



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO
FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN
ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA
CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA



Tema: Elaboración de liposomas por combinaciones de fosfolípidos para la encapsulación del antibiótico doxiciclina como sistema de administración de fármacos.

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención de título de Ingenieros Biotecnólogos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autores: Héрман Alexis Chávez Salazar

Josué David Cruz Vasquez

Tutor: PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacís

Ambato – Ecuador

Febrero-2024

APROBACIÓN DEL TUTOR

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autoriza la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología

Ambato, 15 de Enero del 2024

PhD. Lorena de los Ángeles Núñez Villacis

C.I. 1804256905

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

Nosotros, Hérmán Alexis Chávez Salazar y Josué David Cruz Vasquez, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del título de Ingenieros Biotecnólogos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



.....
Hérmán Alexis Chávez Salazar

C.I. 0605232669

AUTOR



.....
Josué David Cruz Vasquez

CI. 1850259670

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato, para que considere el presente Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura consulta y procesos de investigación, según las normas de la institución.

Cedemos los derechos en línea patrimoniales de nuestro Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



.....
Hérmán Alexis Chávez Salazar

C.I. 0605232669

AUTOR



.....
Josué David Cruz Vasquez

CI. 1850259670

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos profesores calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Por constancia firman

.....

Presidente del tribunal

.....

Dra. Helena Maritza De la Torre Olvera

1309651998

.....

Mg. Daniel Alfonso Cabrera Valle

1802561595

Ambato, 6 de Febrero del 2024

AGRADECIMIENTO

A Dios, por darme salud y bendecirme durante todo este sacrificado pero maravilloso camino que es la universidad, por permitirme ahora, conseguir y celebrar este logro junto a mi familia.

A mis padres, Hérmán y Marilú, a quienes amo y admiro, han sido, son y siempre serán mi pilar fundamental, pues su sacrificio incalculable se refleja ahora que he alcanzado esta meta en mi vida, gracias por su amor, enseñanzas y lecciones, espero estén orgullosos de lo que han conseguido, porque este logro, es totalmente suyo.

A mi hermano Tommy con quién he compartido una infinidad de momentos, siendo en ocasiones mi confidente y sobre todo mi compañero de aventuras y hasta de peleas.

A mi Abuelita Rita, que siempre ha estado pendiente de mí y no dudó de mis capacidades, también a mi Abuelito Humberto pues sé que desde el cielo me estuvo cuidando y guiando en cada paso de esta etapa de mi vida.

A mi tía Miriam y a mi Padrino Luis, quienes no dudaron en abrirme las puertas de su hogar cuando decidí venir a estudiar en esta ciudad.

A la Sra. Pili y al Ing. Mario, quienes siempre estuvieron pendiente de mí, me apoyaron en todo sentido y me ayudaron en cualquier necesidad que tuve.

A mi tutora PhD Lorena Núñez, gracias por su paciencia, su guía y por compartir su conocimiento durante todo el transcurso del proyecto. Gracias por la oportunidad y la confianza de permitirme ser su tesista, ya que fue un objetivo desde que fue mi docente.

A mis docentes, PhD Orestes López, PhD Mario García, PhD Liliana Cerda, PhD María Daniela Garcés, PhD Irvin Tubón, PhD Helena De la Torre, quienes no dudaron en ayudarnos y guiarnos cuando necesitamos de su conocimiento.

A Josu, por aceptar realizar este proyecto conmigo, por su paciencia, ayuda y consideración en cada circunstancia que pasamos en este arduo trayecto, que pese a las adversidades que surgieron nunca estuvo en duda nuestra amistad.

A todos mis amigos y compañeros, quienes estuvieron presentes en cada paso de mi vida universitaria, gracias por los consejos, las risas, las tristezas, las alegrías y todos los momentos que compartimos. Ha sido un placer y un gusto enorme sobrellevar mi experiencia universitaria junto con ustedes.

A mis amigas Ailín, Priscila y a mi amigo Sebastián, quienes me han brindado incontables muestras de apoyo y siempre festejaron mis logros, gracias por su amistad y sinceridad, ha sido fundamental para que supere muchas dificultades en este trayecto.

Tanto por agradecer a todos aquellos que formaron parte de esta maravillosa etapa y tanto que decir, simplemente, les puedo decir gracias por absolutamente todo, los quiero mucho y valoro un montón que formen parte de mi vida.

--Alexis Chávez Salazar--

AGRADECIMIENTO

A Dios quiero agradecer por sus bendiciones y oportunidades, que me ha permitido culminar esta etapa de mi vida, amentando mis conocimientos y creciendo como persona.

Para mis papás Ricardo y Mercy, gracias por darme su amor, confianza, paciencia y corrección que me han permitido ser la persona quien soy y estar alcanzando un sueño de mi vida. Ustedes son mi pilar fundamental, siempre estaré orgulloso de ser su hijo.

A mi tutora PhD Lorena Núñez gracias por las oportunidades que me ha brindado, estaré infinitamente agradecido por compartir su conocimiento y darnos mucha paciencia en cada fase del proyecto.

Estaré agradecido por la ayuda y conocimientos que me brindaron PhD Orestes López, PhD Mario García, PhD Liliana Cerda, PhD María Daniela Garcés, PhD Irvin Tubón, PhD Helena De la Torre; su trabajo demuestra que existen excelentes profesionales que guía a los estudiantes en la investigación.

Mi hermano Daniel mi compañero de vida con quien he pasado los mejores momentos de mi vida, siempre me hace reír con sus ocurrencias.

Para mis amigos con los que crecí: mi mejor amigo Robertiño que extraño, siempre ha estado apoyándome en cada momento, incluso desde la distancia; Juanito mi hermano de aventuras de universidad; Kevin y Sebas mis hermanos de futbol, sin ustedes tampoco sería la persona quien soy. Agradezco a los mejores amigos que me brindó la universidad: Isra, Abel, Mike, Alexis, Cami, Vivi, Josa, Mishu, Kerly, Washito, Fer y Caro. Gracias a todos por su amistad y apoyo, agradezco por haber conocido a personas tan maravillosas que me ayudaron a pasar esta experiencia con alegría.

--Josué Cruz--

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR.....	ii
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN	iii
DERECHOS DE AUTOR.....	iv
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
AGRADECIMIENTO.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ÍNDICE DE TABLAS	xiii
ÍNDICE DE ANEXOS.....	xiv
GLOSARIO.....	xv
RESUMEN EJECUTIVO	xvi
ABSTRACT	xvii
CÁPITULO I.- MARCO TEÓRICO.	1
1.1. Antecedentes Investigativos.....	1
1.1.1. Sistemas de administración de fármacos Tradicionales.....	1
1.1.2. Sistemas de administración de fármacos dirigidos.	1
1.1.3. Liposomas como sistema de administración dirigida.	3
1.1.4. Componentes de la estructura de los liposomas.....	8
1.1.5. Proceso de formación de los liposomas.	10
1.1.6. Vías de administración de liposomas.	12
1.1.7. Doxiciclina.	15
1.2. Objetivos	16
1.2.1. Objetivo general.....	16
1.2.2. Objetivos específicos	16

CÁPITULO II.- METODOLOGÍA	17
2.1. Materiales.....	17
2.1.1. Reactivos.....	17
2.1.2. Material fungible.....	18
2.1.3. Equipos de laboratorio	18
2.2. Métodos.....	19
2.2.1. Optimización del proceso de elaboración de liposomas para la encapsulación de doxiciclina.	19
2.2.2. Análisis de la eficiencia de encapsulación de doxiciclina en los liposomas.	20
2.2.3. Evaluación de la estabilidad de los liposomas con doxiciclina por medio de una digestión simulada <i>in vitro</i>	22
2.2.4. Análisis Estadístico	23
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	24
3.1. Análisis de resultados.....	24
3.1.1. Optimización del proceso de elaboración de liposomas para la encapsulación de doxiciclina.	24
3.1.1.1. Elaboración de los liposomas mediante la combinación de lecitina y colesterol por el método de película hidratada.	24
3.1.2. Análisis de la eficiencia de encapsulación de doxiciclina en los liposomas.	35
3.1.3. Evaluación de la estabilidad de los liposomas con doxiciclina por medio de una digestión simulada <i>in vitro</i>	53
CÁPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
4.1. Conclusiones	61
4.2. Recomendaciones.....	63
BIBLIOGRAFÍA.....	64

ANEXOS.....	79
-------------	----

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Estructura e interacción de los componentes de los liposomas.	5
Figura 2. Evaluación de la formación de estructuras liposomales por medio del microscopio de luz invertida.	27
Figura 3. Evaluación de la formación de estructuras liposomales cargadas con doxiciclina por medio del microscopio de luz invertida.	30
Figura 4. Imágenes de las soluciones liposomales obtenidas por medio de microscopía óptica.	31
Figura 5. Evaluación de la formación de estructuras liposomales por medio del microscopio electrónico de transmisión (TEM).	33
Figura 6. Imágenes de las soluciones liposomales obtenidas por medio del microscopio de transmisión electrónica.	34
Figura 7. Curva de calibración de Doxiciclina.	36
Figura 8. Histograma del análisis de las distintas proporciones de CL:CHO.	38
Figura 9. Estructura química de la doxiciclina con sus grupos funcionales.	40
Figura 10. Gráfica del análisis de la doxiciclina por espectroscopía FTIR	41
Figura 11. Análisis del espectro infrarrojo de la doxiciclina.	43
Figura 12. Gráfica del análisis de la lecitina de soya y el colesterol por espectroscopía F-TIR.	45
Figura 13. Análisis del espectro infrarrojo de la solución liposomal obtenida de la proporción 70:30.	46
Figura 14. Análisis comparativo del espectro de doxiciclina y de los liposomas, con carga y sin carga.	47
Figura 15. Comparativa de los espectros infrarrojos de las tres proporciones evaluadas.	48
Figura 16. Gráfica del análisis térmico de la lecitina de soya por DSC.	50
Figura 17. Curva correspondiente a liposomas de la proporción (60:40) con doxiciclina obtenida mediante el Calorímetro diferencial de barrido.	51
Figura 18. Curva correspondiente a liposomas de la proporción (70:30) con doxiciclina obtenida mediante el Calorímetro diferencial de barrido.	52

Figura 19. Digestión de los liposomas en las fases del sistema gastrointestinal. 54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. <i>Proporciones de lecitina y colesterol evaluadas para la obtención de liposomas por el método de película hidratada.</i>	26
Tabla 2. <i>Proporciones de lecitina y colesterol evaluadas para la obtención de liposomas cargados de doxiciclina por el método de película hidratada.</i>	28
Tabla 3. <i>Eficiencia de encapsulación de doxiciclina en los liposomas elaborados con las diferentes proporciones de CL:CHO.</i>	36
Tabla 4. <i>Bandas de absorción del espectro de infrarrojo de la doxiciclina</i>	42
Tabla 5. <i>Estabilidad de los liposomas de proporción 70:30 con doxiciclina durante la simulación bucal, estomacal e intestinal in vitro.</i>	56
Tabla 6. <i>Estabilidad de los liposomas de proporción 70:30 con doxiciclina que fueron sometidos a la simulación secuencial del sistema gastrointestinal in vitro.</i>	57
Tabla 7. <i>Almacenamiento de los liposomas de proporción 70:30 (CL:CHO) con doxiciclina a diferentes temperaturas.</i>	59
Tabla 8. <i>Datos para la obtención de la curva de calibración a concentraciones conocidas.</i>	79

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A. Obtención de la ecuación de la curva de calibración de la doxiciclina. 79

Anexo B. Análisis estadístico de la encapsulación de doxiciclina de los liposomas. 79

GLOSARIO

- **CL:** Lecitina de soya cruda.
- **CHO:** Colesterol
- **Tt:** Temperatura de transición
- **SSF:** Líquido salival simulado
- **SGF:** Líquido gástrico simulado
- **SIF:** Líquido intestinal simulado
- **PEG:** Polietilenglicol
- **SUV:** Vesículas unilaminares pequeñas
- **LUV:** Vesículas unilaminares grandes
- **MLV:** Vesículas multilaminares
- **GULV:** Vesículas unilaminares gigantes
- **BHE:** Barrera hematoencefálica
- **TGI:** Tracto gastrointestinal
- **FB:** Fase bucal
- **FG:** Fase estomacal
- **FI:** Fase intestinal
- **TEM:** Microscopio de transmisión electrónica
- **F-TIR:** Espectroscopía infrarroja por la transformada de Fourier
- **DSC:** Calorímetro Diferencial de Barrido

RESUMEN EJECUTIVO

El desarrollo de nanosistemas de administración de fármacos es importante para un mejor tratamiento de enfermedades. El objetivo de este estudio fue elaborar liposomas con lecitina (CL) y colesterol (CHO) para la encapsulación del antibiótico doxiciclina. Este antibiótico es importante en el tratamiento de infecciones bacterianas y se administra vía oral.

La elaboración de los liposomas se realizó mediante el método de película hidratada, evaluando distintas proporciones de CL:CHO. Se caracterizaron los liposomas mediante análisis infrarrojo (FT-IR), análisis térmico (DSC) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Adicionalmente, se evaluó la estabilidad de los liposomas en el tracto digestivo mediante una simulación *in vitro* y también la mejor temperatura de conservación. Se determinó que la proporción ideal de CL:CHO para obtener los liposomas fue de 70:30, esta misma proporción fue la que presentó la mejor eficiencia de encapsulación de doxiciclina con un 56 por ciento.

Se verificó la formación de nanovesículas esféricas y la presencia de elementos químicos característicos de cada componente en los liposomas cargados de doxiciclina. Los liposomas mantuvieron una estabilidad promedio del 50 por ciento, cercana a los liposomas sin digestión y la mejor temperatura de conservación fue de 4 grados Celsius luego de dos semanas. En conclusión, se ha demostrado que con CL y CHO se puede elaborar liposomas que encapsulen fármacos, como doxiciclina, y que estos liposomas logran un porcentaje de encapsulación y estabilidad adecuados por lo que tienen potencial para ser aplicados como nanosistemas de administración de fármacos por vía oral.

Palabras clave: Biotecnología farmacéutica, liposomas, encapsulación, nanotecnología, administración de fármacos, fosfolípidos, doxiciclina.

ABSTRACT

The development of nanodrug delivery systems is important for the better treatment of diseases. The objective of this study was to prepare liposomes with lecithin (CL) and cholesterol (CHO) for the encapsulation of the antibiotic doxycycline. This antibiotic is important in the treatment of bacterial infections and is administered orally.

The preparation of the liposomes was carried out using the hydrated film method, evaluating different proportions of CL:CHO. Liposomes were characterized by infrared analysis (FT-IR), thermal analysis (DSC), and transmission electron microscopy (TEM). Additionally, the stability of the liposomes in the digestive tract was evaluated through an in vitro simulation and also the best storage temperature was tested. It was determined that the ideal proportion of CL:CHO to obtain the liposomes was 70:30, this same proportion was the one that presented the best doxycycline encapsulation efficiency with 56 percent.

The formation of spherical nanovesicles and the presence of chemical groups of each component were verified in the liposomes loaded with doxycycline. The liposomes maintained an average stability of percent, close to liposomes without digestion, and the best storage temperature was 4 degrees Celsius after two weeks. In conclusion, it has been shown that with CL and CHO are good elements for liposomes fabrication and drug encapsulation, such as doxycycline. These liposomes achieve an adequate encapsulation percentage and stability, which is why they have the potential to be applied as nanosystem for oral drug administration.

Keywords: Pharmaceutical biotechnology, liposomes, encapsulation, nanotechnology, drug delivery, phospholipids, doxycycline.

CÁPITULO I.- MARCO TEÓRICO.

1.1. Antecedentes Investigativos.

1.1.1. Sistemas de administración de fármacos Tradicionales.

Los sistemas de administración de fármacos son métodos o vías utilizadas para introducir medicamentos en el organismo de un paciente **(Jain, 2020)**. Las vías tradicionales o convencionales de administración de fármacos incluyen la vía oral, parenteral, dérmica y ocular; de estas, la vía oral es la más aceptada por la población; sin embargo, los medicamentos administrados vía oral se enfrentan a barreras y condiciones del sistema digestivo que deben superar previo a su absorción **(Homayun et al., 2019)**.

Los métodos de administración tradicionales se han empleado desde las primeras civilizaciones humanas. Estos métodos son muy conocidos y ampliamente utilizados en la práctica médica actual. La vía por la cual se administra un fármaco depende de varios factores o parámetros como: la naturaleza química del medicamento, la zona de absorción, la farmacocinética, la condición del paciente, entre otras **(Karra et al., 2019)**. Los sistemas de administración de fármacos tradicionales no desaparecerán, pero, la aparición de tecnologías farmacéuticas modernas, como los sistemas de administración de fármacos dirigida están complementado a estos sistemas tradicionales **(Laffleur & Keckeis, 2020; Meng et al., 2020)**.

1.1.2. Sistemas de administración de fármacos dirigidos.

Los sistemas de administración dirigidos constituyen tecnologías diseñadas para la administración específica y/o la liberación controlada de agentes terapéuticos. Estos sistemas regulan la velocidad y la zona específica del organismo donde se liberará el

fármaco, esto con la finalidad de que la administración del medicamento sea de manera local y no de manera sistémica, es decir, que no afecte a todo el organismo (**Manzari et al., 2021**).

Las tecnologías orientadas al diseño de estos sistemas se enfocan en cuatro factores clave que consisten en: las rutas de entrega, los vehículos de reparto, la carga y las estrategias de focalización. Complementariamente a esto, se debe tener en cuenta cómo progresan y se desarrollan las enfermedades, así como las formas en las que reacciona el cuerpo tanto a la enfermedad como al fármaco con el que se la trata (**Adepu & Ramakrishna, 2021**).

Las rutas de entrega se refieren a la búsqueda de alternativas viables y mucho más eficaces para la administración del medicamento. Mientras que, los vehículos de reparto hacen referencia al diseño y formación de estructuras que serán portadoras de la carga, transportándola hasta su sitio de acción específico (**Sreeharsha et al., 2019**). La carga es el contenido de estos vehículos de reparto, es decir, el fármaco o agente terapéutico que se va a introducir y transportar en los mismos. Una vez definidas estas características, las estrategias de focalización, se basan en las soluciones que deben implantarse en torno a la experiencia y a la prueba con varias metodologías, a fin de que estos sistemas tengan la mayor eficiencia al tratar la enfermedad de manera focalizada (**Sung & Kim, 2020**).

Así, todas estas características, proveen a estos sistemas de administración dirigidos grandes ventajas, donde se destacan la reducción de la dosis, frecuencia de administración del medicamento y una mejor adherencia al tratamiento. Es decir, la adaptación y reacción al tratamiento es mucho menos invasiva debido a que reduce los efectos adversos, complementariamente, influye en la mejora respecto a la selectividad de la actividad farmacológica y provee de un efecto terapéutico prolongado (**Sung & Kim, 2020**).

Los sistemas de administración de fármacos dirigidos al permitir la entrega de un medicamento en una zona específica, provee de una máxima eficacia a nivel terapéutico y, a su vez, minimiza la cantidad de efectos secundarios. Por lo tanto, estos sistemas implementan una variedad de enfoques a fin de lograr esta gestión terapéutica dirigida (**Patra et al., 2018**). Por estas ventajas, se han diseñado nuevas estrategias de administración de los agentes terapéuticos, proporcionando una mayor estabilidad química y actividad con respecto a los medicamentos administrados de forma oral.

Los sistemas de administración dirigidos se aplican a partir de la encapsulación de los ingredientes activos en nanopartículas como: micelas, liposomas, nanoesferas, entre otras (**C. Li et al., 2019**). Las nanopartículas encapsulan a los medicamentos para posteriormente, dirigirlas a áreas específicas del organismo, además, pueden diseñarse para que su liberación también sea controlada, elevando así, su eficiencia a nivel terapéutico (**Dang & Guan, 2020**).

La demanda de los sistemas de administración de fármacos dirigidos aumentó en los últimos años, por la alta eficiencia y baja toxicidad que presentan; un ejemplo de estos sistemas corresponde a los liposomas, resultando como las estructuras más utilizadas como nanoportadores (**Olusanya et al., 2018**). Los liposomas aplicados como sistema de administración de fármacos presentan características favorables para la encapsulación de un medicamento, tanto en el control de la liberación del fármaco como en su biocompatibilidad (**P. Liu et al., 2022**).

1.1.3. Liposomas como sistema de administración dirigida.

Los liposomas son considerados como vehículos para portar diversos componentes terapéuticos, como anticancerígenos, antibióticos, genes, entre otros medicamentos (**Ahmed et al., 2018**). La estructura de los liposomas permite la encapsulación de esta amplia cantidad de fármacos, logrando encapsular moléculas de diferente solubilidad (**Chen et al., 2020**). Las ventajas presentes en la administración de fármacos basados

en lípidos corresponden a su estabilidad y biodisponibilidad, ya que producen la liberación controlada del fármaco con una baja toxicidad, siendo los sistemas de administración de fármacos más investigados.

Mandracchia & Giuseppe Tripodo (2020) definen a los liposomas como vesículas creadas a partir de lípidos, esencialmente fosfolípidos, los cuales forman una bicapa lipídica similar a las membranas celulares. Estas vesículas se emplean como sistemas de transporte de sustancias a nivel biomédico, ya que permiten encapsular tanto sustancias hidrófilas (solubles en agua) como sustancias lipófilas (solubles en lípidos).

Los liposomas pueden tener distintos tamaños y estructuras, los cuales pueden modificarse a fin de mejorar su estabilidad y capacidad de entrega. Su aplicación como vehículos de administración de fármacos se da gracias a la protección que brindan al ingrediente farmacéutico ante la degradación enzimática, elevando paralelamente su biodisponibilidad (**Zhong et al., 2022**). Otra característica para resaltar es que su acción puede ser focalizada, debido a que se puede dirigir a tejidos específicos del organismo, debido a esto se emplean para encapsular principios activos y así, mejorar su penetración en su sitio de acción. También son empleados en investigaciones para el estudio funcional y estructural de las membranas celulares (**H. Zhang et al., 2020**).

Los liposomas son estructuras coloidales que poseen una forma esférica, los componentes que los conforman tienen la capacidad de autoensamblarse al estar en una solución, gracias a sus características anfifílicas; dando como resultado la formación de bicapas lipídicas y un núcleo acuoso (**Guimarães et al., 2021**).

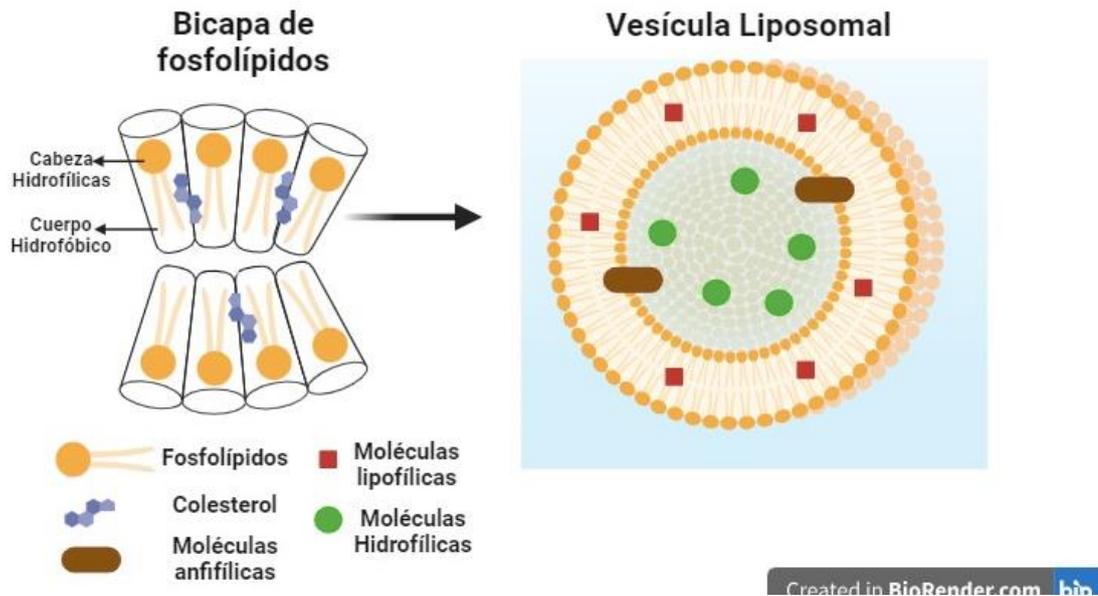


Figura 1. Estructura e interacción de los componentes de los liposomas. Imagen elaborada por **BioRender**.

La imagen muestra la interacción de los fosfolípidos y colesterol para la formación de la estructura vesicular, donde sus cabezas hidrofílicas y cuerpos hidrófobos se agrupan, produciendo un núcleo acuoso; proporcionando la capacidad de encapsular moléculas con diferente solubilidad por parte de los liposomas.

En general, existen cuatro tipos principales de sistemas de administración de liposomas, que son liposomas convencionales, liposomas estabilizados, liposomas dirigidos a ligando y combinaciones entre los mismos.

Los liposomas convencionales constituyen la primera generación, estos se forman por una bicapa lipídica que puede estar formada por fosfolípidos, ya sean aniónicos, catiónicos o neutros, que junto con el colesterol, rodean un volumen acuoso definido. El potencial clínico de estos liposomas convencionales inició cuando se descubrió que la administración liposomal era útil para elevar el índice terapéutico de fármacos encapsulados, en ese entonces, de la anfotericina y la doxorubicina. Desde allí, estas formulaciones convencionales han reducido la toxicidad de compuestos, incidiendo positivamente en la biodistribución y farmacocinética del fármaco a los tejidos enfermos, en comparación con el fármaco libre. Sin embargo, este sistema

convencional tiene ciertas desventajas, ya que tiende a eliminarse rápidamente en la sangre, limitando su eficacia terapéutica **(W.-J. Zhang et al., 2019)**.

A fin de mejorar la estabilidad de los liposomas y prolongar su tiempo de circulación, se han generado liposomas estérilmente estables, donde el polímero hidrófilo que es el polietilenglicol (PEG) constituye la opción óptima para la obtención de liposomas de esta categoría. Es así como el establecimiento de una membrana especializada mejora significativamente la eficacia de los agentes encapsulados, ya que minimizan la opsonización *in vivo*, mediante componentes séricos complementados con el rápido reconocimiento y absorción de los sistemas a los cuales va dirigido, lo que prolonga el tiempo de circulación y reduce los efectos secundarios **(Homayun et al., 2019)**.

Los liposomas dirigidos a ligandos poseen un gran potencial puesto que ofrecen la administración de fármacos en un sitio específico dependiendo de las células u órganos determinados del organismo que expresan o sobreexpresan ligandos de manera selectiva, es decir, los ligandos son moléculas específicas que actúan como receptores o moléculas de adhesión celular que se encuentran en el sitio de la enfermedad. Existen varios tipos de ligandos como anticuerpos, proteínas, péptidos y carbohidratos, sin embargo, los más empleados son los anticuerpos, debido a que son los componentes más versátiles al momento de unirse a la superficie de los liposomas. Una de las ventajas del uso de anticuerpos monoclonales es la gran estabilidad y afinidad de unión que ofrecen **(J. Li et al., 2020)**.

La nueva generación de liposomas utiliza las plataformas de diseño anteriores con las cuales se busca mejorar la orientación de los liposomas y, por consiguiente, la administración de fármacos asociada. Como es el caso de la unión inmunoliposomal específica del objetivo con la estabilización estérica de PEG, en este caso, se crea inmunoliposomas de circulación prolongada con una especializada farmacocinética **(Margossian et al., 2022)**.

Estos sistemas de administración de fármacos basados en formas liposomales han aportado significativamente a la creación de fármacos mucho más potentes y a la vez estables, mejorando así los tratamientos terapéuticos **(Patra et al., 2018)**. Existen varios métodos y técnicas enfocadas para la preparación de liposomas, aunque el principio del mecanismo de disposición e interacción entre los lípidos y fármacos no es discutible. Por lo tanto, el control y regulación experimental se enfoca hacia el tamaño, la carga y la hidratación de la superficie de los liposomas **(Davoodi et al., 2018)**.

Los liposomas se caracterizan en función de parámetros físicos, químicos y biológicos, sin embargo, el tamaño es un factor clave en su diseño, pues incide directamente en la circulación de estos hasta llegar al sitio objetivo. Dependiendo de la caracterización y estructuración de los liposomas, se pueden encapsular diversas clases de fármacos, como antivirales, antifúngicos, antimicrobianos, vacunas, medicamentos antituberculosos y terapias génicas **(Scicluna & Vella-Zarb, 2020)**.

La clasificación que tienen los liposomas depende de las bicapas lipídicas o por su tamaño; las vesículas unilaminares pequeñas (SUV) poseen un diámetro de 20 a 100 nm, las vesículas unilaminares grandes (LUV) tienen un diámetro de 100 a 1000 nm; incluso si tienen más de una bicapa lipídica siendo vesículas multilaminares (MLV) **(Kanda et al., 2021)**. Los liposomas están ensamblados por fosfolípidos, estos son compuestos biodegradables y biocompatibles, por la similitud de los lípidos que componen las membranas celulares del organismo **(Shah et al., 2020)**.

Las aplicaciones de los liposomas se incluyen en campos como: la inmunología, dermatología, adyuvantes de vacunas, trastornos oculares, focalización cerebral, enfermedades infecciosas y terapia tumoral **(Dhapte & Pokharkar, 2019)**.

1.1.4. Componentes de la estructura de los liposomas.

Los liposomas, se utilizan ampliamente como modelos de membrana, esto gracias a la versatilidad respecto a su composición estructural, en la cual se encuentran una gran cantidad de lípidos, lo que se relaciona estrechamente con la estructura de las membranas celulares. Los lípidos que los componen pueden ser de origen natural o sintético. Además, su estructura depende tanto del grado como de la longitud de las cadenas hidrocarbonadas presentes, incluso influyen parámetros fisicoquímicos como el pH o la carga iónica de la fase acuosa (Nsairat et al., 2017).

Los fosfolípidos constituyen los lípidos que se usan con mayor frecuencia para elaborar liposomas, cuya variabilidad se da en torno al grupo que se une al fosfato; la lecitina es el componente más aplicado para la formación de liposomas, ya que tiene una gran cantidad de fosfolípidos, siendo la fosfatidilcolina la más empleada debido a que es fácilmente extraíble tanto de la yema de huevo como de la semilla de soya (Guimarães et al., 2021).

1.1.4.1.Lecitina de soya.

La lecitina se encuentra conformado por triglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos; es el resultado del proceso de extracción de lípidos de fuentes naturales como animales o vegetales; un ejemplo de fuente natural vegetal corresponde a la soya, la obtención de la lecitina a partir de esta fuente es mucho más económica y estable (Le et al., 2019).

La lecitina constituye un componente óptimo para la formación de liposomas. ya que es mucho más asequible, segura y rentable desde el punto de vista de producción. Además, la soya se produce a gran escala en todo el mundo, por tanto, los liposomas generados a partir de lecitina de soya sin refinar resultan mucho más económicos, esto gracias a que este componente al no ser refinado contiene cantidades

significativamente mayores de fosfolípidos que otras fuentes vegetales (**Le et al., 2019**).

La lecitina de soya tiene la gran ventaja de ser más estable por contener una menor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, resultando más segura y con alta disponibilidad; esto provoca que la producción farmacéutica de liposomas sea menos costosa (**Asprea et al., 2019**). **Kanda et al. (2021)** aplicó la lecitina de soya como materia prima para la producción de liposomas, este componente presentó una combinación de fosfolípidos lo que permitió la obtención de liposomas estables.

El contenido de la lecitina de soya corresponde a compuestos fosfáticos, es decir una combinación de fosfolípidos, teniendo como principales a la fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol (**Cala Calviño & Morris Quevedo, 2021**).

1.1.4.2. Colesterol.

Los fosfolípidos tienen un papel fundamental en la formación de los liposomas, pero la degradación irreversible de estos componentes lipídicos afecta a la estabilidad de la membrana liposomal, por lo que la aplicación de esteroides en la composición de las membranas ha favorecido al proporcionar una mayor resistencia de la membrana evitando su permeabilidad (**Tai et al., 2018**).

Para la elaboración de los liposomas se ha aplicado el colesterol (CHO), por su influencia en la estabilidad del liposoma permitiendo una mayor fluidez y rigidez en su estructura, influyendo en la liberación del fármaco (**Nakhaei et al., 2021**).

La concentración de CHO en la membrana celular constituye aproximadamente entre el treinta y cincuenta por ciento de todos los componentes lipídicos, desempeñando funciones esenciales en la membrana, con respecto a la permeabilidad, elasticidad, dureza y el acondicionamiento de la misma. El CHO es el componente más utilizado en formulaciones liposomales puesto que, a más de sus funciones a nivel de membrana, previene la aglomeración de liposomas y mejora su estabilidad (Nsairat et al., 2023).

1.1.5. Proceso de formación de los liposomas.

Para la formación de los liposomas existen dos categorías que corresponden a: métodos convencionales y métodos modernos (Ajeeshkumar et al., 2021). Los principales métodos convencionales corresponden a: evaporación por fase inversa, método por inyección y película hidratada; mientras las metodologías modernas aplican la hidratación y electroformación en microfluído o el uso de un fluido supercrítico (Large et al., 2021).

1.1.5.1. Métodos Convencionales.

- **Método por película hidratada (Bangham).**

Este tipo de metodología es la más aplicada con respecto a la producción de liposomas donde se establecen dos fases de solubilidad; teniendo una fase orgánica donde se solubilizarán los componentes anfífilos, como los fosfolípidos, con disolventes orgánicos (Large et al., 2021).

Posteriormente de la homogenización de los componentes lipídicos se busca la eliminación del disolvente orgánico por medio de la evaporación a través de un rotavapor (Miere (Groza) et al., 2021), como resultado de este proceso se obtiene una

película lipídica fina que se hidratará con una solución acuosa con agitación dando como resultado la formación de los liposomas (**Guimarães et al., 2021**).

Para la eficiente formación de los liposomas al hidratarlos con la fase inorgánica, un factor crítico a considerar corresponde a la temperatura de fase de transición de los fosfolípidos (T_t). Los fosfolípidos al estar por encima de esta temperatura presentan una fase cristalina líquida, en esta fase se produce la formación de las vesículas liposomales por la orientación aleatoria de sus cadenas lipofílicas. En cambio, al tener un valor menor a la T_t , las cadenas lipofílicas están expandidas y ensambladas, impidiendo la formación de los liposomas (**Catala, 2019**).

Este tipo de proceso ha sido el más estudiado, ya que al tener un planteamiento directo es más simple con respecto a su ejecución produciendo la encapsulación de los agentes terapéuticos (**Ajeeshkumar et al., 2021**). A pesar de tener un enfoque directo, los tamaños de las nanopartículas corresponden a la categoría de vesículas unilaminares gigantes (GULV), por lo que es necesaria la aplicación de un proceso de homogenización que reducirá el tamaño de las nanopartículas y dará una distribución uniforme (**Catala, 2019**). En el método de Bangham se homogeniza el tamaño de los liposomas a través de la extrusión con el paso de las vesículas por membranas o filtros; otra técnica para homogenizar corresponde a la aplicación de sonicación por las fuerzas de corte producidas (**Maja et al., 2020**).

- **Método por Inyección de solvente.**

Una metodología alternativa para la formación de vesículas liposomales, corresponde al método de inyección de solvente. Su metodología se basa en la inyección de la fase orgánica en un gran volumen de una solución acuosa, en el cual el solvente más utilizado corresponde al etanol (**Ajeeshkumar et al., 2021**). La fase orgánica contiene a los fosfolípidos y al fármaco disueltos, al ser ingresado el solvente en la fase acuosa, se produce la formación de bicapas lipídicas por la desfavorable exposición de los fosfolípidos en el medio acuoso. Al tener la formación de los liposomas se procede a

la separación del solvente residual a través de una membrana de diálisis o por medio de la evaporación por un rotavapor, finalmente se pasa por un tubo de filtración bajo la presión de gas nitrógeno (**Gouda et al., 2021**).

1.1.5.2. Métodos modernos.

- Método por fluido supercrítico.

La aplicación de este tipo de metodología necesita condiciones de un fluido en condiciones supercríticas, como el dióxido de carbono supercrítico a una presión de 250 bar, lo que produce la dilución de los fosfolípidos y colesterol en el fluido. Posteriormente el fluido se expande con etanol a 60 °C, para luego la solución ser mezclada con una solución acuosa con el fármaco (**Trucillo et al., 2020**).

Las principales ventajas que presenta este tipo de método de formación de liposomas es la alta eficiencia de encapsulación y una mayor estabilidad de los mismos (**Trucillo et al., 2019**). Esto permite el control y esterilización *in situ* de los liposomas formados, permitiendo su aplicación a nivel industrial; sin embargo, los altos costos impiden su aplicación en laboratorio por las infraestructuras especiales que se necesitan para su control (**Catala, 2019**).

1.1.6. Vías de administración de liposomas.

Los liposomas como sistemas de administración dirigidos para agentes terapéuticos han presentado mejores características para ser asimilados por el organismo. Los liposomas por su biocompatibilidad son capaces de superar las barreras biológicas como la piel, intestino delgado, barrera hematoencefálica, entre otras; incluso pueden proteger a los fármacos de una posible respuesta inmunitaria (**Filipczak et al., 2020**).

Por lo que la aplicación de los liposomas se puede combinar con las vías tradicionales de fármacos para potenciar el efecto terapéutico.

1.1.6.1. Administración transdérmica.

Los lípidos han sido aplicados como vehículos vesiculares para la administración de fármacos por una vía transdérmica, como para la dosificación de analgésicos o el tratamiento para infecciones virales o bacterianas (**Sudhakar et al., 2021**). La administración transdérmica permite la circulación directa del fármaco en el organismo, ya que evitan la degradación por el sistema gastrointestinal (**Filipczak et al., 2020**).

Por medio de los liposomas se han suministrado fármacos de forma no invasiva, es decir que no se realizaron cortes o inyecciones para ser administrados. Para esto los liposomas convencionales han sido modificados con la adición de potenciadores o activadores para la facilitar la penetración de los vehículos liposomales en la piel (**Hasan et al., 2020**). Las modificaciones de los liposomas influyen en la forma y tamaño de estos; permitiendo atravesar los espacios intracelulares sin romper sus estructuras (**Souto et al., 2021**).

1.1.6.2. Administración a través de la barrera hematoencefálica.

La barrera hematoencefálica (BHE) se encarga de la protección del sistema nervioso central, ya que controla el transporte de moléculas de la sangre al cerebro, restringiendo el paso a tan solo moléculas esenciales (**K. H. Wong et al., 2019**). Este tipo de barrera está conformada por la unión de células endoteliales que impiden el paso de la mayoría de los fármacos, provocando una baja permeabilidad de agentes terapéuticos (**Yamaguchi et al., 2020**). Debido al acceso limitado hacia las zonas del

cerebro, los liposomas se han aplicado como sistemas de administración de fármacos no invasivos y biocompatibles, para el cerebro.

La BHE presenta mecanismos de transporte que permiten el traspaso de liposomas al cerebro, suministrando la molécula terapéutica a las neuronas. Uno de estos mecanismos es la transcitosis, en el cual intervienen receptores celulares que controlan el paso de las moléculas al cerebro (**dos Santos Rodrigues et al., 2018**). Estos receptores pueden integrarse como ligando en la superficie de los liposomas permitiendo atravesar la BHE y administrar el agente terapéutico.

1.1.6.3. Administración oral.

Las ventajas presentes en la aplicación de los liposomas, como sistemas de administración por vía oral, corresponden a su biocompatibilidad y la protección del fármaco a ser degradado (**C. Y. Wong et al., 2018**). Los liposomas al pasar por el tracto gastrointestinal (TGI), sufren alteraciones y producen la liberación del agente terapéutico encapsulado. Los componentes y condiciones del TGI afectan a la estructura de los liposomas, modificando la concentración de nanovesículas intactas con el fármaco encapsulado (**He et al., 2019**). Para que los liposomas puedan soportar estas condiciones se han aplicado modificaciones en cuanto a su estructura; en especial con la adición o recubrimiento de polímeros en la superficie, algunos de los polímeros que mejoraron la estabilidad de los liposomas son la pectina, quitosano, lectina, entre otros (**Filipczak et al., 2020**).

A pesar de las limitantes que presentan para ser administrados por vía oral, los liposomas por sus características minimizan los efectos secundarios y la toxicidad de los medicamentos (**Elsharkasy et al., 2020**). Por esto se han aplicado como nanovehículos para la encapsulación de antibióticos como la doxiciclina para el tratamiento de infecciones bacterianas en ratones (**Wang et al., 2023**). Sin embargo,

la efectividad de encapsulación a partir de fosfolípidos de origen natural no ha sido ampliamente investigada.

1.1.7. Doxiciclina.

El fármaco doxiciclina es un tipo de antibiótico que actúa en contra de bacterias grampositivas y gramnegativas, siendo aplicado para el tratamiento de infecciones intestinales, respiratorias, urinarias o reproductivas (**Aniagor et al., 2021**). Este tipo de fármaco pertenece a la familia de las tetraciclinas, afectando a las proteínas ribosómicas de las bacterias (**Peyriere et al., 2018**).

El consumo de doxiciclina ha presentado efectos secundarios sobre el tracto gastrointestinal, provocando irritación sobre los órganos de este sistema, provocando esofagitis, alteraciones digestivas, entre otras afecciones en el organismo (**Mazabel Riera & Monsalve Buriticá, 2020**).

Lee et al. (2023), en su trabajo referencia la microencapsulación de la doxiciclina mediante liposomas como un prometedor sistema de administración de fármacos, por medio de la tecnología de microfluidos donde se obtiene una disminución de los efectos tóxicos del medicamento.

1.2.Objetivos

1.2.1. Objetivo general

- Elaborar liposomas cargados con el antibiótico doxiciclina mediante la combinación de fosfolípidos para la aplicación como sistema administración de fármacos.

1.2.2. Objetivos específicos

- Optimizar el proceso de elaboración de liposomas para la encapsulación de doxiciclina mediante la combinación de diferentes fosfolípidos.
- Determinar la eficiencia de la formación de liposomas y de la encapsulación del antibiótico doxiciclina.
- Evaluar la estabilidad de los liposomas con doxiciclina por medio de una digestión simulada *in vitro*.

CÁPITULO II.- METODOLOGÍA

2.1.Materiales

Los materiales aplicados en el proyecto de investigación (Reactivos, material fungible y equipos de laboratorio) corresponden a los que se presenta a continuación:

2.1.1. Reactivos

- Lecitina de soya cruda
- Colesterol
- Doxiciclina
- Etanol (95 % de pureza).
- Metanol
- Cloroformo
- Protamina
- Cloruro de sodio
- Cloruro de potasio
- Ácido clorhídrico
- Fosfato dipotásico
- Agua destilada
- Sales Biliares (comprimido)
- Pepsina (comprimido)
- Pancreatina

2.1.2. Material fungible

- Matraces Erlenmeyer de 250 mL
- Vasos de precipitación 25 mL
- Vasos de precipitación 50 mL
- Tubos Falcon 15 mL
- Probeta 10 mL
- Probeta 50 mL
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Pinzas
- Gradilla
- Micropipeta 100 μ L a 1000 μ L
- Pipetas Graduadas (5 mL-25 mL)

2.1.3. Equipos de laboratorio

- Autoclave
- Plancha de agitación
- Balanza analítica Ohaus PA-313
- Ultrasonicador
- Incubadora
- Refrigerador
- Centrífuga (Hettich Zentrifugen y Germany)
- Espectrofotómetro UV-VIS Fisher Scientific accuSkan Go
- Espectrofotómetro infrarrojo Jasco FT/IR 4100
- Calorímetro Diferencial de Barrido DSC
- Rotoevaporador IKA HB10
- Vórtex
- Potenciómetro

2.2.Métodos

2.2.1. Optimización del proceso de elaboración de liposomas para la encapsulación de doxiciclina.

2.2.1.1.Obtención de los fosfolípidos y colesterol.

El reactivo de colesterol se adquirió de la empresa Thermo Fisher Scientific, mientras que la lecitina de soya cruda se obtuvo de un sector comercial como suplemento alimenticio al ganado.

2.2.1.2.Preparación de la solución orgánica.

La lecitina de soya y el colesterol se combinaron en 20 mL de una mezcla de solventes orgánicos (cloroformo y metanol 2:1 v/v), a diferentes proporciones: 60:40; 70:30; 80:20 de lecitina de soya cruda:colesterol respectivamente; para cada formulación se obtuvo 100 mg de lípidos totales (**Fathalla et al., 2020**).

2.2.1.3.Preparación de la solución inorgánica.

Para la hidratación de la película lipídica se utilizó la solución inorgánica usando la solución del método de (**Fathalla et al., 2020**); mientras en 10 mL de tampón citrato (10 mM, pH 3,3) se diluyó 10 mg del fármaco doxiciclina.

2.2.1.4. Formación de liposomas por el método de película hidratada.

Para la formación de los liposomas se aplicó una metodología modificada de **(Fathalla et al., 2020)**; se colocó la solución orgánica en el balón y se evaporó a presión reducida a 40°C por medio un rotavapor a 90 rpm, posterior a esto se formó una película delgada en las paredes del balón.

La hidratación de la película delgada se efectuó usando 10 mL del tampón citrato que contiene el antibiótico doxiciclina, el producto se agitó por un período de 2 min a 37°C y 90 rpm aplicando el rotavapor. Pasado los dos minutos se incubó la solución a temperatura ambiente por 3 horas. Finalmente, a la suspensión obtenida se trató en un ultrasonificador por 30 ciclos con baño de hielo, cada ciclo consistía en 2 segundos de encendido y 2 segundos de apagado a una frecuencia del 25%.

2.2.1.5. Análisis de las soluciones liposomales por medio del microscopio óptico de luz invertida.

Por medio de un objetivo de 40x en un microscopio óptico de luz invertida EVOs se obtuvieron imágenes de la solución liposomal **(Miere (Groza) et al., 2021)**.

2.2.2. Análisis de la eficiencia de encapsulación de doxiciclina en los liposomas.

2.2.2.1. Determinación de la concentración de doxiciclina encapsulada y residual.

Cada proporción de los liposomas cargados con doxiciclina, se midió su eficiencia de encapsulación por medio del método de adición de protamina **(Tai et al., 2019)**; la solución de protamina (50 mg/5ml) con la solución liposomal se homogenizó en

volúmenes iguales 1:1, para posteriormente ser incubadas por 6 horas; se centrifugó la muestra a 10 000 gravedades por 35 min, para obtener dos fases, el precipitado se lavó con agua destilada tres veces, para luego ser disuelta en metanol. Se midió la absorbancia del precipitado disuelto y el sobrenadante en un espectrofotómetro UV-vis. Los valores de absorbancia se registraron a una longitud de onda de 273 nm (**Gholse et al., 2022**). La obtención de los valores de concentración se realizó reemplazando las variables de la fórmula de la curva de doxiciclina **Figura 7** con los valores de absorbancia.

El cálculo del porcentaje de encapsulación se basa en la fórmula:

$$EE\% = \frac{\text{Cantidad total de doxiciclina} - \text{Cantidad libre de doxiciclina}}{\text{Cantidad total de doxiciclina}} \times 100$$

Cantidad total de doxiciclina= Concentración del sobrenadante + Concentración del precipitado.

Cantidad libre de doxiciclina= Concentración del sobrenadante

2.2.2.2. Evaluación de la formación de liposomas y eficiencia de encapsulación de doxiciclina por medio espectroscopía infrarroja de la transformada de Fourier.

La evaluación por medio de espectroscopía infrarroja para cada proporción de los liposomas cargados con doxiciclina se tomó de 3 a 5 µL de las muestras de los componentes utilizados y los liposomas formados, para analizarlos en un intervalo de 4000 a 400 cm⁻¹ con una resolución de 0.48 a 1.93 cm⁻¹ (**Fathalla et al., 2020**).

2.2.2.3. Evaluación de la formación de liposomas con doxiciclina por medio de análisis térmico.

La evaluación por medio del calorímetro diferencial de barrido DSC se tomó de 3 a 5 mg de muestras de los componentes utilizados, se equilibró a una temperatura de 25 °C manteniéndolo por 5 min para posteriormente subir la temperatura en un intervalo de 10 °C/min hasta llegar a 300°C (Fathalla et al., 2020). Esto se aplicó con una corriente de gas de nitrógeno.

2.2.3. Evaluación de la estabilidad de los liposomas con doxiciclina por medio de una digestión simulada *in vitro*.

Por medio de una simulación de las condiciones del sistema gastrointestinal en base del estudio de Tai et al. (2019); se inició con el precalentamiento a 37°C de la solución con los liposomas. Posteriormente se empezó a someter la solución liposomal en diferentes fases que corresponden a: 1) Fase bucal donde se simuló el fluido salival (SSF) para esto se preparó el SSF con 0.597 g NaCl y 0.101 g de KCl en 500 mL de agua destilada; se mezcló en proporciones de 1:1 los liposomas y SSF ajustando el pH a 6.8, para dejarlo por 10 min. 2) Fase estomacal corresponde al líquido gástrico simulado (SGF); se simuló el líquido gástrico FGS con 1 g de NaCl, 3.5 mL de HCl concentrado y se ocupó el comprimido de cápsula comercial (DIGESTOTAL BILIAR), con 300 mg de pepsina en su contenido; los componentes se disolvieron en 500 mL agua destilada; se mezcló 1:1 de proporciones de volumen de los liposomas y de FGS ajustando el pH a 1.5 dejándolo por 2 h. 3) Fase de intestino delgado, como última fase se simuló las condiciones del líquido intestinal (SIF); se obtuvo el SIF con 3.4 g de K₂HPO₄, 4.35 g NaCl, 1.6 g de pancreatina y se ocupó el comprimido de cápsula comercial (DIGESTOTAL BILIAR), con 315 mg sales biliares en su contenido; los componentes se disolvieron en 500 mL de agua destilada Se ajustó la mezcla de la muestra de fase estomacal a un pH de 6.8. Se mezcló 1:1 de proporciones de volumen de los liposomas y de SIF ajustando el pH 7.0 dejándolo por 2 h.

Se midió la eficiencia con el método (Tai et al., 2019); donde al producto resultante del sistema digestivo simulado se centrifugó a 10000 gravedades y se midió por espectrofotometría UV-vis. Los valores de absorbancia se registraron a una longitud de onda de 273 nm (Gholse et al., 2022).

2.2.3.1. Evaluación de las condiciones de almacenamiento.

Para esta evaluación se tomó suspensiones liposomales y se las colocó en tubos Falcon (10 mL) en base al método de (Bhatia et al., 2004); a un período de tiempo de dos semanas con las siguientes condiciones:

- a. RF=4-8°C.
- b. TA=20±2°C.
- c. 30±2°C.
- d. 37±2°C.

2.2.4. Análisis Estadístico

Se realizó un análisis ANOVA con las siguientes especificaciones:

- Ho= Las concentraciones de los liposomas y colesterol incide en la eficiencia de encapsulación de la doxiciclina.
- Ha= Las concentraciones de los liposomas y colesterol no incide en la eficiencia de encapsulación de la doxiciclina.

Posterior a la obtención de los resultados de la ANOVA se realizó una prueba post hoc, a través del método de Tukey con un 95% de confianza, con el cual se obtendrá una mayor sensibilidad para definir cuál de los tratamientos será el más significativo, donde, si *p value* es menor a 0.05 se aceptará la hipótesis nula.

CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de resultados.

3.1.1. Optimización del proceso de elaboración de liposomas para la encapsulación de doxiciclina.

3.1.1.1. Elaboración de los liposomas mediante la combinación de lecitina y colesterol por el método de película hidratada.

El proceso de preparación de liposomas inicia con la optimización de la concentración de los fosfolípidos, colesterol y otros elementos a emplear en el proceso. Este es un paso fundamental debido a que la composición de la formulación liposomal influye directamente en la encapsulación del fármaco y su posterior liberación, alterando la estabilidad y permeabilidad de la bicapa lipídica (**Inglut et al., 2020; Maritim et al., 2021**).

Una fuente natural de fosfolípidos empleada en la fabricación de liposomas es la lecitina, la estructura de la lecitina comprende una mezcla compleja de fosfolípidos combinados como: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, entre otros (**Johnson et al., 2020**). La lecitina puede extraerse de diversas matrices como por ejemplo de yemas de huevos, semillas de girasol o de la soya (**Bot et al., 2021**). La aplicación de lecitina extraída de la soya ha presentado mayores ventajas para la formación de liposomas, debido a que tienen una menor cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, proporcionando mayor estabilidad a la membrana (**Le et al., 2019**). Los liposomas formados a partir de lecitina de soya han sido investigados en áreas biomédicas como la encapsulación de curcumina como agente antiinflamatorio (**Gao et al., 2021**); también se ha empleado como componente de liposomas con isoniazida, para el tratamiento de la tuberculosis (**Nkanga et al., 2017**).

La lecitina extraída de la soya puede presentar diversos niveles de pureza y es la lecitina de alta pureza la que tiene un mayor valor comercial en el mercado. Debido a los costos, se ha investigado la aplicación de lecitina de baja pureza, la cual contiene un 60% de fosfolípidos y 40% de triglicéridos (**Pino, 2021**), con esto se ha reportado que, la lecitina de menor pureza posee un mayor contenido de fitoesteroles que pueden proporcionar mayor estabilidad a la membrana de los liposomas y mejor eficiencia de encapsulación (**J. Li et al., 2022; Nkanga et al., 2017**).

El colesterol (CHO) es otro elemento utilizado en la fabricación de liposomas y su función radica en que su adición mejora la estructura de las membranas lipídicas, influyendo en el empaquetamiento de los fosfolípidos al reducir la permeabilidad de la membrana (**Guimarães et al., 2021**). El colesterol se localiza e interactúa en la parte hidrofóbica de los fosfolípidos, influyendo en la rigidez y elasticidad de los liposomas (**Jovanović et al., 2018**).

La concentración máxima de CHO en la composición de liposomas que se han estudiado corresponde alrededor de un 50% (**Briuglia et al., 2015**); pues el CHO reduce la fluidez de la membrana liposomal alterando significativamente el tamaño y rigidez del liposoma (**Nsairat et al., 2017**). Concentraciones de CHO alrededor de 25% en la formulación de los liposomas han mejorado la cohesión de la membrana, facilitando su formación y disminuyendo la temperatura de transición de los fosfolípidos, es decir, la temperatura en la cual se producen cambios debido a la proximidad del grupo polar y a la interacción entre el medio y cabeza de los fosfolípidos, ordenándolos para formar la bicapa lipídica (**Nakhaei et al., 2021**). En base a estas características se definió como componentes principales de los liposomas a elaborar en este estudio a la lecitina de soya cruda (CL) y al colesterol (CHO).

Para la determinación de las concentraciones óptimas de lecitina y colesterol se procedió a evaluar diferentes proporciones de estos. Se utilizó como referencia el

estudio de **Gugleva et al. (2019)**, en el cual se encapsuló doxiciclina en nanovesículas por la técnica de película hidratada a diferentes proporciones, pero con otros componentes liposomales. A partir de esta investigación se definió en el presente trabajo tres diferentes proporciones de CL:CHO, para la obtención de las soluciones liposomales. Las proporciones evaluadas fueron 60:40, 70:30 y 80:20 como se muestra en la **Tabla 1**. Cada proporción se realizó para la obtención de 100 mg de contenido liposomal en 10 ml de la solución Buffer Citrato a pH 3-3.3, y cada componente se disolvió en la solución orgánica mencionada en la metodología. Posterior a la evaporación de esta solución, la película formada se hidrató con la solución Buffer, para la formación de los liposomas. La solución Buffer se ajustó al pH mencionado, ya que a un pH menor a 3.5 los grupos fosfato de los fosfolípidos se volverán más hidrófilos favoreciendo la agrupación de estos, produciendo de forma más eficiente la bicapa lipídica (**Bot et al., 2021**).

Tabla 1. *Proporciones de lecitina de soya cruda y colesterol evaluadas para la obtención de liposomas por el método de película hidratada.*

Proporción de los liposomas	Componentes	Solución Buffer Citrato pH (3-3.3)
60:40	CL:CHO	10 ml
70:30	CL:CHO	10 ml
80:20	CL:CHO	10 ml

Nota: Cada proporción se realizó para la obtención de 100 mg de contenido liposomal en la solución Buffer Citrato a pH (3-3.3), donde CL corresponde a lecitina de soya cruda y CHO al colesterol.

Los liposomas obtenidos con las diferentes proporciones fueron visualizados y analizados en un microscopio de luz invertida a través del aumento de 40x, como se muestra en la **Figura 2**.

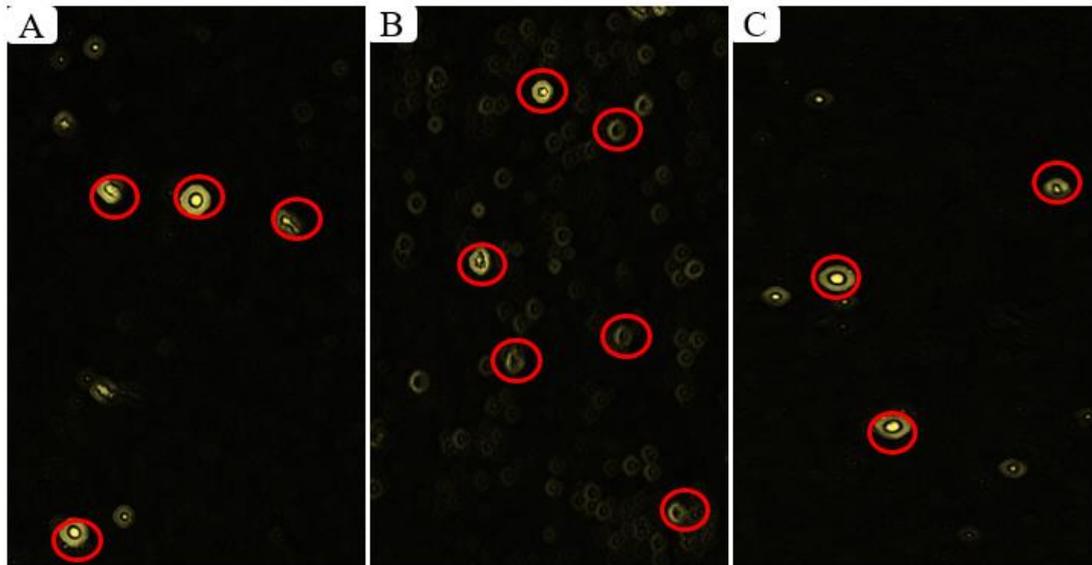


Figura 2. Evaluación de la formación de estructuras liposomales por medio del microscopio de luz invertida.

Se observó imágenes microscópicas de las tres proporciones de liposomas a 40X: (A) 60:40 (CL:CHO), (B) 70:30 y (C) 80:20. Las imágenes fueron corregidas en el programa FIJI para una mejor visualización. Las circunferencias rojas indican las estructuras con forma de esférica característica que poseen los liposomas.

Como se mencionó anteriormente, en la formación de liposomas, el parámetro clave a tener en cuenta es la proporción de CL:CHO. En la **Figura 2** se muestran las imágenes obtenidas para cada proporción evaluada. Se observa una mayor cantidad de liposomas formados tanto en la **Figura 2A** 60:40 (CL:CHO) y principalmente en la **Figura 2B** 70:30; en comparación de la **Figura 2C** correspondiente a la proporción 80:20. Esto debido a que a menor cantidad de CHO, la bicapa lipídica es menos rígida y por ende más propensa a la deformación, provocando una disminución del número de vesículas formadas, o también a la formación de los liposomas de baja calidad que en poco tiempo serán desarmados (**Pande, 2023**). Las imágenes obtenidas sugirieron que la mejor proporción para la elaboración de liposomas es de 70:30 CL:CHO (**Figura 2B**). Sin embargo, hasta este punto no se podía considerar como definitivo este resultado debido a que no se logró analizar la morfología de los liposomas a detalle ni a la escala adecuada, siendo necesario otro tipo de pruebas confirmatorias como la Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Para obtener resultados definitivos sobre la mejor proporción CL:CHO para formar liposomas se procedió a elaborar nuevamente los liposomas en las proporciones definidas en la **Tabla 1**, pero esta vez incluyendo en la formulación liposomal al fármaco de interés, la doxiciclina. La cantidad de doxiciclina añadida para la encapsulación fue de 10 %(p/p), es decir, para el total de liposomas formados correspondientes a 100 mg, se diluyó 10 mg de doxiciclina en la solución Buffer Citrato a pH 3-3.3. La formulación final de los liposomas se muestra en la **Tabla 2**.

Tabla 2. *Proporciones de lecitina de soya cruda y colesterol evaluadas para la obtención de liposomas cargados de doxiciclina por el método de película hidratada.*

Proporción de los liposomas	Componentes	Solución Buffer Citrato pH 3-3.3	Doxiciclina/lípido %(p/p)
60:40	CL:CHO	10 ml	10
70:30	CL:CHO	10 ml	10
80:20	CL:CHO	10 ml	10

Nota: Cada proporción se realizó para la obtención de 100 mg de contenido liposomal en la solución Buffer Citrato a pH (3-3.3), donde CL corresponde a lecitina de soya cruda y CHO al colesterol.

La proporción del 10% (p/p) de doxiciclina por cada 100 mg de liposomas se seleccionó, debido a que en varios estudios se ha demostrado que la precipitación de los liposomas y la baja eficiencia de encapsulación se generan debido a altas proporciones en la relación fármaco/lípido (**Budai et al., 2009; Fathalla et al., 2020; Pande, 2023**).

La selección de la doxiciclina como fármaco para la encapsulación, se basa en la importancia de su actividad ante microorganismos grampositivos y gramnegativos, haciendo que su aplicación terapéutica sea esencial en el ámbito biomédico. Esto debido a que atraviesa de mejor manera las membranas bacterianas y posee una vida

media prolongada, lo que contribuye a su difusión dentro de las células para así lograr su acción inhibitoria (**Feitosa et al., 2022**).

Las soluciones liposomales obtenidas en este punto fueron analizadas bajo diferentes tipos de microscopios para determinar de manera definitiva la mejor proporción de CL:CHO para la encapsulación de doxiciclina y también para determinar la eficiencia de la encapsulación. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente sección.

3.1.1.2. Análisis de las soluciones liposomales por medio del microscopio óptico de luz invertida.

La microscopía permite la visualización de la morfología, tamaño y homogeneidad de los liposomas, basándose en tres principales técnicas que corresponden a óptica, electrones o por fuerza atómica (**Sopyan et al., 2020**). Con respecto a la microscopia óptica, esta aporta la visibilidad rápida de vesículas en las muestras, mostrando tanto su homogeneidad como el estado agregación de las soluciones liposomales; sin embargo, esta técnica no refleja una información detallada sobre la morfología de las nanovesículas (**Robson et al., 2018**).

La aplicación del microscopio óptico de luz invertida se utilizó como método rápido y de bajo costo para la verificación de la formación de los liposomas por medio del análisis de las estructuras esféricas y de la homogeneidad presente en cada una de las muestras. Las imágenes obtenidas por medio del microscopio de luz invertida a través de una escala de 40x, fueron editadas en el programa FIJI, con el fin de definir las estructuras esféricas de forma más clara en las imágenes de las muestras liposomales (**Figura 3**).

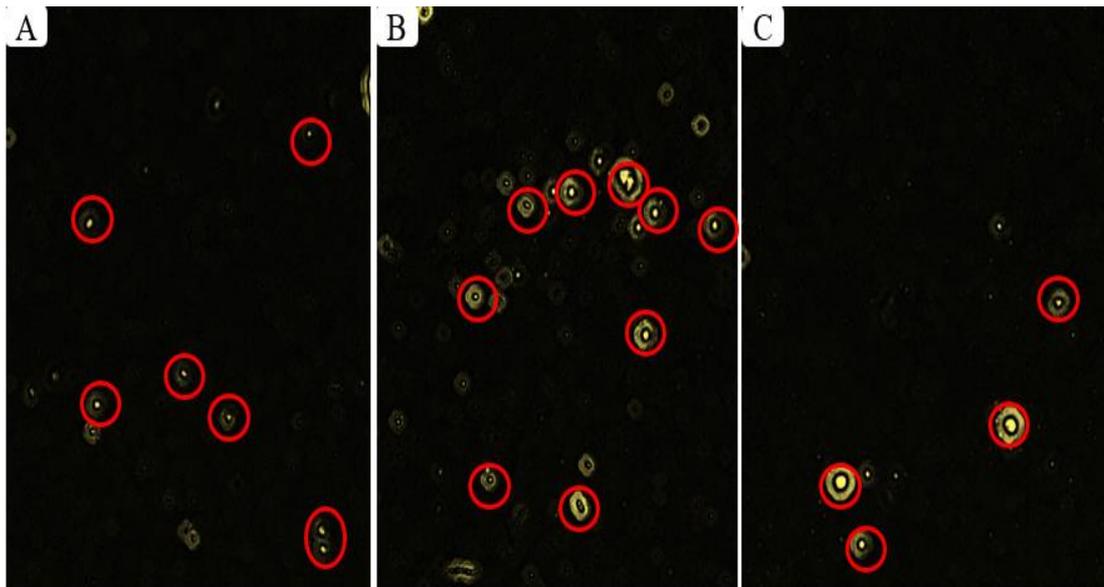


Figura 3. Evaluación de la formación de estructuras liposomales cargadas con doxiciclina por medio del microscopio de luz invertida.

Se observó imágenes microscópicas de los liposomas cargados con doxiciclina a 40x de proporciones: (A) 60:40 (CL:CHO), (B) 70:30 y (C) 80:20. Las imágenes fueron corregidas en el programa FIJI para una mejor visualización. Las circunferencias rojas indican las estructuras con forma de esférica característica que poseen los liposomas.

La aplicación del programa FIJI en cada imagen de 40x se realizó con el fin de eliminar factores de ruido causados por el microscopio y diferenciar las vesículas de forma más detallada y clara. Las imágenes obtenidas por medio del microscopio de luz invertida mostraron la presencia de estructuras esféricas en la medida de 40x para cada una de las proporciones (CL:CHO). Sin embargo, las estructuras más definidas y con mejor resolución de las soluciones liposomales correspondieron a la proporción 70:30 (**Figura 3B**). Igualmente, en esta proporción es en donde se observa mayor cantidad de liposomas formados y de tamaño variable. Aunque en las **Figuras 3A** y **3C** correspondientes a las proporciones 60:40 y 80:20, respectivamente; también se observa la formación de estos liposomas, sin embargo, la cuantificación es menor al de la proporción 70:30.

Las imágenes y morfología de los liposomas que se muestran en la **Figura 3** a 40x son similares a imágenes reportadas en otras investigaciones (**Gibis et al., 2016; Miere (Groza) et al., 2020**) sobre la elaboración de liposomas, **Figura 4**. Las vesículas resultantes en estos estudios tienen una apariencia más difusa, la diferencia con el presente trabajo se debe a la resolución que se encuentran en las imágenes de los liposomas por la aplicación del programa FIJI, resultando con estructuras esféricas con mayor definición en la presente investigación. La imagen de la **Figura 4A** corresponde a liposomas elaborados por fosfolípidos purificados como fosfatidilcolina, los autores de este estudio obtuvieron resultados similares con respecto a la forma y distribución homogénea de las vesículas.

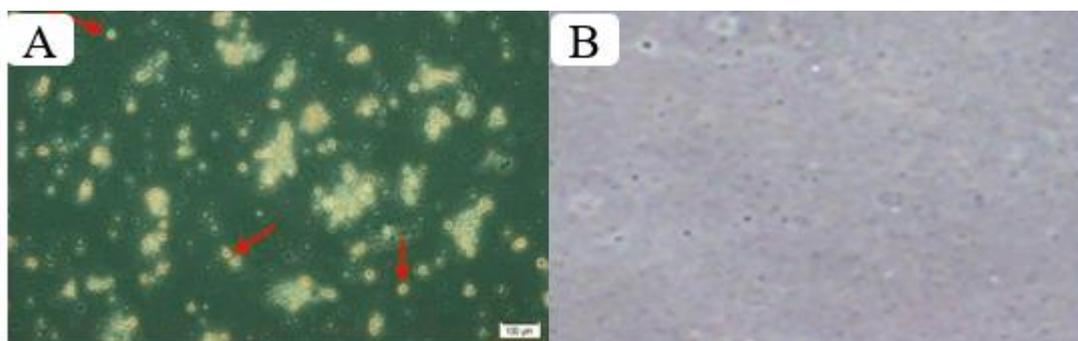


Figura 4. Imágenes de las soluciones liposomales obtenidas por medio de microscopía óptica.

Imágenes vistas por el microscopio de luz invertida de las soluciones liposomales; obtenidas de (A) (**Miere (Groza) et al., 2021**) y (B) (**Gibis et al., 2016**), empleada para una comparativa con el análisis resultante de la muestra de liposomas elaborados.

Las imágenes obtenidas a partir del microscopio de luz invertida proporcionaron una información limitada sobre las soluciones liposomales, por lo que fue necesario aplicar la técnica microscopía electrónica de transmisión (TEM) para un mejor análisis de la morfología de los liposomas.

3.1.1.3. Análisis de las soluciones liposomales por medio del microscopio electrónico de transmisión (TEM).

La técnica de microscopía electrónica de transmisión proporciona una superresolución con un alto aumento de las imágenes, obteniendo una mejor caracterización y visualización de la morfología de los liposomas (**Robson et al., 2018**). El principio se basa en el aprovechamiento de los fenómenos físico-atómicos producidos a partir de un haz de luz de electrones acelerado (**Lin et al., 2021**). Con esto, al colisionar los electrones con la muestra, en función tanto de su grosor como del tipo de átomos que la conforman, una parte de ellos se dispersan de manera selectiva, en sí, unos atraviesan y otros son desviados. A partir de eso, todos estos electrones son modulados por lentes especializados que forman una imagen con distintas intensidades de gris que definen el grado de dispersión de los electrones que incidieron en la muestra (**Rizvi et al., 2021**).

Este tipo de técnica es la más aplicada para la obtención de imágenes de liposomas y caracterización de las nanoestructuras a un tamaño de 500 nm, proporcionando vistas de la orientación y morfología de las nanovesículas (**Miere (Groza) et al., 2020; Sopyan et al., 2020**). Las imágenes obtenidas por TEM que se presentan en **la Figura 5**, se compararon entre sí para analizar la formación de los liposomas para determinar la mejor proporción para la encapsulación de doxiciclina.

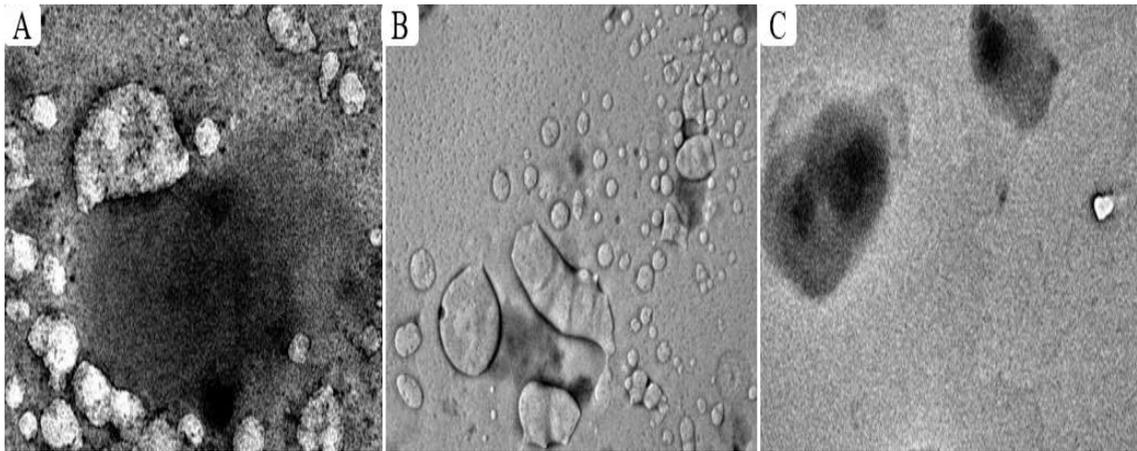


Figura 5. Evaluación de la formación de estructuras liposomales por medio del microscopio electrónico de transmisión (TEM).

En las imágenes se presentan a soluciones liposomales vistas por TEM a escala 500 nm (A): se observan pocas vesículas liposomales definidas según la proporción (60:40). (B): se observan liposomas definidos y en una cantidad considerable al ser la proporción ideal (70:30). (C): cúmulo no definido de la proporción (80:20), donde no se observa formación de liposomas. Imágenes obtenidas en el Centro de Nanociencia y Nanotecnología (CENCINAT) de la Universidad de las Fuerzas Armadas (ESPE).

De acuerdo con el análisis microscópico TEM, se observó la formación de los liposomas, en la mayoría de las muestras que se presentan en la **Figura 5**. En general se aprecian nanovesículas que pese a no tener una homogeneidad en cuanto a tamaño, existe una apreciación clara de la estructura esférica que adquieren. La **Figura 5A** muestra la proporción 60:40 con una baja cantidad de estructuras esféricas. La **Figura 5B** corresponde a la proporción de liposomas 70:30 donde se observa un mayor número de estructuras vesiculares y bien definidas. Por último, en la **Figura 5C** que corresponde a la proporción 80:20, no se observa la formación de estructuras esféricas, esto puede deberse a factores como la presencia de liposomas en muy baja cantidad o la degradación de los liposomas antes del análisis TEM.

Un factor que puede influir de manera significativa en la fabricación de liposomas es la sonicación. El proceso de sonicación disminuye el tamaño y favorece a la homogeneidad de las vesículas producidas, aunque dependiendo de las condiciones del ultrasonicador los liposomas pueden ser desintegrados (**Pandur et al., 2020**). Para

que los liposomas puedan soportar condiciones de estrés producidas por la sonicación, se ha aplicado el colesterol logrando fortalecer la resistencia de la membrana, teniendo liposomas más estables (**Pavlović et al., 2022**). En referencia a la proporción 60:40 y 70:30 (**Figura 5A y 5B**) se observa la formación de vesículas debido a que estas muestras contienen mayor cantidad de CHO en su composición, logrando resistir las condiciones sonicación. En cambio, la ausencia de estructuras esféricas en la proporción 80:20 (**Figura 5C**), se puede explicar por la baja concentración de CHO, produciendo la baja estabilidad de la membrana, por lo que los liposomas no soportaron las condiciones de estrés del ultrasonificador y provocando su desintegración (**Gugleva et al., 2019**).

La presencia de liposomas de diferente tamaño y morfología obtenidas en esta investigación concuerda con imágenes reportadas en otros estudios relacionados (**Gibis et al., 2016**), **Figura 6**. Un factor que influye en el tamaño y morfología de los liposomas es la técnica empleada, por ejemplo, la técnica de hidratación de película puede dar como resultado la formación de estructuras lipídicas abiertas, estructuras tubulares, entre otras (**Baxa, 2018**). La estructura de los liposomas obtenidos en esta investigación también se asemeja a liposomas elaborados con fosfolípidos sintéticos por el método de inyección y observados a una escala de 100 nm (**Afrasiabi et al., 2023**).

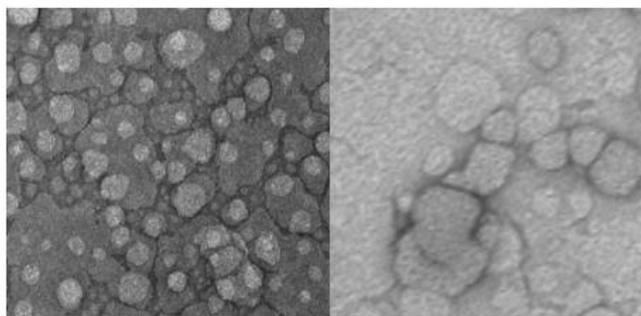


Figura 6. Imágenes de las soluciones liposomales obtenidas por medio del microscopio de transmisión electrónica.

Imágenes por TEM de las soluciones liposomales; obtenidas de (**Gibis et al., 2016**), empleada para una comparativa con el análisis resultante de la muestra de liposomas elaborados.

En base a los resultados de TEM y a las características de cada solución liposomal, se puede confirmar que la proporción 70:30 es el tratamiento que permite obtener liposomas de mejor calidad y en mayor cantidad, los liposomas se observan como nanopartículas esféricas, suaves y definidas.

3.1.2. Análisis de la eficiencia de encapsulación de doxiciclina en los liposomas.

3.1.2.1. Determinación de la concentración de doxiciclina encapsulada y residual.

Para determinar la eficiencia de la encapsulación de doxiciclina fue necesario centrifugar las soluciones liposomales para obtener dos fracciones. La primera fracción correspondió al sobrenadante que contenía el Buffer Citrato pH 3-3.3 y la doxiciclina que no fue encapsulada, mientras que, la segunda fracción fue el precipitado que correspondió a los liposomas cargados de doxiciclina.

Por medio de espectrofotometría UV-vis a 273nm, se determinó la cantidad de doxiciclina en el sobrenadante y la doxiciclina encapsulada en los liposomas, mediante los valores de absorbancia, los cuales se reemplazaron en la fórmula que se obtuvo a partir de la curva de calibración de doxiciclina representada en la **Figura 7**; esta curva de calibración fue diseñada en base a los valores mostrados en el **ANEXO A**.

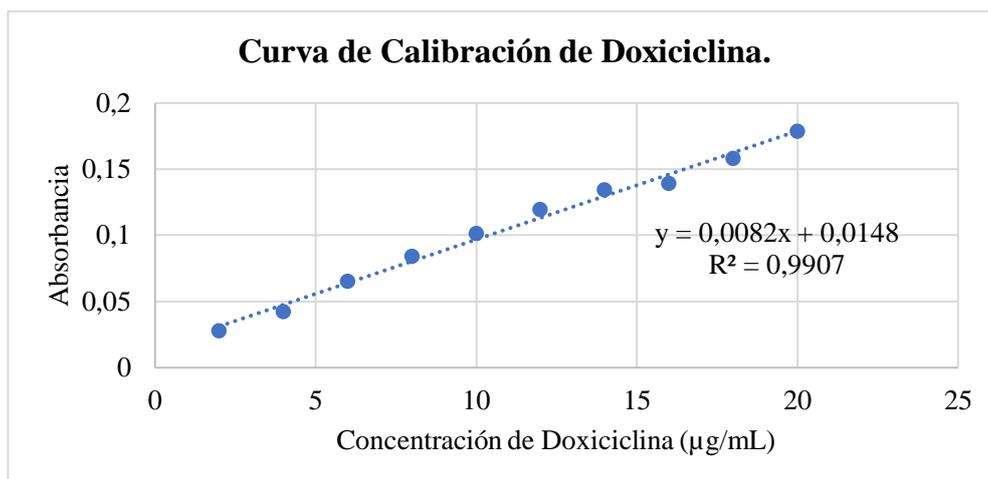


Figura 7. Curva de calibración de Doxiciclina (**Elaboración propia**).

Una vez obtenidos los valores de concentración de cada fracción, estos fueron reemplazados en la **Ecuación 1**, donde la cantidad total de doxiciclina corresponde a la suma de las concentraciones de ambas fracciones y la cantidad libre de doxiciclina corresponde a la concentración en la fase del sobrenadante, para obtener así el valor porcentual de la eficiencia de encapsulación que se expone en la **Tabla 3**.

$$EE\% = \frac{\text{Cantidad total de doxiciclina} - \text{Cantidad libre de doxiciclina}}{\text{Cantidad total de doxiciclina}} \times 100$$

Ecuación 1. Fórmula para el cálculo del valor porcentual de la eficiencia de encapsulación de los liposomas.

Tabla 3. Eficiencia de encapsulación de doxiciclina en los liposomas elaborados con las diferentes proporciones de CL:CHO.

Muestras (CL:CHO)	Concentración Precipitado (µg/ml)	Concentración Sobrenadante (µg/ml)	Eficiencia de encapsulación (%)	Promedio±SD (%)
R1 (60:40)	321.9512195	338.0487805	48.7804878	48.06±1.10
R2 (60:40)	282.9268293	321.7073171	46.79306172	
R3 (60:40)	198.7804878	210.2439024	48.59868813	
R1 (70:30)	270.7317073	206.9512195	56.67602757	56.41±1.16
R2 (70:30)	225.6097561	202.4390244	55.13513514	
R3 (70:30)	287.804878	213.5365854	57.40695694	

R1 (80:20)	84.14634146	212.9268293	28.32512315	26.60±1.58
R2 (80:20)	72.56097561	215.1219512	25.22255193	
R3 (80:20)	74.87804878	210.2439024	26.26176219	

Nota: Para cada proporción de CL:CHO se realizaron tres réplicas. Los datos que se muestran son la media de las réplicas y la desviación estándar (\pm SD).

La **Tabla 3** indica que la eficiencia de encapsulación de doxiciclina en los liposomas de la proporción 60:40 (CL:CHO), presentó un valor de $48.06 \pm 1.10\%$, correspondiente al segundo tratamiento más viable. En cuanto a los liposomas de la proporción 70:30, estos presentaron la mayor eficiencia de encapsulación logrando un $56.41 \pm 1.16\%$, siendo el mejor tratamiento. El último tratamiento fue el menos eficiente, correspondiente a la proporción 80:20 se obtuvo un valor de $26.60 \pm 1.58\%$. Complementario a esto en la **Figura 8**, se muestra gráficamente a partir de un histograma que la proporción 70:30 (CL:CHO) es la ideal, para la encapsulación de doxiciclina.

En el **ANEXO B** se reportan los análisis de varianza ANOVA realizados en torno a la eficiencia de encapsulación de doxiciclina, donde se determinó la existencia de diferencias significativas en la eficiencia de encapsulación con las diferentes proporciones de lecitina y colesterol evaluadas. A partir de esto, se aplicó la prueba HSD Tukey, con un nivel del 95% y así, se determinó un mayor porcentaje representativo de la eficiencia de encapsulación en la proporción 70:30 (CL:CHO). Con estos valores se comprobó la hipótesis nula planteada, sobre la influencia de la concentración de los liposomas en la eficiencia de encapsulación de la doxiciclina.

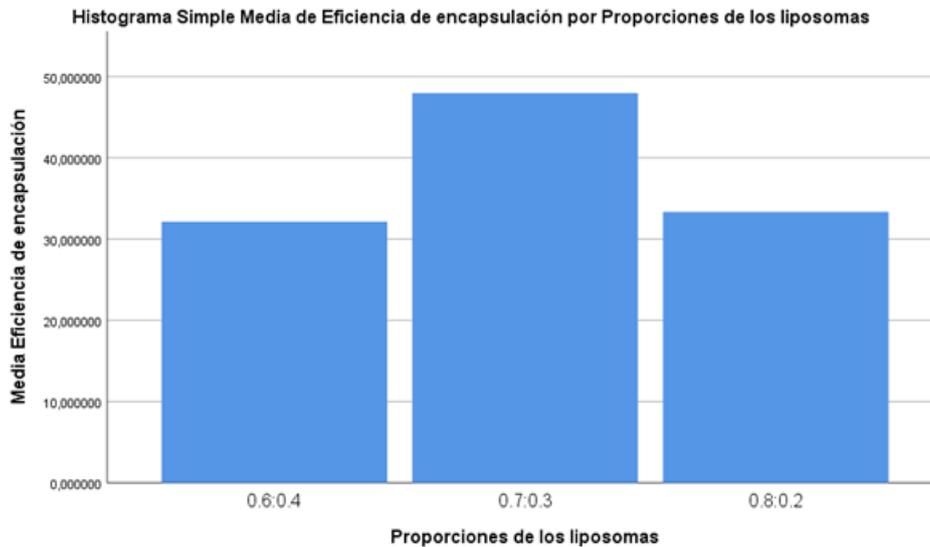


Figura 8. Histograma del análisis de las distintas proporciones de CL:CHO.

A partir del análisis estadístico proporcionado en el ANEXO B, se realizó el análisis gráfico para lo cual se empleó el histograma; en la cual se puede distinguir que la barra central correspondiente a la proporción 0.7:0.3 posee un valor más alto respecto a la media de la eficiencia de encapsulación. Mientras que, las proporciones 0.6:0.4 y 0.8:0.2 respectivamente se relacionan con valores menores en el eje de la media de la eficiencia de encapsulación.

Cabe mencionar, que la encapsulación de la doxiciclina se puede generar tanto de forma pasiva o activa; la primera se desarrolla a la par de la formación de los liposomas, mientras que la segunda ocurre empleando los liposomas ya formados (Villanueva Alvaro, 2019). En esta investigación, lo ocurrido corresponde a la denominada encapsulación pasiva, por lo que a mayor estabilidad de la membrana en la formación de liposomas se producirá una mayor encapsulación.

La proporción 60:40 (CL:CHO) logró una eficiencia de encapsulación de doxiciclina del $48.06 \pm 1.10\%$, gracias al alto contenido de colesterol que dota de resistencia y rigidez a la membrana, impidiendo la salida del agente encapsulado y evitando la degradación del liposoma. A pesar de esto, la proporción 70:30 (CL:CHO) produjo una mayor estabilidad tanto para la formación de nanovesículas como para la encapsulación de doxiciclina, ya que provee de un equilibrio óptimo en relación con su composición de fosfolípidos. Gugleva et al., (2019) expone que una alta concentración de CHO puede inferir en la bicapa lipídica provocando la fuga de la

doxiciclina, al interrumpir las interacciones entre los fosfolípidos. Refiriéndose a este artículo, el mejor tratamiento correspondió a una proporción de 7:3 de sus componentes liposomales, donde dicho tratamiento obtuvo un valor de $58.5 \pm 0.9\%$ de eficiencia de encapsulación; este valor es bastante cercano al obtenido en la presente investigación. Por otra parte, la proporción 80:20 fijó un valor de $26.60 \pm 1.58\%$, esto se sugiere que se debe a la baja estabilidad de la membrana, como consecuencia de la baja concentración de CHO.

En investigaciones sobre la encapsulación de doxiciclina en liposomas a base de fosfolípidos de origen sintético, se ha encontrado una eficiencia de encapsulación aproximada a $47.2 \pm 3.1\%$ (Afrasiabi et al., 2023). Al comparar estos valores con los obtenidos en la presente investigación, se demuestra una alta eficiencia de encapsulación de doxiciclina, similar a los reportados en la literatura.

Los resultados mostrados en esta sección demuestran que los liposomas fabricados con la proporción lecitina de soya cruda y colesterol 70:30 fueron los mejores para encapsular doxiciclina. Sin embargo, para corroborar la correcta encapsulación del fármaco se realizaron análisis complementarios como espectroscopía infrarroja. La espectroscopía infrarroja permite corroborar tanto la formación de los liposomas como la encapsulación de la doxiciclina a través de un espectro, estos resultados se presentan en la sección siguiente.

3.1.2.2. Evaluación de la formación de liposomas y eficiencia de encapsulación de doxiciclina por medio espectroscopía infrarroja de la transformada de Fourier.

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) es una técnica aplicada para la obtención de un espectro infrarrojo ya sea de absorción o emisión de un sólido, líquido o gas. Esto permite realizar un análisis integral del estado

bioquímico de la muestra, al monitorear los niveles de las biomoléculas principales que están contenidas en la misma. Esto se logra en base a su principio que radica en la excitación de los grupos moleculares a partir de un haz de luz infrarroja que genera movimientos de vibración en los enlaces moleculares (**Magalhães et al., 2021**).

Los movimientos vibracionales; se diferencia a partir del tipo de desplazamiento generado en los enlaces, los cuales tienden a ser tanto de tensión como de flexión. Así, las tensiones generan un estiramiento o estrechamiento del enlace, mientras que, las flexiones generan un tipo de deformación del enlace. Dichos movimientos también pueden presentarse de manera simétrica y asimétrica, siempre y cuando el número de átomos que conforman el enlace es de tres o más (**Petit & Puskar, 2018**).

El análisis de una muestra a partir de esta técnica provee de un espectro de absorción infrarrojo que proporciona información tanto de la estructura como del conjunto de los grupos funcionales. Todas las moléculas determinan un conjunto de bandas de absorción, donde cada banda representa un movimiento de vibración correspondiente a un enlace específico dentro de la molécula, es así como, este conjunto de señales suele ser denominado la huella dactilar del compuesto analizado (**Magalhães et al., 2021**).

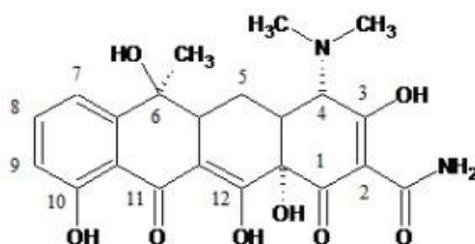


Figura 9. Estructura química de la doxiciclina con sus grupos funcionales, obtenido de (**Kogawa & Salgado, 2012**).

La doxiciclina **Figura 9**, es un antibiótico derivado de las oxitetraciclinas; **Kogawa & Salgado (2012)** señala que cualquier variación en el oxígeno dispuesto en el carbono 1 y en el hidroxilo del carbono 3, va a inactivar la estructura. Además, mencionan que el $N(CH_3)_2$ dispuesto en el carbono 4 es esencial para dotar de la actividad antimicrobiana, así también, la eliminación de $OH-$, CH_2- o ambos a la vez, hace que el compuesto tenga mayor estabilidad. Sin embargo, la presencia de $Cl-$ o CH_3- en el carbono 9, tiende a disminuir la actividad de la molécula.

La **Figura 10**, muestra un ejemplo bibliográfico de espectro FTIR para la doxiciclina, esta se utilizó como referencia para los análisis de la presente investigación. Igualmente, en la **Tabla 4** se muestra un desglose de los rangos de onda de la doxiciclina y la respectiva asignación estructural.

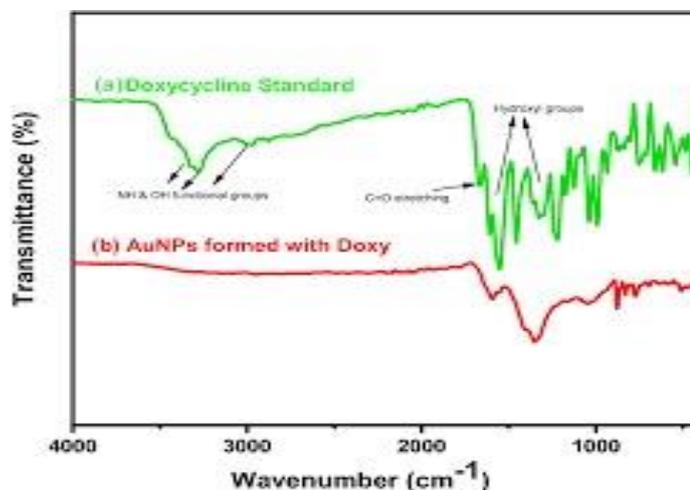


Figura 10. Gráfica del análisis de la doxiciclina por espectroscopía FTIR

Gráfica del análisis F-TIR de la doxiciclina obtenida de (**Safdar et al., 2022**), empleada para una comparativa con el análisis resultante de la muestra de liposomas elaborados. Se presenta el espectro F-TIR estándar de la doxiciclina, en el cual se observan los principales picos con los grupos funcionales que definen las bandas, en este caso se tiene grupos funcionales NH y OH, una extensión correspondiente a $C=O$ y grupos hidroxilos.

Tabla 4. *Bandas de absorción del espectro de infrarrojo de la doxiciclina*

Rango de onda (cm⁻¹)	Asignación estructural
3300 – 3200	Estiramientos tanto simétricos como asimétricos del enlace $-N-H$ de la amina.
3000 – 2900	Estiramientos de los enlaces de tipo $C-H$ y CH_3 .
1700 – 1550	Estiramientos $-C=O$, vibraciones en el enlace $N-H$ y enlaces aromáticos de tipo $-C=C$.
1400 – 1300	Estiramientos tanto simétricos como asimétricos en los enlaces acil $-C-H$ y fenil $-C-O$.
1250 – 1200	Estiramientos en los enlaces de $-C-OH$ del etanol y $-C-N$.
1050 – 980	Señales correspondientes a un alcohol primario $R-OH$.
950 – 600	Torsiones fuera del plano del enlace $-C-H$ y también sustituciones en los anillos aromáticos.

En resumen, se llevó a cabo el análisis FTIR para la doxiciclina, los liposomas de la proporción 70:30 sin doxiciclina y para los liposomas de la proporción 70:30 con doxiciclina. La muestra de la doxiciclina se analizó en estado sólido, mientras que, de los liposomas, al encontrarse en solución, fueron analizadas en estado líquido. Esto se analizó en base a la **Tabla 4**, con la cual se definió las señales propias de cada banda junto con su respectivo grupo funcional, así como también las torsiones y estrechamientos que se generan según el tipo de enlace.

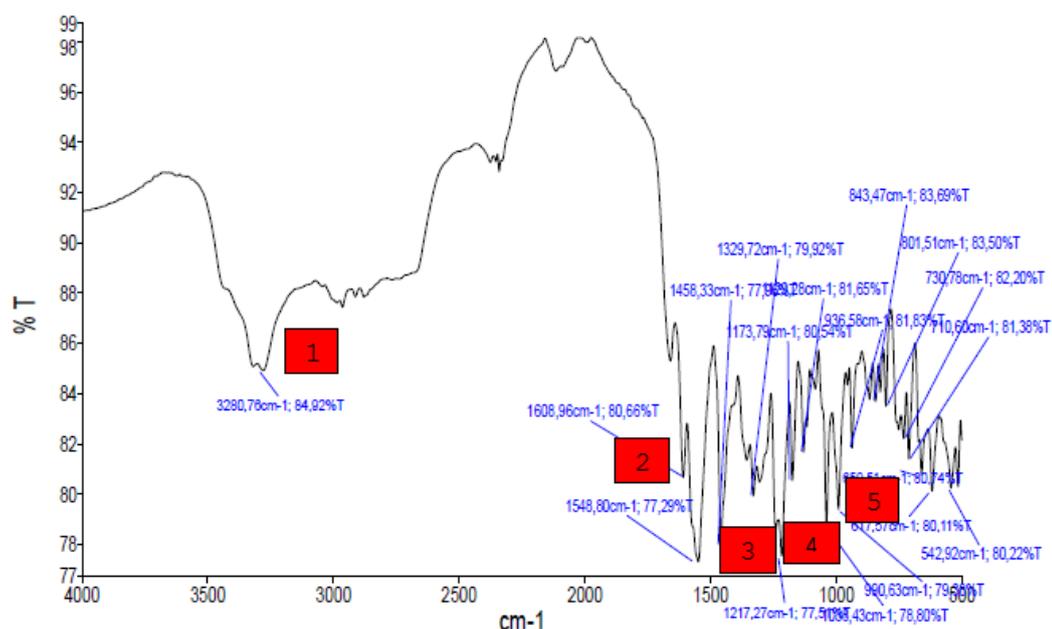


Figura 11. Análisis del espectro infrarrojo de la doxiciclina.

Curva de la doxiciclina obtenido, donde se observan los picos que representan grupos funcionales de este fármaco donde el pico 1 representa el grupo amino, el pico 2 el grupo carbonilo y el pico 5 el alcohol primario.

Para la doxiciclina, se obtuvo el espectro que se muestra en la **Figura 11**, la doxiciclina tiene varios picos, los mismos que denotan los grupos funcionales que posee; (**Bureau et al., 2019**) indica que los grupos funcionales comprenden la región entre 4000 y 1500 cm^{-1} , esto debido a que los grupos funcionales absorben la radiación en un intervalo específico de frecuencias independientemente de la molécula a la que esté unido.

La región comprendida entre 1500 y 600 cm^{-1} , se denomina la región de huella digital, puesto que, **Bureau et al. (2019)** define que las bandas que aparecen en esta zona son generadas a partir de varios tipos de vibraciones de enlace, por lo tanto, es un tanto complicado asignar su origen, sin embargo, esta complejidad posibilita que cada muestra tenga un espectro particular.

Al contrastar el espectro obtenido con la **Figura 10 (Safdar et al., 2022)**, se puede determinar una similitud en el pico 1, cuyo valor es 3280.76 cm^{-1} , se asemeja a la señal

correspondiente a 3271 cm^{-1} , la cual pertenece al enlace tipo $-N-H$ del grupo funcional amino. Por otra parte, en el pico 2, la muestra también define las señales 1608.96 cm^{-1} y 1548.80 cm^{-1} , lo cual concuerda con lo obtenido por **(Safdar et al., 2022)**, al mencionar que esta región se atribuye a enlaces de estiramiento de los carbonilos $-C=O$ cetónicos, los cuales se disponen unidos tanto al núcleo tetracíclico como a las tensiones aromáticas de los enlaces $-C=C$, esto debido a que la doxiciclina pertenece al grupo de las tetraciclinas.

Mientras tanto, en el pico 3, se tienen estiramientos simétricos y asimétricos los cuales están asociados a los grupos $-C-H$ y $-C-O$, esto en el rango comprendido ente 1217.27 cm^{-1} y 1458.33 cm^{-1} , así también, en el pico 4, se localizan estiramientos correspondientes al enlace $-C-N$, todos estas señales y rangos tienen concordancia con los espectros determinados por **(Safdar et al., 2022)**, lo que genera una lectura óptima de las señales y vibraciones obtenidas.

Las señales del alcohol primario se encuentran en el rango correspondiente a 1039 cm^{-1} y 990.63 cm^{-1} , delimitado en el pico 5, además, las señales restantes que se encuentran al final de la curva muestran las torsiones y sustituciones que se generan fuera del plano de los enlaces $C-H$ en los anillos aromáticos de este compuesto farmacéutico **(Leon Fontecha, 2019)**.

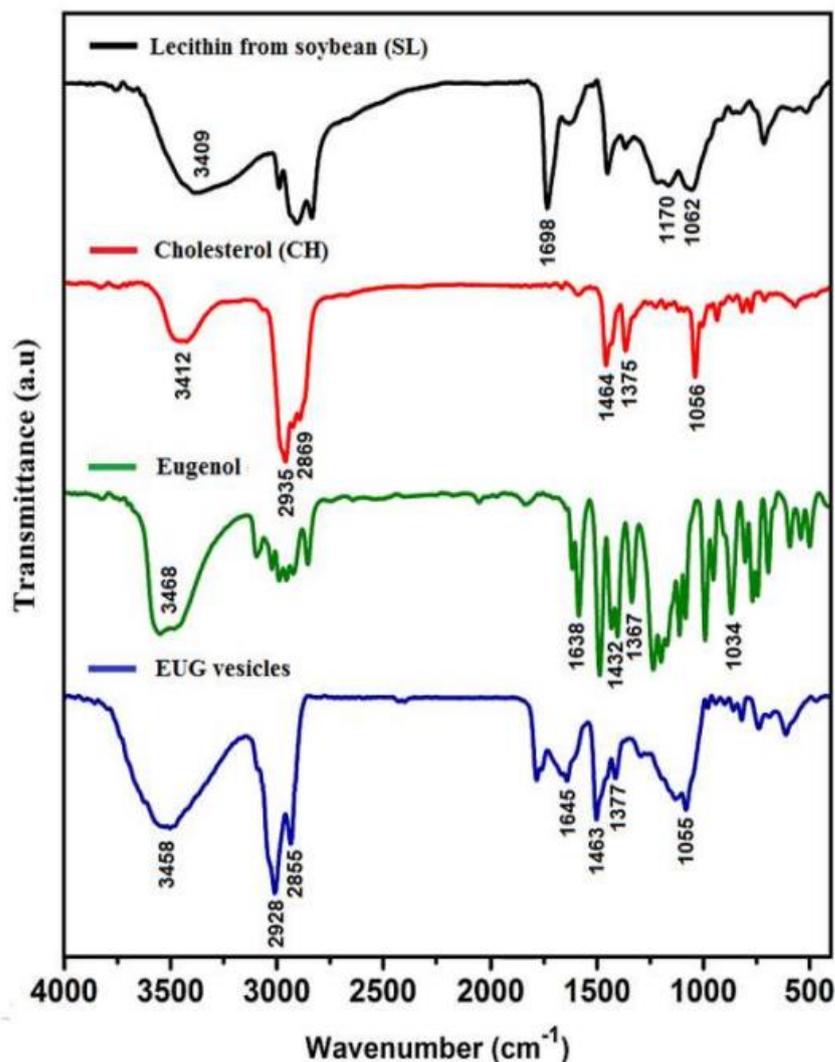


Figura 12. Gráfica del análisis de la lecitina de soya y el colesterol por espectroscopía F-TIR.

Gráfica del análisis F-TIR de la lecitina de soya y el colesterol obtenida de (**Jibrán et al., 2020**), empleada para una comparativa con el análisis resultante de la muestra de liposomas elaborados.

En el caso del análisis F-TIR de la **Figura 12**, (**Jibrán et al., 2020**), se realizó con el fin de corroborar la efectividad de encapsulación de eugenol, que es un derivado fenólico, sin embargo, la formación de los liposomas que lo contendrían se dio por la combinación de lecitina de soya y colesterol, siendo factible la comparación de su espectro con el obtenido en los resultados pese a haber encapsulado doxiciclina.

Ante esto, cabe mencionar que existen una serie de factores que pueden afectar la calidad de los espectros obtenidos, donde destacan el contacto entre la muestra y el cristal, la influencia de la forma física de la muestra y la señal residual del espectro.

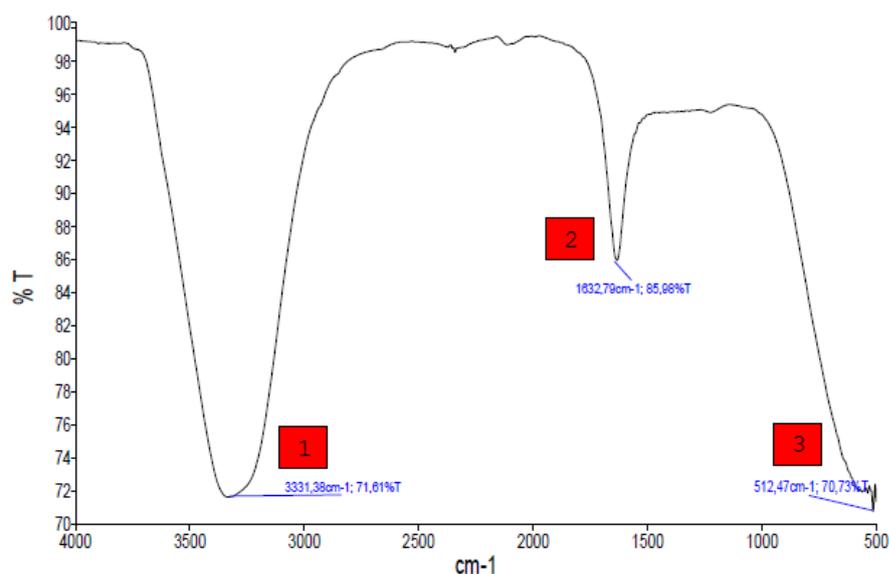


Figura 13. Análisis del espectro infrarrojo de la solución liposomal obtenida de la proporción 70:30.

Curva de los liposomas sin carga de doxiciclina en la cual se observan 3 picos representativos que corresponden a sus grupos funcionales, donde el pico 1 es el grupo amino, el pico el grupo carbonilo y el pico 3 el grupo bivalente CH₂.

La **Figura 13** muestra el espectro obtenido de los liposomas ya formados, pero sin la carga o encapsulación de la doxiciclina, por tanto las señales detectadas corresponden a los grupos funcionales tanto de la lecitina como del colesterol que son los componentes que se combinaron para la formación de dichos liposomas. Aunque, al tener una mayor proporción de lecitina respecto al colesterol, las señales sugieren mayor afinidad por este componente, ya que en el pico 1, muestra el pico a 3331.38 cm⁻¹, dicho valor es cercano al espectro de la lecitina de soya analizado por (**Jibrán et al., 2020**), cuyo valor ronda los 3409 cm⁻¹, asimismo, el pico 2, que define 1632.79

cm^{-1} tiene valores semejantes a las señales determinadas por el mismo autor, ya que en su caso se obtuvo 1698 cm^{-1} , aquí cabe mencionar que el pico dictamina la presencia del grupo funcional $C = O$. Finalmente, la señal perteneciente al pico 3, donde se muestra el valor 512.47 cm^{-1} , denota la presencia del grupo funcional asociado al enlace CH_2 .

Para tener una comparativa que demuestre que la doxiciclina fue encapsulada por las vesículas liposomales, se definieron los espectros sobrepuestos de la doxiciclina, los liposomas sin carga y los liposomas cargados con la doxiciclina, tal como se observa en la **Figura 14**. Se observa que, el espectro de la doxiciclina tiene muy poca similitud con los espectros de las otras muestras, lo que señala una eficiente encapsulación. Los espectros de las muestra de liposomas tanto cargados como sin cargar demuestran que se detectó los componentes de los liposomas, es decir, la lecitina de soya y el colesterol.

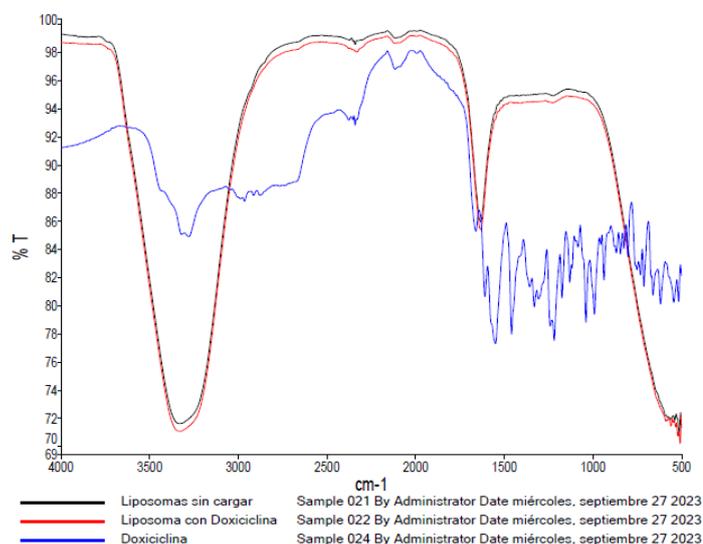


Figura 14. Análisis comparativo del espectro de doxiciclina y de los liposomas, con carga y sin carga.

Comparación entre las curvas de la doxiciclina, los liposomas sin carga y los liposomas cargados con doxiciclina, la divergencia entre las curvas de los liposomas y la curva de la doxiciclina demuestra la encapsulación del fármaco

Es necesario mencionar que, al tener los espectros sobrepuestos, hay que tomar a consideración las bandas de absorción del espectro infrarrojo de la doxiciclina para así tener una perspectiva más clara de las zonas y, por tanto, de las variables estructurales que surgen a través de la detección de las vibraciones, para esto se tiene la **Tabla 4** a manera de complemento, pues, las especificaciones de cada espectro ya fueron sustentadas.

Otro punto a destacar es que según **Jibrán et al. (2020)**, en el espectro obtenido no se observan las bandas correspondientes al grupo amida, sin embargo, destaca la banda característica del grupo amina, esto sugiere que en la muestra está presente el fármaco, es decir, la doxiciclina pero en su forma tautomérica ceto.

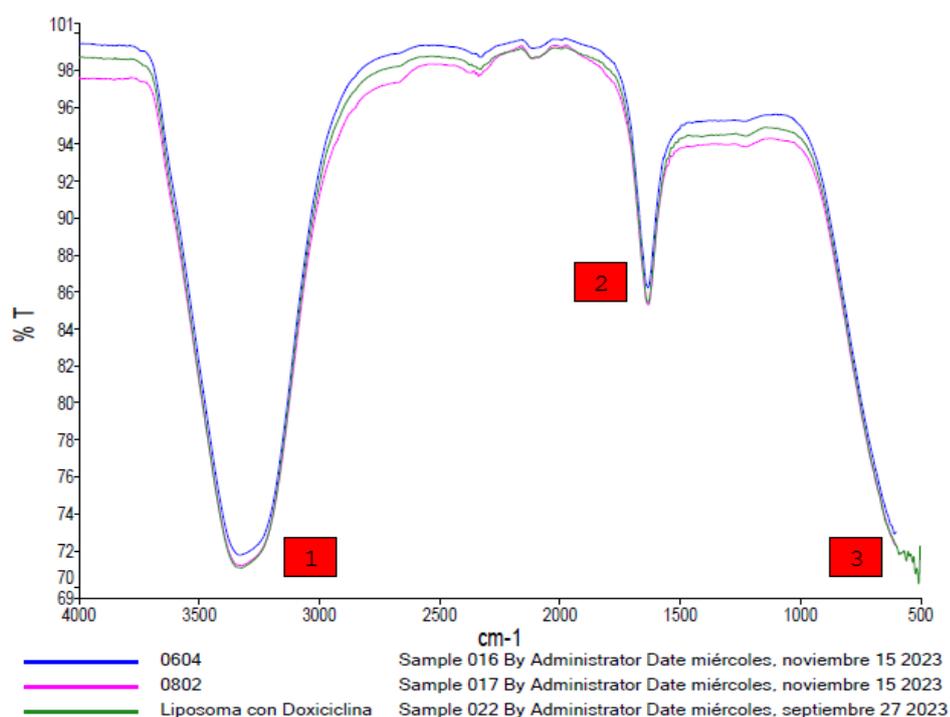


Figura 15. Comparativa de los espectros infrarrojos de las tres proporciones evaluadas.

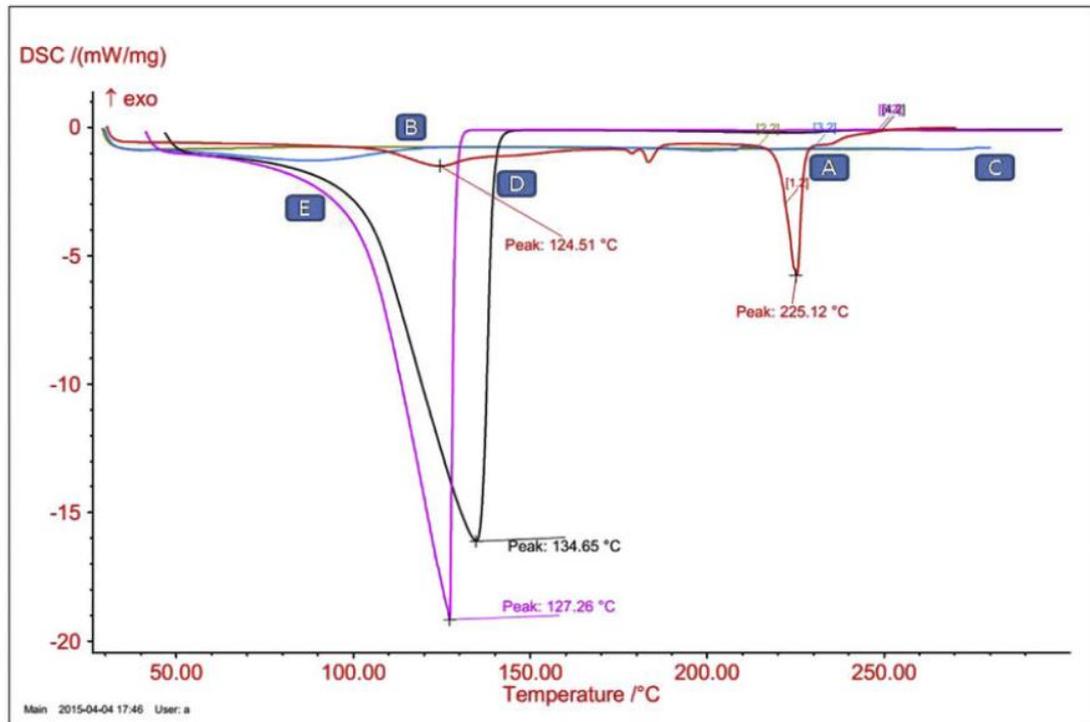
Comparación entre las tres proporciones de acuerdo con la composición de los liposomas, en la cual se evidencia cierta similitud, sin embargo, los picos de la proporción 70:30, se acercan más a las condiciones previstas en relación con la curva de la doxiciclina, demostrando que esta proporción tiene una mayor eficiencia.

Adicionalmente con el fin de tener un enfoque más claro que determine que la proporción ideal en cuanto a la combinación de los componentes es 70 y 30, se realizó la sobreposición de las 3 proporciones probadas, a partir de esto, se confirmó que dicha proporción es la óptima debido a pequeñas, pero a la vez significativas diferencias en sus espectros.

La diferencia principal la tenemos en la **Figura 15**, más específicamente en los picos 1 y 2, donde el espectro de la combinación de 60 y 40 es paralelo pero nunca se topa con los espectros de las otras dos combinaciones, esto según **Le et al. (2019)** se debe a que esta muestra posee una mayor cantidad de colesterol, lo cual hace que la lectura de las señales de absorción sean distintas, pero, a su vez, indica también que hubo una eficiente encapsulación debido a que difiere significativamente de los valores del espectro de la doxiciclina. Ocurre lo contrario con la proporción 80 y 20, la cual, tiene valores más cercanos a los del espectro del fármaco, lo que conlleva a interpretar que hubo una menor encapsulación de este, esto debido a tener menos cantidad de colesterol, ya que **Nakhaei et al. (2021)** infiere que el colesterol al ser un agente atrapante e influir directamente en la formación de la vesícula liposomal, al tenerlo en menor proporción, incidirá también en la disminución de la encapsulación del fármaco.

3.1.2.3. Evaluación de la formación de liposomas con doxiciclina por medio de análisis térmico.

De manera complementaria al análisis por espectroscopía, también se realizó un análisis térmico a través de la aplicación del Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC), con el cual se mide la cantidad de calor ya sea liberado o absorbido por la muestra y puede ser tanto durante el calentamiento como el enfriamiento en un determinado rango de temperatura (**Leyva-Porras et al., 2019**). Este análisis se utiliza para caracterizar las propiedades térmicas de la muestra, así como también, para determinar la temperatura en la que se generan transiciones de fases concretas, donde el principal factor a denotar corresponde a la temperatura de fusión.



DSC thermogram of [A] Norfloxacin, [B] PLA, [C] Soya lecithin and [D] optimized formulation LPNPs-8 gel [E] optimized nanoparticle suspension.

Figura 16. Gráfica del análisis térmico de la lecitina de soya por DSC.

Gráfica del DSC de la lecitina de soya obtenida de (Dave et al., 2017) y empleada para un contraste con la gráfica obtenida del análisis de la muestra de liposomas elaborados.

En este caso se tomaron en cuenta ciertas condiciones, empezando la cantidad de la muestra se mantuvo en el rango de 3 a 5 mg, a partir de eso, se equilibró la temperatura de 25°C manteniéndola por 5 minutos y posteriormente se subió la temperatura en un intervalo de 10°C/minuto hasta llegar a 300°C, paralelamente de aplicó una corriente de gas nitrógeno (Fathalla et al., 2020).

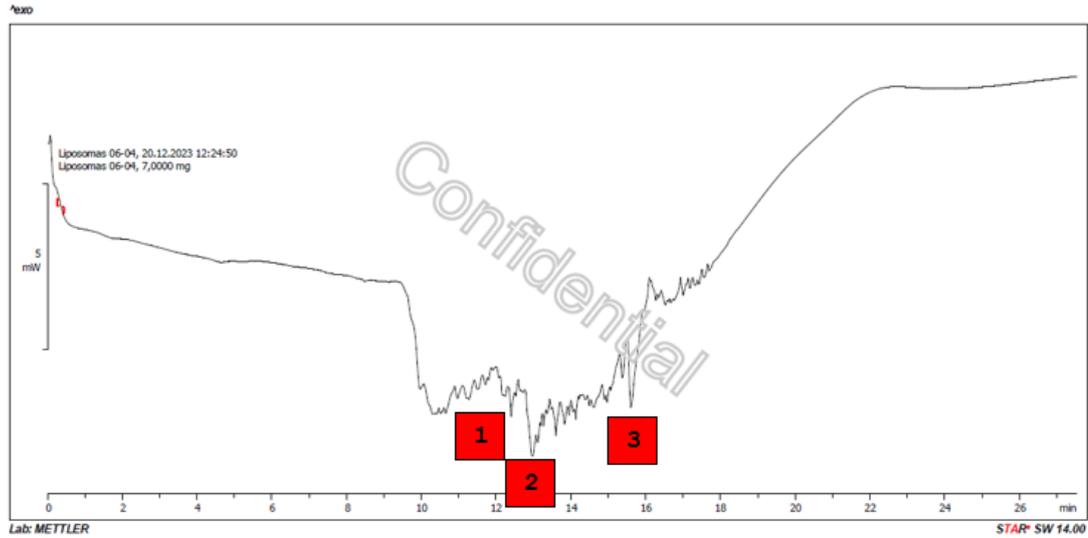


Figura 17. Curva correspondiente a liposomas de la proporción (60:40) con doxiciclina obtenida mediante el Calorímetro diferencial de barrido.

Respecto a la **Figura 17** de liposomas se puede observar una serie de picos, sin embargo, se analizarán los más significativos. En este caso, (NCBI, 2023) menciona que el punto de fusión de la doxiciclina se encuentra entre 195 y 201° C, para esto, se tiene el pico 3, que muestra un pico significativo el cual ronda los 200°C, corroborando que el pico definido corresponde al punto de fusión de la doxiciclina. Mientras tanto, en el pico 1, se tiene otro pico significativo, el cual denota el punto de fusión del colesterol, en este caso, se dispone entre 145 y 150° C, lo cual se confirma con lo determinado por (NCBI, 2023) que menciona que el punto de fusión del colesterol ronda los 148° C. Así también, el pico 2 denota un pico que se encuentra entre 145 y 165°C, el cual sugiere el punto de fusión de la lecitina de soya, cuyo valor según (NCBI, 2023) es superior a los 145°C.

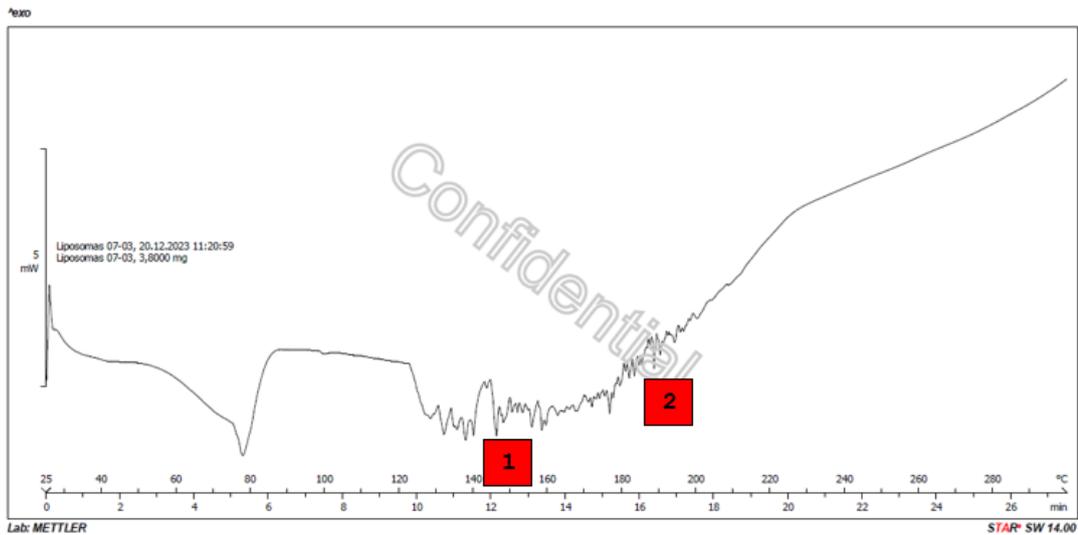


Figura 18. Curva correspondiente a liposomas de la proporción (70:30) con doxiciclina obtenida mediante el Calorímetro diferencial de barrido.

Mientras que, la curva dictaminada para la proporción (70:30), **Figura 18** denota una perspectiva más clara en cuanto a la especificación de los puntos de fusión de la muestra de liposomas analizada, en este caso, tiene en el pico 1, el punto de fusión del colesterol, que según (NCBI, 2023) ronda los 148° C, estando dentro del rango obtenido que es de 145 y 150° C. En el pico 2, tenemos el punto de fusión resultante de la doxiciclina, ya que (NCBI, 2023) define un rango entre 195 y 201° C, lo cual es cercano al valor dictaminado que se encuentra entre 190 y 210°C.

Con esto, se analizó tanto las interacciones como la estabilidad térmica entre el fármaco y los lípidos, con lo cual se dictaminó que los picos de fusión y de calor de entalpía del fármaco puro, es decir, de la doxiciclina fueron similares a los picos de las partículas cargadas con el fármaco, esto sugiere que los componentes lipídicos y el colesterol interactúan en gran medida puesto que se demuestra una estabilidad térmica eficiente a raíz de una eficiente encapsulación al comparar con la **Figura 16 (Dave et al., 2017)**.

3.1.3. Evaluación de la estabilidad de los liposomas con doxiciclina por medio de una digestión simulada *in vitro*.

Una vez determinado la mejor proporción de CL:CHO para la obtención de liposomas y una vez verificado que los liposomas de la proporción 70:30 fueron los mejores en encapsular la doxiciclina, se procedió a evaluar la estabilidad de los liposomas mediante una digestión gástrica simulada.

Al ser la doxiciclina un antibiótico que se administra comúnmente por vía oral es necesario analizar su estabilidad durante este trayecto hasta llegar al intestino. Este tipo de antibióticos administrados por vía oral se absorben de manera variable, tanto en el estómago como en el intestino delgado, en donde presenta una absorción entre el 90 y 100% (**Parolo, 2010**). Aunque este porcentaje puede verse sesgado o disminuido, por la reacción con iones metálicos como el Fe, Ca y Al; con los cuales al formar complejos, no logran ser asimilados en la fase intestinal (**Feitosa et al., 2022**). La finalidad de esta simulación radica en la evaluación de la estabilidad de los liposomas, para que soporten las condiciones del sistema gastrointestinal, manteniendo encapsulada a la doxiciclina.

Otro aspecto a considerar es que antibióticos como la doxiciclina pueden presentar efectos secundarios en el organismo, como la formación de úlceras por la irritación esofágica, ya que al ser disuelto produce un pH menor a 3 (**Guo et al., 2019**). Para reducir estos efectos se modifica la concentración administrada del fármaco, sin embargo, la biodisponibilidad y efecto terapéutico pueden verse afectados (**Wertz et al., 2023**). La administración de fármacos en nanovehículos como los liposomas es una excelente opción para que el fármaco no solo mantenga su integridad y eficiencia, sino que además, se reduzcan los efectos secundarios asociados al permitir que el fármaco sea absorbido y liberado en un sitio específico.

Se ha reportado que la digestión de los liposomas ocurre en mayor proporción en la fase gástrica e intestinal, y que la etapa bucal no tiene un efecto significativo con respecto a la degradación de estos (W. Liu, Hou, et al., 2020).

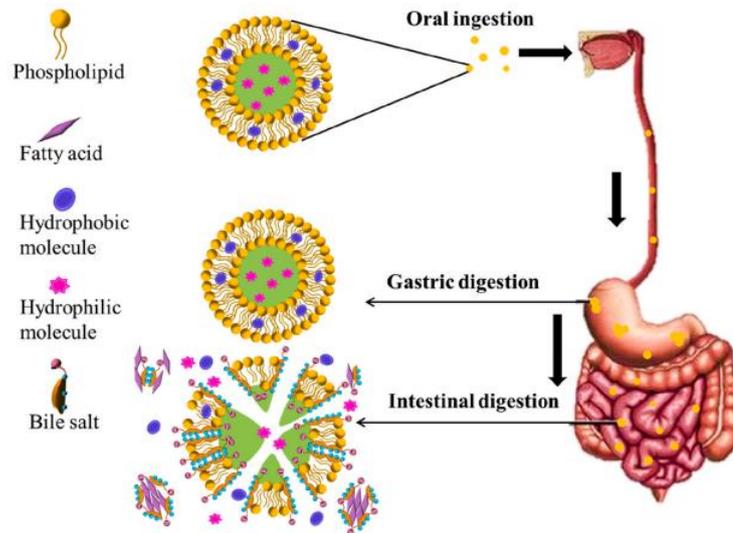


Figura 19. Digestión de los liposomas en las fases del sistema gastrointestinal.

La digestión de los liposomas consta de tres fases principales, correspondiendo primero a la fase oral o bucal, posteriormente los liposomas se dirigen a la fase gástrica; como fase final corresponde a la digestión intestinal donde se produce la mayor liberación del fármaco por la presencia de agentes como las sales biliares. Esta imagen fue obtenida de: (W. Liu, Hou, et al., 2020).

Se realizó la digestión simulada de los liposomas 70:30 (CL:CHO) con doxiciclina. Primero, se simuló la digestión por separado para cada fase como muestra la **Tabla 5**, el propósito fue analizar de manera independiente cada fase y determinar aquella que afecta o altera en mayor medida la estabilidad de los liposomas. Segundo, los liposomas 70:30 (CL:CHO) con doxiciclina pasaron por cada una de las fases de forma secuencial y en iguales proporciones 1:1, obteniendo los valores presentados en la **Tabla 6**. El propósito de esta simulación secuencial fue determinar el efecto global de la digestión sobre la estabilidad de los liposomas.

La estabilidad de los liposomas se determinó en relación con la capacidad de los liposomas de mantener la eficiencia de encapsulación de la doxiciclina, determinada en la **Tabla 3**. Para ello, al finalizar la digestión simulada en cada fase las muestras fueron centrifugadas para medir la cantidad de doxiciclina presente en el precipitado y en el sobrenadante, los cálculos de la eficiencia de encapsulación se realizaron de manera similar a la descrita en la sección **3.1.2.1**. La estabilidad de los liposomas en la digestión secuencial se realizó de la misma manera.

Para la simulación de las fases por separado se procedió como se describe a continuación. La fase bucal se simuló con sales para imitar el fluido salival y se ajustó el pH a 6.8; al ser la primera fase, se determinó que no existieron diferencias significativas en la estabilidad de los liposomas. Esto se infirió ya que, la eficiencia de encapsulación obtenida fue de 56.33% casi similar a la eficiencia de encapsulación obtenida en los liposomas antes de ser sometidos a la digestión 56.41%. Con respecto a la fase estomacal se simuló, con las condiciones de pH 1.5 y aplicación de comprimidos que contenían enzimas digestivas en su composición. En esta fase se obtuvo una variación, aunque no significativa, esto se determinó porque la eficiencia de encapsulación obtenida fue de 55.14% la cual es menor a la de los liposomas antes de ser sometidos a la digestión. Esta reducción se debe a que en el estómago se encuentran enzimas con la capacidad de dañar o degradar la membrana liposomal y como consecuencia existiría la liberación del fármaco. La última etapa correspondió a la fase intestinal, donde el fluido se componía de sales, enzimas y surfactantes digestivos. En esta fase se obtuvo el mayor efecto sobre la estabilidad de los liposomas, al finalizar esta fase la eficiencia de encapsulación obtenida fue de 50.33%, lo cual al compararlo con la eficiencia de encapsulación obtenida en los liposomas antes de ser sometidos a la digestión mostró una reducción de 6.08%. Estos resultados sugieren la gran estabilidad de los liposomas, gracias a la proporción ideal de los componentes combinados CL:CHO para su elaboración

Tabla 5. Estabilidad de los liposomas de proporción 70:30 con doxiciclina durante la simulación bucal, estomacal e intestinal *in vitro*.

Muestras (CL:CHO)	Concentración Precipitado (µg/ml)	Concentración Sobrenadante (µg/ml)	Eficiencia de encapsulación (%)	Promedio±SD (%)
FB1 (70:30)	14.5366	11.1463	56.6002	56.330±0.90
FB2 (70:30)	13.1951	9.9268	57.0675	
FB3 (70:30)	14.0732	11.3659	55.3212	
FE1 (70:30)	16.5854	13.1098	55.8522	55.145±0.86
FE2 (70:30)	16.7195	14.1341	54.1897	
FE3 (70:30)	16.0976	12.9634	55.3924	
FI1 (70:30)	2.7195	2.8537	48.7965	50.337±1.35
FI2 (70:30)	2.0732	2.000	50.8982	
FI3 (70:30)	1.9024	1.8049	51.3158	

Nota: Se muestra el porcentaje de eficiencia de encapsulación de doxiciclina de los liposomas, posterior a ser sometidos individualmente a cada fase de la simulación del sistema gastrointestinal *in vitro*. Analizados por medio de la eficiencia de encapsulación que representan por la media y desviación estándar (\pm SD). Cada fase correspondiente a: FB: Fase Bucal, FE: Fase Estomacal e FI: Fase Intestinal; se trataron con tres réplicas.

La estabilidad de los liposomas cargados con doxiciclina no tuvo una alteración significativa en la fase gástrica, esto puede explicarse por la cantidad de colesterol (70:30) presente en su membrana, ya que el CHO produce una mayor rigidez en la estructura de los liposomas, esto conlleva a que no se afecte la carga de doxiciclina (W. Liu. Hou. et al., 2020). Los liposomas al estar en medio con un pH bajo, produce un estado de agregación entre estos, ya que se disminuye las fuerzas de repulsión entre sí a esas condiciones, teniendo una baja influencia en la estructura liposomal (W. Liu. Kong. et al., 2020).

Las sales biliares que contiene el líquido simulado de la fase intestinal, corresponde a el factor de disrupción que más influye para la estabilidad de los liposomas (Wu et al., 2020); por lo que puede incidir en la estructura de la membrana liposomal en esta etapa.

Posterior a la evaluación de las fases por separado, los liposomas se evaluaron en la Fase Bucal, Fase Estomacal y Fase Intestinal de forma secuencial. Para la simulación se mezclaron proporciones equivalentes a 1:1 utilizado 4 réplicas. Al finalizar la digestión secuencial para cada réplica se midió la estabilidad de liposomas con carga, basándose en el procedimiento para la determinación de la eficiencia de encapsulación. El porcentaje de eficiencia de encapsulación al finalizar la digestión secuencial fue de 49.90% (Tabla 6), este valor es menor al de los liposomas antes de la digestión (56.41%).

Tabla 6. Estabilidad de los liposomas de proporción 70:30 con doxiciclina que fueron sometidos a la simulación secuencial del sistema gastrointestinal *in vitro*.

Muestras	Concentración Precipitado (µg/ml)	Concentración Sobrenadante (µg/ml)	Eficiencia de encapsulación (%)	Promedio
R1 (70:30)	21.30487805	20.79268293	50.60834299	
R2 (70:30)	20.80487805	21.13414634	49.60744402	
R3 (70:30)	20.13414634	20.29268293	49.80392157	49,90%
R4 (70:30)	20.65853659	20.97560976	49.619215	

Nota: Se muestra el porcentaje de eficiencia de encapsulación de doxiciclina de los liposomas, posterior a ser sometidos a la simulación secuencial del sistema gastrointestinal *in vitro*, es decir cada muestra pasó por las tres fases de la simulación *in vitro*.

Las principales enzimas que influyen en la degradación de liposomas corresponden a la fosfolipasa, la lipasa pancreática y el colesterol esterasa; este tipo de enzimas producen la catálisis de los fosfolípidos y del colesterol, conjuntamente compuestos

biosurfactantes como las sales biliares que alteran la estructura de los liposomas perdiendo su estabilidad y favoreciendo la actividad enzimática (**W. Liu et al., 2019**). La aplicación de cápsulas comerciales con el contenido de las enzimas y de las sales biliares puede significar una limitante para el análisis de la estabilidad de los liposomas, ya al encontrarse bajas concentraciones de sus componentes, no producen un mayor efecto en los liposomas. Sin embargo, los resultados de la **Tabla 6** exponen que, tras finalizar la digestión simulada la estabilidad de los liposomas se reduce en un 6.50%.

Los resultados obtenidos proporcionan evidencia del potencial de los liposomas de proporción 70:30 (CL:CHO) como sistema de administración de doxiciclina por vía oral.

3.1.3.1. Evaluación de las condiciones de almacenamiento.

El análisis de la conservación de los liposomas es de vital importancia, ya que para que sea usado como un sistema de administración de doxiciclina, debe mantener la integridad de los liposomas durante su tiempo de almacenamiento (**Farooque et al., 2021**), es decir, se debe mantener la retención del fármaco en la membrana liposomal. El estudio sobre el almacenamiento del producto liposomal final se debe considerar en las etapas iniciales de su preparación, ya que puede modificar el tamaño de la partícula y la liberación del medicamento (**Shah et al., 2020**).

La evaluación de la estabilidad de los liposomas en diferentes condiciones de almacenamiento se realizó por medio de la conservación de muestras liposomales en distintas temperaturas y por un período de dos semanas. La estabilidad de los liposomas se evaluó en función de la capacidad para mantener la eficiencia de encapsulación de la doxiciclina. Posterior al período de almacenamiento de las muestras, estas fueron centrifugadas, para medir la cantidad de doxiciclina presente en

el precipitado y en el sobrenadante, se determinó aplicando el mismo procedimiento del anterior apartado para la eficiencia de encapsulación.

La influencia de la temperatura en el almacenamiento de liposomas se evidenció por los porcentajes de eficiencia de encapsulación de la **Tabla 7**, donde la conservación de liposomas a 4°C se estableció como la mejor temperatura para mantener la estabilidad de los liposomas, ya que la eficiencia de encapsulación fue de 52.72% luego de dos semanas. El almacenamiento a una temperatura a 20°C produjo una reducción de la eficiencia de encapsulación, teniendo un valor de 44.15%. Mientras los liposomas que fueron sometidos a altas temperaturas de 30° y 37°C, sus valores de eficiencia de encapsulación fueron 12.9% y 8.68% respectivamente. A partir de estos resultados, se constató una gran estabilidad de los liposomas de proporción 70:30 (CL:CHO), con respecto a su almacenamiento, principalmente en condiciones de refrigeración a 4°C y que a temperaturas de 30°C o más afectan la estabilidad.

Tabla 7. Almacenamiento de los liposomas de proporción 70:30 (CL:CHO) con doxiciclina a diferentes temperaturas.

Temperaturas (°C)	Concentración Precipitado (µg/ml)	Concentración Sobrenadante (µg/ml)	Eficiencia de encapsulación (%)
4	16.51219512	14.80487805	52.7258567
20	16.52439024	20.90243902	44.15118931
30	20.52439024	138.2926829	12.92328956
37	21.24390244	223.4146341	8.683082444

Nota: Se muestra el porcentaje de eficiencia de encapsulación de doxiciclina en los liposomas, después de ser almacenados a diferentes condiciones de temperatura, por un período de dos semanas.

Las condiciones de almacenamiento de los liposomas afectan su integridad física y estabilidad química; por lo que puede producir una alteración de su tamaño o sufrir reacciones tanto de oxidación como de hidrólisis (**Battista et al., 2020**). La estabilidad de los liposomas a 4°C puede estar vinculada a que se encontraban en forma de solución; cuando los liposomas se encuentran en una forma farmacéutica líquida, por

lo general suelen ser almacenadas en un rango de temperatura entre 2 a 8°C (**Shah et al., 2020**).

El almacenamiento a bajas temperaturas de los liposomas favorece a la estabilidad de la membrana; ya que a mayor temperatura se produce una mayor hidrólisis de los fosfolípidos (**Pan et al. 2018**); por lo que los liposomas almacenados a una temperatura de 30 y 37 °C tuvieron la mayor reducción de eficiencia de encapsulación, siendo de 43.49% y 47.72% respectivamente.

Respecto al almacenamiento a 20°C, por la disminución de su eficiencia de encapsulación se puede suponer que se produjo la degradación de la membrana liposomal y liberación de doxiciclina; la investigación de (**Han et al., 2020**) obtuvo una tasa de fuga menor del fármaco encapsulado en los liposomas cuando los almacenó a 4°C, en comparación a su almacenamiento a temperatura ambiente.

El almacenamiento de los liposomas cargados con doxiciclina a corto plazo presenta una estabilidad a 4°C al estar en forma de solución liposomal; por lo que se puede considerar su aplicación como sistema de administración del antibiótico doxiciclina, para seguir las siguientes etapas para la formulación de un producto liposomal final.

CÁPITULO IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- En el presente estudio se optimizó el proceso de elaboración de liposomas para la encapsulación de doxiciclina por el método de película hidratada. Se determinó que los liposomas compuestos de lecitina y colesterol en proporción 70:30 fueron los que presentaron liposomas de mejores características y con mayor eficiencia de encapsulación de doxiciclina con un 56.41%. Estos resultados fueron confirmados por microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión (TEM), ya que presentaron una mayor cantidad de nanovesículas formadas con estructuras esféricas más definidas y una gran homogeneidad con respecto a su tamaño.
- La encapsulación de doxiciclina se verificó por análisis infrarrojo (F-TIR) y térmico (DSC). El análisis de los espectros infrarrojos evidenció la aparición de picos significativos de los liposomas, los cuales coincidían con los picos representativos de la lecitina de soya cruda, colesterol y la doxiciclina. Esta similitud en los picos demostró la presencia de los grupos funcionales característicos para cada componente. A su vez, el análisis térmico corroboró la encapsulación de doxiciclina a través de los puntos de fusión de cada componente, al presentar coincidencias notables en los picos caracterizados por el calorímetro diferencial de barrido.
- La eficiencia de encapsulación se determinó a partir del análisis por espectrofotometría UV-vis, donde se obtuvo que los liposomas 70:30 son los que presentan el mejor nivel de encapsulación con un 56,41%, a diferencia de los liposomas 60:40 y 80:20 con 48,06% y 26,60%, respectivamente. Esto fue justificado mediante un ANOVA, lo que confirmó como mejor tratamiento a la proporción 70:30 al ser estadísticamente significativo respecto a la encapsulación de doxiciclina.

- La digestión simulada *in vitro* demostró que los liposomas de la proporción 70:30 tienen el potencial de resistir las condiciones características de cada fase (bucal, estomacal e intestinal). Esto se demostró gracias a la comparación del porcentaje de eficiencia de encapsulación en las digestiones realizadas con la eficiencia de encapsulación de liposomas no sometidos a digestión, que fue 56,41%. En la digestión por fases, la fase intestinal fue la que más efecto tuvo en la eficiencia de encapsulación, con un valor 50,33%, mientras que al final de la digestión secuencial la eficiencia de encapsulación fue de 49,15%. Esto demostró una reducción de la eficiencia del 6,07% y 7,25% respectivamente.
- La estabilidad de los liposomas fue estudiada almacenándolos a diferentes condiciones de temperatura, mediante la comparación de la eficiencia de encapsulación antes y después de evaluarlos a estas condiciones. El almacenamiento de los liposomas a una temperatura de 4°C mantuvo una mayor estabilidad, ya que su eficiencia de encapsulación fue de 52.72%, luego de dos semanas. A diferencia de los liposomas almacenados a temperaturas de 30 y 37°C tuvieron una disminución significativa de la eficiencia de encapsulación. Esto indicó que la temperatura influye significativamente en la estabilidad de los liposomas, ya que se conservan de mejor manera a una temperatura de 4°C.
- Finalmente, esta investigación ha demostrado que la lecitina de soya cruda y el colesterol son componentes viables para la elaboración de liposomas que encapsulen doxiciclina. La combinación de estos componentes provee de alta estabilidad a los liposomas para que resistan las condiciones que presenta el sistema gastrointestinal y para que mantengan su eficiencia de encapsulación al ser almacenados a 4°C. Se considera que los liposomas elaborados tienen el potencial de ser empleados como nanovehículos de administración de fármacos por vía oral.

4.2.Recomendaciones

- Continuar las pruebas *in vitro* de los liposomas con enzimas purificadas y sales biliares a mayor concentración.
- Elaborar liposomas con recubrimiento de la membrana a partir de compuestos como polietilenglicol.
- Extender el tiempo de las pruebas almacenamiento sobre los liposomas.
- Medir el tamaño de los liposomas por medio equipos como DLS (Dynamic Light Scattering)

BIBLIOGRAFÍA

- Adepu, S., & Ramakrishna, S. (2021). Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules* 2021, Vol. 26, Page 5905, 26(19), 5905. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26195905>
- Afrasiabi, S., Partoazar, A., & Chiniforush, N. (2023). In vitro study of nanoliposomes containing curcumin and doxycycline for enhanced antimicrobial photodynamic therapy against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Scientific Reports* 2023 13:1, 13(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-38812-4>
- Ahmed, K. S., Hussein, S. A., Ali, A. H., Korma, S. A., Lipeng, Q., & Jinghua, C. (2018). Liposome: composition, characterisation, preparation, and recent innovation in clinical applications. 27(7), 742–761. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1527337>
- Ajeeshkumar, K. K., Aneesh, P. A., Raju, N., Suseela, M., Ravishankar, C. N., & Benjakul, S. (2021). Advancements in liposome technology: Preparation techniques and applications in food, functional foods, and bioactive delivery: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(2), 1280–1306. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12725>
- Aniagor, C. O., Igwegbe, C. A., Ighalo, J. O., & Oba, S. N. (2021). Adsorption of doxycycline from aqueous media: A review. *Journal of Molecular Liquids*, 334, 116124. <https://doi.org/10.1016/J.MOLLIQ.2021.116124>
- Asprea, M., Tatini, F., Piazzini, V., Rossi, F., Bergonzi, M. C., & Bilia, A. R. (2019). Stable, Monodisperse, and Highly Cell-Permeating Nanocochleates from Natural Soy Lecithin Liposomes. *Pharmaceutics*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11010034>
- Battista, S., Maggi, M. A., Bellio, P., Galantini, L., D'Archivio, A. A., Celenza, G., Colaiezzi, R., & Giansanti, L. (2020). Curcuminoids-loaded liposomes: influence of lipid composition on their physicochemical properties and efficacy as delivery systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 597, 124759. <https://doi.org/10.1016/J.COLSURFA.2020.124759>

- Baxa, U. (2018). Imaging of liposomes by transmission electron microscopy. *Methods in Molecular Biology*, 1682, 73–88. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7352-1_8
- Bhatia, A., Kumar, R., & OmPrakash, K. (2004, July 16). *Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation*. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15367383/>
- Bot, F., Cossuta, D., & O'Mahony, J. A. (2021). Inter-relationships between composition, physicochemical properties and functionality of lecithin ingredients. *Trends in Food Science & Technology*, 111, 261–270. <https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2021.02.028>
- Briuglia, M. L., Rotella, C., McFarlane, A., & Lamprou, D. A. (2015). Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release. *Drug Delivery and Translational Research*, 5(3), 231–242. <https://doi.org/10.1007/S13346-015-0220-8>
- Budai, M., Chapela, P., Budai, L., Wales, M., Petrikovics, I., Zimmer, A., Gróf, P., & Klebovich, I. (2009). *Liposomal oxytetracycline and doxycycline: studies on enhancement of encapsulation efficiency - PubMed*. Drug Discoveries & Therapeutics. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22495463/>
- Bureau, S., Cozzolino, D., & Clark, C. J. (2019). Contributions of Fourier-transform mid infrared (FT-MIR) spectroscopy to the study of fruit and vegetables: A review. *Postharvest Biology and Technology*, 148, 1–14. <https://doi.org/10.1016/J.POSTHARVBIO.2018.10.003>
- Cala Calviño, L., & Morris Quevedo, H. J. (2021). Lecitina de Soya: potencialidades terapéuticas y preventivas. *I SIMPOSIO DE SALUD FAMILIAR GRAMGI 2021*.
- Catala, A. (2019). Liposomes - Advances and Perspectives. *Liposomes - Advances and Perspectives*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.77926>
- Chen, Y., Xia, G., Zhao, Z., Xue, F., Gu, Y., Chen, C., & Zhang, Y. (2020). 7,8-Dihydroxyflavone nano-liposomes decorated by crosslinked and glycosylated lactoferrin: storage stability, antioxidant activity, in vitro release, gastrointestinal digestion and transport in Caco-2 cell monolayers. *Journal of Functional Foods*, 65, 103742. <https://doi.org/10.1016/J.JFF.2019.103742>

- Dang, Y., & Guan, J. (2020). Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. *Smart Materials in Medicine*, 1, 10–19. <https://doi.org/10.1016/J.SMAIM.2020.04.001>
- Dave, V., Yadav, R. B., Kushwaha, K., Yadav, S., Sharma, S., & Agrawal, U. (2017). Lipid-polymer hybrid nanoparticles: Development & statistical optimization of norfloxacin for topical drug delivery system. *Bioactive Materials*, 2(4), 269–280. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2017.07.002>
- Davoodi, P., Lee, L. Y., Xu, Q., Sunil, V., Sun, Y., Soh, S., & Wang, C. H. (2018). Drug delivery systems for programmed and on-demand release. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 104–138. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2018.07.002>
- Dhapte, V., & Pokharkar, V. (2019). Nanosystems for drug delivery: Design, engineering, and applications. *Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles*, 321–345. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102579-6.00013-7>
- dos Santos Rodrigues, B., Oue, H., Banerjee, A., Kanekiyo, T., & Singh, J. (2018). Dual functionalized liposome-mediated gene delivery across triple co-culture blood brain barrier model and specific in vivo neuronal transfection. *Journal of Controlled Release*, 286, 264–278. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2018.07.043>
- Elsharkasy, O. M., Nordin, J. Z., Hagey, D. W., de Jong, O. G., Schiffelers, R. M., Andaloussi, S. EL, & Vader, P. (2020). Extracellular vesicles as drug delivery systems: Why and how? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159, 332–343. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.04.004>
- Farooque, F., Wasi, M., & Mughees, M. M. (2021). Liposomes as Drug Delivery System: An Updated Review. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(5-S), 149–158. <https://doi.org/10.22270/JDDT.V11I5-S.5063>
- Fathalla, D., Youssef, E. M. K., & Soliman, G. M. (2020). Liposomal and Ethosomal Gels for the Topical Delivery of Anthralin: Preparation, Comparative Evaluation and Clinical Assessment in Psoriatic Patients. *Pharmaceutics* 2020, Vol. 12, Page 446, 12(5), 446. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS12050446>

- Feitosa, R. C., Ishikawa, E. S. A., Silva, M. F. A. da, Silva-Júnior, A. A. da, & Oliveira-Nascimento, L. (2022). Five decades of doxycycline: Does nanotechnology improve its properties? *International Journal of Pharmaceutics*, *618*, 121655. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2022.121655>
- Filipczak, N., Pan, J., Yalamarty, S. S. K., & Torchilin, V. P. (2020). Recent advancements in liposome technology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *156*, 4–22. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.06.022>
- Gao, X., Yi, X., Liu, Z., Dong, X., Xia, G., Zhang, X., & Shen, X. (2021). Comparative Study on Curcumin Loaded in Golden Pompano (*Trachinotus blochii*) Head Phospholipid and Soybean Lecithin Liposomes: Preparation, Characteristics and Anti-Inflammatory Properties. *Molecules* *2021*, Vol. *26*, Page *2328*, *26*(8), 2328. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES26082328>
- Gholse, Y. N., Chaple, D. R., & Kasliwal, R. H. (2022). Development and Validation of Novel Analytical Simultaneous Estimation Based UV Spectrophotometric Method for Doxycycline and Levofloxacin Determination. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, *12*(4), 5458–5478. <https://doi.org/https://doi.org/10.33263/BRIAC124.54585478>
- Gibis, M., Ruedt, C., & Weiss, J. (2016). In vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Research International*, *88*, 105–113. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2016.02.010>
- Gouda, A., Sakr, O. S., Nasr, M., & Sammour, O. (2021). Ethanol injection technique for liposomes formulation: An insight into development, influencing factors, challenges and applications. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, *61*, 102174. <https://doi.org/10.1016/J.JDDST.2020.102174>
- Gugleva, V., Titeva, S., Rangelov, S., & Momekova, D. (2019). Design and in vitro evaluation of doxycycline hyclate niosomes as a potential ocular delivery system. *International Journal of Pharmaceutics*, *567*, 118431. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2019.06.022>

- Guimarães, D., Cavaco-Paulo, A., & Nogueira, E. (2021). Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. *International Journal of Pharmaceutics*, *601*, 120571. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2021.120571>
- Guo, Y., Li, H. M., Li, C. X., Zhu, W. Q., Wang, Y. F., & He, Y. H. (2019). Oesophageal ulceration in adult patients treated with doxycycline for acne vulgaris. *Journal of International Medical Research*, *47*(12), 6404–6409. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/0300060519881272>
- Han, B., Yang, Y., Chen, J., Tang, H., Sun, Y., Zhang, Z., Wang, Z., Li, Y., Li, Y., Luan, X., Li, Q., Ren, Z., Zhou, X., Cong, D., Liu, Z., Meng, Q., Sun, F., & Pei, J. (2020). Preparation, characterization, and pharmacokinetic study of a novel long-acting targeted paclitaxel liposome with antitumor activity. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 553–571. <https://doi.org/10.2147/IJN.S228715>
- Hasan, M., Khatun, A., Fukuta, T., & Kogure, K. (2020). Noninvasive transdermal delivery of liposomes by weak electric current. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *154–155*, 227–235. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.06.016>
- He, H., Lu, Y., Qi, J., Zhu, Q., Chen, Z., & Wu, W. (2019). Adapting liposomes for oral drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *9*(1), 36–48. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2018.06.005>
- Homayun, B., Lin, X., & Choi, H. J. (2019). Challenges and Recent Progress in Oral Drug Delivery Systems for Biopharmaceuticals. *Pharmaceutics 2019, Vol. 11, Page 129*, *11*(3), 129. <https://doi.org/10.3390/PHARMACEUTICS11030129>
- Inglut, C. T., Sorrin, A. J., Kuruppu, T., Vig, S., Cicalo, J., Ahmad, H., & Huang, H. C. (2020). Immunological and Toxicological Considerations for the Design of Liposomes. *Nanomaterials 2020, Vol. 10, Page 190*, *10*(2), 190. <https://doi.org/10.3390/NANO10020190>
- Jain, K. K. (2020). An Overview of Drug Delivery Systems. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2059, pp. 1–54). Humana Press Inc. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9798-5_1

- Jibrán, F., Memon, Z., Siddiqui, R. A., Aslam, Z., Nisar, U., Imad, R., & Shah, M. R. (2020). Eugenol and liposome-based nanocarriers loaded with eugenol protect against anxiolytic disorder via down regulation of neurokinin-1 receptors in mice. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33(5), 2275–2284. <https://doi.org/10.36721/PJPS.2020.33.5.SUP.2275-2284.1>
- Johnson, W., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Gill, L. J., & Heldreth, B. (2020). Safety Assessment of Lecithin and Other Phosphoglycerides as Used in Cosmetics. *International Journal of Toxicology*, 39(2_suppl), 5S-25S. <https://doi.org/10.1177/1091581820953123>
- Jovanović, A. A., Balanč, B. D., Ota, A., Ahlin Grabnar, P., Djordjević, V. B., Šavikin, K. P., Bugarski, B. M., Nedović, V. A., & Poklar Ulrih, N. (2018). Comparative Effects of Cholesterol and β -Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 120(9), 1800039. <https://doi.org/10.1002/EJLT.201800039>
- Kanda, H., Katsube, T., Wahyudiono, & Goto, M. (2021). Preparation of Liposomes from Soy Lecithin Using Liquefied Dimethyl Ether. *Foods 2021, Vol. 10, Page 1789, 10(8)*, 1789. <https://doi.org/10.3390/FOODS10081789>
- Karra, N., Swindle, E. J., & Morgan, H. (2019). Drug delivery for traditional and emerging airway models. *Organs-on-a-Chip*, 1, 100002. <https://doi.org/10.1016/J.OOC.2020.100002>
- Kogawa, A. C., & Salgado, H. R. N. (2012). *Doxycycline hyclate: a review of properties, applications and analytical methods*. <https://doi.org/10.17616/R31NJN39>
- Laffleur, F., & Keckeis, V. (2020). Advances in drug delivery systems: Work in progress still needed? *International Journal of Pharmaceutics*, 590, 119912. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.119912>
- Large, D. E., Abdelmessih, R. G., Fink, E. A., & Auguste, D. T. (2021). Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 176, 113851. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2021.113851>

- Le, N. T. T., Cao, V. Du, Nguyen, T. N. Q., Le, T. T. H., Tran, T. T., & Thi, T. T. H. (2019). Soy Lecithin-Derived Liposomal Delivery Systems: Surface Modification and Current Applications. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 4706, 20(19), 4706. <https://doi.org/10.3390/IJMS20194706>
- Lee, C. Y., Su, C. T., Tsai, T., Hsieh, C. M., Hung, K. Y., Huang, J. W., & Chen, C. T. (2023). Formulation Development of Doxycycline-Loaded Lipid Nanocarriers using Microfluidics by QbD Approach. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 112(3), 740–750. <https://doi.org/10.1016/J.XPHS.2022.09.023>
- Leon Fontecha, Y. A. (2019). *Estudio cristalográfico y estructural del hidrato de doxiciclina $2c_{22}h_{24}n_2o_8.2hcl.c_{2}h_6o.h_2o$ y de los productos de desolvatación/solvatación y deshidratación/hidratación*. Universidad Industrial de Santander. <https://noesis.uis.edu.co/handle/20.500.14071/14137>
- Leyva-Porras, C., Cruz-Alcantar, P., Espinosa-Solís, V., Martínez-Guerra, E., Piñón-Balderrama, C. I., Martínez, I. C., & Saavedra-Leos, M. Z. (2019). Application of Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Modulated Differential Scanning Calorimetry (MDSC) in Food and Drug Industries. *Polymers* 2020, Vol. 12, Page 5, 12(1), 5. <https://doi.org/10.3390/POLYM12010005>
- Li, C., Wang, J., Wang, Y., Gao, H., Wei, G., Huang, Y., Yu, H., Gan, Y., Wang, Y., Mei, L., Chen, H., Hu, H., Zhang, Z., & Jin, Y. (2019). Recent progress in drug delivery. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 9(6), 1145–1162. <https://doi.org/10.1016/J.APSB.2019.08.003>
- Li, J., Nan, J., Wu, H., Park, H. J., Zhao, Q., & Yang, L. (2022). Middle purity soy lecithin is appropriate for food grade nanoliposome: Preparation, characterization, antioxidant and anti-inflammatory ability. *Food Chemistry*, 389, 132931. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2022.132931>
- Li, J., Zhao, J., Tan, T., Liu, M., Zeng, Z., Zeng, Y., Zhang, L., Fu, C., Chen, D., & Xie, T. (2020). Nanoparticle drug delivery system for glioma and its efficacy improvement strategies: A comprehensive review. *International Journal of Nanomedicine*, 15, 2563–2582. <https://doi.org/10.2147/IJN.S243223>

- Lin, Y., Zhou, M., Tai, X., Li, H., Han, X., & Yu, J. (2021). *Analytical transmission electron microscopy for emerging advanced materials*.
<https://doi.org/10.1016/j.matt.2021.05.005>
- Liu, P., Chen, G., & Zhang, J. (2022). A Review of Liposomes as a Drug Delivery System: Current Status of Approved Products, Regulatory Environments, and Future Perspectives. *Molecules* 2022, Vol. 27, Page 1372, 27(4), 1372.
<https://doi.org/10.3390/MOLECULES27041372>
- Liu, W., Hou, Y., Jin, Y., Wang, Y., Xu, X., & Han, J. (2020). Research progress on liposomes: Application in food, digestion behavior and absorption mechanism. *Trends in Food Science & Technology*, 104, 177–189.
<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2020.08.012>
- Liu, W., Kong, Y., Ye, A., Shen, P., Dong, L., Xu, X., Hou, Y., Wang, Y., Jin, Y., & Han, J. (2020). Preparation, formation mechanism and in vitro dynamic digestion behavior of quercetin-loaded liposomes in hydrogels. *Food Hydrocolloids*, 104, 105743.
<https://doi.org/10.1016/J.FOODHYD.2020.105743>
- Liu, W., Ye, A., Han, F., & Han, J. (2019). Advances and challenges in liposome digestion: Surface interaction, biological fate, and GIT modeling. *Advances in Colloid and Interface Science*, 263, 52–67. <https://doi.org/10.1016/J.CIS.2018.11.007>
- Magalhães, S., Goodfellow, B. J., & Nunes, A. (2021). FTIR spectroscopy in biomedical research: how to get the most out of its potential. *Applied Spectroscopy Reviews*, 56(8–10), 869–907. <https://doi.org/10.1080/05704928.2021.1946822>
- Maja, L., Željko, K., & Mateja, P. (2020). Sustainable technologies for liposome preparation. *The Journal of Supercritical Fluids*, 165, 104984.
<https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2020.104984>
- Mandracchia, D., & Giuseppe Tripodo. (2020). Micro and Nano-drug Delivery Systems. *Silk-Based Drug Delivery Systems*, 1–24. <https://doi.org/10.1039/9781839162664-00001>

- Manzari, M., Shamay, Y., Kiguchi, H., Rosen, N., Scaltriti, M., & Heller, D. A. (2021). Targeted drug delivery strategies for precision medicines. *Nature Reviews Materials* 2021 6:4, 6(4), 351–370. <https://doi.org/10.1038/s41578-020-00269-6>
- Margossian, K. O., Brown, M. U., Emrick, T., & Muthukumar, M. (2022). Coacervation in polyzwitterion-polyelectrolyte systems and their potential applications for gastrointestinal drug delivery platforms. *Nature Communications* 2022 13:1, 13(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29851-y>
- Maritim, S., Boulas, P., & Lin, Y. (2021). Comprehensive analysis of liposome formulation parameters and their influence on encapsulation, stability and drug release in glibenclamide liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 592, 120051. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2020.120051>
- Mazabel Riera, E. C., & Monsalve Buriticá, S. (2020). Doxiciiclina hielato, formulaciones de liberación controlada y cromatografía líquida de alta resolución para su detección en plasma. *Fondo Editorial Biogénesis*, 48-63., 47–62.
- Meng, W., He, C., Hao, Y., Wang, L., Li, L., & Zhu, G. (2020). Prospects and challenges of extracellular vesicle-based drug delivery system: considering cell source. *Drug Delivery*, 27(1), 585–598. <https://doi.org/10.1080/10717544.2020.1748758>
- Miere (Groza), F., Fritea, L., Cavalu, S., & Ioana Vicaș, S. (2020). Formulation, Characterization, and Advantages of Using Liposomes in Multiple Therapies. *Pharmacophore*, 11(3), 1–12. <https://pharmacophorejournal.com/article/formulation-characterization-and-advantages-of-using-liposomes-in-multiple-therapies>
- Miere (Groza), F., Vicas, S. I., Tima, A. V., Ganea, M., Zdrinca, M., Cavalu, S., Fritea, L., Vicas, L., Muresan, M., Pallag, A., & Dobjanschi, L. (2021a). Preparation and Characterization of Two Different Liposomal Formulations with Bioactive Natural Extract for Multiple Applications. *Processes* 2021, Vol. 9, Page 432, 9(3), 432. <https://doi.org/10.3390/PR9030432>
- Miere (Groza), F., Vicas, S. I., Tima, A. V., Ganea, M., Zdrinca, M., Cavalu, S., Fritea, L., Vicas, L., Muresan, M., Pallag, A., & Dobjanschi, L. (2021b). Preparation and Characterization of Two Different Liposomal Formulations with Bioactive Natural

Extract for Multiple Applications. *Processes* 2021, Vol. 9, Page 432, 9(3), 432.
<https://doi.org/10.3390/PR9030432>

Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Jadidi Kouhbanani, M. A., Varma, R. S., Marofi, F., Jarahian, M., & Beheshtkhoo, N. (2021a). Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.705886>

Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Jadidi Kouhbanani, M. A., Varma, R. S., Marofi, F., Jarahian, M., & Beheshtkhoo, N. (2021b). Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 705886.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.705886>

National Center for Biotechnology Information. (2023). *Cholesterol* | C₂₇H₄₆O | CID 5997 - *PubChem*. PubChem Compound Summary for CID 5997, Cholesterol.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Cholesterol>

Nkanga, C. I., Krause, R. W., Noundou, X. S., & Walker, R. B. (2017). Preparation and characterization of isoniazid-loaded crude soybean lecithin liposomes. *International Journal of Pharmaceutics*, 526(1–2), 466–473.
<https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2017.04.074>

Nsairat, H., Ibrahim, A. A., Jaber, A. M., Abdelghany, S., Atwan, R., Shalan, N., Abdelnabi, H., Odeh, F., El-Tanani, M., & Alshaer, W. (2023). Liposome bilayer stability: emphasis on cholesterol and its alternatives. *Journal of Liposome Research*.
<https://doi.org/10.1080/08982104.2023.2226216>

Nsairat, H., Khater, D., Sayed, U., Odeh, F., Al Bawab, A., & Alshaer, W. (2017). Liposomes: structure, composition, types, and clinical applications ☆. *Heliyon*, e09394. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09394>

Olusanya, T. O. B., Ahmad, R. R. H., Ibegbu, D. M., Smith, J. R., & Elkordy, A. A. (2018). Liposomal Drug Delivery Systems and Anticancer Drugs. *Molecules* 2018, Vol. 23, Page 907, 23(4), 907. <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23040907>

- Pan, L., Zhang, S., Gu, K., & Zhang, N. (2018). Preparation of astaxanthin-loaded liposomes: characterization, storage stability and antioxidant activity. *CyTA - Journal of Food*, *16*(1), 607–618. <https://doi.org/10.1080/19476337.2018.1437080>
- Pande, S. (2023). Liposomes for drug delivery: review of vesicular composition, factors affecting drug release and drug loading in liposomes. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, *51*(1), 428–440. <https://doi.org/10.1080/21691401.2023.2247036>
- Pandur, Ž., Dogsa, I., Dular, M., & Stopar, D. (2020). Liposome destruction by hydrodynamic cavitation in comparison to chemical, physical and mechanical treatments. *Ultrasonics Sonochemistry*, *61*, 104826. <https://doi.org/10.1016/J.ULTSONCH.2019.104826>
- Parolo, M. E. (2010). *Minerales arcillosos de la Norpatagonia argentina en la retención de compuestos orgánicos que impactan sobre la salud humana y el medio ambiente*. <https://repositoriodigital.uns.edu.ar/handle/123456789/2112>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. *Journal of Nanobiotechnology 2018 16:1*, *16*(1), 1–33. <https://doi.org/10.1186/S12951-018-0392-8>
- Pavlović, N., Mijalković, J., Đorđević, V., Pecarski, D., Bugarski, B., & Knežević-Jugović, Z. (2022). Ultrasonication for production of nanoliposomes with encapsulated soy protein concentrate hydrolysate: Process optimization, vesicle characteristics and in vitro digestion. *Food Chemistry: X*, *15*, 100370. <https://doi.org/10.1016/J.FOCHX.2022.100370>
- Petit, T., & Puskar, L. (2018). FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. *Diamond and Related Materials*, *89*, 52–66. <https://doi.org/10.1016/J.DIAMOND.2018.08.005>
- Peyriere, H., Makinson, A., Marchandin, H., & Reynes, J. (2018). Doxycycline in the management of sexually transmitted infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *73*(3), 553–563. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX420>

- Pino, J. A. (2021). LECITINA: QUIMICA, BIOQUIMICA Y USO EN LA INDUSTRIA ALIMENTARIA. *Ciencia y Tecnología de Los Alimentos*, 31(1), 68–78. <https://go.gale.com/ps/i.do?p=AONE&sw=w&issn=08644497&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA663462503&sid=googleScholar&linkaccess=fulltext>
- Rizvi, A., Mulvey, J. T., Carpenter, B. P., Talosig, R., & Patterson, J. P. (2021). A Close Look at Molecular Self-Assembly with the Transmission Electron Microscope. *Chemical Reviews*, 121(22), 14232–14280. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMREV.1C00189>
- Robson, A. L., Dastoor, P. C., Flynn, J., Palmer, W., Martin, A., Smith, D. W., Woldu, A., & Hua, S. (2018). Advantages and limitations of current imaging techniques for characterizing liposome morphology. *Frontiers in Pharmacology*, 9(FEB), 328115. <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2018.00080>
- Safdar, M., Ozaslan, M., & Junejo, Y. (2022). Synthesis, Characterization and Employed Doxycycline Capped Gold Nanoparticles on TRP Channel Expressions in SKBR3 Breast Cancer Cells and Antimicrobial Activity. *Journal of Cluster Science*, 33(6), 2635–2642. <https://doi.org/10.1007/S10876-021-02181-7>
- Scicluna, M. C., & Vella-Zarb, L. (2020). Evolution of Nanocarrier Drug-Delivery Systems and Recent Advancements in Covalent Organic Framework-Drug Systems. *ACS Applied Nano Materials*, 3(4), 3097–3115. <https://doi.org/10.1021/ACSANM.9B02603>
- Shah, S., Dhawan, V., Holm, R., Nagarsenker, M. S., & Perrie, Y. (2020). Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154–155, 102–122. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.07.002>
- Sopyan, I., Insan Sunan, K., & Gozali, D. (2020). A Review: A Novel of Efforts to Enhance Liposome Stability as Drug Delivery Approach. *Systematic Reviews in Pharmacy*, 11(6), 555. <https://openurl.ebsco.com/EPDB%3Agcd%3A3%3A840195/detailv2?sid=ebsco%3Aplink%3Ascholar&id=ebsco%3Agcd%3A144464349&crl=c>
- Souto, E. B., Macedo, A. S., Dias-Ferreira, J., Cano, A., Zielińska, A., & Matos, C. M. (2021). Elastic and Ultradeformable Liposomes for Transdermal Delivery of Active

Pharmaceutical Ingredients (APIs). *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 9743, 22(18), 9743. <https://doi.org/10.3390/IJMS22189743>

Sreeharsha, N., Venugopala, K. N., Nair, A. B., Roopashree, T. S., Attimarad, M., Hiremath, J. G., Al-Dhubiab, B. E., Ramnarayanan, C., Shinu, P., Handral, M., Haroun, M., & Tratrat, C. (2019). An efficient, lung-targeted, drug-delivery system to treat asthma via microparticles. *Drug Design, Development and Therapy*, 13, 4389–4403. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S216660>

Sudhakar, K., Fuloria, S., Subramaniyan, V., Sathasivam, K. V., Azad, A. K., Swain, S. S., Sekar, M., Karupiah, S., Porwal, O., Sahoo, A., Meenakshi, D. U., Sharma, V. K., Jain, S., Charyulu, R. N., & Fuloria, N. K. (2021). Ultraflexible Liposome Nanocargo as a Dermal and Transdermal Drug Delivery System. *Nanomaterials* 2021, Vol. 11, Page 2557, 11(10), 2557. <https://doi.org/10.3390/NANO11102557>

Sung, Y. K., & Kim, S. W. (2020). Recent advances in polymeric drug delivery systems. *Biomaterials Research* 2020 24:1, 24(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/S40824-020-00190-7>

Tai, K., Liu, F., He, X., Ma, P., Mao, L., Gao, Y., & Yuan, F. (2018). The effect of sterol derivatives on properties of soybean and egg yolk lecithin liposomes: Stability, structure and membrane characteristics. *Food Research International*, 109, 24–34. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2018.04.014>

Tai, K., Rappolt, M., He, X., Wei, Y., Zhu, S., Zhang, J., Mao, L., Gao, Y., & Yuan, F. (2019). Effect of β -sitosterol on the curcumin-loaded liposomes: Vesicle characteristics, physicochemical stability, in vitro release and bioavailability. *Food Chemistry*, 293(17), 92–102. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.077>

Trucillo, P., Campardelli, R., & Reverchon, E. (2019). A versatile supercritical assisted process for the one-shot production of liposomes. *The Journal of Supercritical Fluids*, 146, 136–143. <https://doi.org/10.1016/J.SUPFLU.2019.01.015>

Trucillo, P., Campardelli, R., & Reverchon, E. (2020). Liposomes: From Bangham to Supercritical Fluids. *Processes* 2020, Vol. 8, Page 1022, 8(9), 1022. <https://doi.org/10.3390/PR8091022>

- Villanueva Alvaro, D. Y. (2019). *Síntesis, optimización y caracterización de liposomas como transportadores moleculares*. <http://hdl.handle.net/10902/17826>
- Wang, C., Yang, Y., Cao, Y., Liu, K., Shi, H., Guo, X., Liu, W., Hao, R., Song, H., & Zhao, R. (2023). Nanocarriers for the delivery of antibiotics into cells against intracellular bacterial infection. *Biomaterials Science*, *11*(2), 432–444. <https://doi.org/10.1039/D2BM01489K>
- Wertz, P. W., Tao, R. E., Prajapati, S., Pixley, J. N., Grada, A., & Feldman, S. R. (2023). Oral Tetracycline-Class Drugs in Dermatology: Impact of Food Intake on Absorption and Efficacy. *Antibiotics* 2023, Vol. 12, Page 1152, *12*(7), 1152. <https://doi.org/10.3390/ANTIBIOTICS12071152>
- Wong, C. Y., Al-Salami, H., & Dass, C. R. (2018). Recent advancements in oral administration of insulin-loaded liposomal drug delivery systems for diabetes mellitus. *International Journal of Pharmaceutics*, *549*(1–2), 201–217. <https://doi.org/10.1016/J.IJPHARM.2018.07.041>
- Wong, K. H., Riaz, M. K., Xie, Y., Zhang, X., Liu, Q., Chen, H., Bian, Z., Chen, X., Lu, A., & Yang, Z. (2019). Review of Current Strategies for Delivering Alzheimer's Disease Drugs across the Blood-Brain Barrier. *International Journal of Molecular Sciences* 2019, Vol. 20, Page 381, *20*(2), 381. <https://doi.org/10.3390/IJMS20020381>
- Wu, Z. L., Zhao, J., & Xu, R. (2020). Recent advances in oral nano-antibiotics for bacterial infection therapy. *International Journal of Nanomedicine*, *15*, 9587–9610. <https://doi.org/10.2147/IJN.S279652>
- Yamaguchi, S., Ito, S., Masuda, T., Couraud, P. O., & Ohtsuki, S. (2020). Novel cyclic peptides facilitating transcellular blood-brain barrier transport of macromolecules in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, *321*, 744–755. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2020.03.001>
- Zhang, H., Fan, T., Chen, W., Li, Y., & Wang, B. (2020). Recent advances of two-dimensional materials in smart drug delivery nano-systems. *Bioactive Materials*, *5*(4), 1071–1086. <https://doi.org/10.1016/J.BIOACTMAT.2020.06.012>

- Zhang, W.-J., Hong, C.-Y., Pan, C.-Y., Zhang, W.-J., Hong, C.-Y., & Pan, C.-Y. (2019). Polymerization-Induced Self-Assembly of Functionalized Block Copolymer Nanoparticles and Their Application in Drug Delivery. *Macromolecular Rapid Communications*, *40*(2), 1800279. <https://doi.org/10.1002/MARC.201800279>
- Zhong, X., Di, Z., Xu, Y., Liang, Q., Feng, K., Zhang, Y., Di, L., & Wang, R. (2022). Mineral medicine: from traditional drugs to multifunctional delivery systems. *Chinese Medicine* 2022 *17:1*, *17*(1), 1–30. <https://doi.org/10.1186/S13020-022-00577-9>

ANEXOS.

Anexo A. Obtención de la ecuación de la curva de calibración de la doxiciclina.

Tabla 8. Datos para la obtención de la curva de calibración a concentraciones conocidas.

Concentración Precipitado ($\mu\text{g/ml}$)	Absorbancia
2	0.0277
4	0.0422
6	0.0653
8	0.084
10	0.1015
12	0.1195
14	0.1344
16	0.1391
18	0.1580
20	0.1787

Anexo B. Análisis estadístico de la encapsulación de doxiciclina de los liposomas.

ANOVA Simple – Eficiencia de encapsulación (%) por Proporción de Lecitina de soya cruda con Colesterol (CL:CHO).

Variable dependiente: Eficiencia de encapsulación (%).

Factor: Proporción de Lecitina de soya cruda con Colesterol.

Numero de observaciones: 3.

Número de niveles: 2.

Tabla ANOVA para eficiencia de encapsulación (%) por Proporción de Lecitina de soya cruda con Colesterol (CL:CHO).

<i>Fuente</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>gl</i>	<i>Media cuadrática</i>	<i>Razón F</i>	<i>Sig.</i>
Entre grupos	1418.198	2	709.099	421.576	.000
Dentro de grupos	10.092	6	1.682		
Total	1428.290	8			

Pruebas de Comparaciones Múltiples para eficiencia de encapsulación (%) por Proporción de Lecitina de soya cruda con Colesterol (CL:CHO).

Método: 95.0% Tukey HSD.

(I) Proporciones de los liposomas	(J) Proporciones de los liposomas	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	Sig.
60:40	70:0.3	-8.348627333*	1.058936335	.001
	80:0.2	21.454266793*	1.058936335	.000
70:30	60:40	8.348627333*	1.058936335	.001
	80:20	29.802894127*	1.058936335	.000
80:20	60:40	-21.454266793*	1.058936335	.000
	70:30	-29.802894127*	1.058936335	.000