0017	3,0250E-5 ns	0,6780
R^2	88,01		90,84		41,58	

ns: no significativo ($p > 0,05$)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$

β_0 : Constante de regresión; β_1 : Sólidos totales (%); β_2 : Velocidad de homogeneización (rpm); β_{11} y β_{22} : Coeficiente cuadrático; β_{12} : Coeficiente de interacción

Como se observa en la Tabla 9, el potencial ζ para los 12 tratamientos estuvo entre 14,74 mV y 23,22 mV sin mostrar diferencias significativas, como lo demuestra el análisis ANOVA para esta variable. Aunque los valores del potencial ζ no estuvieron por encima de +30 mV, valor dentro de la teoría del DLVO tomado como criterio de estabilidad (68, 69), los resultados obtenidos permiten una estabilidad de las suspensiones, ya que estas

preparaciones en 24 horas a temperatura ambiente no presentaron una separación de fases observada visualmente.

Tabla 9. Resultados de las variables respuesta (viscosidad, tamaño y potencial ζ) del DCC

Tratamiento	Variables independientes		Variables respuesta		
	Sólidos totales (%)	Velocidad de homogeneización (rpm)	Viscosidad (cP)	Tamaño de partícula (μm)	Potencial ζ (mV)
1	30	2000	153,0	0,5967	22,43
2	30	4000	225,0	0,5314	17,6
3	40	4000	474,0	0,5479	22,59
4	30	6000	281,0	0,4234	19,5
5	20	4000	109,5	0,4814	18,85
6	30	4000	218,5	0,4520	18,75
7	20	2000	55,5	0,4544	14,74
8	40	6000	548,5	0,3179	23,22
9	40	2000	986,5	1,3609	16,32
10	30	4000	217,8	0,4793	22,12
11	30	4000	210,3	0,5133	21,33
12	20	6000	148,0	0,5631	19,22

Previo al estudio por el diseño central compuesto DCC, fue preparada por duplicado una suspensión bajo la condiciones descritas por Saavedra (56), con igual relación gelatina:sacarosa, cantidad de doxiciclina de 2%, porcentaje de sólidos de 13,3% y velocidad de homogeneización a 2000 rpm. El valor de potencial ζ obtenido fue de 7,10 mV \pm 0,67 mV, demostrando que suspensiones preparadas con gelatina y sacarosa con un

porcentaje de sólidos entre el 20% y 40% incrementan las fuerzas repulsivas del sistema coloidal, lo cual se ve reflejado en el aumento del potencial ζ . Además, la gelatina como agente espesante, influye en la estabilidad de la suspensión y su concentración afecta la velocidad de sedimentación del sistema (70). A esto se le suma, según lo descrito por Vasisht, que una propiedad que se aprovecha de la gelatina para ser usada en procesos de microencapsulación, es la movilidad electroforética (μ), la cual mantiene la estabilidad electrostática de las gotas de gelatina coloidal en suspensión (71).

Por otro lado, los experimentos indican que la viscosidad tiende a incrementar con el aumento del aumento del contenido de sólidos totales en la suspensión (

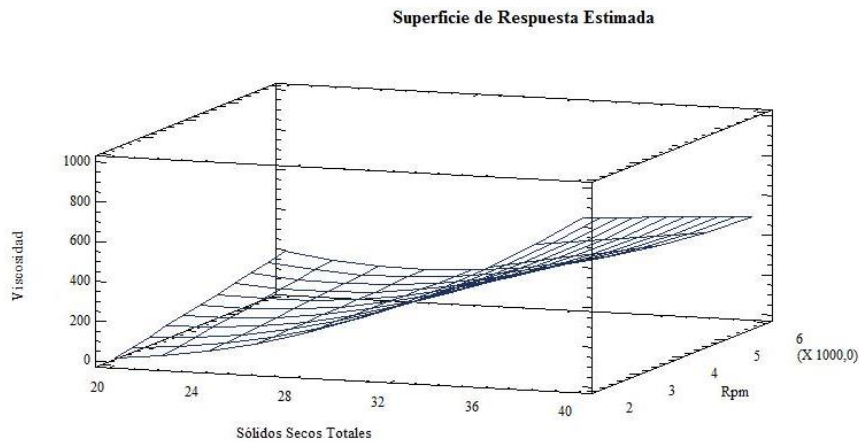
Figura 1A). Resultados similares fueron reportados en varios estudios, donde se observó un aumento de la viscosidad con el porcentaje de sólidos (41, 72, 73).

Este efecto se atribuye principalmente a la gelatina, ya que la sacarosa como carbohidrato exhibe la propiedad de tener bajas viscosidades y una buena solubilidad a altas cantidades de sólidos (38). Esta característica se aprovecha para aumentar el porcentaje de sólidos en la solución de alimentación; de esta forma se afecta directamente y de forma positiva el rendimiento del proceso y se disminuye la energía necesaria para evaporar el agua durante el proceso de secado (74).

Adicionalmente, la gelatina es un hidrocoloide usado como agente emulsificante, espesante y gelificante en la preparación de emulsiones y suspensiones, por esta razón su concentración en dichas preparaciones implica un efecto en la viscosidad (75).

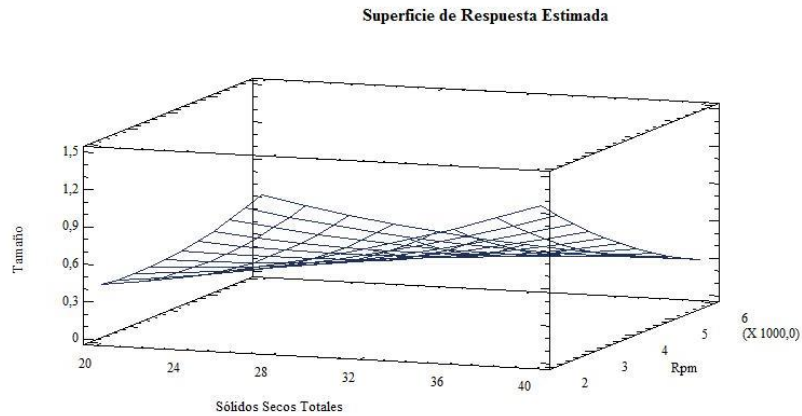
Desde el punto de vista de la interacción entre la gelatina y la sacarosa, se ha reportado que los polisacáridos pueden conducir a un aumento en la extensión de la estructura secundaria de las proteínas (76). Para el caso de la gelatina, esta proteína tiene como estructura secundaria una triple hélice de cadenas polipeptídicas, ya que debido al contenido de prolina e hidroxiprolina se interrumpe la formación de la estructura α -hélice (77). Este tipo de organización puede llevar a una mayor viscosidad del sistema y aumentar el impedimento estérico, que en conjunto van a beneficiar la estabilidad.

A



$$\text{Viscosidad} = 170,95 - 46,8483 * \text{ST} + 0,180813 * \text{rpm} + 1,694 * \text{ST}^2 - 0,00663125 * \text{ST} * \text{rpm}$$

B



$$\text{Tamaño} = -0,0701792 + 0,0143171*ST + 0,000164075*rpm + 0,000923312*ST^2 - 0,0000143962*ST*rpm + 2,19391E-8*rpm^2$$

Figura 1. Superficie de respuesta y ecuación estimada para: A) Viscosidad; B) Tamaño

Frente al efecto observado en el tamaño de partícula, esta variable es principalmente afectada por la velocidad de homogeneización (

Figura 1B) y en la Tabla 8 el coeficiente que representa este factor tiene un efecto fuertemente significativo ($p < 0,01$) sobre el tamaño de la suspensión de alimentación. Al aumentar la fuerza de corte, se facilita la ruptura de las partículas por un proceso físico y se disminuye el tamaño de estas.

Asimismo, a medida que se aumenta el porcentaje de sólidos, el tamaño de partícula promedio del sistema coloidal incrementa y al aplicar una mayor velocidad, se mejora la dispersión y el sistema es más homogéneo.

Dentro del análisis, el objetivo que se persiguió al usar la metodología de superficie de respuesta, fue determinar el impacto de cada factor evaluado y como estos interactúan. Una vez se analizó el efecto, como se realizó anteriormente, se llevó a cabo el proceso de optimización para obtener la calidad deseada de la suspensión de alimentación. Para el caso de estudio, no se tuvo en cuenta la variable respuesta potencial ζ , ya que como se mencionó, está no se vio afectada estadísticamente por los dos factores estudiados.

Se podría explicar la ausencia de variabilidad significativa del potencial ζ a partir de un proceso físico. En este sentido, cuando se incrementa el porcentaje de sólidos entre el rango de 20% a 40%, la suma de los efectos de cada una de las partículas no produce cambios notorios en la interfase sólido-líquido y sobre la base de la teoría del DLVO, la energía neta de interacción para ese caso posee una zona de repulsión con altura suficiente para dar estabilidad al sistema (curva de energía neta) y esas concentraciones de sólidos mantienen el balance de energía (69). A esto se suma que la energía de agitación aplicada (2000 rpm a 6000 rpm) a esas concentraciones de sólidos estudiadas, permitió una estabilización tal que al no existir poblaciones marcadas de mayor tamaño que generaran efecto de atracción en partículas pequeñas, se impidió la aparición de sedimentación irreversible, además, dichos cambios hubieran sido notorios por la presencia de variaciones en el potencial ζ .

De esta forma, la optimización se derivó de minimizar el tamaño de partícula y acertar la viscosidad a 250 cP. Por tanto, la combinación de niveles de factores que maximiza la función de deseabilidad bajo los dos parámetros establecidos es: porcentaje de sólidos 33% y velocidad de homogeneización 6000 rpm.

El porcentaje de sólidos resultante de la optimización, está dentro del valor recomendado en los procesos industriales de secado por aspersión ($> 30\%$) para reducir costos y aumentar la eficiencia del secado (78).

La Tabla 10 contiene los datos predichos por el software y los resultados experimentales para viscosidad y tamaño de partícula. La viscosidad con respecto al valor estimado presentó un coeficiente de variación del 1%, con una similitud entre ambos resultados que da lugar a un buen ajuste y exactitud en el estudio. Sin embargo, para el tamaño se obtuvo una diferencia amplia entre el valor predicho y experimental, con un coeficiente de variación de 20,2%. Aunque el rango esperado sea mayor, la variabilidad entre las muestras es baja con una desviación estándar de $0,019 \mu\text{m}$, lo que permite entender que el efecto en las muestras es similar y a esto se le suma que el tamaño promedio obtenido ($0,437 \mu\text{m}$) y el índice de polidispersidad (0,278) es un buen indicador de estabilidad, porque una distribución de tamaño estrecha representa una dispersión más estable y disminuye la velocidad de sedimentación del sistema, además, minimiza el fenómeno de maduración de Ostwald, en el cual las partículas grandes aumentan de tamaño debido a la disolución de las partículas pequeñas (79, 80). Adicionalmente, optimiza las condiciones de secado, ya que dicho valor, según el sistema de clasificación de tamaños de partícula de la Sociedad Americana de la Ciencia del Suelo (SSSA, por sus siglas en inglés) se encuentra dentro del rango para ser considerado como una partícula de arcilla ($0 \mu\text{m}$ a $2 \mu\text{m}$), tamaño que favorece la formación de una gota más pequeña durante el proceso de atomización y al haber una mayor superficie de contacto será más eficiente la transferencia de masa y de calor (74, 81).

Por todo lo anterior, se aceptan las condiciones de preparación de la suspensión de alimentación arrojadas por el modelo como óptimas.

Tabla 10. Resultados experimentales y estimados de la suspensión de alimentación a partir de las condiciones óptimas: sólidos totales (33%) y velocidad de homogeneización (6000 rpm)

Respuesta	Valor observado	Valor estimado	CV (%)
Viscosidad (cP \pm SD)	246,50 \pm 5,80	250,0	1,0
Tamaño de partícula (μ m \pm SD)	0,437 \pm 0,019	0,33	20,2
Potencial ζ (mV \pm SD)	22,79 \pm 0,73	----	----
Deseabilidad		0,99	

n = 3

CV: Coeficiente de variación

A partir de este punto, la formulación preparada con gelatina y sacarosa con un 33% de sólidos y homogeneizada a 6000 rpm, se le hará referencia como F1.

3.3.1.2. Diseño de mezclas D-optimal. La incorporación del agente encapsulante CMC en la suspensión de alimentación, se hizo con la finalidad de mejorar las características del producto final en cuanto al perfil de liberación. Varios estudios incluyeron este carbohidrato dentro de la mezcla de los encapsulantes para controlar la liberación del analito y realizaron la evaluación de esta característica por modelos de digestión *in vitro* (50, 82, 83).

La razón por la cual en dichos estudios se usó este carbohidrato, se debe al efecto protector que este polímero ejerce durante la digestión ácida gástrica, el cual se asocia al entrecruzamiento por lactonización que ocurre a pH ácido, entre el ácido carboxílico y los grupos hidroxilo libres (84). Además, la CMC otorga un control en la liberación de fármacos, ya que se hidrata fácilmente a la temperatura del cuerpo humano, y como resultado ocurre una relajación de la cadena del polímero con una posterior expansión de volumen, lo cual tiene impacto en la velocidad de disolución del ingrediente activo (85).

Una limitante en la composición de la mezcla es que ninguno de los agentes podía estar en un 100%. Desde la perspectiva de la viscosidad del sistema, esta se aumentaría considerablemente con la gelatina y la CMC, por lo que se vería afectado negativamente el proceso de atomización y velocidad de secado (38). Otro aspecto a considerar, es que la sacarosa se emplea como material secundario o de relleno, ya que no tiene propiedades de formador de pared (49).

Por estas razones se empleó el diseño de mezclas D-optimal, que permite realizar restricciones de restricciones de los componentes de la suspensión. Los resultados obtenidos en este estudio de los de los 14 tratamientos evaluados en términos de viscosidad, tamaño y potencial ζ se muestran en la

Tabla 11.

Tabla 11. Resultados obtenidos de las variables respuesta (viscosidad, tamaño de partícula y potencial ζ) del diseño de mezclas D-optimal

Tratamiento	Variables independientes			Variables respuesta		
	Gelatina (%)	Sacarosa (%)	CMC (%)	Viscosidad (cP)	Tamaño de partícula (µm)	Potencial ζ (mV)
1	9,77	90,00	0,23	216,7	0,6037	19,39
2	26,57	73,33	0,10	352,7	0,4324	22,39
3	34,50	65,00	0,50	390,0	0,3959	22,03
4	22,10	77,50	0,40	376,7	0,4651	22,88
5	9,77	90,00	0,23	219,5	0,6093	19,77
6	34,70	65,00	0,30	345,8	0,4250	20,97
7	34,70	65,00	0,30	343,3	0,4807	21,14
8	18,23	81,67	0,10	334,2	0,4552	21,47
9	26,17	73,33	0,50	367,5	0,5373	22,14
10	9,50	90,00	0,50	299,5	0,3165	20,62
11	17,83	81,67	0,50	342,7	0,3684	21,61
12	15,95	83,75	0,30	338,4	0,4563	22,14
13	22,10	77,50	0,40	378,0	0,4556	22,48
14	28,55	71,25	0,20	309,5	0,3871	22,92

El polisacárido CMC por su habilidad de retener agua y ser un agente de suspensión, va a conferir una mayor viscosidad al sistema (51, 80). Asimismo, la gelatina, como se mencionó en la sección 3.3.1.1., es un estabilizante y agente espesante. Por tanto, cuando la gelatina está a concentraciones por encima de 10% y la CMC en porcentaje mayores a 0,2%, los valores de viscosidad se encuentran entre 342 cP y 390 cP (Tabla 11).

La CMC es un homopolisacárido lineal de unidades de β-(1,4)-D-glucopiranososa cuyo peso molecular varía de acuerdo a las unidades del monosacárido y grado de sustitución (86). A pesar de ser un compuesto de alto peso molecular, su incorporación en la suspensión no afectó de forma considerable el tamaño al compararse con la suspensión de gelatina y sacarosa previamente descrita (sección 3.3.1.1), manteniendo los valores por debajo de 1 µm.

Se destaca que la variabilidad entre los tratamientos en cuanto a potencial ζ es baja, con un coeficiente de variación de 5,0%. Al usarse un porcentaje de sólidos de 33%, hay más disponibilidad de cargas que imparten una mayor repulsión, generando un mayor potencial ζ .

La gelatina es un polímero iónico que al valor del pH neutro de la suspensión tiene carga positiva y la CMC en solución acuosa suele estar cargada negativamente, por tanto la interacción entre ambos compuestos es de nivel electrostático (80). En el sistema de estudio prevalecen las cargas positivas, de esta forma, los menores valores de potencial ζ se obtuvieron cuando la gelatina estuvo en una más baja proporción (tratamientos 1, 5 y 10 con datos de 19,39 mV, 19,77 mV y 20,62 mV, respectivamente).

En términos del ajuste del modelo de regresión, el cúbico especial propuesto para evaluar el comportamiento de cada una de las tres variables respuesta, es correcto y puede ser aceptado, ya que en los tres casos se obtuvo un valor del coeficiente de determinación por encima de 92% y un valor-P menor a 0,05 (

Tabla 12).

Tabla 12. Coeficiente de regresión, coeficiente de determinación y valor-P del modelo cúbico especial ajustado a los datos experimentales en el diseño de mezclas D-optimal para viscosidad, tamaño de partícula y potencial ζ

Coefficiente	Viscosidad	Modelo	Tamaño de partícula	Modelo	Potencial ζ	Modelo
X ₁	-52,46		0,37		23,61	
X ₂	-68,08		0,66		21,19	
X ₃	-2,750E6		-1131,62		27570,29	
X ₁ X ₂	1787,3		-0,36		-2,08	
X ₁ X ₃	2,823E6		1151,49		-28089,93	
X ₂ X ₃	2,818E6		1128,04		-28025,27	
X ₁ ² X ₂ X ₃	-2,952E5		21,56		3329,17	
X ₁ X ₂ ² X ₃	-2,885E5		-88,14		3358,95	
X ₁ X ₂ X ₃ ²	1,135E7		5435,03		-1,91E5	
P-valor		0,0024		0,0169		0,0005
R ²		96,84		92,85		98,35

Finalmente, se obtuvo una formulación óptima basada en los límites deseados descritos en la Tabla 7. La optimización indicó que la mejor composición es mediante una mezcla de 13,64% gelatina, 85,86% sacarosa y 0,50% CMC. En adelante, a esta formulación se le nombrará F2.

La deseabilidad del modelo para estas proporciones fue de 0,912, resultado que se encuentra dentro del rango de 0,8 a 1,0 para considerar la estimación de la calidad de un producto como aceptable. Cuando se encuentra por debajo de 0,63 la calidad del producto se considera como pobre y valores por debajo de 0,37 es un producto inaceptable (87).

La comparación entre las respuestas estimadas y observadas se encuentra en la

Tabla 13. La similitud entre los valores muestra el ajuste del estudio.

Tabla 13. Comparación entre las respuestas predichas y ajustadas por el modelo cúbico especial

Respuesta	Valor observado	Valor estimado	CV (%)
Viscosidad (cP \pm SD)	325,53 \pm 3,33	329,17	1,40
Tamaño de partícula (μm \pm SD)	0,326 \pm 0,017	0,318	1,76
Potencial ζ (mV \pm SD)	21,30 \pm 0,28	21,19	0,37
Deseabilidad		0,912	

3.3.2. Caracterización de las micropartículas

3.3.2.1. Contenido de humedad y actividad de agua. El contenido de humedad y la actividad de agua son parámetros importantes en la evaluación de la calidad y vida útil de los polvos. Estas dos características han sido empleadas para describir el contenido de agua en este tipo de productos (88,89). Sin embargo, cabe anotar que miden dos “tipos” de agua; por un lado, el contenido de humedad es la medida de la cantidad de agua en la matriz del polvo expresada en gramos de agua por gramo de sólido seco; y la actividad de agua es la medida de agua disponible en un sistema para las reacciones químicas y microbiológicas (90).

En este estudio, los polvos obtenidos en ambas formulaciones mostraron un porcentaje de humedad por debajo del 5,4%, sin tener diferencias significativas entre ellas ($p > 0,05$) (Tabla 14). Además, los resultados son similares con lo reportado por Mishra y Mishra, que

obtuvo valores del contenido de humedad entre 2,16% y 5,03% para micropartículas de doxiciclina obtenidas a partir de polímeros mucoadhesivos por secado por aspersión (22).

Tabla 14. Contenido de humedad y actividad de agua (a_w) de las micropartículas (media \pm SD, n = 3)

Muestra	a_w	Contenido de humedad (%)
Polvo F1	0,302 \pm 0,01 a	5,36 \pm 0,05 a
Polvo F2	0,352 \pm 0,01 a	5,24 \pm 0,01 a

Letra distinta en la misma columna indica que son significativamente diferentes $p < 0,05$

Bajo lo descrito por Tontul y Topuz, el contenido de humedad de las dos formulaciones, al estar cercano a 5%, limita la capacidad del agua para actuar como plastificante, por tanto se va a afectar el proceso de aglomeración y apelmazamiento durante el almacenamiento (74).

Por su parte, los datos de actividad acuosa de las micropartículas se encuentran por debajo de 0,6 (Tabla 14), lo cual se considera aceptable para propósitos farmacéuticos según la USP 38 (61). A partir de una a_w de 0,6, empieza a producirse un crecimiento microbiano, lo cual indica que las micropartículas no tienen el agua disponible para generar una inestabilidad microbiológica y ser susceptibles al ataque de bacterias, hongos y levaduras (91).

Generalmente, los polvos obtenidos por microencapsulación presentan un contenido de humedad entre 1% y 6% y una actividad de agua igual o menor a 0,3 (92). La evaluación

del contenido de agua de las formulaciones estudiadas bajo estos dos parámetros se encuentra dentro de estos valores.

Es de especial cuidado controlar las condiciones de procesamiento del producto, en términos de temperatura y humedad relativa, puesto que la humedad del polvo entra en equilibrio con la humedad del aire; además con los bajos valores de actividad acuosa obtenidos, la presión de vapor de las micropartículas es reducida y conlleva a una fácil adsorción de agua en ambientes de humedad relativa alta (93). Adicionalmente, el agua interviene en la cohesión entre partículas, porque aumenta las fuerzas capilares a través del fortalecimiento de puentes de hidrógeno entre estas (88). Esto se verá reflejado en un aumento del tamaño de partícula, apelmazamiento y cambio de las características del polvo original.

3.3.2.2. Tamaño de partícula y potencial ζ . En la Tabla 15 se muestra el tamaño de partícula y el potencial ζ de las micropartículas obtenidas mediante secado por aspersión. Las formulaciones presentaron un tamaño entre 0,3 μm y 0,8 μm , valores esperados en polvos de secado por aspersión, donde normalmente se obtienen partículas de tamaño pequeño (< 50 μm) (94).

El índice de polidispersidad de F2 fue menor a 0,3, valor aceptado como óptimo por la mayoría de los investigadores (95). Este índice indica el grado de dispersión en el tamaño de las partículas. Sin embargo, es común que los polvos obtenidos por secado por aspersión presenten polidispersidad en el tamaño de partícula, debido a la falta de uniformidad del

tamaño en la gota formada en la atomización o a la presencia de diferentes poblaciones de partículas (96).

Tabla 15. Tamaño de partícula y potencial ζ de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión (media \pm SD, n = 3)

Muestra	Tamaño de partícula (μm)	PD*	Potencial ζ (mV)
F1	0,764 \pm 0,066 a	0,367 \pm 0,043	20,62 \pm 1,13 a
F2	0,334 \pm 0,043 b	0,251 \pm 0,011	21,36 \pm 1,84 a

*PD: índice de polidispersidad

Letra distinta en la misma columna indica que son significativamente diferentes $p < 0,05$

Las suspensiones F1 y F2 están preparadas bajo las mismas condiciones: porcentaje de sólidos, velocidad de homogeneización y variables durante el proceso de secado. Por tanto, la variación en el tamaño de partícula se debe, probablemente, a las diferencias en las propiedades físicas de la suspensión de alimentación. Retomando los resultados de la caracterización de las suspensiones en términos de tamaño de partícula, la formulación F2 arrojó un valor promedio de 0,326 $\mu\text{m} \pm 0,017 \mu\text{m}$, el cual es menor y estadísticamente diferente ($p < 0,05$) que el tamaño promedio de F1 (0,437 $\mu\text{m} \pm 0,019 \mu\text{m}$). Un menor tamaño en la suspensión favorece la formación de una menor gota en la atomización, hay mayor área superficial que aumenta el contacto con el aire caliente y es menor la cantidad de solvente por evaporar. Al-Kahtani y Hassan observaron que al disminuir la gota en el proceso de secado por aspersión, también reducía el tamaño de las micropartículas (97).

En términos del potencial ζ , no hubo diferencias significativas entre F1 y F2 ($p > 0,05$). Aunque la carga que las micropartículas adquirieron en solución no estuvo por encima de ± 30 mV, considerándose este criterio como indicador de estabilidad (98), su carga está por encima del valor de neutralidad (-10 mV- $+10$ mV), lo que le permite tener una repulsión electrostática y prolongar el tiempo de agregación (99).

3.3.2.3. Humectabilidad y solubilidad. Las propiedades de rehidratación de las micropartículas fueron evaluadas en términos de humectabilidad y solubilidad (Tabla 16). Se presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$) de cada característica entre las formulaciones.

Tabla 16. Humectabilidad y solubilidad de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión (media \pm SD, n = 3)

Muestra	Solubilidad (%)	Humectabilidad (g/min)
F1	44,68 \pm 0,20 a	0,0287 \pm 0,0011 a
F2	47,26 \pm 0,19 b	0,1131 \pm 0,0015 b

Letra distinta en la misma columna indica que son significativamente diferentes $p < 0,05$

La solubilidad es un parámetro que indica la habilidad de los polvos obtenidos por secado por aspersión para formar una solución o una suspensión en agua. Las formulaciones de este estudio presentaron una mayor tendencia a formar una suspensión, lo cual se puede atribuir a la formación de un recubrimiento que impide la lixiviación de los compuestos de menor peso molecular como la doxiciclina (100).

Esta propiedad está directamente relacionada con las características del agente encapsulante. Por lo tanto, materiales encapsulantes basados en proteína, como la gelatina, generalmente producen polvos con una baja solubilidad (74). Los resultados obtenidos mostraron una solubilidad para F1 significativamente menor que F2, lo cual se asocia con la cantidad de gelatina en la composición de la suspensión de alimentación.

En términos de la humectabilidad, la formulación F1 mostró un menor valor, es decir que tarda más tiempo en humedecerse. Dicha formulación contiene una mayor proporción de gelatina en sus componentes, por lo cual el resultado de humectabilidad podría relacionarse en este caso particular con otra proteína de los estudios realizados por Gaiani et al. y Murrieta-Pazos et al., quienes encontraron que los polvos lácteos con mayor contenido de proteína en la superficie de las partículas toman más tiempo para ser hidratados (101, 102).

3.3.2.4. Ángulo de reposo, densidad aparente y compactada. En el diseño y formulación de productos, las propiedades de fluidez son importantes en el manejo de polvos farmacéuticos durante su procesamiento y almacenamiento. La relación de Hausner (RH), el índice de Carr (IC) y el ángulo de reposo son comúnmente usados en farmacia como indicadores de fluidez de los polvos (88, 103).

Las medidas de fluidez de los polvos de las formulaciones F1 y F2 se describen a partir del ángulo de reposo, el índice Carr (IC) y la Relación Hausner (RH), obtenidos estos dos últimos por la relación entre la densidad aparente y compactada (Tabla 17).

Tabla 17. Propiedades de fluidez de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión (media \pm SD, n = 3)

Muestra	Ángulo de reposo	Densidad aireada o aparente (g/cm ³)	Densidad compactada (g/cm ³)	Índice de Carr, IC (%)	Relación Hausner, RH
F1	48,25 \pm 0,90 a	0,24 \pm 0,003 a	0,35 \pm 0,004 a	29,20 \pm 1,61 a	1,41 \pm 0,03 a
F2	35,90 \pm 0,62 b	0,32 \pm 0,003 b	0,42 \pm 0,004 b	23,33 \pm 0,27 b	1,30 \pm 0,005 b

Letra distinta en la misma columna indica que son significativamente diferentes $p < 0,05$

Como se observa en la Tabla 17, el ángulo de reposo de las micropartículas de F2 estuvo entre 35° y 45°, lo cual indica que las partículas presentan fluidez con algo de cohesividad; diferente a las micropartículas de F1, con un ángulo entre 45° y 55° que representa cohesividad y pérdida de fluidez libre (104).

Basado en los resultados del índice de Carr y la Relación Hausner, la formulación F2 se define como un polvo con fluidez pasable según los rangos de IC: 21% - 25% y RH: 1,26 - 1,34; caso contrario con F1, que se considera como un polvo con pobre fluidez bajo el criterio de IC: 26% - 31% y RH: 1,35 - 1,45 (105).

Con relación a la densidad compactada, una investigación de encapsulación de doxiciclina a partir de polímeros mucoadhesivos, encontró que este parámetro varió de 0,20 g/cm³ a 0,502 g/cm³ y se vio afectado en gran medida por la morfología de las partículas. De este modo, las partículas hundidas y colapsadas fueron estadísticamente menores que las partículas esféricas y lisas (22). En este trabajo, la densidad compactada fue similar a la del

estudio descrito y las micropartículas de la formulación F2 mostraron un mayor valor que las micropartículas de F1. Esta última y como se describe a continuación (sección 3.3.2.5.) se caracterizó por presentar partículas de superficie porosa y con grietas, lo cual influyó en la densidad.

Adicionalmente, dicha diferencia puede asociarse al tamaño de partícula, siendo menor para las partículas de F2 (Tabla 15). De esta forma, cuando las partículas son más pequeñas se puede reducir el espacio entre estas. Este comportamiento permite obtener un mayor valor en la densidad compactada, ya que hay una mejor organización de las micropartículas y se aumenta la cantidad de polvo para ocupar un mismo volumen (106).

La importancia de caracterizar los polvos en términos de fluidez, es que estas propiedades mecánicas se pueden combinar con condiciones ambientales como humedad y temperatura y, con propiedades del producto, como tamaño de partícula y composición química, con la finalidad de agrupar los problemas físicos y químicos relacionados con el producto durante la fabricación y distribución (104).

3.3.2.5. Morfología de las micropartículas. En la Figura 2 se muestra las micrografías SEM de las formulaciones F1 y F2. Se observa que la mezcla de agentes encapsulantes influye en la morfología de las micropartículas, ya que se visualiza diferencias entre ambas formulaciones.

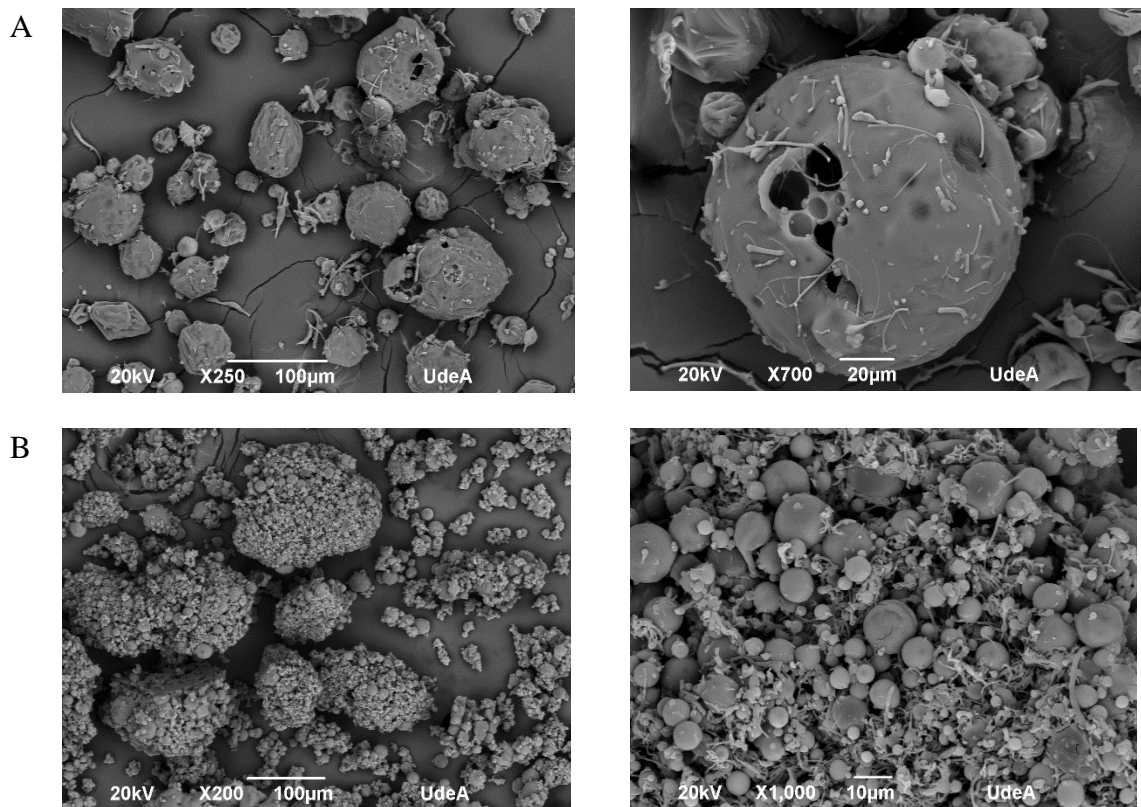


Figura 2. Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las micropartículas obtenidas por secado por aspersión: (A) F1 Gel:Sac (B) F2 Gel:Sac:CMC

Las micropartículas de F1 presentaron grietas, poros, roturas e irregularidades en la superficie. Estos resultados están de acuerdo con el trabajo de Xie et al. que utilizó una mezcla de gelatina y sacarosa para encapsular vitamina A y la superficie de las micropartículas presentó iguales características (45).

Contrario a F1, las micropartículas de F2 se caracterizaron por tener una superficie continua y suave, sin fisuras o grietas aparentes. A partir de lo reportado por Su y colaboradores, la formación de una superficie externa lisa se atribuyó a la adición de CMC, ya que este polisacárido actúa como plastificante y puede retener moléculas de agua unidas a su propia

estructura, de esta forma llena los espacios internos vacíos de las micropartículas preservando la hidratación, evitando las depresiones en la superficie y asegurando así una pared más uniforme y lisa de las micropartículas (83).

Asimismo, tanto en F1 como en F2 se observaron aglomeraciones entre las micropartículas, lo cual es relativamente común en polvos producidos por secado por aspersión (96).

Por último, cabe resaltar que la integridad de la pared es importante para asegurar una mejor retención del activo; además, una superficie suave es una característica deseable para garantizar una menor permeabilidad del vapor de agua y de oxígeno, generando mayor protección de la sustancia encapsulada frente a condiciones ambientales (96). En este mismo sentido, es importante que para futuras investigaciones se analicen y caractericen estas propiedades, con la intención de identificar posibles asociaciones entre su morfología (incluyendo las deformaciones de las micropartículas) y la liberación del fármaco.

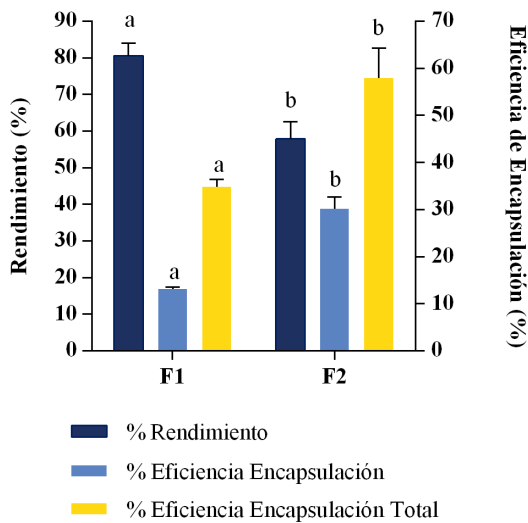
Ahora bien, es importante señalar que para poder realizar una comparación precisa entre las micrografías aquí presentadas, es importante homogeneizar las escalas de medición en la captura de las imágenes, una labor que debe realizarse en un estudio posterior.

3.3.3. Rendimiento y eficiencia de encapsulación

El rendimiento del polvo recuperado en ambas formulaciones fue mayor al 50% (Figura 3A). Este resultado se encuentra dentro de lo esperado, ya que otros estudios que han empleado la técnica de secado por aspersión para la encapsulación de doxiciclina obtuvieron valores de rendimiento desde 20,62% hasta 86,80% (22, 24, 23).

Una de las variables que tiene un impacto en el rendimiento es la viscosidad del líquido de alimentación porque afecta el proceso de atomización; además hay mayor probabilidad que la suspensión quede adherida a las paredes en su transcurso hacia la boquilla (107). Teniendo en cuenta esto, el rendimiento de F2 fue menor en comparación a F1 porque partió de una suspensión de alimentación con una viscosidad de $325,53 \text{ cP} \pm 3,33 \text{ cP}$ mayor a la de la formulación F1 ($246,50 \text{ cP} \pm 5,80 \text{ cP}$).

A



B

Muestra	Cantidad total de doxiciclina en el polvo (g Dox/100 g polvo)	Cantidad total equivalente a doxiciclina base (g DoxBase/100 g polvo)
F1	$3,21 \pm 0,41$ a	$2,78 \pm 0,36$ a
F2	$9,46 \pm 0,62$ b	$8,20 \pm 0,54$ b

Figura 3. (A) Rendimiento y eficiencia de encapsulación en el proceso de microencapsulación de doxiciclina por secado por aspersión (B) Cantidad total de doxiciclina por cada 100 g de polvo. Se muestran resultados promedio \pm desviación estándar (n = 3). Letra diferente en la barra de igual color indica que son significativamente diferentes $p < 0,05$

Dentro del análisis de la eficiencia de encapsulación se identificó que es común que las investigaciones no hagan diferencia entre el activo libre y el encapsulado y hacen el cálculo de este parámetro teniendo en cuenta toda la cantidad del agente en el polvo. Partiendo de esto, en varios estudios de encapsulación de doxiciclina usando polímeros mucoadhesivos por secado por aspersión, la eficiencia de encapsulación total del fármaco obtenida estuvo entre 43,51% hasta 69,00%, lo cual se asemeja a los resultados de F1 y F2 con eficiencias de $34,80\% \pm 1,57\%$ y $57,91\% \pm 6,40\%$, respectivamente (23, 21).

Ahora bien, al momento de establecer la cantidad de producto a administrar para el tratamiento de infecciones intracelulares, se deben tener en cuenta dos puntos: 1) la cantidad de principio activo en los sistemas microparticulados (Figura 3B) y 2) la dosis requerida de doxiciclina base.

Frente a ello, es importante destacar que la dosis diaria de doxiciclina base que se usa en el tratamiento de enfermedades infecciosas puede ser fácilmente administrada con las formulaciones F1 y F2. Estas formulaciones contienen aproximadamente entre 14 y 41 veces más principio activo por cada 100 g, que la dosis máxima empleada en los tratamientos infecciosos (200 mg) (30). Estas concentraciones permiten ofrecer una mayor cantidad de fármaco por formulación, lo cual puede ayudar a proponer otras formas de presentación final del producto.

3.3.4. Liberación *in vitro*

Con el fin de describir y comparar el proceso de liberación de doxiciclina no encapsulada (libre) y encapsulada en micropartículas obtenidas por secado por aspersión, se utilizó un modelo cinético de primer orden que sigue la Ecuación 10:

Ecuación 10

$$Y = Y_{max} * (1 - e^{-K*X})$$

Donde:

Y: contenido de doxiciclina liberada expresado en mg doxiciclina/mL de la solución

Y_{max} : estimación del contenido de doxiciclina liberada a tiempo infinito, expresado en mg doxiciclina/mL de la solución

K: constante de velocidad de liberación (horas^{-1})

X: tiempo (horas)

En la Tabla 18 se indican los parámetros anteriormente mencionados según el modelo aplicado para describir la liberación de doxiciclina, tanto libre como a partir de las micropartículas, bajo los dos valores de pH estudiados. Todas las formulaciones presentaron un buen ajuste al modelo de acuerdo con los valores de R^2 obtenidos por cada una de ellas. Adicionalmente, los residuales siguen una distribución Gaussiana (test de normalidad D'Agostino-Pearson) y la curva se acerca a los puntos de los datos.

Tabla 18. Parámetros cinéticos de liberación de doxiciclina (primer orden), coeficiente de determinación (R^2) y suma de cuadrados de los residuos (SCE)

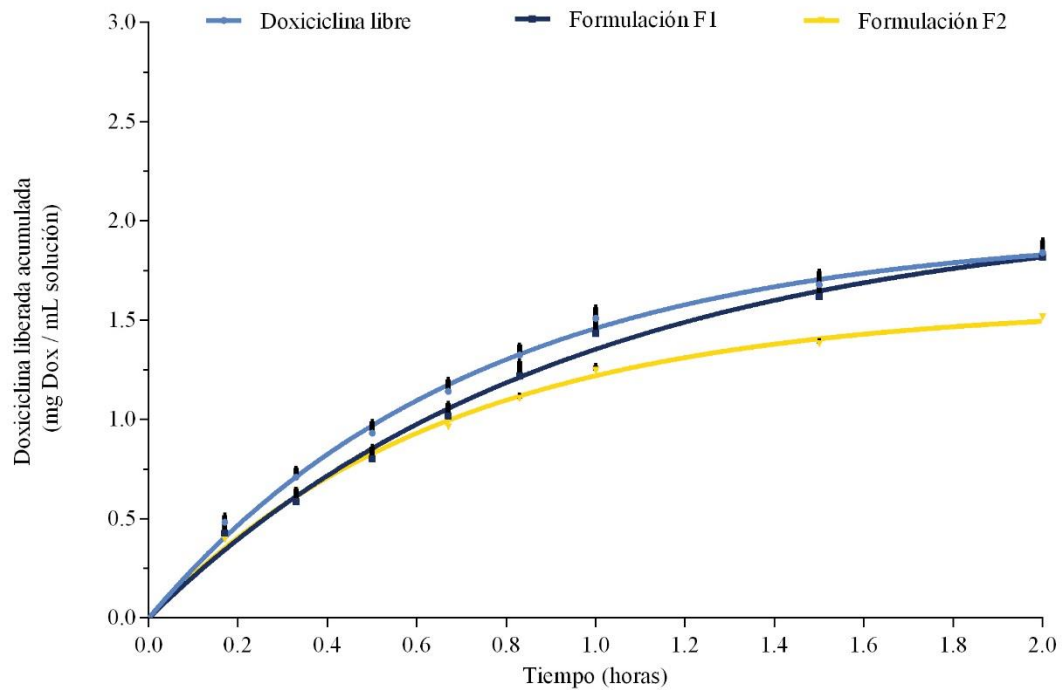
pH	Parámetros	Formulación		
		Doxiciclina libre	F1	F2
1.2	K	1,370	1,070	1,493
	Ymax	1,956	2,0660	1,574
	R ²	0,9815	0,9743	0,9922
	SCE	0,08481	0,1286	0,02281
6.8	K	2,002	2,642	1,972
	Ymax	0,7927	0,6560	0,7013
	R ²	0,9998	0,9994	0,9994
	SCE	0,005280	0,02645	0,01433

El test de normalidad D'Agostino-Pearson de residuales para cada formulación en los dos valores de pH (ácido y básico), arrojó un valor-P mayor a 0,05, por consiguiente, indica que los datos son consistentes con los supuestos de regresión

Al evaluar el valor de K de cada formulación a pH ácido, se esperaría que la velocidad de liberación de las formulaciones microparticuladas fuera menor a la de la doxiciclina libre, pero F2 mostró un mayor valor en la constante de liberación. Sin embargo, en la Figura 4A se observa una liberación más abrupta cuando el fármaco se encuentra libre. La liberación de doxiciclina desde F1 empieza a ser estadísticamente diferente de F2 ($p < 0,05$) a partir de la primera hora y desde este punto comienza a ser más sostenida en F2. Este cambio en la liberación y la mayor retención del activo en la matriz es posible asociarlo con la morfología de las micropartículas, lo que se podría comprobar a través de otros modelos matemáticos que incluyan parámetros de los cambios físicos que sufre el sistema, y de esta forma, se lograría una mayor aproximación en la descripción de la concentración del fármaco en el tiempo. Entre algunos de estos modelos se encuentran: 1) el modelo cinético de la raíz cúbica de Hixson-Crowel; 2) el modelo de Higuchi basado en la linearización de la raíz cuadrada del tiempo; 3) el modelo de langenbucher y; 4) el modelo de la ley del exponente de Korsmeyer-Peppas, el cual permite determinar si tiene lugar o no un proceso de difusión que obedezca la ley de Fick (108).

La micropartículas que componen la formulación F2 se caracterizaron por presentar una superficie lisa y sin grietas, lo cual puede generar una mayor protección del activo en el medio. A esto se le suma que una investigación realizada por Calvo y colaboradores, mostró que el uso de CMC como material de pared, proporcionó protección a las micropartículas contra la condición de digestión ácida gástrica y controló la liberación del agente del núcleo en un fluido intestinal simulado (50). En cuanto a la formulación F1, se consiguió disminuir la velocidad de liberación del activo que se refleja por un menor valor de K comparado con el de doxiciclina libre; no obstante, la cantidad final liberada luego de 2 horas, que normalmente es el tiempo empleado para realizar estudios de liberación de fármacos en condiciones que simulen el medio gástrico (50, 109), es similar a la de doxiciclina libre. Por lo tanto su desempeño en términos de reducción de efectos secundarios es inferior frente a la formulación F2.

A



B

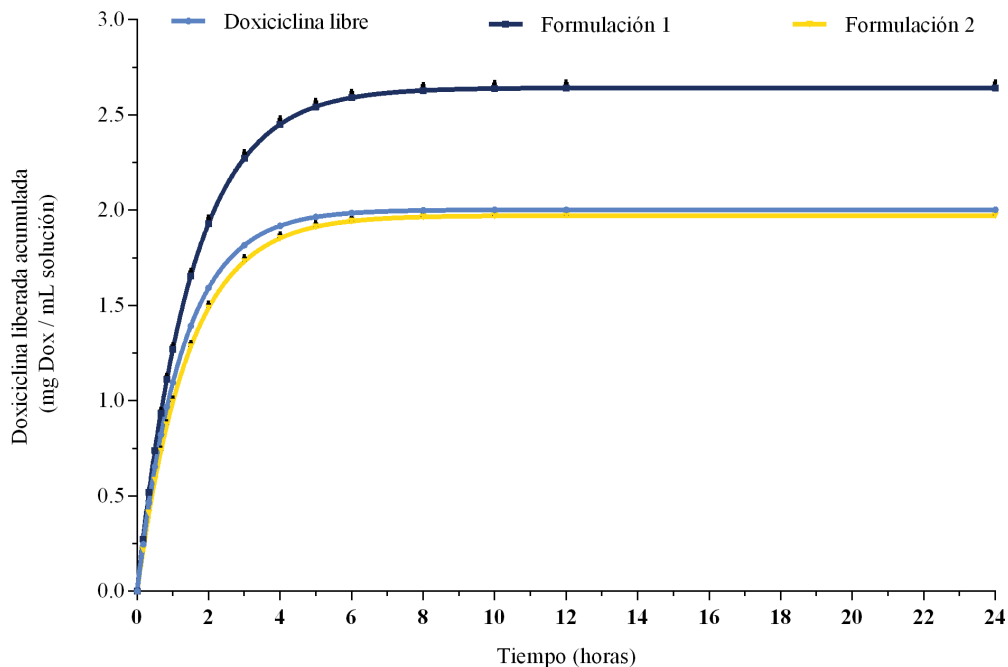


Figura 4. Perfil de liberación de doxiciclina libre y micropartículas obtenidas por secado por aspersion: (A) pH 1,2 (B) pH 6,8

Si se compara el valor de Y_{max} de los modelos cinéticos de cada formulación, obtenidos de la evaluación en medio ácido (pH 1,2), los valores de F1 y doxiciclina libre son similares, mientras que para F2 se obtuvo el menor valor de los tres. Esto es importante, porque al haber una menor cantidad de doxiciclina liberada durante el paso en el sistema gástrico previo al intestino, se puede mejorar la biodisponibilidad del fármaco al disminuir los problemas de absorción, como la formación de quelatos, que es una característica propia de este principio activo (30). De igual modo, cuando la doxiciclina está más protegida en medio ácido, se consigue mitigar la aparición de efectos adversos al atenuar la irritación del tracto digestivo. Es común que luego de una administración oral de doxiciclina se produzca una irritación del estómago y del esófago, con riesgo de producir ulceraciones y vómito, que se acentúan durante administraciones prolongadas (31, 110).

Con el aumento de pH, la formulación F1 tiene una rápida velocidad de liberación (mayor valor de K) y a partir de 8 horas alcanza una concentración constante y aproximadamente de 2,6 mg/mL (Figura 4B). Aunque F2 presentó un perfil similar a la doxiciclina libre, sin diferencias significativas ($p > 0,05$) en la concentración liberada desde 5 horas de transcurrido el proceso; al hacer un análisis total, es decir, teniendo en cuenta las condiciones previas a las que fue sometida la formulación (pH ácido), se podría verificar que hay un cambio en el modo de liberación de la doxiciclina encapsulada en esta formulación ya que la cantidad de fármaco disponible en medio ácido fue menor en F2 y, por tanto, la cantidad de doxiciclina que llega a intestino para ser absorbida será mayor. Como ya se señaló, esto reduce la exposición de la mucosa gástrica al fármaco, disminuyendo dolencias asociadas a la administración de doxiciclina. Lo anterior podría ser verificado a través de un estudio *in vitro* de digestión gástrica e intestinal, empleando soluciones gástricas e intestinales simuladas, como el realizado por Calvo y colaboradores (50).

3.4. CONCLUSIONES

- El diseño de un sistema microparticulado de doxiciclina por secado por aspersión permitió establecer una posible formulación, con potencial farmacéutico, a partir de su caracterización y evaluación del perfil de liberación. La formulación F2 tiene el potencial de ser empleada para el tratamiento de enfermedades intracelulares a través de una administración oral porque presentó características deseables en cuanto a propiedades de fluidez, morfología, eficiencia de encapsulación y protección del fármaco durante su paso por un pH ácido y los materiales empleados para su elaboración son biodegradables y de fácil consecución.
- El proceso de secado por aspersión resultó adecuado para el desarrollo de la formulación, ya que permitió obtener sistemas microparticulados de doxiciclina con porcentajes de rendimiento superiores al 50% y eficiencias de encapsulación entre 34% y 58%
- El proceso de optimización de las condiciones de preparación de la suspensión de alimentación permitió establecer las condiciones ideales con sólidos en 33% y velocidad de homogeneización de 6000 rpm.
- Los datos obtenidos de la caracterización fisicoquímica de las micropartículas mostraron la influencia de las características físicas de la suspensión y el tipo de agente encapsulante empleado sobre las propiedades finales de las micropartículas. El tamaño de partícula del sistema coloidal de la suspensión influyó en la formación de la gota durante la atomización,

afectando de forma directa el tamaño de las micropartículas. Asimismo, la viscosidad del líquido de alimentación afectó el rendimiento del proceso de secado, donde a una mayor viscosidad, el porcentaje de rendimiento disminuyó.

Las características del agente encapsulante influyeron en las propiedades de rehidratación y fluidez. Se observó que una mayor proporción de gelatina disminuye el porcentaje de solubilidad, favoreciendo que los polvos formen suspensiones en agua y la CMC posibilitó la formación de superficies lisas y contribuyó a una menor cohesividad entre las partículas

4. ENCAPSULACIÓN DE DOXICICLINA EN UN SISTEMA LIPOSOMAL: APROXIMACIÓN A UNA FORMULACIÓN CON LIBERACIÓN INTRACELULAR

4.1. MARCO CONCEPTUAL

4.1.1. Vectorización de medicamentos para el tratamiento de infecciones intracelulares

En los sistemas tradicionales de administración de fármacos, como la administración oral o la inyección intravascular, el medicamento se distribuye por todo el cuerpo a través de la circulación sanguínea sistémica y solo una pequeña parte del medicamento llega a los compartimentos intracelulares. El suministro directo y específico de fármacos dentro del compartimento intracelular podría facilitar la concentración del fármaco dentro de los focos de infección y, por lo tanto, podría actuar como un mejor agente terapéutico (111).

Entre las estrategias para la liberación dirigida del principio activo a la diana, se encuentran los nanovehículos cargados de fármaco los cuales representan una alternativa prometedora. Diferentes transportadores farmacéuticos han sido comúnmente estudiados y su funcionalidad se puede modificar con el fin de producir partículas de larga circulación en sangre, otorgar especificidad para que se acumulen en los tejidos o tener la habilidad de responder a estímulos. Algunos de estos transportadores son: nanopartículas metálicas, dendrímeros, nanopartículas a partir de péptidos, liposomas, nanotubos de carbono y «quantum dots» (112).

4.1.2. Liposomas como sistema de transporte de fármacos

Dentro del amplio grupo de sistemas de liberación de fármacos, aparecen los liposomas como sistemas lipídicos de liberación. Estas vesículas fueron descubiertas a inicios de los años 60 por Bangham y colaboradores (113) e inicialmente fueron utilizadas como modelos de membrana biológicas (114). Sin embargo, por su variada versatilidad estructural, su carácter biodegradable y biocompatible, se abrió paso a la utilización de estas vesículas como sistemas de liberación de principios activos. Fue así como a principios de la década de los 70, Gregory Gregoriadis descubrió el potencial de los liposomas en esta área (115).

Una evidencia que da cuenta del amplio uso de los liposomas es la existencia de formulaciones liposomales en el mercado (Tabla 19) (116).

Tabla 19. Formulaciones liposomales aprobadas para uso humano

Producto	Fosfolípido	Principio activo	Año de aprobación
Ambisome®	HSPC y DSPG	Anfotericina B	1990 (Europa), 1997 (USA), 2000
Doxil®	HSPC y DSPG-PEG ₂₀₀₀	Doxorrubicina	1995, 1999, 2003 (Europa, Canadá) 2007
DaunoXome®	DSPC	Daunorubicina	1996 (Europa), 1996 (USA)
Myocet™	EPC	Doxorrubicina	2000 (Europa)
DepoDurt™	DOPC y DPPG	Sulfato de morfina	2004
DepoCyt™	DOPC y DPPG	Citosina arabinosida	1999
Lipo-Dox	DSPC y DSPG-PEG ₂₀₀₀	Doxorrubicina	2001 (Taiwán)
Marquibo	ESM	Vincristina	2012 (USA)

Tomado de Ref. 103. HSPC: Fosfatidilcolina de soya hidrogenada, DSPG: Distearoil fosfatidilglicerol, DSPC: Distearoil fosfatidilcolina, EPC: Fosfatidilcolina de huevo, DOPC: Dioleoil fosfatidilcolina, DPPG: Dipalmitoil fosfatilglicerol, ESM: Esfingomielina de huevo, PEG: Polietilenglicol

Los liposomas son vesículas esféricas que tienen un centro acuoso encerrado por una o más capas de fosfolípidos (117). Están compuestos de una bicapa lipídica con cadenas hidrofóbicas de lípidos y los grupos de las cabezas polares de los lípidos orientadas hacia la cavidad interior y hacia la solución extra vesicular (118).

4.1.2.1. Composición de los liposomas. Los fosfolípidos, compuestos mayoritarios de los liposomas, están normalmente formados por un grupo fosfato, dos alcoholes y dos o más ácidos grasos. En un extremo de la molécula se encuentra el grupo fosfato y un alcohol. Esta zona es la cabeza polar, es decir, tiene carga eléctrica y es atraída por el agua (parte hidrófila). El otro extremo está formado por los ácidos grasos, es neutro, hidrófobo e insoluble en agua, pero soluble en grasas (Figura 5) (119, 120).

Dependiendo de la fuente, los fosfolípidos se clasifican en sintéticos (obtenidos mediante síntesis química) y en naturales, provenientes de plantas, principalmente aceites vegetales (tales como soja, algodón y girasol) y de tejidos animales, como cerebro de bovino y yema de huevo. En términos de producción, la yema de huevo y la soja constituyen la fuente más importante de esta clase de fosfolípidos (116).

Estas fuentes naturales se caracterizan por estar compuestas por diferentes tipos de fosfolípidos; siendo la fosfatidilcolina, también conocida como lecitina, el fosfolípido más abundante. En la Tabla 20 se muestra la composición de ácidos grasos de dos fosfatidilcolinas extraídas de aceite de soja y yema de huevo (120).

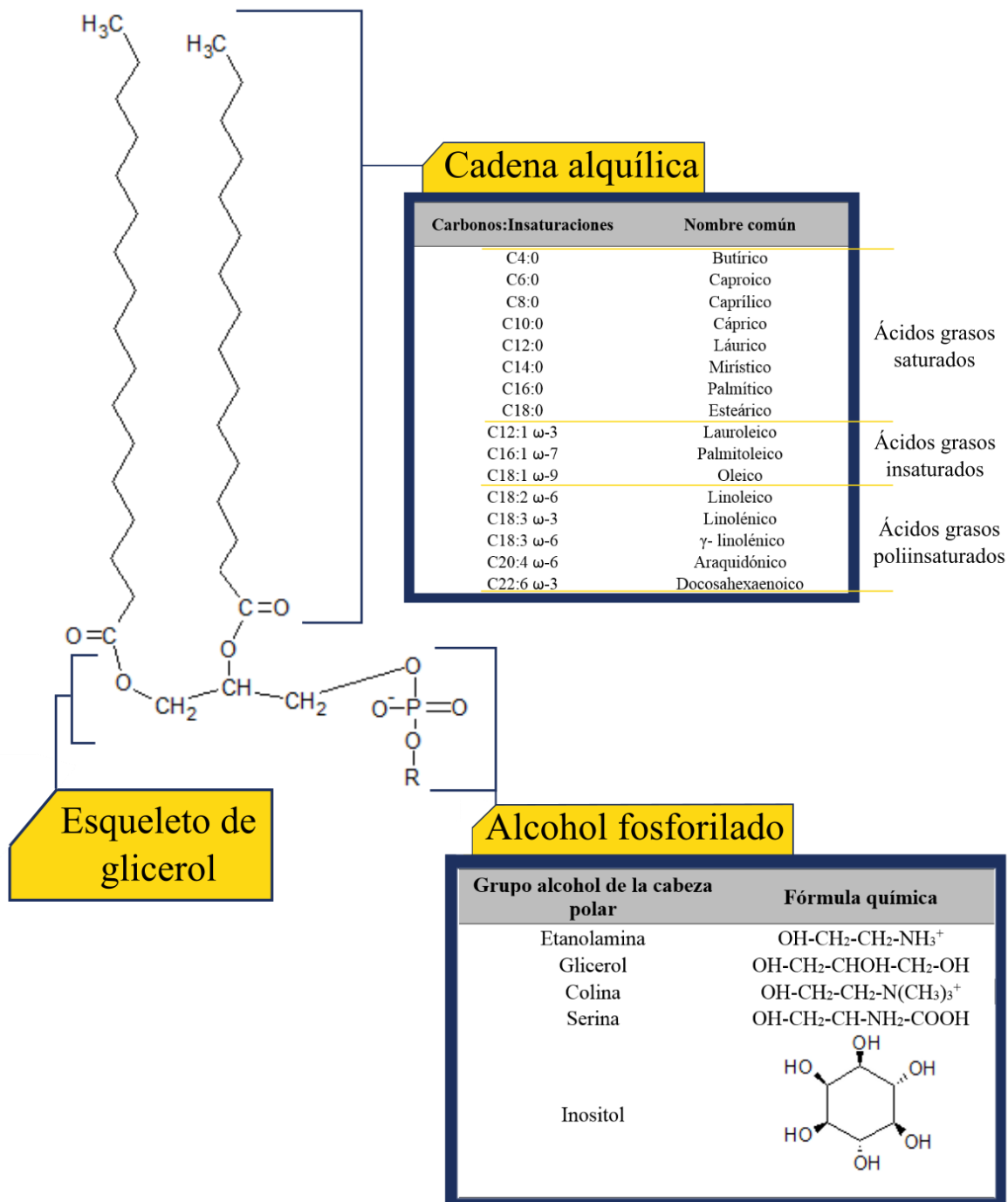


Figura 5. Estructura general de un fosfolípido. Tomado de Ref. (120)

Tabla 20. Composición de ácidos grasos de fosfatidilcolina extraída de yema de huevo y aceite de soja

Composición de ácidos grasos		Fosfatidilcolina	
		Yema de huevo	Aceite de soja
16:0	Palmítico	32	12
16:1	Palmitoleico	1,5	< 0,2
18:0	Estearico	16	2,3
18:1	Oleico	26	10
18:2	Linoleico	13	68
18:3	Linolénico	< 0,3	5
20:4	Araquidónico	4,8	<0,1
22:5	Docosapentaenoico	4,0	<0,1

Tomado de Ref. (120)

Desde el punto de vista económico, los fosfolípidos obtenidos por métodos sintéticos, debido a su pureza, tienen un mayor costo que aquellos obtenidos por fuentes naturales (116).

En el diseño de liposomas, como sistemas lipídicos de liberación controlada, es importante una adecuada selección de los fosfolípidos, ya que estos compuestos tienen diferentes propiedades de acuerdo al tipo de grupo de cabeza y las cadenas alquílicas que los componen; lo que se verá reflejado en las características finales de las vesículas desarrolladas.

En términos de estabilidad química, la oxidación de los fosfolípidos en los liposomas toma lugar principalmente en las cadenas alquílicas de ácidos grasos insaturados (121). A esto se suma que algunos autores señalan que los fosfolípidos saturados como dipalmitoilfosfatidilcolina, forman una bicapa rígida e impermeable, mientras que la fosfatidilcolina insaturada, de huevo o soja, proporciona bicapas más permeables y menos estables (122).

Otro aspecto a tener en cuenta en la selección de los fosfolípidos, es la temperatura de transición principal de fase (T_m), en la cual el fosfolípido pasa de un estado gel a una fase líquida-cristalina. Hay varios factores que afectan esta temperatura entre los que se encuentran: a) la naturaleza del grupo de la cabeza polar. En el caso de los fosfolípidos fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilglicerol (PG), si tienen una misma longitud de la cadena alquílica su T_m será igual, pero si se compara con fosfatidiletanolamina, la T_m de esta será mayor; 2) la longitud de la cadena alquílica, ya que los fosfolípidos con una mayor cadena de ácidos grasos presentan altas T_m ; 3) el grado de saturación de la cadena alquílica, puesto que al comparar fosfolípidos con igual grupo de cabeza polar y longitud en las cadenas de hidrocarburos, aquellos con una mayor saturación, tendrán una mayor T_m y 4) la pureza de los fosfolípidos, debido a que los fosfolípidos de origen natural tienen un amplio rango de T_m que se atribuye a la mezcla de componentes con diferente longitud de la cadena de hidrocarburos; de esta forma, solamente los sintéticos tendrán una T_m definida (116).

A continuación, en la Tabla 21, se muestran la temperatura de transición de algunos fosfolípidos.

Tabla 21. Temperatura de transición principal de fase de fosfolípidos

Fosfolípidos	Abreviación	T _m (°C)
Fosfatidilcolina de soja	SPC	-20 a -30
Fosfatidilcolina hidrogenada de soja	HSPC	52
Fosfatidilcolina de huevo	EPC	-5 a -15
Dimiristoilfosfatidilcolina	DMPC	23
Dipalmitoilfosfatidilcolina	DPPC	41
Dioleoilfosfatidilcolina	DOPC	-22
Distearoilfosfatidilcolina	DSPC	55
Dimiristoilfosfatidilglicerol	DMPG	23
Dioleoilfosfatidilglicerol	DOPG	-18
Distearoilfosfatidilglicerol	DSPG	55
Dimiristoilfosfatidiletanolamina	DMPE	50
Dipalmitoilfosfatidiletanolamina	DPPE	60
Dimiristoilfosfatidilserina	DMPS	38
Dipalmitoilfosfatidilserina	DPPS	51

Tomado de Ref. (116). T_m: Temperatura de transición principal de fase

4.1.2.2. Clasificación de los liposomas. Los liposomas se pueden clasificar de acuerdo a su tamaño (vesículas pequeñas, grandes y gigantes), estructura (uni, oligo y multilamelares) y carga de los fosfolípidos (neutro, aniónico o catiónico) (117).

Por tamaño y número de lamelas

- Vesículas multilamelares grandes (MLV, por sus siglas en inglés *Multilamellar Vesicles*) miden entre 1.000 nm a 10.000 nm. Están formadas por múltiples bicapas

concéntricas, separadas entre sí por un estrecho espacio acuoso que mide aproximadamente 5 nm de grosor. El volumen de líquido encapsulado por la membrana lipídica o “volumen atrapado” es una importante característica de los liposomas y usualmente varía entre 0,5 y 5 μmol de lípido, dependiendo de la composición lipídica y del método de preparación del liposoma. Los volúmenes de atrapamiento son altos, oscilando entre 3 y 5 μmol .

- Vesículas unilamelares grandes (LUV, por sus siglas en inglés *Large Unilamellar Vesicles*) miden de 50 nm a 300 nm y su corteza solo está formada por una sola bicapa lipídica. Tienen volumen de atrapamiento de 1 a 3 μmol de lípido.
- Vesículas unilamelares pequeñas (SUV, por sus siglas en inglés *Unilamellar Vesicles*) miden de 25 nm a 50 nm. Por ser tan pequeñas tienen un radio de curvatura muy estrecho que hace que los lípidos tiendan a ubicarse más en la mitad externa que en la mitad interna de la bicapa. El desbalance de lípidos a través de la bicapa los hace inestables, además que el volumen de atrapamiento es muy pequeño (0,2 μmol) (123, 124).

Por carga

La cabeza polar de los fosfolípidos es quien confiere la carga a los liposomas, por tanto, las moléculas de carácter anfífilico pueden clasificarse según la carga de la cabeza polar como aniónicos (cabeza polar cargada negativamente), catiónicos (cabeza polar cargada positivamente), zwitteriónicos (la cabeza polar puede tener tanto carga positiva como negativa dependiendo del medio) y no iónicos (119). En la Tabla 22 se muestran los fosfolípidos comúnmente usados con su respectiva carga neta a pH 7,0 (116).

Tabla 22. Fosfolípidos comúnmente usados y su carga neta a pH 7,0

Fosfolípido	Abreviación	Carga neta pH 7,0
Fosfatidilcolina	PC	0
Fosfatidiletanolamina	PE	0
Fosfatidilserina	PS	-1
Ácido fosfatídico	PA	-1
Fosfatidilinositol	PI	-1
Fosfatidilglicerol	PG	-1
Cardiolipina	CL	-2

Tomado de Ref. (116)

4.1.2.3. Métodos de preparación. El uso de diferentes métodos de preparación produce liposomas de distintos tipos. El tamaño de los liposomas puede ser reducido por sonicación, extrusión u homogeneización (125). Los pasos básicos que se siguen en todos los métodos son: a) eliminación del disolvente orgánico en el que se encuentran disueltos los lípidos; b) dispersión e hidratación de los lípidos en medio acuoso; c) purificación de los liposomas resultantes; d) análisis del producto final (119).

Algunos de los métodos utilizados para la preparación de liposomas se describen en la Tabla 23.

Tabla 23: Métodos de preparación de liposomas

Método de preparación	Descripción	Tipo de vesícula	Ref.
Hidratación de película	Hidratación mediante agitación de una película lipídica previamente formada por evaporación de una solución de los lípidos disueltos en un solvente orgánico	Vesículas MLV con una distribución heterogénea de tamaño y lamellaridad	(126)
Inyección de etanol	Inyección lenta, por medio de una jeringa, de una mezcla lipídica (disuelta en etanol o éter) sobre una solución acuosa caliente, seguido de la evaporación del solvente	Vesículas SUV	(120)
Evaporación en fase reversa	Formación de una emulsión acuosa/orgánica por sonicación y luego los liposomas son obtenidos por evaporación de la fase orgánica	Vesículas LUV con un rango de tamaño entre 150 nm a 450 nm	(127)
Diálisis de detergente	Obtención de liposomas a partir de una mezcla de fosfolípidos y un detergente de concentración micelar crítica alta, como sales biliares y octilglucósido. La remoción del detergente se hace con técnicas como diálisis, cromatografía de columna o adsorción en Biobeds	Vesículas tipo LUV con diámetros promedio de 100 nm	(120)

4.1.3. Direccionamiento de liposomas hacia macrófagos

En particular, la capacidad fagocítica de los macrófagos para eliminar cuerpos extraños y células alteradas y la habilidad de los patógenos para evadir esos mecanismos de defensa y residir dentro de los macrófagos, ha hecho que desde años anteriores diferentes investigadores hayan direccionado su interés hacia estas células como objetivo terapéutico (128–130). Así mismo, se ha identificado que los sistemas de liberación de fármacos hacia macrófagos constituyen una estrategia potencial en el tratamiento de infecciones intracelulares (4, 131, 132).

El proceso de interacción de los liposomas con el sustrato biológico se puede llevar a cabo por 4 posibles mecanismos : 1) intercambio o transferencia de lípidos o proteínas entre el liposoma y la membrana celular; 2) adsorción del liposoma en la membrana celular, a la cual no sigue su incorporación al interior de la célula; este fenómeno modifica la permeabilidad tanto del liposoma como de la membrana celular favoreciendo no sólo el paso del fármaco del liposoma al citoplasma, sino también el intercambio de lípidos entre las dos membranas; 3) fusión del liposoma con la membrana celular y posterior vertido del contenido al interior del citoplasma o la membrana, según la lipofilia del fármaco; 4) endocitosis, la cual se trata de una fagocitosis del liposoma intacto que, una vez en el interior de la célula, se funde con los orgánulos subcelulares, y al ser atacados por la acción de las fosfolipasas se libera el fármaco (133).

La ventaja que presentan los liposomas para el tratamiento de estas enfermedades es que al ingresar en sangre son rápidamente captados por células del Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF), como los macrófagos (128). Sacando ventaja de la función de homeostasis y el papel como células fagocíticas, se usan los liposomas como “caballo de troya” para liberar fármacos en el interior de los macrófagos (1).

El uso experimental de liposomas en modelos *in vitro* o *in vivo* para varios tipos de enfermedades infecciosas relacionadas con macrófagos, han sido revisadas por Alving (134), por Emmen y Storm (135) y por Wasan y Lopez-Berestein (136). Estos autores recopilaron diversas investigaciones en la que se emplearon liposomas como vectores de fármacos en el tratamiento de Leishmaniasis, malaria, tuberculosis, infecciones fúngicas, VIH e infecciones causadas por *Brucella* spp., *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium*.

Varias investigaciones han direccionado su estudio para determinar las condiciones óptimas de captación de los liposomas por los macrófagos, determinadas por factores como el tamaño, la composición y las propiedades de superficie de este mecanismo de transporte de fármacos. Algunos autores han indicado que los liposomas cargados negativamente se asocian más rápido y liberan su contenido efectivamente en el interior de los macrófagos en contraste con liposomas neutros y cargados positivamente (137, 138). Liposomas pequeños pueden liberar los principios activos de forma más efectiva en comparación con los grandes, ya que son mayormente internalizados (139). En cuanto a la composición, cierta clase de fosfolípidos son preferiblemente reconocidos por macrófagos, como la fosfatidilserina (PS) (139, 140).

La versatilidad de los liposomas ayuda a que sean utilizados con otros compuestos. Por ejemplo, ciertos cambios en la cubierta de los liposomas empleando ligandos o polímeros pueden mejorar la especificidad, selectividad, mucoadhesividad y respuesta inmune de estas vesículas (141). En particular los carbohidratos pueden mediar las interacciones de los liposomas con las células diana. Por ejemplo, se ha identificado que receptores de manosa se expresan abundantemente en

macrófagos del hígado, bazo y alvéolos (142). Estudios han empleado liposomas manosilados para aumentar la efectividad en el direccionamiento de los mismos hacia los macrófagos (141–144).

Diversas estrategias se han utilizado para direccionar los liposomas hacia macrófagos, no solo en el tratamiento de infecciones intracelulares, sino también hacia otras enfermedades donde estas células están involucradas (Tabla 24).

Tabla 24. Empleo de liposomas en el tratamiento de enfermedades que involucran macrófagos

Formulación	Principio activo	Tamaño	Materiales	Indicaciones	Ref.
NP-siRNA Liposomas	4 medicamentos anti TB (INH, RIF, PZA y SM) y TGF- β 1 siRNA encapsulados en liposomas pegilados	265,1 nm	Colesterol/1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[amino(polietilenglicol)-2000](DSPE-PEG2000)	Tratamiento de Tuberculosis (TB), <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	(145)
αEnv-A-LUVs (Inmunoliposomas asimétricos)	Sistema vacío (nanosistema lipídico creado para tener una buena circulación en sangre y ligar partículas del virus y por efecto <i>flip-flop</i> exponer la PS para ser internalizados por macrófagos, y así eliminar el virus)	N.R	<u>Capa externa:</u> Esfingomiolina de cerebro de porcino (BsM)/dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE) <u>Capa interna:</u> fosfatidiletanolamina (DOPE)/1-palmitoil-2-oleoil-fosfatidilserina (POPS)	Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH)	(146)
LE-doxy	Doxiciclina (doxy) encapsulado en liposomas cargados negativamente por un sistema de gradiente de ácido sulfúrico	3178 nm	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina(DPPC)/ colesterol y esfingomiolina(SPH)/colesterol	Para infecciones causadas por <i>Mycobacterium smegmatis</i> , el cual se alberga en macrófagos	(11)
Prototipo liposomal de ciprofloxacina	Ciprofloxacina encapsulado en liposomas cargados negativamente	N.R	Fosfatidilcolina de huevo/colesterol 1:1	Tratamiento contra el patógeno intracelular <i>Francisella tularensis</i> (tularemia neumónica). Dirigido a macrófagos alveolares	(147)
Liposomas manolisados	Proteínas, péptidos y ácidos nucleicos encapsulados en liposomas manolisados	N.R	Distearil fosfatidilcolina (DSPC)/dioleoil fosfatidiletanolamina (DOPE)/colesterol (CH)/mananoO-palmitoil (OPM)	Liberación dirigida a células dendríticas y macrófagos	(141)
Dexametasona liposomas	Dexametasona encapsulada en liposomas	500 nm, 200 nm y 70 nm	Fosfatilcolina de yema de huevo/colesterol/dicetilfosfato 7:2,1	Tratamiento de aterosclerosis. Liberación hacia células espumosas y macrófagos	(148)
Gentamicina liposomas pH-sensibles	Gentamicina encapsulada en liposomas pH-sensibles	N.R	1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina(DPPC)/colesterol 55:45 DOPE-N-succinil-DOPE-PEG-ceramide 69,5:30:0,5 y 65:30:5 DOPE-N-succinil-DOPE-choI-PEG-ceramide 35:30:30:5 y 39,5:30:30:0,5	Tratamiento contra la bacteria intracelular <i>Salmonella entérica</i> Serovar Typhimurium. Dirigido a macrófagos del hígado, riñón y bazo	(149)

NR: No reporta

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Reactivos

Fosfolípidos sintéticos dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dimiristoilfosfatidilserina (DMPS) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Estados Unidos). FluorSave™ reagent, Tween®20, cloroformo, metanol y ácido acético glacial grado analítico y, acetonitrilo y metanol grado HPLC (Merck, Darmstadt, Alemania). Paraformaldehído (Carlo Erba Reagents, Milán, Italia). Medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), PBS (1X) pH 7,4 Gibco®, Tripsina (1X) y marcador nuclear Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos). Fluoróforo DiO Vybrant® solución de marcación celular V22886 (Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, Estados Unidos).

4.2.2. Preparación de liposomas

4.2.2.1. Efecto de la solución de hidratación sobre el tamaño y carga superficial de liposomas vacíos. Los liposomas se prepararon por el método de evaporación en fase reversa (REV), según lo descrito por Mertins y colaboradores con algunas modificaciones (150). Se hicieron tres formulaciones independientes con el fosfolípido DMPC a una concentración de 6 mg/mL. Brevemente, en un balón de fondo redondo se formó una emulsión agua en aceite (W/O) con la adición de 25 µL de agua destilada a la solución del fosfolípido en cloroformo y sonicación por 2 min a 40 kHz, 66% de potencia y 30 °C (Ultrasonido serie DYT, Scientz, Ningbo, China). Posteriormente, el solvente orgánico fue evaporado en rotavaporador (R114 Buchi, Alemania), con baño de agua (B-480, Buchi, Alemania) por

encima de la T_m ($> 25^\circ\text{C}$) y con bomba de vacío (R 300, Boeco, Alemania) a 60 MPa, hasta observar la formación del organogel. A continuación, los balones fueron cubiertos con aluminio para protegerlos de la luz y se dejaron en desecador durante la noche.

Después de esto, los liposomas se obtuvieron adicionando al organogel tres tipos de soluciones de hidratación (buffer fosfato salino - PBS 10 mM pH 7,4 compuesta por 136,9 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na_2HPO_4 y 1,5 mM KH_2PO_4 ; agua destilada y buffer fosfato 10 mM pH 7,4 compuesta por 3,88 mM NaH_2PO_4 y 6,12 mM Na_2HPO_4) con el fin de evaluar el efecto de estas soluciones en el tamaño y la carga superficial de las vesículas.

Con la intención de obtener LUV, las suspensiones de liposomas se sometieron a sonicación por 2 min. Acto seguido, y con la finalidad de producir poblaciones homogéneas de vesículas unilamelares e incrementar el volumen de atrapamiento, las suspensiones se expusieron a tres ciclos de congelación-descongelación (*freeze-thaw*) en los que las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido (-196°C) por 10 segundos y descongeladas en baño maría a 50°C por 1 min (151, 152). Finalmente, los liposomas fueron homogeneizados por un proceso de extrusión en un mini-extruder (Avanti Polar Lipids, Canadá- Estados Unidos) utilizando membranas de policarbonato (Whatman) de 200 nm.

4.2.2.2. Efecto de DMPS sobre tamaño y potencial ζ de las vesículas. Los liposomas vacíos fueron preparados a una concentración de 6 mg/mL por el método de evaporación en fase reversa REV, empleando como solución de hidratación buffer fosfato (10 mM) pH 7,4.

Con el fin de determinar el efecto de un fosfolípido aniónico sobre el tamaño de las vesículas y garantizar un valor de potencial ζ negativo (entre -60 mV a -30 mV) frente a liposomas elaborados con un fosfolípido neutro, se evaluaron cuatro diferentes relaciones molares de DMPC y DMPS; 7:3 que representa un incremento del 30,7%, 1:1 del 50,9%, 1:3 del 75,6% y 1:5 del 83,8% de DMPS en relación masa/masa.

Para garantizar la disolución del DMPS en el solvente orgánico, la mezcla de los fosfolípidos fue disuelta en cloroformo:metanol 8:2

4.2.2.3. Capacidad de encapsulación de doxiciclina en vesículas lipídicas. Se prepararon liposomas por el método REV utilizando los fosfolípidos DMPC y DMPC:DMPS 1:1 (59,9%), con la presencia y sin la presencia de doxiciclina (blanco).

Se evaluó la capacidad de los liposomas neutros y aniónicos para incorporar cantidades crecientes de doxiciclina (0,1 mM, 1 mM, 5 mM, 10 mM, y 15 mM) dejando constante la concentración de fosfolípidos a 6 mg/mL. Adicionalmente, se observó el efecto de esta incorporación sobre el tamaño y potencial ζ de las vesículas.

Es importante tener en cuenta que, al ser la doxiciclina hclato un compuesto soluble en agua, su adición en el sistema liposomal, se debe hacer en la solución de hidratación, como se implementó en la preparación de los liposomas.

4.2.3. Caracterización formulación liposomal

4.2.3.1. Tamaño y potencial ζ . El tamaño y potencial ζ de los liposomas, se determinó utilizando el procedimiento descrito en la sección 3.2.5.3. La preparación de las muestras consistió en la dilución de los liposomas (6 mg/mL) hasta alcanzar una concentración de 0,3 mg/mL en agua ultrapura. Cada suspensión liposomal se leyó por triplicado.

4.2.3.2. Eficiencia de encapsulación. Para cuantificar la cantidad de doxiciclina encapsulada en liposomas, se tomó 1 mL de la formulación liposomal y se llevó a centrifugación a 14000 rpm durante 1 hora a 4 °C. Posteriormente, se eliminó el sobrenadante (material no encapsulado) y los liposomas fueron desestabilizados por la adición de 200 μ L de solución de Tween®20 al 1,0% y sonicación durante 5 min a 58 KHz y 99% de potencia. Finalmente, el contenido de doxiciclina se cuantificó por HPLC-DAD (sección 3.2.6.1).

Para el cálculo del porcentaje de eficiencia de encapsulación se empleó la Ecuación 11:

Ecuación 11

$$\text{Eficiencia de encapsulación (\%)} = \frac{\text{Cantidad de doxiciclina en los liposomas}}{\text{Cantidad de doxiciclina a encapsular}} \times 100$$

4.2.4. Incorporación de doxiciclina liposomal en macrófagos

4.2.4.1. Cultivo celular. Para esta investigación se cultivaron macrófagos de la línea celular DH82 (ATCC® CRL-10389™) en frascos Falcon® T25, adicionando 50 mL de medio DMEM

y suplementados con 10 mM de HEPES y 5% (v/v) de FBS. El cultivo celular se mantuvo en incubadora con CO₂ al 5% y 37 °C (Binder CB 150, Tuttlingen, Alemania). Luego de alcanzar una confluencia mayor al 90%, las células fueron desprendidas con 1 mL de tripsina 1X dejando actuar por 15 min en incubadora y, posteriormente, fueron lavadas con 10 mL de DMEM (centrifugación por 10 min a 1800 rpm). Una vez lavadas, se procedió a sembrar las células en un plato de 24 pozos, en los cuales se agregaron 2×10^5 células/pozo. Para la visualización de la captación de liposomas por microscopía confocal, previo a la adición de células, a cada pozo se agregó un cristal de 0,16 mm de espesor y 12 mm de diámetro. Acto seguido, las células se dejaron adherir en el plato durante 24 horas de incubación, tiempo en el que se proyecta que se alcanzó una cantidad aproximada de 3×10^5 células/pozo según la tasa de crecimiento para esta línea celular (153). Los grupos de tratamientos de macrófagos empleados fueron los siguientes: a) grupo control (sin tratamiento); b) grupo de células con liposomas sin marcar DMPC-DOX o PCPS-DOX; y c) grupo de células con liposomas marcados DiO-DMPC-DOX o DiO-PCPS-DOX. Adicionalmente, se hizo un análisis en dos fases; en la primera, se incubó la formulación PCPS-DOX a cuatro diferentes tiempos (15 min, 30 min, 1 hora y 2 horas); y en la segunda, se realizó la comparación de internalización entre DMPC-DOX y PCPS-DOX.

Los liposomas PCPS-DOX y DMPC-DOX, empleados para obtener DiO-PCPS-DOX y DiO-DMPC-DOX, respectivamente, se marcaron con la sonda fluorescente DiO (perclorato de 3,3'-dioctadeciloxacarbocianina) de acuerdo con lo propuesto por Claassen con algunas modificaciones (154); 1 mL de la formulación liposomal de doxyciclina se incubó con 3,62 µL de la solución de DiO (1 M) a temperatura ambiente durante 10 min en oscuridad. El

marcador no enlazado en la membrana de las vesículas fue removido por centrifugación a 14000 rpm por 1 hora a 4 °C, luego el sobrenadante fue retirado y 500 µL de buffer fosfato (10 mM) pH 7,4 fueron adicionados sobre el botón, se agitó a 3000 rpm en vórtex por 1 min y nuevamente se procedió a centrifugar, este paso se repitió una vez más para completar un total de 3 lavados. La eficiencia de incorporación de la sonda se verificó por análisis de los sobrenadantes de cada lavado en espectrofluorómetro Synergy HT (Biotek Instruments Inc, USA) a ex/em 485/528 nm, hasta no observar diferencias significativas ($p > 0,05$) en la unidad relativa de fluorescencia (RFU) entre cada lavado. Finalmente, el botón fue resuspendido en 1500 µL de buffer fosfato y a partir de esta suspensión se hizo una dilución 1/32 con medio de cultivo DMEM (concentración final del fosfolípido de 0,125 mg/mL) (155). Las formulaciones liposomales no marcadas PCPS-DOX y DMPC-DOX fueron tratadas bajo las mismas condiciones sin la adición del marcador DiO.

4.2.4.2. Fase 1. Una vez completadas las 24 horas de adherencia de las células en el plato, se hizo un lavado con 500 µL de PBS en todos los grupos. A continuación, se dejó al grupo control con medio de cultivo, y en cada pozo de los grupos tratamiento b y c, se agregaron separadamente 200 µL de las formulaciones liposomales anteriormente descritas (PCPS-DOX y DiO-PCPS-DOX) y fueron incubadas en los tiempos ya señalados. Cumplido el tiempo de incubación, se lavaron las células, del grupo control y de los grupos tratamiento, tres veces con PBS y se agregaron 200 µL de solución de paraformaldehído al 10% a cada pozo y luego se dejaron en una atmósfera humidificada con CO₂ al 5% y 37 °C por 20 min. Acto seguido, se dejó el plato en refrigeración a 4 °C hasta procesar los cristales y rastrear la incorporación por microscopía confocal.

4.2.4.3. Fase 2. Para realizar la comparación de internalización de las dos formulaciones liposomales, se agregaron, de forma separada y por duplicado, 200 μ L de DMPC-DOX y PCPS-DOX (grupo tratamiento b); y DiO-DMPC-DOX y DiO-PCPS-DOX (grupo tratamiento c). Luego se incubaron bajo las condiciones de cultivo anteriormente descritas durante 1 hora. Cumplido el tiempo, las células se fijaron con paraformaldehído al 10 %, y los cristales fueron tratados con Hoechst para la tinción del núcleo.

El procesamiento de los cristales consistió en la tinción del núcleo con Hoechst, para lo cual, el paraformaldehído fue retirado y las células fueron lavadas 5 veces con PBS, luego se trataron con solución de cloruro de amonio 50 mM en PBS, dejando en contacto durante 5 min. Se lavaron las células unas 5 veces más y se aplicó solución de Hoechst 2 ppm en PBS y se dejó actuar por una hora y media a temperatura ambiente y en oscuridad. Por último, los cristales fueron lavados y se pegaron de forma inversa en un portaobjetos con FluorSave™.

Los portaobjetos se dejaron reposar por 24 horas a temperatura ambiente, antes de hacer la lectura en el microscopio confocal. Las imágenes fueron capturadas en un microscopio confocal láser de barrido Olympus FV1000 acoplado a un software de análisis de imagen FluoView FV10-ASW2.1, con el objetivo 60X (PlanApo N 60x Oil NA 1.42 WD 0.15 mm). De cada cristal de las formulaciones DiO-DMPC-DOX y DiO-PCPS-DOX, se capturaron dos fotos de diferentes campos y de cada una se calculó el perfil de la intensidad de fluorescencia del canal verde (DiO 484/501 nm). Así mismo se hizo un conteo visual del

número total de células por campo y se identificaron las células que contenían liposomas marcados en su interior; esto con el fin de hallar el porcentaje de células positivas para la incorporación de liposomas.

Con la intención de corroborar los resultados del análisis por microscopía confocal, se realizó un estudio preliminar por citometría de flujo siguiendo los mismos parámetros de preparación de las muestras anteriormente descritos. Sin embargo, debido a las características de este ensayo, luego de la hora de incubación, fue necesario desprender las células antes de fijarlas con paraformaldehído al 10 %, y de esta forma obtener las células en suspensión.

Previo a la lectura, fueron mezcladas las suspensiones de las repeticiones de cada tratamiento, grupo control y grupo tratamiento b y c. El análisis se realizó en el citómetro de flujo LSR-Fortessa (BD Biosciences, Alemania), equipado con tres láseres. Las muestras se excitaron a 488 nm con un láser de cristal de zafiro de fase sólida y la fluorescencia fue detectada con un filtro de 530/30 nm. Para cada muestra, fueron adquiridos 10.000 eventos y los datos se analizaron en el programa FlowJo (Tree star, USA). Los parámetros evaluados fueron: dispersión frontal o *forward scatter* (FSC), dispersión lateral o *side scatter* (SSC), intensidad mediana de fluorescencia (IMF) y comparación del área bajo la curva en el histograma.

4.2.5. Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software Graph Prad Prism 6.01 (GraphPad Software, Inc. Estados Unidos). Los datos del efecto de la solución de hidratación en la formación de

vesículas lipídicas y efecto de la concentración de doxiciclina en el tamaño y potencial ζ , se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) de un factor con el fin de realizar el test de diferencias significativas; posteriormente los resultados se sometieron al pos-test de Tukey. Adicionalmente se usó el test no paramétrico Mann-Whitney para comparar la captación de dos formulaciones liposomales de doxiciclina en células DH82. Los valores se consideraron significativos para un valor $p < 0,05$.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Preparación de liposomas

4.3.1.1. Efecto de la solución de hidratación en el potencial ζ y el tamaño del liposoma Dentro de las soluciones de hidratación empleadas para la preparación de liposomas se encuentran: agua destilada, soluciones buffer, solución salina y soluciones no electrolíticas como aquellas compuestas por azúcar (121).

Aunque el agua no cumple con la propiedad fisiológica (osmolaridad) para una preparación liposomal *in vivo* (156), se quería analizar si presentaba alguna diferencia con las soluciones buffer evaluadas.

Propiedades fisicoquímicas como el tamaño del liposoma y la carga superficial, tienen una gran influencia en la eficiencia del liposoma como “drug carrier” *in vivo*, en la liberación controlada y en la biodisponibilidad (125).

Así mismo, durante el proceso de preparación de liposomas, la hidratación influye en el tipo de vesícula a formar (número de capas, tamaño y volumen de atrapamiento). Otros factores que influyen en la velocidad de formación del liposoma y en su morfología es la rata de adición de la solución de hidratación, temperatura de agitación y condiciones iónicas. Estas variables pueden generar diferentes tipos de preparaciones liposomales a pesar de partir de una misma concentración y composición lipídica e igual volumen de hidratación (156).

El efecto del medio de hidratación en el tamaño y potencial ζ es importante para determinar la solución a usar en la preparación de liposomas con fines de uso *in vivo*. Al evaluar tres soluciones de hidratación (agua destilada, buffer fosfato salino (PBS) 10 mM pH 7,4 y buffer fosfato 10 mM pH 7,4) (Tabla 25), se observa que no hay diferencias significativas en el tamaño de vesículas vacías ($p > 0,05$) y los valores promedio del índice de polidispersidad, para cada suspensión, indican que en todos los casos se formó una dispersión monodispersa ($PD < 0,3$) (95).

Tabla 25. Efecto de la solución de hidratación en la carga y tamaño de liposomas vacíos tipo LUV, (media \pm SD, n = 3)

Solución de hidratación (pH)	Potencial ζ (mV)	Tamaño de partícula (nm)	PD*
Agua destilada	-11,027 \pm 1,824 a	162,433 \pm 2,750 a	0,089 \pm 2,173
Buffer fosfato 10 mM (7,4)	-8,370 \pm 2,503 b	157,233 \pm 9,811 a	0,109 \pm 0,037
PBS 10 mM (7,4)	-2,350 \pm 0,368 c	154,367 \pm 5,558 a	0,119 \pm 0,013

*PD: índice de polidispersidad. Letra distinta en la misma columna indica que son significativamente diferentes $p < 0,05$. Las lecturas de tamaño y potencial ζ se realizaron a 25 °C

En cuanto al potencial ζ , las cargas de las vesículas para los tres casos es neutra (valores alrededor de -10 mV y +10 mV) (99). El fosfolípido DMPC se caracteriza por tener una carga neutra a pH 7,0; sin embargo, es la orientación de los grupos que hacen parte de la cabeza del liposoma quienes determinan la carga superficial de la membrana (157).

Makino y colaboradores propusieron un modelo para la orientación de los grupos de cabeza de lípidos a partir de un estudio con liposomas preparados con fosfatidilcolina y analizaron la dependencia del potencial ζ con la temperatura y la fuerza iónica (158). De esta forma, a baja fuerza iónica, el potencial ζ es más negativo debido a que el plano del grupo colina se encuentra por debajo del plano del grupo fosfato, mientras que a mayor fuerza iónica, el potencial ζ es más positivo debido al cambio de orientación de la cabeza polar (127).

El valor menos negativo en la carga superficial de las suspensiones liposomales se obtuvo a partir de la solución de hidratación PBS. Esto se puede explicar porque se neutralizan las cargas de la superficie por las sales que se están adicionando (NaCl y KCl) y los iones se pueden adsorber sobre la superficie del liposoma. Adicionalmente, se podría pensar que este medio provoca una inclinación del plano colina-fosfato hacia afuera de la bicapa, con lo cual las vesículas adquieren un potencial ζ más positivo.

Los valores de potencial ζ en agua destilada demuestran la presencia de una carga superficial, lo que podría explicarse por la reorientación de los grupos de cabeza lipídica (157). El potencial ζ es un factor importante que confiere estabilidad a las nanopartículas: valores altos favorecen la repulsión entre las partículas y aumentan la resistencia a la

agregación (159). Con el agua destilada se obtuvo el valor más negativo en potencial ζ , lo que genera un sistema coloidal más estable. Sin embargo, cabe recordar que el agua no es una alternativa adecuada para la preparación de una formulación liposomal inyectable y que las soluciones buffer estudiadas son compatibles con el medio fisiológico (160). De esta forma, entre las dos soluciones buffer, por sus resultados en potencial ζ , la mejor opción en este caso es el buffer fosfato pH 7,4.

4.3.1.2. Efecto de DMPS sobre tamaño y potencial ζ de las vesículas. Como se observa en la Figura 6, la adición de fosfatidilserina a liposomas neutros de DMPC reduce el tamaño de las vesículas lipídicas, probablemente debido a la mayor posibilidad de empaquetamiento de estos fosfolípidos. Este resultado es consistente con lo reportado por Makino et al., quienes señalaron que al aumentar la concentración de PS desde 0,7% mol a 14,0% mol en un sistema compuesto por fosfatidilcolina y colesterol, se reduce el tamaño de la vesícula desde 180,0 nm a 128,6 nm (140).

Es bien sabido que la carga superficial en los liposomas depende de la composición de los fosfolípidos, específicamente del tipo de cabeza polar, pues existen fosfolípidos zwitterónicos, catiónicos y aniónicos, dependiendo de la función química unida al fosfato. En este sentido, la adición del fosfolípido aniónico PS produjo un cambio significativo en el potencial ζ de vesículas neutras, haciendo que la carga superficial fuera más negativa. Cuando se hace la adición del 50,9% de PS, se evidencia una saturación, ya que la carga del liposoma comienza a disminuir (se acerca más a cero) respecto a las concentraciones de 75,6% y 83,8% PS.

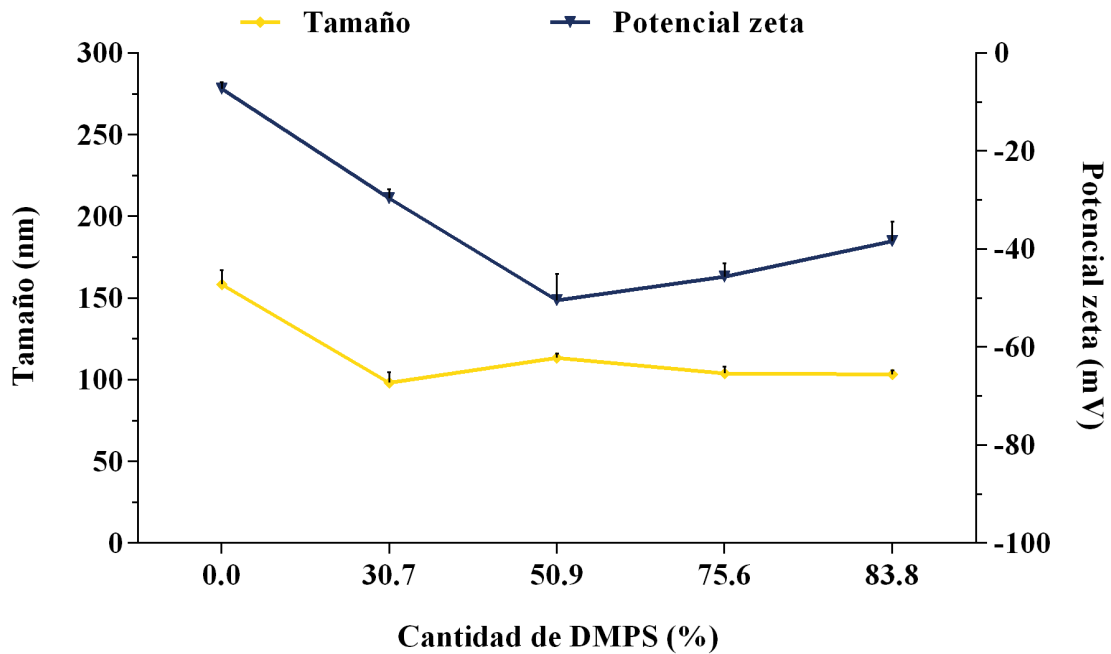


Figura 6. Efecto de la composición de fosfolípidos (DMPC:DMPS) sobre la carga superficial y el tamaño de liposomas vacíos.

Desde la perspectiva de la teoría DLVO, la cual se considera como un punto de partida útil para intentar comprender los sistemas coloidales complejos como emulsiones, espumas y suspensiones, se pueden emplear unas “reglas empíricas” para dar una estimación del grado de estabilidad de un sistema coloidal a partir del valor del potencial ζ de las partículas dispersas. Siendo así, las partículas coloidales son más estables cuando el potencial ζ es -30 mV o más negativo; e inestables, debido a una aglomeración, cuando el potencial ζ se encuentra entre -5 mV y $+5$ mV (69).

Igualmente, la fuerza de repulsión que surge del solapamiento de las dobles capas eléctricas que rodean a los liposomas cargados, es la razón principal de su estabilidad y la forma de

prevenir la fusión de las bicapas. Esta fuerza de repulsión actúa contra cada superficie y lo hace en oposición a cualquier intento de disminuir la distancia de separación (69, 127).

En este sentido, la adición de 50,9% PS, que equivale a una relación molar PC:PS 1:1, hace que el potencial ζ sea más negativo en comparación con la relación 7:3 (30,7% de DMPS), pasando a $-50,33 \text{ mV} \pm 2,73$ desde $-29,60 \text{ mV} \pm 1,39 \text{ mV}$ y además, a partir de este punto, cantidades superiores de PS producen una saturación del sistema. Por esta razón, se estableció la relación molar PC:PS 1:1 como el sistema liposomal aniónico para los siguientes ensayos.

4.3.1.3. Capacidad de encapsulación de doxiciclina en vesículas lipídicas. El estudio del efecto de la incorporación de cantidades crecientes de doxiciclina sobre el tamaño de liposomas neutros (DMPC) y aniónicos (DMPC:DMPS 1:1), mostró que para el caso del fosfolípido DMPC hay una relación inversa entre la concentración de doxiciclina y el tamaño. Se observó una disminución desde $166,1 \text{ nm} \pm 2,9 \text{ nm}$ (liposomas vacíos) hasta $122,9 \text{ nm} \pm 9,18 \text{ nm}$ (liposomas con 15 mM de doxiciclina), cambio que se empieza a evidenciar a partir de la concentración de 1 mM. Por el contrario, con el sistema mixto DMPC:DMPS 1:1, solamente la mayor cantidad de doxiciclina adicionada (15 mM) produjo un leve incremento en el diámetro promedio de los liposomas. Estos cambios se pueden atribuir a diferencias en la organización molecular (empaquetamiento) de los fosfolípidos en la membrana, causada por la interacción fármaco-lípido que tiene lugar durante la formación de la vesícula (Figura 7) (161).

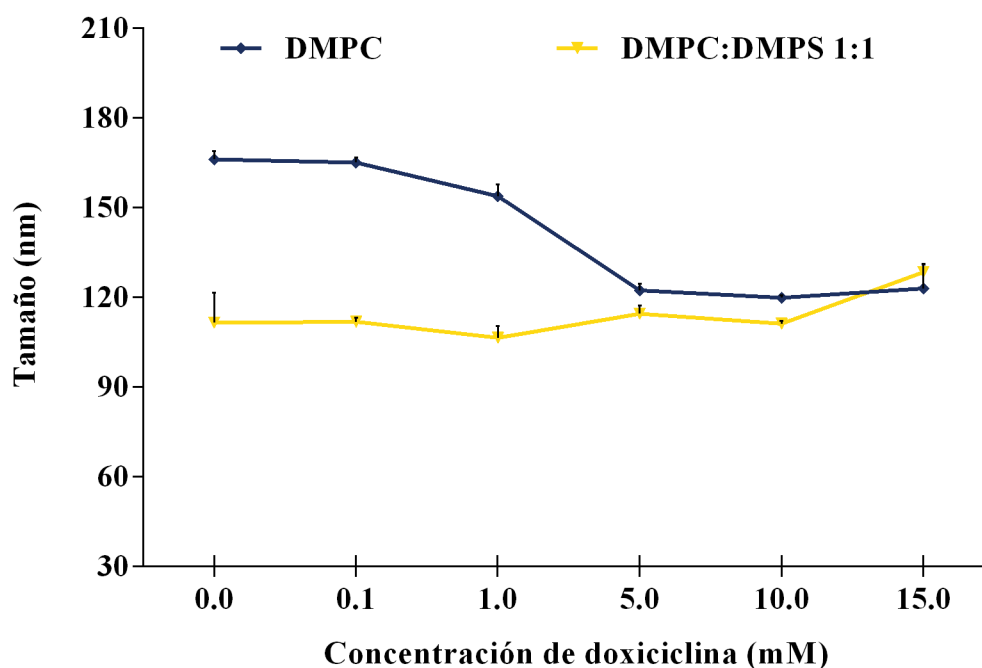


Figura 7. Efecto de la incorporación de cantidades crecientes de doxiciclina sobre el tamaño de liposomas compuestos de DMPC y DMPC:DMPS 1:1

Una aproximación a la interacción entre doxiciclina y vesículas lipídicas fue realizada por Malekar y colaboradores, quienes encontraron que la adición de doxiciclina a una concentración de 2 mM en liposomas compuestos por DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina), no altera significativamente la temperatura de transición principal (pasó de 42,96 °C a 41,86 °C). Esto sugiere que la doxiciclina no se asoció con la bicapas lipídicas y, en cambio, se incorporó en el núcleo acuoso o se adsorbió parcialmente en la superficie de la bicapa (19).

De este modo, los cambios en el tamaño de las vesículas con el aumento de la concentración de doxiciclina, va estar marcado principalmente por la ubicación de la doxiciclina y su interacción con la cabeza polar. Además, la diferencia entre ambos sistemas liposomales,

radica en el grupo terminal de la cabeza polar, ya que en los liposomas mixtos tienen además de la colina por el DMPC, la serina del DMPS.

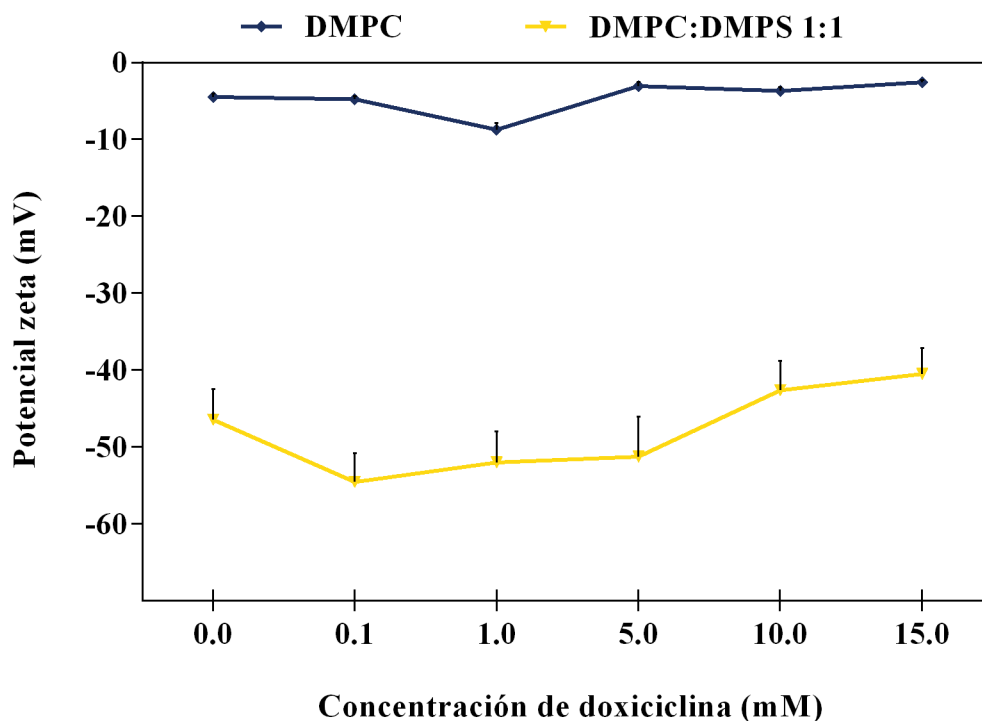


Figura 8. Efecto de la incorporación de cantidades crecientes de doxiciclina sobre la carga superficial de liposomas compuestos de DMPC y DMPC:DMPS 1:1

En cuanto al efecto en la carga superficial de las vesículas, el incremento en la cantidad de doxiciclina adicionada no generó una variación en los sistemas de DMPC y el valor del potencial ζ se mantiene dentro del rango de neutralidad (+10 mV y -10 mV). En el caso de los liposomas de DMPC:DMPS 1:1, se observó que hay pequeños cambios con el aumento de doxiciclina, se hace más negativo y a partir de 10 mM comienza a ser más positivo; sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas con respecto a los liposomas vacíos ($p < 0,05$) (Figura 8). La doxiciclina es una molécula que tiene tres valores

de pKa (3,02, 7,97 y 9,15) (162) y en un medio con un valor de pH 7,4 se va a encontrar en su forma zwitteriónica (Figura 9B), lo cual podría explicar que no hubo modificaciones en la carga de la superficie con aumentos de la concentración de doxiciclina.

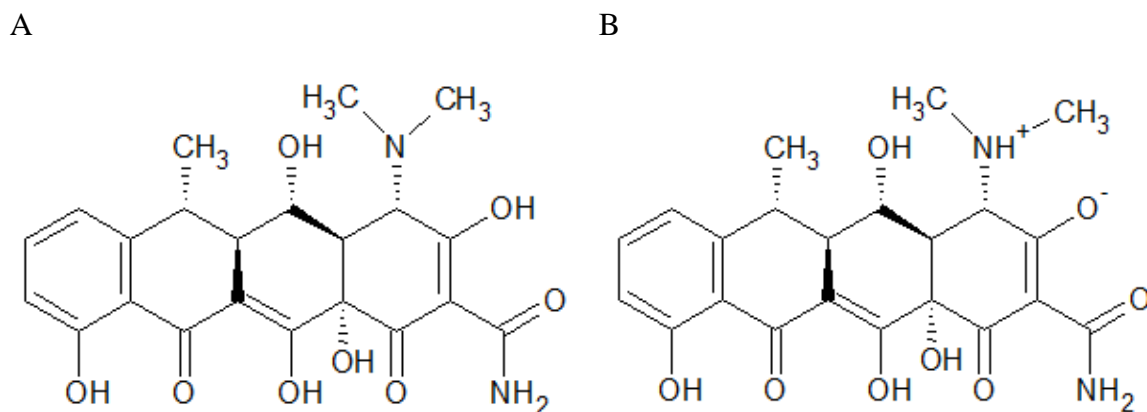


Figura 9. (A) Estructura química de doxiciclina; (B) Ionización de doxiciclina a pH 7,4, información obtenida de Chemicalize.

Además, basado en lo descrito por Malekar y colaboradores, la doxiciclina a pH fisiológico, no afecta la orientación de los fosfolípidos o el entorno de los grupos fosfato de la cabeza polar de vesículas lipídicas de DPPC, ya que el análisis por espectroscopía de resonancia magnética nuclear de fósforo-31 (³¹P-RMN) mostró que no hubo cambios en el espectro de liposomas vacíos frente al espectro de liposomas con doxiciclina (19). Esto también explica que para los dos sistemas lipídicos propuestos (DMPC y DMPC:DPMS 1:1), no se encontraron diferencias significativas en el potencial ζ con aumentos en la concentración de doxiciclina, porque el grupo fosfato se mantiene expuesto hacia la superficie, sin modificación en la orientación de la cabeza polar.

No obstante, se necesitan más estudios para comprender el efecto de atrapamiento de doxiciclina en las vesículas compuestas por DMPC y DMPC:DMPS 1:1. Algunas técnicas que permitirían investigar los cambios en las propiedades dinámicas de diferentes regiones de los liposomas y que han sido empleadas en otros estudios, son: calorimetría diferencial de barrido (DSC), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) (163, 164).

En términos de la capacidad de encapsulación de los liposomas, se puede apreciar en la Tabla 26 que, en ambos sistemas, al aumentar la cantidad de doxiciclina a encapsular, el contenido incorporado también incrementa, aunque en el caso de DMPC a una concentración de 15 mM hay una saturación, que puede deberse a la interacción específica de este fármaco con el grupo terminal colina del fosfolípido DMPC durante la ubicación del activo en el centro acuoso o en su adsorción en la superficie de la vesícula. Dicha interacción va a ser diferente con el sistema liposomal mixto por la presencia del grupo terminal serina que lo aporta el fosfolípido DMPS.

Asimismo, cuando se preparan liposomas con cantidades bajas de doxiciclina, esta se incorpora mejor en las dos formulaciones. De tal manera que en el sistema de DMPC a una concentración de 0,1 mM se logra incorporar 0,0060 mM que representa una eficiencia de 5,98%, mientras que para DMPC:DMPS 1:1 a una concentración de 1 mM se encapsula 0,0417 mM que equivale a una eficiencia de 4,17%.

Al comparar los dos sistemas, el neutro (DMPC) tiene una mayor capacidad para encapsular doxiciclina con el incremento de la concentración y, en cada valor evaluado, se observaron

diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto al sistema aniónico (DMPC:DMPS) (Tabla 26).

Tabla 26. Incorporación de doxiciclina en liposomas neutros y aniónicos, (media \pm SD, n = 3)

Doxiciclina adicionada (mM)	Doxiciclina incorporada (mM)		Doxiciclina incorporada (%)	
	DMPC	DMPC:DMPS 1:1	DMPC	DMPC:DMPS 1:1
0,1	0,0060 \pm 0,0006 a	0,0019 \pm 0,0004 b	5,98 \pm 0,60 a	2,06 \pm 0,55 b
1,0	0,0166 \pm 0,0007 a	0,0417 \pm 0,0066 b	1,66 \pm 0,07 a	4,17 \pm 0,66 b
5,0	0,1435 \pm 0,0164 a	0,0879 \pm 0,0026 b	2,87 \pm 0,34 a	1,76 \pm 0,05 b
10,0	0,6028 \pm 0,0665 a	0,1248 \pm 0,0080 b	6,02 \pm 0,66 a	1,25 \pm 0,80 b
15,0	0,2719 \pm 0,0481 a	0,2028 \pm 0,0489 b	1,81 \pm 0,32 a	1,35 \pm 0,33 b

Concentración y porcentaje se analizaron separadamente. Se hizo la comparación entre la misma concentración de doxiciclina para los dos sistemas liposomales, letra distinta en la misma fila indica que son significativamente diferentes $p < 0,05$

En la Figura 10 se hace evidente que la cantidad de doxiciclina incorporada en los dos sistemas aumenta conforme se incrementa la cantidad de principio adicionado durante la preparación. Se observa que los liposomas compuestos por DMPC:DMPS no han llegado al punto de saturación, en tanto que el sistema de DMPC se logra saturar con cantidades por encima de 10 mM.

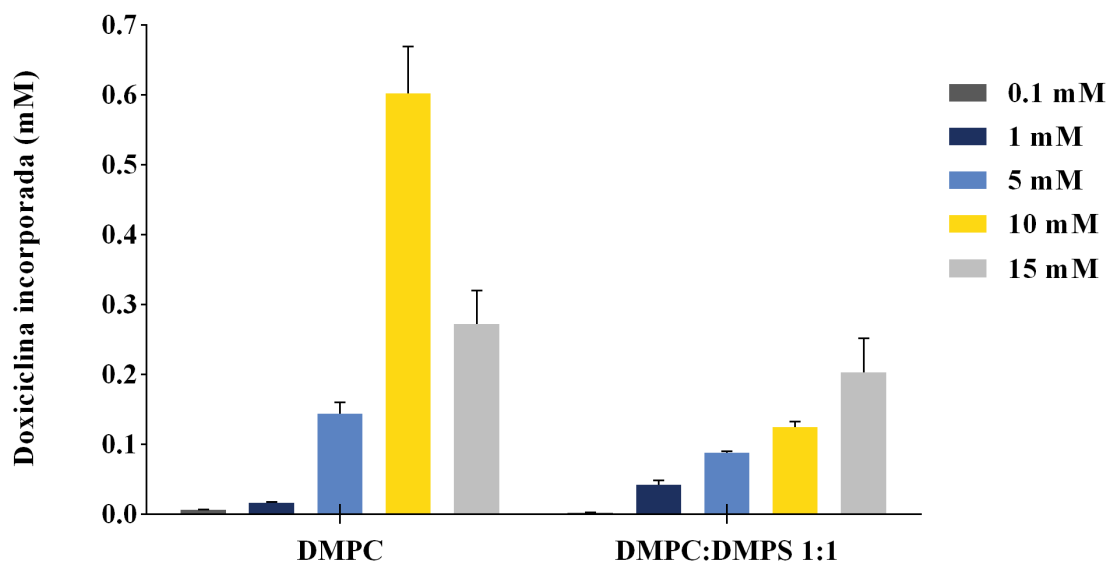


Figura 10. Doxyciclina incorporada en liposomas construidos con DMPC y DMPC:DMPS 1:1

Los resultados de eficiencia de encapsulación obtenidos en los dos sistemas liposomales se pueden contrastar con otros estudios, los cuales también usaron liposomas para encapsular doxyciclina (Tabla 27). En estos trabajos se obtuvieron mayores eficiencias en comparación con las dos formulaciones desarrolladas; sin embargo, estas diferencias se atribuyen al tipo de fosfolípido, la concentración de lípidos empleada y al tamaño de las vesículas. Para el caso 1, a pesar de utilizar concentraciones de fosfolípido y doxyciclina similares a las de la presente investigación, 2 mg/mL y 0,264 mM respectivamente, se alcanzó una eficiencia de encapsulación mayor e igual a $16,29\% \pm 1,53\%$; sin embargo, se resalta que el tipo de liposoma elaborado fue MLV, lo cual puede favorecer para este tipo de fármaco la interacción con la membrana y el atrapamiento. Por otro lado, en el caso 2 se desarrollaron vesículas de tamaño inferior a 100 nm, pero la concentración de fosfolípidos es 10 veces mayor a la del presente estudio, de esta forma se modifica la curvatura y el empaquetamiento en la membrana, que se refleja en un aumento en la eficiencia.

Finalmente, el caso 3 y 4 tienen en común el tamaño de partícula que es superior a 1 μm y, como se mencionó anteriormente, este tipo de vesículas al parecer favorecen la encapsulación de doxiciclina.

De forma general, se destaca que las investigaciones de la Tabla 27 emplearon DPPC, que es un fosfolípido con cadena alquílica de 16 carbonos (C_{16}) y colesterol que otorga fluidez a la membrana. Esto se relaciona con lo descrito por Budai y colaboradores, quienes señalaron que la estructura fluida de lecitina permite que la doxiciclina se sumerja (más profundamente) en la membrana liposómica (27).

Tabla 27. Liposomas como sistemas de encapsulación de doxiciclina en publicaciones indexadas

No. Caso de estudio	Método preparación	Fosfolípido	Concentración fosfolípido	Concentración Doxiciclina	Solución de hidratación	Eficiencia	Tamaño	Potencial ζ	Ref.
1	Hidratación de película	DPPC	2 mg/mL (2,95 μ mol)	0.1354 mg/mL (0,264 mM)	Buffer fosfato pH 7,0	16,29% \pm 1,53%	MLV	0-4 mV	(27)
2	Hidratación de película	Lecitina de huevo-Estearilamina-Chol (7:2:1)	90 μ moles	2 mg/6rmL (0,650 mM)	Agua destilada estéril	28,68% \pm 6,41%	50-100 nm	NE	(28)
		Lecitina-dicetilfosfato-Chol (7:2:1)				49,17% \pm 6,75%			
		Lecitina:Chol (7:1)				21,06 \pm 0,84 %			
3	Hidratación de película	DPPC-Chol (1:1)	NE	NE	Buffer fosfato pH 7,4	37,6%	1,38 \pm 0,01 μ m	0,52 \pm 0,11 mV	(165)
4	Gradiente con ácido sulfúrico	DPPC-Chol	80 μ moles DPPC + 40 μ moles Chol	8,25 mg/mL (16,09 mM) 33 mg/mL (635,84 mM)	Solución salina	97,77% 14,77%	3178 nm	NE	(11)

NE: No se especifica

A pesar de la baja eficiencia de encapsulación obtenida, las dos formulaciones, a las diferentes cantidades de doxiciclina incorporada, lograron encapsular una concentración de doxiciclina por encima de la MIC de tratamientos con este fármaco para infecciones intracelulares causadas por *Staphylococcus aureus* (MIC 11,2 µg/mL), *Ehrlichia* spp. (MIC 0,03 µg/mL) y *Brucella melitensis* (MIC 0,5 µg/mL) (15, 166, 167). Esto es importante porque el sistema de transporte liposomal debe suministrar doxiciclina a las concentraciones terapéuticas deseadas en el sitio de acción, para que esta actúe durante el proceso de la infección, lo cual se conseguiría con las formulaciones desarrolladas en este estudio.

Para finalizar, los liposomas preparados con una concentración de doxiciclina de 10 mM fueron seleccionados para el estudio *in vitro* de captación por macrófagos debido a que, a ese valor de concentración, ambos sistemas presentan un tamaño de partícula similar.

4.3.2. Incorporación de doxiciclina liposomal en macrófagos

La mayoría de infecciones intracelulares ocurren en células con alta actividad fagocítica como macrófagos y células dendríticas (6). La línea celular DH82 empleada para este estudio, histiocitos provenientes de células neoplásicas de un Golden Retriever diagnosticado con histiocitosis maligna, aún conserva la actividad fagocítica y por esta razón fue utilizada para evaluar la capacidad de direccionamiento del sistema liposomal hacia macrófagos (153).

En una primera instancia se hizo un ensayo piloto con 5×10^5 células/pozo y se incubaron durante 1 hora con DiO-PCPS-DOX a una dilución de 1/4 (concentración final de fosfolípido de 3 mg/mL). Luego se verificó la captación de los liposomas al interior de las células en microscopio invertido

de fluorescencia Axio Vert.A1 (Zeiss, Oberkochen, Alemania), encontrándose que la formulación de doxiciclina liposomal DiO-PCPS-DOX es incorporada al interior de las células fagocíticas DH82 (Figura 11).

Pese a que este primer ensayo sirvió para verificar la vectorización de los liposomas, presentó algunos problemas, que fueron de utilidad para las posteriores lecturas (fase 1 y fase 2), como: a) la alta densidad celular que impedía una correcta cuantificación y b) la excesiva concentración de liposomas que dificultaba la comparación entre las dos formulaciones.

Por esta razón, se disminuyó el número de células sembradas por pozo a 2×10^5 células y la concentración del sistema liposomal fue reducida a 0,125 mg/mL, para atenuar la intensidad de fluorescencia.

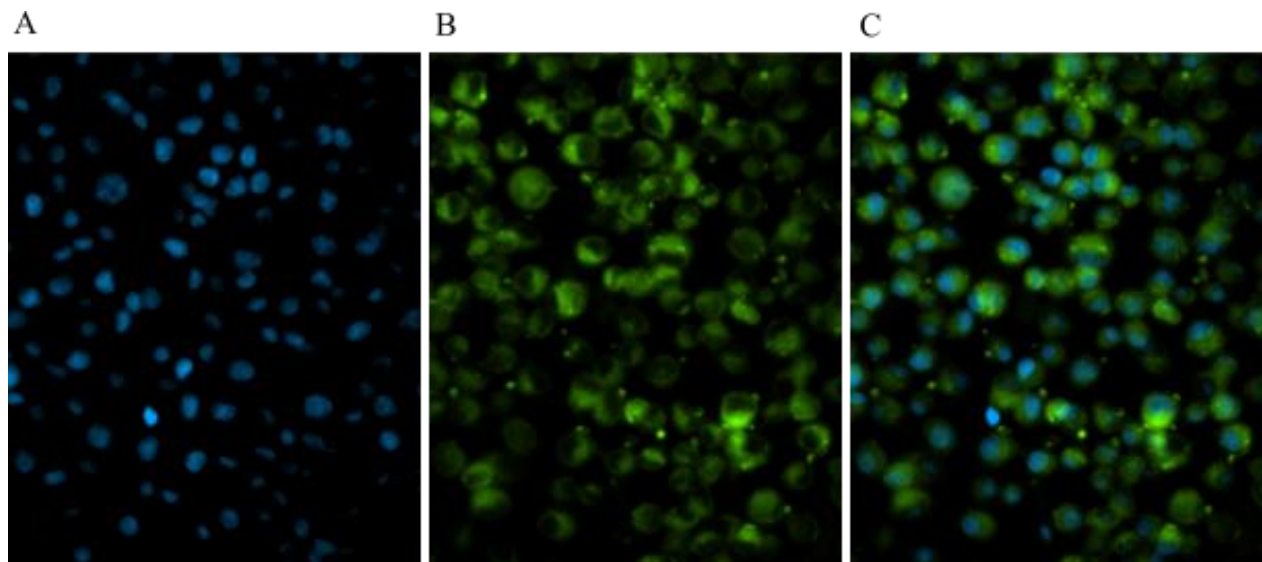


Figura 11. Captación de doxiciclina liposomal DiO-PCPS-DOX en macrófagos de la línea celular DH82 evaluados por microscopía de fluorescencia luego de 1 hora de incubación. Los núcleos se tiñeron en azul con Hoechst (A), doxiciclina liposomal marcada con DiO (B), imágenes superpuestas canal azul y verde (C). Las micrograffías fueron capturadas con un aumento de 60X.

4.3.2.1. Fase 1. A partir del registro visual en los tiempos estipulados, se encontró que con el tiempo se aumenta la internalización de los liposomas (aumento en la aglomeración de puntos verdes al interior de los macrófagos). De esta manera, también se observó que se aumentó la intensidad de la fluorescencia por la acumulación de liposomas dentro de las células (Figura 12).

Este resultado coincide con lo reportado por Raz y colaboradores, quienes observaron un aumento en la radioactividad de liposomas que contenían ^{125}I -BSA con respecto al tiempo de incubación (137).

A partir de este ensayo se estableció el tiempo de incubación para desarrollar la fase 2. El tiempo seleccionado para realizar la comparación entre las dos formulaciones fue el de 1 hora, ya que es el momento en que se puede establecer más claramente las diferencias entre los dos casos.

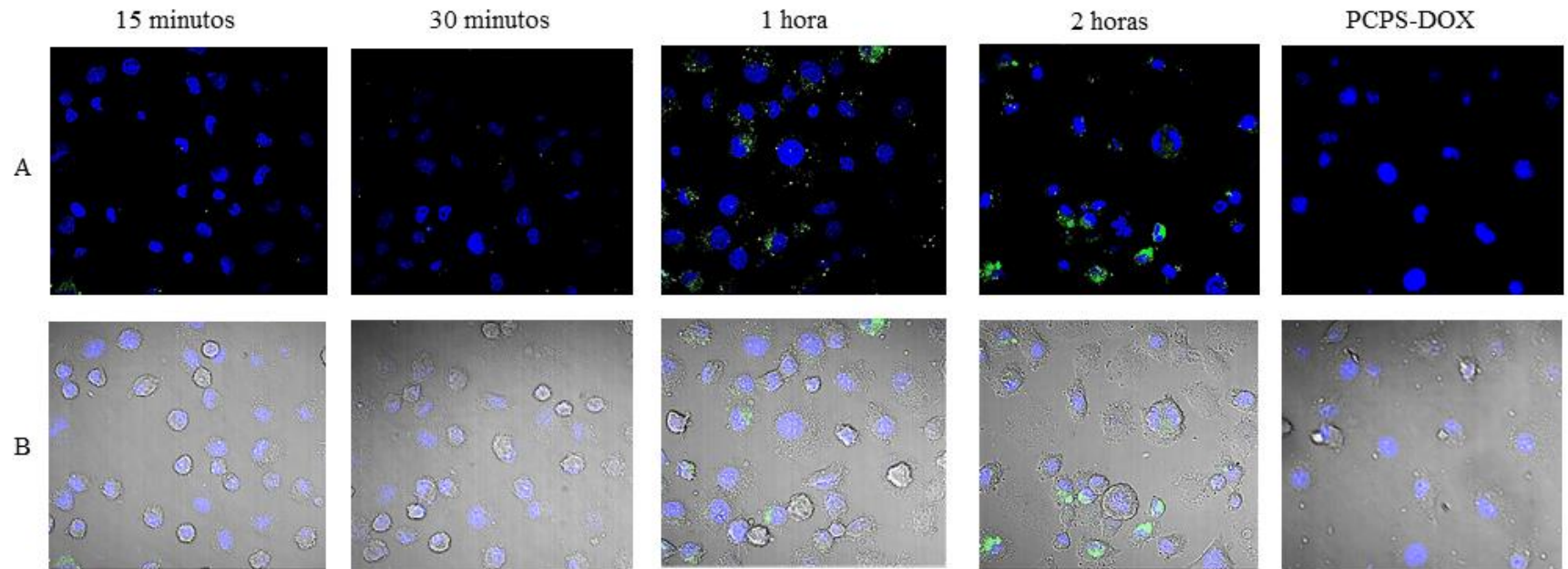
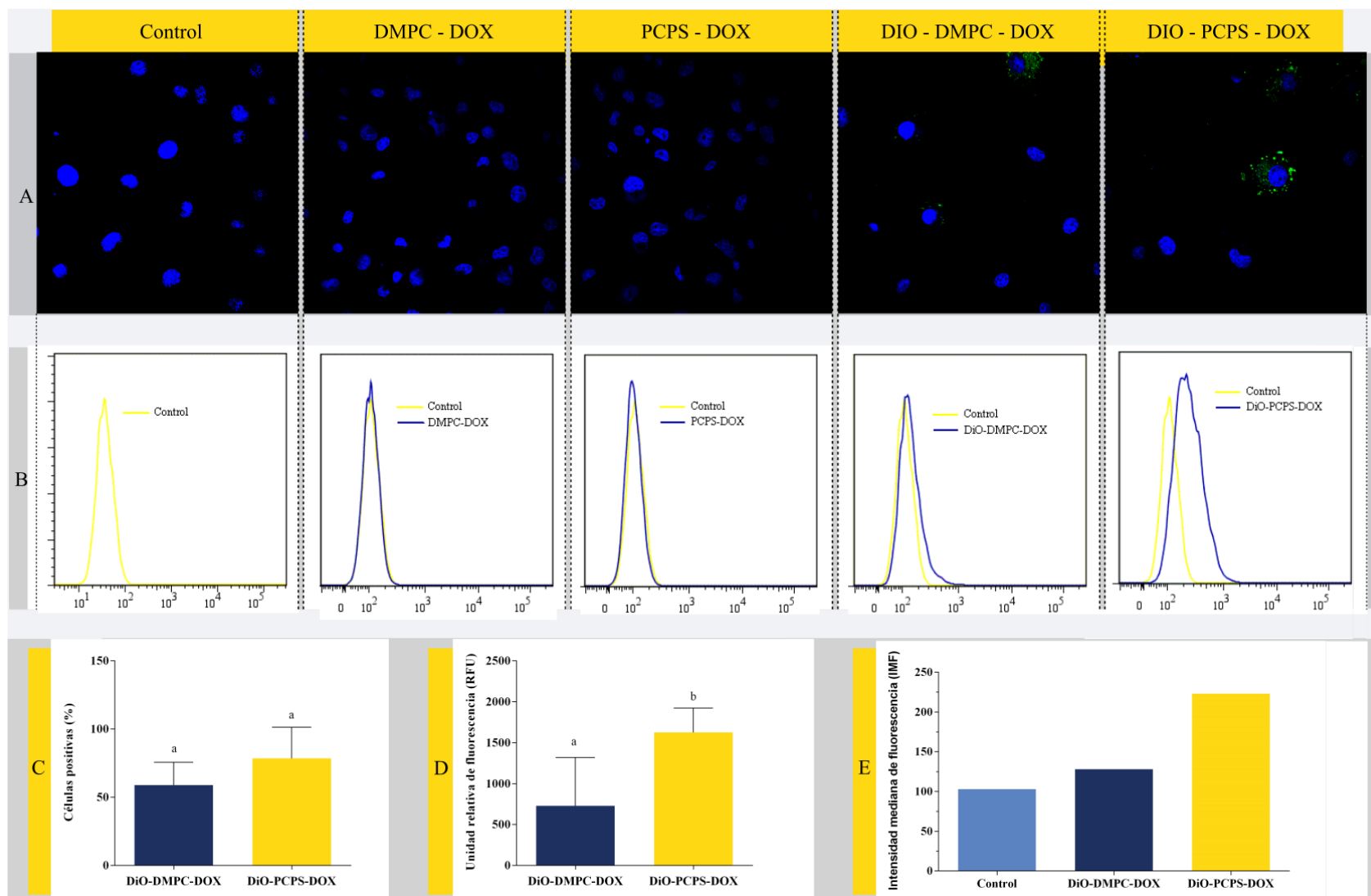


Figura 12. Imágenes de microscopia confocal láser de barrido (CLSM) de células DH82 incubadas con doxiciclina liposomal DiO-PCPS-DOX a cuatro diferentes tiempos (15 min, 30 min, 1 h y 2 h). El núcleo se representa en azul (Hoechst) y los liposomas en verde (DiO). Se muestra la superposición de imágenes: (A) canal azul y verde; (B) canal azul y luz transmitida. Imágenes de células con liposomas sin marcar se presentan en la quinta columna (de izquierda a derecha). La ganancia y el nivel de negro fueron ajustados con el control (células sin tratamiento) y se mantuvieron iguales para todas las muestras evaluadas

4.3.2.2. Fase 2. Los resultados muestran que las dos formulaciones, DiO-DMPC-DOX y DiO-PCPS-DOX, se han internalizado en el citoplasma de las células DH82. (Figura 13A y 13B). No se detectó incorporación de liposomas en el núcleo, lo cual se comprueba por la ausencia de colocalización entre la sonda DiO (liposomas) y el marcador Hoechst.

Se observa que la morfología de las células con tratamiento es similar a las células control (Figura 13A), lo cual indica que la interacción de los liposomas (marcados y no marcados) con las células no causó ningún daño en la membrana celular. Esto se soporta con los resultados obtenidos por citometría de flujo, ya que la comparación univariada de los histogramas de dispersión frontal (FSC) y de dispersión lateral (SSC) entre el grupo control y los grupos tratamiento (analizados separadamente cada tratamiento *versus* el control) por medio del algoritmo de sustracción de Overton (168), mostraron que no hay diferencias significativas en el tamaño y granularidad de las células luego de ser expuestas a las formulaciones liposomales.

Figura 13. Análisis comparación de internalización entre las formulaciones liposomales DMPC-DOX y PCPS-DOX en células DH82, luego de 1 hora de incubación. (A) superposición de imágenes de CLSM, canal azul y verde, de células sin tratamiento (control), células con liposomas sin marcar (DMPC-DOX y PCPS-DOX) y células con liposomas marcados (DiO-DMPC-DOX y DiO-PCPS-DOX); (B) histogramas de intensidad de fluorescencia de DiO colectada en FL1(FITC) obtenidos por citometría de flujo; (C) porcentaje de células con liposomas del total de células por campo evaluado (dos repeticiones por formulación, de cada una dos campos); (D) valores de RFU de DiO por campo evaluado para cada formulación, obtenidos a partir del nerfil de la intensidad de fluorescencia. Los datos obtenidos de CLSM se representan como un promedio \pm SD (n=4); (E) Intensidad mediana de fluorescencia (IMF) de las formulaciones marcadas con DiO y el control.



Adicionalmente, si se hace un análisis desde el punto de vista del modo de internalización de los liposomas en el citoplasma, se podría pensar que siguen un patrón clásico de captación mediada por endocitosis, en concordancia con lo descrito por Raz (137). Esto también se puede justificar porque se visualizan puntos verdes en el citoplasma, correspondientes a la sonda fluorescente DiO, la cual se intercala fácilmente entre los fosfolípidos de la membrana del liposoma (154), además no se observa fluorescencia en la membrana celular y nuclear; por tanto, no hubo un proceso de intercambio o transferencia de lípidos y tampoco una fusión del liposoma con posterior vertido del fármaco (133). Todo esto sugiere que la principal vía de captación es por endocitosis, donde ocurre la fagocitosis del liposoma intacto.

Sin embargo, para confirmar la vía de internalización del sistema liposomal, se pueden hacer estudios que incluyan temperaturas de incubación diferentes (4 °C y 37 °C) para determinar si la captación ocurre por un proceso pasivo (fusión) o activo (endocitosis); asimismo, incluir inhibidores de las vías endocíticas y verificar si el porcentaje de captación se ve afectado. Estos análisis fueron empleados en la investigación realizada por Di Marzio et al. para caracterizar el mecanismo de interacción de vesículas lipídicas y no lipídicas con macrófagos (169).

En principio, todo material particulado tiene altas posibilidades de ser capturado por células fagocíticas (170). En el caso de los liposomas, se ha comprobado que son fácilmente reconocidos como material particulado por los macrófagos y, además, aquellos de menor tamaño liberan más eficiente su contenido en macrófagos (132).

Sin embargo, en este caso se quería determinar si la adición de fosfatidilserina en la membrana lipídica, por ser un marcador de reconocimiento durante el proceso de muerte celular por apoptosis, ejerce un cambio significativo en la captación de la formulación de doxiciclina liposomal (171). De esta forma e iniciando el análisis en términos de la cantidad de células que incorporaron liposomas en su citoplasma (Figura 13C), se observó que no hay diferencias significativas ($p > 0,05$) entre ambas formulaciones, lo cual indica que los dos sistemas vesiculares tienen la misma capacidad de reconocimiento por las células para ser incorporados. No obstante, por la variabilidad visual de cada campo es aconsejable aumentar el número de muestras. También es relevante determinar la cantidad promedio incorporada de liposomas, porque de esta manera se asegura una mayor concentración del fármaco al interior de la célula y se disminuye la aparición de resistencias bacterianas. En este sentido, el sistema DiO-PCPS-DOX fue mayormente internalizado en promedio por célula en comparación a DiO-DMPC-DOX ($p < 0.05$) (Figura 13D). Esto es congruente con los resultados de citometría de flujo, porque al comparar los valores de la intensidad mediana de fluorescencia (IMF) obtenidos de las células incubadas con las formulaciones marcadas con DiO, el sistema DiO-PCPS-DOX tuvo un aumento de 2,2 veces sobre el control y el sistema DiO-DMPC-DOX de 1,2 veces (Figura 13E).

De igual manera, al contrastar los histogramas de fluorescencia, se observa un desplazamiento con los dos sistemas DiO-DMPC-DOS y DiO-PCPS-DOX, siendo mayor con este último (Figura 13B), y al someter estas distribuciones al algoritmo de Kolmogorov-Smirnov (K-S), el cambio encontrado con DiO-PCPS-DOX es del 67,6% y con DiO-DMPC-DOX es del 24,0% frente al control, lo cual corrobora que la formulación aniónica compuesta por la mezcla de DMPC y DMPS tiene una mayor captación por los macrófagos

de la línea celular DH82. Este resultado es consistente con lo reportado por Raz et al. quienes hallaron que liposomas de carga negativa compuestos por fosfatidilserina, fosfatidilcolina y lisolecitina son fagocitados por macrófagos peritoneales murinos a una mayor velocidad (12 veces más rápido) (137).

También resulta pertinente tener en cuenta el estudio realizado por Makino y colaboradores, en el cual se buscaba comprender el efecto de las propiedades de superficie de liposomas en la captación por células HL-60RG. Ellos encontraron que la internalización es independiente de la carga superficial, ya que liposomas de PC-Chol con diferentes contenidos de PE (neutro) o PA (aniónico) no fueron eficientemente capturados en comparación con liposomas con PS (aniónico), concluyendo de esta forma que el fosfolípido PS es específicamente importante para la actividad fagocítica de macrófagos (140).

El hecho que el sistema mixto compuesto por DMPC y DMPS se acumule más al interior de las células, se puede explicar porque la distribución normal de fosfolípidos en la membrana plasmática de las células se caracteriza por tener fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina en la cara externa de la membrana, mientras que la mayor parte de la fosfatidiletanolamina (PE) y toda la fosfatidilserina (PS) están ubicadas hacia el interior de la membrana (171). Durante un proceso de apoptosis se produce un cambio en la asimetría de fosfolípidos de la membrana, lo cual genera la translocación de PS a la superficie y la célula es eliminada por macrófagos y monocitos (140, 172).

4.4. CONCLUSIONES

- En esta investigación se desarrollaron dos sistemas nanoparticulados, neutro y aniónico, utilizando liposomas que dirigieron exitosamente doxiciclina hacia células fagocíticas. Partiendo de la MIC y el direccionamiento del fármaco, el tratamiento de infecciones intracelulares, mediado por liposomas como vehículos lipídicos de doxiciclina, es factible. Esto se debe a que se lograron concentraciones encapsuladas por encima de la MIC de varias bacterias intracelulares y el estudio biológico demostró que estos sistemas son fácilmente detectados por macrófagos.
- El estudio de internalización de los liposomas en los macrófagos demostró que los sistemas presentan una captación dependiente del tiempo y que, según los resultados del perfil de intensidad de fluorescencia e intensidad mediana de fluorescencia, los liposomas aniónicos son mayormente internalizados.
- La evaluación de mezclas de DMPC y DMPS en diferentes relaciones molares, permitió establecer el sistema liposomal aniónico, a partir de los resultados del potencial ζ , como DMPC:DMPS 1:1, con un tamaño promedio de $113,5 \text{ nm} \pm 0,35 \text{ nm}$ y carga superficial de $-49,25 \text{ mV} \pm 4,86 \text{ mV}$.
- De acuerdo a los resultados del ensayo de capacidad de incorporación de doxiciclina, se estableció que este fármaco fue fácilmente incorporado en ambos sistemas cuando se prepara a bajas concentraciones, en DMPC 1 mM (5,98%) y DMPC:DMPC 1 mM (4,17%);

y que los liposomas neutros compuestos por DMPC encapsulan cantidades de doxiciclina significativamente mayores que liposomas aniónicos de DMPC:DMPS.

5. CONCLUSIONES GENERALES

- En esta investigación se desarrollaron dos formulaciones, cada una para una vía de administración diferente, micropartículas para uso oral y liposomas para vía intravenosa, ambas con el potencial de ser implementadas en el tratamiento de enfermedades intracelulares en las que la doxiciclina tenga una acción terapéutica.
- Las micropartículas compuestas por 13,64% gelatina, 85,86% sacarosa y 0,50% CMC presentaron las siguientes características que permiten considerarlas para ser potencialmente utilizadas como sistemas de liberación de doxiciclina: 1) Índice de Carr 23,33% y Relación Hausner 1,30; 2) morfología suave y superficie externa lisa; 3) eficiencia de encapsulación 57,91%; y 4) menor cantidad de principio activo liberada a pH ácido.
- Se identificó que el sistema liposomal aniónico, compuesto por DMPC:DMPS en una relación molar de 1:1, tamaño menor a 200 nm, carga negativa y, que al mismo tiempo se comportó como marcador de reconocimiento por células fagocíticas (reflejado en una mayor tasa de incorporación), cumplió con las condiciones necesarias para ser empleado como un sistema de transporte de doxiciclina que deposite el principio activo en macrófagos y mostró tener las mejores características como sistema selectivo dentro de las formulaciones liposomales evaluadas en este trabajo, abriendo la posibilidad para futuras investigaciones.

6. PERSPECTIVAS

- En la preparación de micropartículas, para lograr aumentar el porcentaje de eficiencia de encapsulación y el rendimiento del proceso de secado, resulta interesante evaluar y optimizar condiciones operativas del proceso, tales como temperatura de entrada, velocidad de alimentación, porcentaje de aspiración y el impacto de estas sobre el rendimiento y la eficiencia.
- Este trabajo se encuentra dentro del marco de un proyecto financiado por Colciencias con el convenio 22833. Dicho proyecto cuenta con el aval del Comité de Ética para experimentar con animales-CEEAA Acta N°8 del 2013 de la Corporación Universitaria Lasallista, para realizar un estudio clínico en perros. Por lo anterior, sería interesante llevar a cabo un estudio farmacocinético de una dosis única en modelo canino, en el cual se pueda estudiar los cambios de la doxiciclina microencapsulada referentes a su absorción, distribución, metabolismo y excreción.

Como la formulación F2 mostró tener potencial aplicación farmacéutica, sería la elegida para continuar con el estudio *in vivo* y de esta forma analizar los parámetros farmacocinéticos versus un control de doxiciclina sin excipientes. Con esto se podría indicar si puede haber un cambio en la dosis o en el régimen de administración de la formulación, asegurando que la concentración en sangre del fármaco se encuentre entre la concentración mínima efectiva y la concentración mínima tóxica.

- En el diseño y desarrollo de productos farmacéuticos es importante garantizar la estabilidad, inocuidad y seguridad de los productos en estudio y más aún cuando se trata de sistemas innovadores. Por tanto, es necesario complementar el análisis para las dos formulaciones propuestas, microparticulada y liposomal, en términos de control microbiológico y estudio de estabilidad acelerado y natural.

En cuanto a la formulación liposomal, la cual va a tener un contacto directo con la célula diana, es importante evaluar la citotoxicidad por ensayo *in vitro* en línea celular o cultivo primario. Asimismo, al tratarse de un sistema inyectable, se deben hacer pruebas de esterilidad y endotoxinas bacterianas.

- Con el fin de aumentar la eficiencia de encapsulación de doxiciclina en el sistema liposomal aniónico, el cual demostró mayor potencial de captación por células fagocíticas, se podría aumentar la concentración de fosfolípido en la preparación y de esta forma aumentar el volumen de atrapamiento.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ladavière C, Gref R. Toward an optimized treatment of intracellular bacterial infections: input of nanoparticulate drug delivery systems. *Nanomedicine (Lond)*. 2015;10(19):3033–55.
2. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2016. Geneva; 2016.
3. World Health Organization (WHO). World malaria report 2016: Summary. Geneva; 2016.
4. Abed N, Couvreur P. Nanocarriers for antibiotics: a promising solution to treat intracellular bacterial infections. *Int J Antimicrob Agents*. 2014;43(6):485–96.
5. Nguyen HA, Grellet J, Paillard D, Dubois V, Quentin C, Saux MC. Factors influencing the intracellular activity of fluoroquinolones: a study using levofloxacin in a *Staphylococcus aureus* THP-1 monocyte model. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(5):883–90.
6. Collier MA, Gallovic MD, Peine KJ, Duong AD, Bachelder EM, Gunn JS, et al. Delivery of host cell-directed therapeutics for intracellular pathogen clearance. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013;11(11):1225–35.
7. Faccini-Martínez AA, García-Álvarez L, Hidalgo M, Oteo JA. Syndromic classification of rickettsioses: an approach for clinical practice. *Int J Infect Dis*. 2014;28:126–39.
8. Nelson ML, Levy SB. The history of the tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci*. 2011;1241(1):17–32.
9. Villaescusa A, García-Sancho M, Rodríguez-Franco F, Tesouro M., Sainz Á. Effects of doxycycline on haematology, blood chemistry and peripheral blood lymphocyte subsets of healthy dogs and dogs naturally infected with *Ehrlichia canis*. *Vet J*. 2015;204(3):263–8.
10. Sumano HS, Ocampo L. Tetraciclina. In: Palacios R, editor. *Farmacología veterinaria*. 3rd

ed. México,D.F: Mc Graw-Hill Interamericana Editores; 2006. p. 235–47.

11. Franklin RK, Marcus SA, Talaat AM, Kukanich BK, Sullivan R, Krugner-Higby LA, et al. A novel loading method for doxycycline liposomes for intracellular drug delivery: characterization of in vitro and in vivo release kinetics and efficacy in a J774A.1 cell line model of *Mycobacterium smegmatis* infection. *Drug Metab Dispos.* 2015;43(8):1236–45.
12. Belouqui A, del Pozo-Rodríguez A, Isla A, Rodríguez-Gascón A, Solinís MÁ. Nanostructured lipid carriers as oral delivery systems for poorly soluble drugs. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2017;42:144–54.
13. Ullah S, Shah MR, Shoaib M, Imran M, Elhissi AMA, Ahmad F, et al. Development of a biocompatible creatinine-based niosomal delivery system for enhanced oral bioavailability of clarithromycin. *Drug Deliv.* 2016;23(9):3480–91.
14. Jaszcz K. Highly Porous crosslinked poly(ester-anhydride) microspheres with high loading efficiency. *Chinese J Polym Sci.* 2015;33(9):1271–82.
15. Shanmuganathan S, Shanumugasundaram N, Adhirajan N, Ramyaa Lakshmi TS, Babu M. Preparation and characterization of chitosan microspheres for doxycycline delivery. *Carbohydr Polym.* 2008;73(2):201–11.
16. Kopytynska-Kasperczyk A, Dobrzynski P, Pastusiak M, Jarzabek B, Prochwicz W. Local delivery system of doxycycline hyclate based on ϵ -caprolactone copolymers for periodontitis treatment. *Int J Pharm.* 2015;491(1–2):335–44.
17. Rose WE, Otto DP, Aucamp ME, Miller Z, de Villiers MM. Prevention of biofilm formation by methacrylate-based copolymer films loaded with rifampin, clarithromycin, doxycycline alone or in combination. *Pharm Res.* 2015;32(1):61–73.
18. Phaechamud T, Mahadlek J. Solvent exchange-induced in situ forming gel comprising ethyl cellulose-antimicrobial drugs. *Int J Pharm.* 2015;494(1):381–92.

19. Malekar SA, Sarode AL, BachII AC, Bose A, Bothun G, Worthen DR. Radio frequency-activated nanoliposomes for controlled combination drug delivery. *AAPS PharmSciTech*. 2015;16(6):1335–43.
20. Aydin O, Aydin B, Tezcaner A, Keskin D. Study on physiochemical structure and in vitro release behaviors of doxycycline-loaded PCL microspheres. *J Appl Polym Sci*. 2015;132(14):1–13.
21. Shukla R, Gupta J, Shukla P, Dwivedi P, Tripathi P, Bhattacharya SM, et al. Chitosan coated alginate micro particles for the oral delivery of antifilarial drugs and combinations for intervention in *Brugia malayi* induced lymphatic filariasis. *RSC Adv*. 2015;5(85):69047–56.
22. Mishra M, Mishra B. Mucoadhesive microparticles as potential carriers in inhalation delivery of doxycycline hyclate: a comparative study. *Acta Pharm Sin B*. 2012;2(5):518–26.
23. Mishra M, Mishra B. Formulation optimization and characterization of spray dried microparticles for inhalation delivery of doxycycline hyclate. *Yakugaku Zasshi*. 2011;131(12):1813–25.
24. Patel P, Mundargi RC, Babu R, Jain D, Rangaswamy V, Aminabhavi TM. Microencapsulation of doxycycline into poly(lactide-co-glycolide) by spray drying technique: effect of polymer molecular weight on process parameters. *J Appl Polym Sci*. 2008;108(6):4038–46.
25. Lemos ML. Antimicrobianos que inhiben la síntesis de proteínas. En: Botana LM, Landoni MF, Martín-Jiménez T, editores. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 1st ed. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana de España, SAU; 2002. p. 468–83.
26. Adi H, Young PM, Chan HK, Stewart P, Agus H, Traini D. Controlled release antibiotics

- for dry powder lung delivery. *J Pharm Sci.* 2010;36(1):119–26.
27. Budai M, Chapela P, Budai L, Wales ME, Petrikovics I, Zimmer A, et al. Liposomal oxytetracycline and doxycycline: studies on enhancement of encapsulation efficiency. *Drug Discov Ther.* 2009;3(1):13–7.
 28. Sangaré L, Morisset R, Omri A, Ravaoarino M. Incorporation rates, stabilities, cytotoxicities and release of liposomal tetracycline and doxycycline in human serum. *J Antimicrob Chemother.* 1998;42(6):831–4.
 29. Date AA, Hanes J, Ensign LM. Nanoparticles for oral delivery: design, evaluation and state-of-the-art. *J Control Release.* 2016;240:504–26.
 30. Majewski M. A current opinion on the safety and efficacy of doxycycline including parenteral administration – A review. *Polish Ann Med.* 2014;21(1):57–62.
 31. Affolter K, Samowitz W, Boynton K, Kelly ED. Doxycycline induced gastrointestinal injury. *Hum Pathol.* 2017;66:212–5.
 32. Uchizono JA. Application of pharmacokinetics and pharmacodynamics in the design of controlled delivery systems. En: Li X, Jasti B, editores. *Design of controlled release drug delivery systems.* 1st ed. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 1–40.
 33. Tiwari G, Tiwari R, Sriwastawa B, Bhati L, Pandey S, Pandey P, et al. Drug delivery systems: an updated review. *Int J Pharm Investig.* 2012;2(1):2–11.
 34. Sosnik A, Seremeta KP. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. *Adv Colloid Interface Sci.* 2015;223:40–54.
 35. Singh A, Van den Mooter G. Spray drying formulation of amorphous solid dispersions. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;100:27–50.
 36. Cal K, Sollohub K. Spray drying technique. I: hardware and process parameters. *J Pharm*

Sci. 2010;99(2):575–85.

37. Sollohub K, Cal K. Spray drying technique: II. current applications in pharmaceutical technology. *J Pharm Sci.* 2010;99(2):587–97.
38. Gharsallaoui A, Roudaut G, Chambin O, Voilley A, Saurel R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Res Int.* 2007;40(9):1107–21.
39. Mohammed NK, Tan CP, Manap YA, Alhelli AM, Hussin ASM. Process conditions of spray drying microencapsulation of *Nigella sativa* oil. *Powder Technol.* 2017;315:1–14.
40. Huang H, Hao S, Li L, Yang X, Cen J, Lin W, et al. Influence of emulsion composition and spray-drying conditions on microencapsulation of tilapia oil. *J Food Sci Technol.* 2012;51(9):2148–54.
41. Frascareli EC, Silva VM, Tonon R V, Hubinger MD. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. *Food Bioprod Process.* 2012;90(3):413–24.
42. Esposito E, Roncarati R, Cortesi R, Cervellati F, Nastruzzi C. Production of eudragit microparticles by spray-drying technique: influence of experimental parameters on morphological and dimensional characteristics. *Pharm Dev Technol.* 2000;5(2):267–78.
43. Santana AA, Cano-Higuita DM, de Oliveira RA, Telis VRN. Influence of different combinations of wall materials on the microencapsulation of jussara pulp (*Euterpe edulis*) by spray drying. *Food Chem.* 2016;212:1–9.
44. Arslan S, Erbas M, Tontul I, Topuz A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. *LWT - Food Sci Technol.* 2015;63(1):685–90.
45. Xie Y, Wang A, Lu Q, Hui M. The effects of rheological properties of wall materials on morphology and particle size distribution of microcapsule. *Czech J Food Sci.*

2010;28(5):433–9.

46. Jacobs IC. Atomization and spray-drying processes. En: Gaonkar AG, Vasisht N, Khare AR, Sobel R, editores. *Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide*. 1st ed. New York: Elsevier Science, Academic Press; 2014. p. 47–56.
47. Nikam VK, Dolas RT, Somwanshi SB, Gaware VM, Kotade KB, Dhamak KB, et al. Microparticles: a novel approach to enhance the drug delivery - A review. *Int J Pharm Res Dev*. 2011;3(8):170–83.
48. Shu B, Yu W, Zhao Y, Liu X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. *J Food Eng*. 2006;76(4):664–9.
49. Le TH, Tran TM V, Ton NMN, Tran TTT, Huynh T V, Nguyen TN, et al. Combination of whey protein and carbohydrate for microencapsulation of pumpkin (*Cucurbita* spp.) seed oil by spray-drying. *Int Food Res J*. 2017;24(3):1227–32.
50. Calvo P, Lozano M, Espinosa-Mansilla A, González-Gómez D. In-vitro evaluation of the availability of ω -3 and ω -6 fatty acids and tocopherols from microencapsulated walnut oil. *Food Res Int*. 2012;48(1):316–21.
51. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME. *Handbook of pharmaceutical excipients*. 6th ed. Rowe RC, Sheskey PJ, Quinn ME, editors. Londres: Pharmaceutical Press; 2009. 888 p.
52. Anandharamakrishnan C, Ishwarya P. Selection of wall material for encapsulation by spray drying. En: Anandharamakrishnan C, Ishwarya P, editores. *Spray drying techniques for food ingredient encapsulation*. 1st ed. Hoboken: Wiley-Blackwell; 2015. p. 77–100.
53. Esposito E, Cervellati F, Menegatti E, Nastruzzi C, Cortesi R. Spray dried Eudragit microparticles as encapsulation devices for vitamin C. *Int J Pharm*. 2002;242(1–2):329–34.
54. Thakral S, Thakral NK, Majumdar DK. Eudragit®: a technology evaluation. *Expert Opin Drug Deliv*. 2013;10(1):131–49.

55. Makadia H, Siegel S. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polym.* 2011;1;3(3):1377–87.
56. Saavedra N. Desarrollo de una formulación de nano y micropartículas de licopeno extraído por fluidos supercríticos a partir de residuos agroindustriales de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Corporación Universitaria Lasallista; 2015.
57. Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of Atomic Force Microscopy (AFM) and Dynamic Light Scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *J Nanoparticle Res.* 2008;10:89–96.
58. Esteban PP, Jenkins ATA, Arnot TC. Elucidation of the mechanisms of action of Bacteriophage K/nano-emulsion formulations against *S. aureus* via measurement of particle size and zeta potential. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2016;139:87–94.
59. Westergaard V. Tecnología de la leche en polvo: evaporación y secado por atomización. 5th ed. Westergaard V, editor. Copenhagen: Niro; 2004. 349 p.
60. Cano-Chauca M, Stringheta PC, Ramos AM, Cal-Vidal J. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2005;6(4):420–8.
61. The United States Pharmacopeial Convention. Farmacopea de los Estados Unidos de América. Fomulario Nacional. USP 38 NF 33. 38th ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2015. 7455 p.
62. Ruz N, Zabala M, Kramer MG, Campanero MA, Dios-Viéitez MC, Blanco-Príeto MJ. Rapid and simple determination of doxycycline in serum by high-performance liquid chromatography: application to particulate drug delivery systems. *J Chromatogr A.* 2004;1031(1–2):295–301.
63. Shen J, Choi S, Qu W, Wang Y, Burgess DJ. In vitro-in vivo correlation of parenteral

- risperidone polymeric microspheres. *J Control Release*. 2015;218:2–12.
64. Barros Neto B, Scarminio IS, Bruns RE. Andando na superfície de resposta. En: Barros Neto B, editor. *Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria*. 2nd ed. Campinas: Unicamp; 2001. p. 251–300.
65. Derringer G, Suich R. Simultaneous optimization of several response variables. *J Qual Technol*. 1980;12(4):214–9.
66. Fernández NEG, Fernández CM, Pérez SI, Morón GY, García MV, Perdomo LI, et al. Diseños de experimentos en tecnología y control de los medicamentos. *Rev Mex Ciencias Farm*. 2008;39(2):28–40.
67. Lewis GA, Mathieu D, Phan-Tan-Luu R. *Pharmaceutical experimental design*. 1st ed. Swarbrick J, editor. New York: Marcel Dekker; 2000. 222 p.
68. Motskin M, Wright DM, Muller K, Kyle N, Gard TG, Porter AE, et al. Hydroxyapatite nano and microparticles: correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. *Biomaterials*. 2009;30(19):3307–17.
69. Schramm LL. Colloid stability. En: Schramm LL, editor. *Emulsions, foams, suspensions and aerosols: microscience and applications*. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2014. p. 163–208.
70. Quintana JM, Califano AN, Zaritzky NE, Partal P, Franco JM. Linear and nonlinear viscoelastic behaviour of oil-in-water emulsions stabilized with polysaccharides. *J Texture Stud*. 2002;33:215–36.
71. Vasisht N. Selection of materials for microencapsulation. En: Gaonkar AG, Vasisht N, Khare AR, Sobel R, editors. *Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide*. 1st ed. New York: Elsevier Science, Academic Press; 2014. p. 173–80.

72. Hogan SA, McNamee BF, O’Riordan ED, O’Sullivan M. Emulsification and microencapsulation properties of sodium caseinate / carbohydrate blends. *Int Dairy J.* 2011;11(3):137–44.
73. Rodea-González DA, Cruz-Olivares J, Román-Guerrero A, Rodríguez-Huezo ME, Vernon-Carter EJ, Pérez-Alonso C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica* L.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *J Food Eng.* 2012;111(1):102–9.
74. Tontul I, Topuz A. Spray-drying of fruit and vegetable juices: effect of drying conditions on the product yield and physical properties. *Trends Food Sci Technol.* 2017;63:91–102.
75. Schramm LL. Food product and agricultural applications. En: Schramm LL, editor. *Emulsions, foams, suspensions and aerosols: microscience and applications.* 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2014. p. 405–32.
76. Amara CB, Eghbal N, Degraeve P, Gharsallaoui A. Using complex coacervation for lysozyme encapsulation by spray-drying. *J Food Eng.* 2016;183:50–7.
77. Gálvez-Mariscal A, Florez-Argüello I, Farrés-González A. Proteínas. En: Baudi-Dergal S, Quintanar-Duarte E, editores. *Química de los alimentos.* 4th ed. Naucalpan de Juárez: Pearson Educación; 2006. p. 119–244.
78. Filková I, Huang LX, Mujumdar AS. Industrial spray drying systems. En: Mujumdar AS, editor. *Handbook of industrial drying.* 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2006. p. 215–56.
79. Schramm LL. Dispersion and dispersed species characterization. En: Schramm LL, editor. *Emulsions, foams, suspensions and aerosols: microscience and applications.* 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2014. p. 23–84.
80. Swarbrick J, Rubino JT, Rubino OP. Dispersiones de partículas gruesas. En: Gennaro AR, editor. *Remington Farmacia.* 20 Tomo 1. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2003. p. 365–85.

81. Schramm LL. Introduction. En: Schramm LL, editor. Emulsions, foams, suspensions and aerosols: microscience and applications. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2014. p. 1–22.
82. Lim W-T, Nyam K-L. Characteristics and controlled release behaviour of microencapsulated kenaf seed oil during in-vitro digestion. J Food Eng. 2016;182:26–32.
83. Su YL, Fu ZY, Zhang JY, Wang WM, Wang H, Wang YC, et al. Microencapsulation of *Radix salvia miltiorrhiza* nanoparticles by spray-drying. Powder Technol. 2008;184:114–21.
84. Mishra MK. Materials of natural origin for encapsulation. En: Mishra MK, editor. Handbook of encapsulation and controlled release. 1st ed. Boca Raton: CRC Press; 2016. p. 493–515.
85. Sandoval PA, Baena Y, Aragón M, Rosas JE, Ponce D'león LF. Mecanismos generales de cesión de principios activos a partir de matrices monolíticas hidrofílicas preparadas con éteres de celulosa. Rev Colomb Cienc Quím Farm. 2008;37(2):105–21.
86. Valdés-Martínez SE. Hidratos de carbono. En: Baudi-Dergal S, Quintanar-Duarte E, editores. Química de los alimentos. 4th ed. Naucalpan de Juárez: Pearson Educación; 2006. p. 29–118.
87. Lazic ZR. Design and analysis of experiments. En: Lazic ZR, editor. Design of experiments in chemical engineering: a practical guide. 1st ed. Weinheim: Wiley-VCH; 2004. p. 157–464.
88. Crouter A, Briens L. The effect of moisture on the flowability of pharmaceutical excipients. Am Assoc Pharm Sci. 2014;15(1):65–74.
89. Teunou E, Fitzpatrick JJ. Effect of relative humidity and temperature on food powder flowability. J Food Eng. 1999;42(2):109–16.
90. Juarez-Enriquez E, Olivas GI, Zamudio-Flores PB, Ortega-Rivas E, Perez-Vega S, Sepulveda DR. Effect of water content on the flowability of hygroscopic powders. J Food

Eng. 2017;205:12–7.

91. Dominic Man CM. The ways food deteriorates and spoils. En: Dominic Man CM, editor. Shelf Life. 2nd ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2015. p. 41–78.
92. Reineccius GA. The spray drying of food flavors. Dry Technol An Int J. 2004;22(6):1289–324.
93. Baudi-Dergal S. Agua. Wn: Baudi-Dergal S, Quintanar-Duarte E, editores. Química de los alimentos. 4th ed. Naucalpan de Juárez: Pearson Educación; 2006. p. 1–28.
94. Gong Z, Zhang M, Mujumdar AS, Sun J. Spray drying and agglomeration of instant bayberry powder. Dry Technol An Int J. 2008;26(1):116–21.
95. Das S, Chaudhury A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. Am Assoc Pharm Sci. 2011;12(1):62–76.
96. Campos AA, Gomes JM, Silva EK, Azevedo VM, Yoshida MI, Borges SV. Physical and thermal properties of oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil microparticles. J Food Process Eng. 2015;38(1):1–10.
97. Al-Kahtani HA, Hassan BH. Spray drying of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. J Food Sci. 1990;55(4):1073–6.
98. Perera UMSP, Rajapakse N. Chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and applications. In: Kim SK, editor. Seafood Processing By-Products. 1st ed. New York: Springer; 2014. p. 371–87.
99. Clogston JD, Patri AK. Zeta potential measurement. En: McNeil SE, editor. Characterization of nanoparticles intended for drug delivery. 1st ed. Mumbai: Humana Press; 2011. p. 63–70.
100. Bicudo MOP, J6 J, de Oliveira GA, Chaimsohn FP, Sierakowski MR, de Freitas RA, et al. Microencapsulation of Jucara (*Euterpe edulis* M.) pulp by spray drying using different

- carriers and drying temperatures. *Dry Technol An Int J.* 2015;33(2):153–61.
101. Gaiani C, Morand M, Sanchez C, Tehrani EA, Jacquot M, Schuck P, et al. How surface composition of high milk proteins powders is influenced by spray-drying temperature. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2010;75(1):377–84.
 102. Murrieta-Pazos I, Gaiani C, Galet L, Cuq B, Desobry S, Scher J. Comparative study of particle structure evolution during water sorption: skim and whole milk powders. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2011;87(1):1–10.
 103. Thalberg K, Lindholm D, Axelsson A. Comparison of different flowability tests for powders for inhalation. *Powder Technol.* 2004;146(3):206–13.
 104. Babosa-Cánovas GV, Ortega-Rivas E, Juliano P, Yan H. Bulk properties. En: Babosa-Cánovas G V, editor. *Food powders physical properties, processing, and functionality.* 1st ed. New York: Kluwer Academic; 2005. p. 55–90.
 105. Shishir MRI, Taip FS, Aziz NA, Talib RA. Physical properties of spray-dried pink guava (*Psidium guajava*) powder. *Agric Agric Sci Procedia.* 2014;2:74–81.
 106. Sanchez-Reinoso Z, Osorio C, Herrera A. Effect of microencapsulation by spray drying on cocoa aroma compounds and physicochemical characterisation of microencapsulates. *Powder Technol.* 2017;318:110–9.
 107. Fernandes RVDB, Marques GR, Borges SV, Botrel DA. Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. *Ind Crops Prod.* 2014;58:173–81.
 108. Ertan G, Karasulu HY, Karasulu E, Ege MA, Kose T, Guneri T. A new in vitro/in vivo kinetic correlation method for nitrofurantoin matrix tablet formulations. *Drug Dev Ind Pharm.* 2000;26(7):737–43.
 109. Bajpai SK, Jadaun M, Bajpai M, Jyotishi P, Shah FF, Tiwari S. Controlled release of

- doxycycline from gum acacia/poly(sodium acrylate) microparticles for oral drug delivery. *Int J Biol Macromol.* 2017;104:1064–71.
110. Ruiz SM, Olvera LG, Chacón S del C, Estrada DV. Pharmacokinetics of an oral extended-release formulation of doxycycline hyclate containing acrylic acid and polymethacrylate in dogs. *Am J Vet Res.* 2015;76(4):367–72.
 111. Maya S, Indulekha S, Sukhithasri V, Smitha KT, Nair SV, Jayakumar R, et al. Efficacy of tetracycline encapsulated O-carboxymethyl chitosan nanoparticles against intracellular infections of *Staphylococcus aureus*. *Int J Biol Macromol.* 2012;51(4):392–9.
 112. Mirza AZ, Siddiqui FA. Nanomedicine and drug delivery: a mini review. *Int Nano Lett.* 2014;4(1):94.
 113. Bangham AD. A correlation between surface charge and coagulant action of phospholipids. *Nature.* 1961;192:1197–8.
 114. Bangham AD, Standish MM, Watkins JC. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *J Mol Biol.* 1965;13(1):238–52.
 115. Perrie Y. Gregory Gregoriadis: introducing liposomes to drug delivery. *J Drug Target.* 2008;16(7–8):518–9.
 116. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z, Luo X, et al. A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci.* 2015;10(2):81–98.
 117. Patil YP, Jadhav S. Novel methods for liposome preparation. *Chem Phys Lipids.* 2014;177:8–18.
 118. Edwards KA, Baeumner AJ. Analysis of liposomes. *Talanta.* 2006;68(5):1432–41.
 119. Sabín Fernández JD. Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas. Universidad de Santiago de Compostela; 2007.
 120. Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic systems:

- a review. *Pharm Acta Helv.* 1995;70(2):95–111.
121. Deepthi V, An K. Liposomal drug delivery system-A review. *RGUHS J Pharm Sci.* 2014;4(2):47–56.
 122. Đorđević V, Balanč B, Belščak-Cvitanović A, Lević S, Trifković K, Kalušević A, et al. Trends in encapsulation technologies for delivery of food bioactive compounds. *Food Eng Rev.* 2014;7(4):452–90.
 123. 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):1–8.
 124. Ball E. Liposomas en dermatología. *Dermatologia Venez.* 1995;33(1):15–23.
 125. Brgles M, Jurašin D, Sikirić MD, Frkanec R, Tomašić J. Entrapment of ovalbumin into liposomes-factors affecting entrapment efficiency, liposome size, and zeta potential. *J Liposome Res.* 2008;18(3):235–48.
 126. Lanio M, Luzardo M, Laborde R, Sánchez O, Cruz Y, Pazos F, et al. Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev Cuba Física.* 2009;26(1):23–30.
 127. Jones MN. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Adv Colloid Interface Sci.* 1995;54:93–128.
 128. Alving CR. Macrophages as targets for delivery of liposome-encapsulated antimicrobial agents. *Adv Drug Deliv Rev.* 1988;2(1):107–28.
 129. Gordon S, Rabinowitz S. Macrophages as targets for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 1989;4(1):27–47.
 130. Bakker-Woudenberg IAJM. Delivery of antimicrobials to infected tissue macrophages. *Adv Drug Deliv Rev.* 1995;17(1):5–20.
 131. Briones E, Colino CI, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics

- in phagocytic cells. *J Control release*. 2008;125(3):210–27.
132. Ahsan F, Rivas IP, Khan MA, Torres Suárez AI. Targeting to macrophages: role of physicochemical properties of particulate carriers - liposomes and microspheres - on the phagocytosis by macrophages. *J Control Release*. 2002;79(1–3):29–40.
 133. Rabasco Álvarez AM, González Rodríguez ML. Formas farmacéuticas innovadoras y formas de liberación sostenida. En: Hernández Herrero G, Moreno González A, Zaragoza García F, Porras Chavarino A, editores. *Tratado de medicina farmacéutica*. 1st ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 123–41.
 134. Alving CR. Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria. *Parasitol Today*. 1986 Apr;2(4):101–7.
 135. Emmen F, Storm G. Liposomes in treatment of infectious diseases. *Pharm Weekbl Sci Ed*. 1987;9(3):162–71.
 136. Wasan KM, Lopez-Berestein G. The Past, present, and future uses of liposomes in treating infectious diseases. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 1995 Jan;17(1):1–15.
 137. Raz A, Bucana CC, Fogler WE, Poste G, Fidler IJ. Biochemical, morphological, and ultrastructural studies on the uptake of liposomes by murine macrophages. *Cancer Res*. 1981;41(2):487–94.
 138. Heath TD, Lopez NG, Papahadjopoulos D. The effects of liposome size and surface charge on liposome-mediated delivery of methotrexate-gamma-aspartate to cells in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 1985;820(1):74–84.
 139. Allen TM, Austin GA, Chonn A, Lin L, Lee KC. Uptake of liposomes by cultured mouse bone marrow macrophages: influence of liposome composition and size. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1061(1):56–64.
 140. Makino K, Tabata J, Yoshioka T, Fukuda M, Ikekita M, Ohshima H, et al. Effects of

- liposomal phosphatidylserine on phagocytic uptake of liposomes by macrophage-like HL-60RG Cells. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2003;29(4):277–84.
141. Vyas SP, Goyal AK, Khatri K. Mannosylated liposomes for targeted vaccines delivery. En: Weissig V, editor. *Liposomes: methods and protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers*. 1st ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2010. p. 177–88.
 142. Vyas SP, Katare YK, Mishra V, Sihorkar V. Ligand directed macrophage targeting of amphotericin B loaded liposomes. *Int J Pharm*. 2000;210(1–2):1–14.
 143. Chono S, Tanino T, Seki T, Morimoto K. Efficient drug targeting to rat alveolar macrophages by pulmonary administration of ciprofloxacin incorporated into mannosylated liposomes for treatment of respiratory intracellular parasitic infections. *J Control Release*. 2008;127(1):50–8.
 144. Jain S, Singh P, Mishra V, Vyas SP. Mannosylated niosomes as adjuvant–carrier system for oral genetic immunization against Hepatitis B. *Immunol Lett*. 2005;101(1):41–9.
 145. Niu N-K, Yin J-J, Yang Y-X, Wang Z-L, Zhou Z-W, He Z-X, et al. Novel targeting of PEGylated liposomes for codelivery of TGF- β 1 siRNA and four antitubercular drugs to human macrophages for the treatment of mycobacterial infection: a quantitative proteomic study. *Drug Des Devel Ther*. 2015;9:4441–70.
 146. Petazzi RA, Gramatica A, Herrmann A, Chiantia S. Time-controlled phagocytosis of asymmetric liposomes: application to phosphatidylserine immunoliposomes binding HIV-1 virus-like particles. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol Med*. 2015;11(8):1985–92.
 147. Hamblin KA, Wong JP, Blanchard JD, Atkins HS. The potential of liposome-encapsulated ciprofloxacin as a tularemia therapy. *Front Cell Infect Microbiol*. 2014;4(79):1–5.
 148. Chono S, Morimoto K. Uptake of dexamethasone incorporated into liposomes by macrophages and foam cells and its inhibitory effect on cellular cholesterol ester

- accumulation. *J Pharm Pharmacol*. 2006;58(9):1219–25.
149. Cordeiro C, Wiseman DJ, Lutwyche P, Uh M, Evans JC, Finlay BB, et al. Antibacterial efficacy of gentamicin encapsulated in pH-sensitive liposomes against an in vivo *Salmonella enterica* serovar Typhimurium intracellular infection model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(3):533–9.
 150. Mertins O, Sebben M, Pohlmann AR, da Silveira NP. Production of soybean phosphatidylcholine-chitosan nanovesicles by reverse phase evaporation: a step by step study. *Chem Phys Lipids*. 2005;138(1–2):29–37.
 151. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR, Janoff AS. Solute distributions and trapping efficiencies in freeze-thawed multilamellar vesicles. *Biochim Biophys Acta*. 1985;817(1):193–6.
 152. Hope MJ, Bally MB, Mayer LD, Janoff AS, Cullis PR. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. *Chem Phys Lipids*. 1986;40(2–4):89–107.
 153. Wellman ML, Krakowka S, Jacobs RM, Kociba GJ. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *Vitr Cell Dev Biol*. 1988;24(3):223–9.
 154. Claassen E. Post-formation fluorescent labelling of liposomal membranes in vivo detection, localisation and kinetics. *J Immunol Methods*. 1992;147(2):231–40.
 155. Burton AJ, Gigue S, Berghaus LJ, Hondalus MK, Arnold RD. Efficacy of liposomal gentamicin against *Rhodococcus equi* in a mouse infection model and colocalization with *R. equi* in equine alveolar macrophages. *Vet Microbiol*. 2015;176(3–4):292–300.
 156. Chatterjee S, Banerjee DK. Preparation, isolation, and characterization of liposomes containing natural and synthetic lipids. En: Basu SC, Basu M, editores. *Liposome methods and protocols*. Volume 199. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 2002. p. 3–14.
 157. Morini MA, Sierra MB, Pedroni VI, Alarcon LM, Appignanesi GA, Disalvo EA. Influence of temperature, anions and size distribution on the zeta potential of DMPC, DPPC and

- DMPE lipid vesicles. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2015;131:54–8.
158. Makino K, Yamada T, Kimura M, Oka T, Ohshima H, Kondo T. Temperature- and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys Chem*. 1991;41(2):175–83.
159. Obeid MA, Khadra I, Mullen AB, Tate RJ, Ferro VA. The effects of hydration media on the characteristics of non-ionic surfactant vesicles (NISV) prepared by microfluidics. *Int J Pharm*. 2017;516(1–2):52–60.
160. Mohan C. *Buffers: a guide for the preparation and use of buffers in biological systems*. Darmstadt, Alemania; 2003.
161. Lawrence SM, Alpar HO, McAllister SM, Brown MW. Liposomal (MLV) polymyxin B: physicochemical characterization and effect of surface charge on drug association. *J Drug Target*. 1993;1(4):303–10.
162. Kogawa AC, Salgado HRN. Quantification of doxycycline hyclate in tablets by HPLC-UV method. *J Chromatogr Sci*. 2013;51(10):919–25.
163. Martins VHG, Rodrigues MR, Mascarenhas LD, de Lopes Azambuja CR, Londoño-Londoño J, de Lima VR. The effect of furazolidone on the physico-chemical properties of dimyristoylphosphatidylcholine bilayers: relevance to anti-leishmanial therapy. *J Mol Struct*. 2014;1059(1):225–31.
164. Lopes de Azambuja CR, dos Santos LG, Rodrigues MR, Rodrigues RF, da Silveira EF, Azambuja JH, et al. Physico-chemical characterization of asolectin-genistein liposomal system: An approach to analyze its in vitro antioxidant potential and effect in glioma cells viability. *Chem Phys Lipids*. Elsevier Ireland Ltd; 2015;193:24–35.
165. Yücel Ç, Değim Z, Yılmaz Ş. Nanoparticle and liposome formulations of doxycycline: transport properties through Caco-2 cell line and effects on matrix metalloproteinase

- secretion. *Biomed Pharmacother.* 2013;67(6):459–67.
166. Davoust B, Keundjian A, Rous V, Maurizi L, Parzy D. Validation of chemoprevention of canine monocytic ehrlichiosis with doxycycline. *Vet Microbiol.* 2005;107(3–4):279–83.
167. Denk A, Demirdag K, Kalkan A, Ozden M, Cetinkaya B, Kilic SS. In vitro activity of *Brucella melitensis* isolates to various antimicrobials in Turkey. *Infect Dis (Auckl).* 2015;47(6):364–9.
168. Overton WR. Modified histogram subtraction technique for analysis of flow cytometry data. *Cytometry.* 1988;9(6):619–26.
169. Di Marzio L, Marianecchi C, Cinque B, Nazzarri M, Cimini AM, Cristiano L, et al. pH-sensitive non-phospholipid vesicle and macrophage-like cells: binding, uptake and endocytotic pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1778(12):2749–56.
170. Levy M, Palliser D. Targeting liposomes to immune cells. En: Santambrogio L, editor. *Biomaterials in regenerative medicine and the immune system.* 1st ed. New York: Springer; 2015. p. 193–207.
171. Williamson P, Eijnde S van den, Schlegel RA. Phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic cells. En: Lecuit T, editor. *Methods in cell biology.* Vol.66. Elsevier; 2001. p. 339–64.
172. Stuart MCA, Damoiseaux JGMC, Frederik PM, Arends J-W, Reutelingsperger CPM. Surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis of rat thymocytes precedes nuclear changes. *Eur J Cell Biol.* 1998;76:77–83.