

Departamento de Química Física

Facultad de Farmacia

Universidad de Sevilla

**Preparación de nanotransportadores liposomiales, basado en el uso de tensioactivos,  
para el transporte del antibiótico  $\beta$ -láctamico cefepima.**

Vanesa Camacho Sánchez

Sevilla, 2016





Facultad de Farmacia

Trabajo Fin de Grado

Grado en Farmacia

Universidad de Sevilla

**Preparación de nanotransportadores liposomiales, basado en el uso de tensioactivos,  
para el transporte del antibiótico  $\beta$ -láctamico cefepima.**

Departamento Química Física.

Trabajo de carácter experimental.

En Sevilla, a 5 de Julio de 2016.

Directora:

Alumno:

Fdo. D<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> del Pilar López Cornejo.  
Profesora Titular de Química Física.

Fdo. Vanesa Camacho Sánchez



## ***Agradecimientos***

A Pilar López Cornejo por permitirme formar parte de su equipo, su paciencia, motivación, por su gran labor en mi formación y por la confianza que ha depositado en mí dándome una considerable libertad para llevar a cabo este trabajo e iniciarme en el camino de la investigación.

A María Luisa Moyá y Manolo López por participar también en mi formación.

A Irene Beck Díaz por su gran ayuda y apoyo, ha sido un gran honor trabajar e iniciarnos en este camino juntas.

A Francisco José Ostos Marcos, José Antonio Lebrón Romero y José María Carnerero Panduro por brindarme ayuda cuando lo he necesitado y hacerme sentir una más del equipo durante estos meses.

A mis padres y hermana por confiar en mí y permitirme tener esta oportunidad de formación.



## **Glosario**

**CH:** colesterol.

**DOPE:** 1,2-dioleoil sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

**Hepes:** (ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-etanosulfónico).

**PC:** fosfatidilcolina

**PEG:** polietilenglicol

**12NBr:** bromuro de N,N,N-trietil-N-(12-naftoxidodecil)amonio.





## Resumen

Cefepima es un antibiótico  $\beta$ -láctamico, perteneciente al grupo de las cefalosporinas, muy utilizado en infecciones graves. La importancia de su uso radica a que presenta una mayor resistencia a las betalactamasas que otras cefalosporinas y, por otro lado, por su capacidad de poder difundirse a través del líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, presenta desventajas farmacocinéticas como un tiempo de vida media muy corto y problemas de estabilidad; por lo que se estudia su incorporación en sistemas vectoriales para contrarrestar dichas desventajas. El sistema vectorial estudiado son liposomas, estructuras vesiculares constituidas por una o más láminas bimoleculares de fosfolípidos, que forman bicapas lipídicas concéntricas, que encierran un número igual de compartimentos acuosos. Al ser moléculas anfipáticas puede encapsular tanto fármacos de naturaleza hidrofílica como hidrofóbica. Para llevar a cabo nuestro estudio se han realizado medidas preliminares del cefepima como son medidas de absorbancia, medidas de estabilidad, la velocidad de degradación del fármaco, así como su tiempo de vida media a las temperaturas de 25° C, 37° C y 60° C. A continuación, llevamos a cabo estudios sobre la encapsulación de cefepima en diferentes tipos de liposomas. Para ello hemos realizado medidas de potencial Z, que nos permitía saber, por ejemplo, si el liposoma en presencia del antibiótico sufría cambios considerables o si, por algún motivo desconocido, no se había encapsulado o se había degradado. También se han llevado a cabo medidas de tamaño, que nos informa si posee el tamaño apropiado para ser administrado por vía intravenosa, y de polidispersidad, que nos da información sobre la homogeneidad del liposoma. También se ha estudiado la eficacia de encapsulación mediante diálisis, permitiéndonos conocer la relación liposoma-tensioactivo más eficiente para encapsular la mayor concentración de fármaco posible dentro del rango de tamaño permitido para la inyección intravenosa.

**Palabras clave:** cefepima, coeficiente de extinción molar, liposoma, índice de polidispersidad, eficacia de encapsulación.



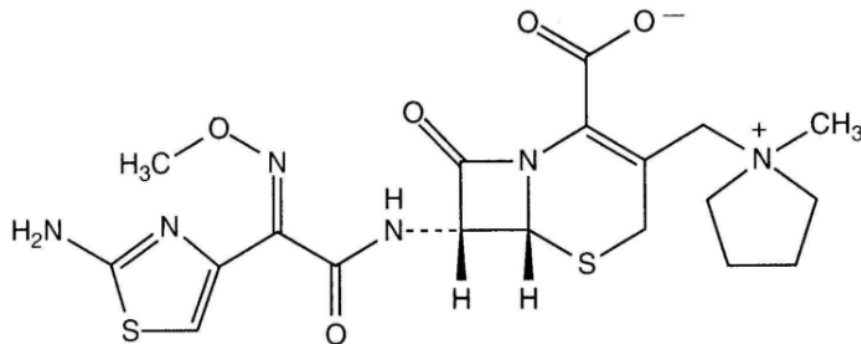
## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	7
3. Parte experimental.....	7
3.1.-Materiales.....	7
3.2.-Métodos.....	8
4. Resultados y discusión.....	13
5. Conclusiones.....	22
6. Referencias bibliográficas.....	23



## 1. INTRODUCCIÓN

Cefepima es un antibiótico  $\beta$ -lactámico del grupo de las cefalosporinas de cuarta generación, con un amplio espectro de actividad frente a muchas bacterias Gram positiva y Gram negativa (Han y col, 2016) (ver figura 1).



**Figura 1:** Estructura química de cefepima.

Está indicado como tratamiento en infecciones nosocomiales, pulmonía, infecciones del tracto urinario, infecciones de la piel y tejidos blandos, sepsis, neutropenia febril e infecciones intra-abdominales (Evageloy y col, 2003). Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo de la síntesis y la reparación de la pared bacteriana. Tiene la ventaja de que es estable frente a la hidrólisis por muchas beta-lactamasas cromosómicas y plasmídicas, y presenta escasa capacidad de inducir beta-lactamasas de tipo I, lo cual hace que sea útil en el tratamiento de infecciones resistentes a antibióticos del grupo de las cefalosporinas que llevan tiempo comercializándose (Cárdenas y col, 2001).

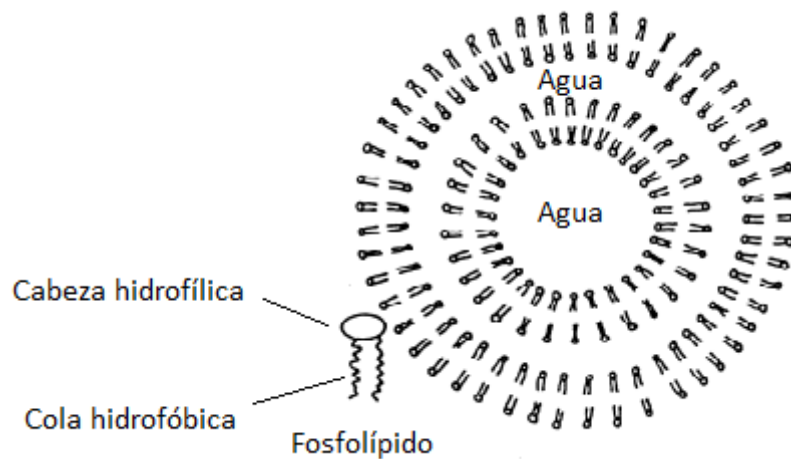
La dosis y la vía de administración utilizadas varían según factores tales como la sensibilidad del microorganismo causante, la severidad de la infección, la función renal y el estado general del paciente. En la mayoría de los casos la vía de administración suele ser intramuscular o intravenosa. Respecto a la dosificación, en pacientes con un funcionamiento renal normal, se administra en un rango de dosis de 0,5g a 2g. Su

volumen de distribución es de 18 L y su unión a proteínas plasmáticas es del 16%. Según la bibliografía (Burgess y col, 2015), el aclaramiento plasmático de cefepima es de 110ml/min. Si el aclaramiento plasmático total para cualquier fármaco es de 120 ml/min, se puede deducir que el antibiótico cefepima es eliminado del organismo casi en su totalidad mediante vía renal, principalmente por filtración glomerular (Burgess y col, 2015). Pese a ello, algunos estudios destacan la eficacia limitada de este medicamento debido a la baja vida media que presenta, aproximadamente 2 horas. Además, presenta una estabilidad muy reducida, de aproximadamente 24h a temperatura ambiente (20 – 25°C) y de unos 7 días a una temperatura de 4°C (Fubara y Notari, 1998).

El uso de vehículos o sistemas transportadores (nanotransportadores tipo liposomas o nanopartículas) podrían servir de estrategia válida para mantener al fármaco más tiempo en el organismo, debido a que son sistemas que proporcionan liberación controlada en el tiempo. Además, es relativamente fácil la síntesis de estos sistemas. Ello permite que se puedan obtener nanotransportadores con características funcionales tales que sirvan para liberar el fármaco en el tejido diana, disminuyendo así los efectos tóxicos del mismo (Villasmil-Sánchez y col, 2010) y aumentando la concentración del compuesto activo en su lugar de acción, lo que podría contribuir a incrementar la eficacia de la sustancia activa. El uso de este tipo de vehículos para el transporte de antibióticos también puede provocar un aumento de la estabilidad de fármacos lábiles como es el caso del cefepima (Akbarzadeh y col, 2013).

Los liposomas son nanopartículas de diámetro variable, normalmente entre 50 nm y 500 nm, que se forman espontáneamente cuando ciertos fosfolípidos son hidratados en medio acuoso (Bangham y Horne, 1964). Están compuestos de materiales biocompatibles y biodegradables y consiste en un volumen acuoso atrapado en una o más bicapas lipídicas. En la Figura 2 se muestra la estructura de un liposoma unilamelar, así como la estructura de la bicapa lipídica. La presencia de partes en la estructura con distinto carácter hidrofóbico/hidrofílico permite encapsular fármacos de diferentes lipofilias, ya sea en la bicapa lipídica, en el compartimento acuoso o en la interfase de la bicapa ( Sharma y S. Sharma, 1997; Clares, 2003).

Dada su alta capacidad de encapsulación, así como la facilidad de construcción de nanoestructuras a partir del uso de diferentes lípidos, los liposomas no sólo han sido investigados como transportadores de fármacos tipo antibióticos, sino también como portadores de material genético, agentes quelantes, vacunas y fármacos antineoplásicos (Gregoriadis y Florence, 1993). También son muy utilizados en la industria cosmética y alimentaria (Akbarzadeh y col, 2013).



**Figura 2:** Estructura de un liposoma MLV.

Los liposomas se pueden clasificar en función de su composición y/o su tamaño.

- Según su composición los liposomas se clasifican en (Samad y col, 2007):
  - I) Liposomas convencionales (CL): formados únicamente por fosfolípidos neutros o cargados negativamente y CH (colesterol).
  - II) Liposomas catiónicos: contruidos a partir de fosfolípidos catiónicos.
  - III) Liposomas de larga circulación (LCL): liposomas a los que se le une en la superficie, mediante enlace covalente, polímeros hidrofílicos de PEG (polietilenglicol), los cuales al estar altamente hidratados, crean una barrera estérica que le impide interactuar con células del organismo. Este tipo de liposomas, al permanecer más tiempo en circulación podían extravasarse a

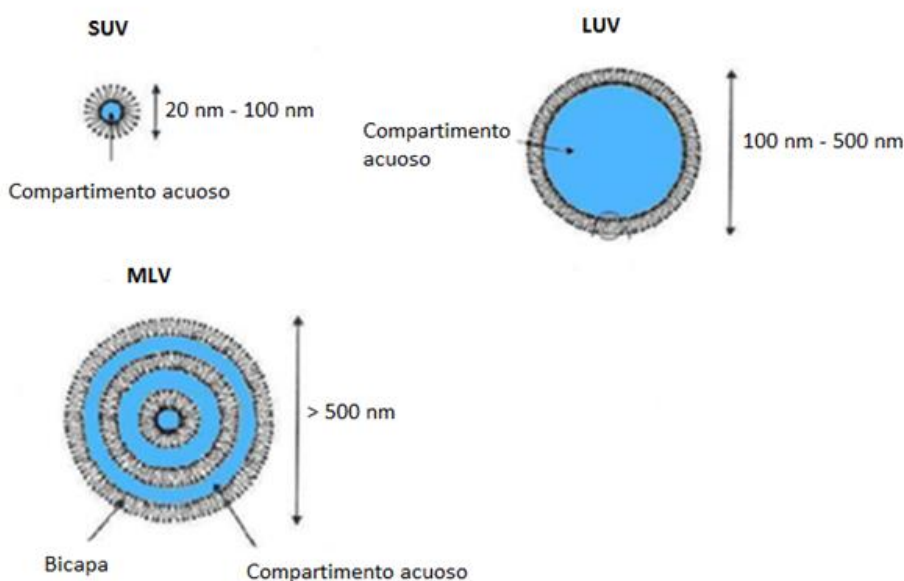
aquellas zonas del cuerpo donde la permeabilidad de los vasos estaba aumentada pudiendo llegar a áreas patológicas como tumores sólidos y sitios de infección e inflamación.

IV) Inmunoliposomas: liposomas tipo CL o LCL unidos a anticuerpos específicos o fragmentos de ellos que le permite potenciar la unión a la célula diana.

- Según su tamaño:

El tamaño de los liposomas puede ser muy variable, y puede estar formado por una sola capa o varias capas. El tamaño influye en la vida media de circulación del liposoma y el número de capas en el grado de encapsulación de fármaco (Sharma y S. Sharma, 1997; Ruano, 2003;). Así, según el tamaño y número de capas se encuentran (ver Figura 3):

- I) Liposomas multilamelares (MLV): formados por varias bicapas lipídicas concéntricas separadas por capas de agua. Presentan un tamaño  $> 100$  nm.
- II) Liposomas unilamelares grandes (LUV): están formados por una sola bicapa lipídica que encierra la fase acuosa. Presenta un tamaño  $> 100$  nm.
- III) Liposomas unilamelares pequeños (SUV): se diferencian de los LUV únicamente en el tamaño que es  $< 100$  nm.



**Figura 3:** Tipos de liposomas en función de su tamaño y número de capas.



La encapsulación de una suficiente cantidad de fármaco es una de las propiedades deseables para su uso. Los factores que afectan en la eficacia de encapsulación del fármaco provienen tanto de las propiedades del liposoma como de las del fármaco. Con respecto al fármaco, el carácter hidrofílico o hidrofóbico del mismo interviene en la eficacia de encapsulación. Con respecto al liposoma, el volumen acuoso, el tamaño, la rigidez de la bicapa, el potencial químico, así como el método de preparación intervienen en dicho proceso ( Villasmil-Sánchez y col, 2010 ).

Un parámetro muy importante a tener en cuenta a la hora de preparar liposomas es la llamada temperatura de transición. A partir de una determinada temperatura los lípidos son capaces de pasar de un estado físico a otro. A esa temperatura se le llama temperatura de transición. Por debajo de la temperatura de transición los lípidos se encuentran en estado sólido y por encima de dicha temperatura de transición en estado líquido. La temperatura de transición de los lípidos varía en función de la longitud y naturaleza de los ácidos grasos (Sabín,2007).

La fluidez de la bicapa lipídica de los liposomas está muy relacionada con estos cambios de estados. Así, se puede conseguir lípidos con bicapas de mayor o menor fluidez utilizando lípidos con diferentes Temperaturas de transición. Así, lípidos con una temperatura de transición mayor de 37°C forman liposomas pocos fluidos, y por tanto menos permeables, a temperatura fisiológica. Por el contrario, lípidos con temperaturas de transición menores de 37°C forman liposomas que liberan el fármaco encapsulado en la fase acuosa de forma más rápida a temperatura fisiológica (Sharma y S. Sharma, 1997).

Por otro lado, la fluidez de la bicapa influye en la interacción liposoma-célula; lípidos de mayor temperatura de transición son captadas por las células RES en menor grado que los lípidos con temperaturas de transición más bajas ( Gabizón y col,1990).

La inclusión de colesterol en la membrana también influye en la fluidez de la misma. A más concentración de colesterol se elimina totalmente la transición de fases, la temperatura de transición se alcanza a mayor temperatura y disminuye la fluidez de la membrana, lo que hace que los liposomas sean más estables eliminando más lentamente el fármaco encapsulado (Clares,2003).

La carga del liposoma también interviene en la interacción liposoma-célula. Liposomas neutros se agregan unos con otros con facilidad, disminuyendo su estabilidad. Además, no interaccionan con las células y el fármaco se libera del liposoma extracelularmente, entrando en las células una vez liberado del nanotransportador. Los liposomas cargados sí interactúan más fuertemente con las células. Los cargados negativamente entran en la célula por endocitosis y son eliminados del plasma más rápidamente que los liposomas catiónicos. Pueden liberar el fármaco en la circulación o extracelularmente después de la interacción con los componentes de la sangre y de los tejidos. Los liposomas catiónicos entran en las células por fusión con las membranas ( Straubinger y col,1983).

La inclusión en la membrana de grupos hidrofílicos como PEG reduce la interacción liposoma- "célula RES" por impedimento estérico, aumentando su vida media en el torrente sanguíneo ( Sharma y S. Sharma, 1997).

Liposomas de menor tamaño tardan más en interaccionar con las células RES. También se ha visto que aumenta su acumulación en tejidos tumorales, lo que puede ser debido a su vida media más larga en comparación con liposomas más grandes (Allen y Chonn,1987).

Para la obtención de liposomas con diferentes tamaños se requieren el uso de diferentes métodos de preparación. El más simple y usado es la hidratación de la película lipídica con un tampón acuoso a temperatura por encima de la temperatura de transición de los lípidos. El fármaco a encapsular puede ir incluido en el núcleo acuoso, en el caso de fármacos hidrofílicos, o en la película de lípidos, en el caso de fármacos lipófilos. Este método de preparación forma lípidos tipo MLV y, por extrusión, se pueden obtener liposomas de una única bicapa lipídica. Una desventaja de este método es su baja eficacia de encapsulación de fármacos hidrófilos. Existen otros métodos de preparación de liposomas, para una revisión más detallada de los mismos Akbarzadeh y col,2013; Clares,2003.

Dada la importancia que presenta el uso de cefepima en pacientes con diversos tipos de infecciones graves y el tiempo de vida tan corto que muestra este fármaco en el organismo humano, así como los bajos porcentajes de encapsulación obtenidos

hasta ahora por otros investigadores (Sapateiro y col, 2012), resulta de gran importancia continuar los estudios en el tema. Para ello se ha realizado un trabajo en el que se han construido nanotransportadores liposomiales de cefepima que sean capaces de encapsular cantidades de fármaco mayores que los obtenidos hasta la fecha por otros investigadores. Para ello se ha llevado a cabo un estudio multidisciplinar en el que se han usado diferentes tipos de medidas: absorbancia, potencial Z, tamaño de partícula, índice de polidispersidad y eficacia de encapsulación. Cabe también mencionar los pocos estudios realizados hasta la fecha sobre encapsulación del antibiótico cefepima pese a la importancia que presenta el tema.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo *principal* de este estudio es la obtención de liposomas eficientes para la encapsulación de altas cantidades del antibiótico betalactámico cefepima. Los liposomas formados deben tener tamaños pequeños (<400 nm) para poder ser administrados por vía intravenosa.

## **3. PARTE EXPERIMENTAL**

### **3.1 Materiales:**

L- $\alpha$ -Fosfatidilcolina (PC, Ref. 61755), DOPE (1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, Ref. P1223) y colesterol (Ref. C8667) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich. El tensioactivo bromuro de N,N,N-trietil-N-(12-naftoxidodecil)amonio (12 NBr) fue sintetizado por un miembro del Grupo FQM-206 del Departamento de Química Física que dirige la profesora López Cornejo. El antibiótico utilizado (cefepima, de la casa Normon) nos fue suministrado por el Hospital Virgen Macarena de Sevilla. Las tripas de diálisis también fueron adquiridas en Sigma-Aldrich. El cloroformo utilizado en la preparación de la película de liposomas fue adquirido en Merck.

Todas las medidas se realizaron a un pH constante de 7,4 de Hepes (ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-etanosulfónico) 10mM. El Hepes utilizado era de Sigma-

Aldrich (Ref. H3375). Las disoluciones se prepararon con agua de tipo Millipore Milli-Q, que tiene una conductividad menor de  $10^6 \text{ S m}^{-1}$ .

### **3.2 Métodos:**

#### **Preparación de liposomas:**

El método escogido para la preparación de los liposomas ha sido el “método de evaporación de la fase reversa”. Se prepararon dos tipos de liposomas diferentes: liposomas aniónicos y liposomas catiónicos. La preparación de los liposomas aniónicos se llevó a cabo con PC y CH. Los liposomas catiónicos se prepararon con una mezcla DOPE/12NBr, y con una mezcla PC/12NBr. La composición de liposomas se expresa en fracción molar  $\alpha$ , definida como la relación de moles de lípido catiónico frente al número de moles de lípido total:

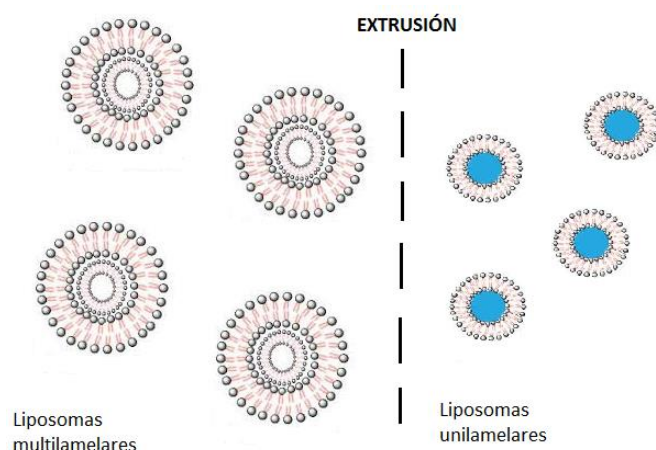
$$\alpha = \frac{nt^+}{nL^0 + nt^+} \quad (1)$$

Las masas de cada componente aparecen recogidas en la Tabla 1. El método de preparación utilizado ha sido el mismo para ambos liposomas: una primera preparación de las capas lipídicas y un segundo paso de hidratación de las mismas. En un principio se disolvieron cantidades requeridas de lípidos en cloroformo y se llevaron a un ultrasonido durante dos minutos (a temperatura ambiente para liposomas con DOPE y a temperatura de  $40^\circ\text{C}$  para los liposomas formados con PC). Una vez disueltos los componentes, se elimina el disolvente orgánico en un rotavapor durante un tiempo de aproximadamente 45 minutos a una temperatura de  $60^\circ\text{C}$ , formándose la película lipídica. Una vez formada dichas películas, libres de cloroformo, se conservan en un congelador a una temperatura de  $-80^\circ\text{C}$ . Este método de conservación permite mantener íntegras las propiedades del liposoma y evita la oxidación de los fosfolípidos hasta su utilización (Barrán, 2015). Posteriormente, la bicapa lipídica es hidratada con una disolución de cefepima en Hepes 10 mM. El proceso de hidratación se lleva a cabo intercalando un proceso de 3 minutos en vortex con otro de dos minutos en

ultrasonido. Posteriormente se realizan 10 ciclos para la preparación de liposomas con DOPE a temperatura ambiente y 5 ciclos para la preparación de liposomas con PC a temperatura de 58 °C. El proceso de hidratación termina con 2h en vortex para liposomas con DOPE y 1 h para liposomas con PC. Una vez hidratadas las películas lipídicas, se extruyen las disoluciones para obtener liposomas homogéneos y unilamelares con la ayuda de un extrusor de Avanti Polar Lipids (ver Figuras 4 y 5). Para obtener liposomas de tamaños menores de 200 nm y baja polidispersidad, se utilizaron membranas de diámetro de poro de 100 y 250 nm de la marca Whatman.



**Figura 4:** Fotografías del extrusor



**Figura 5:** Diagrama gráfico del proceso de extrusión.

**Tabla 1:** Cantidades utilizadas de cada uno de los componentes para la fabricación de liposomas.

	MUESTRA	Relación masas	$\alpha$	DOPE (mg)	PC(mg)	CH (mg)	12NBr (mg)
Liposomas PC:CH	<b>A</b>	5,3:1	–	–	0,017	0,0032	–
	<b>B</b>	1,2:1	–		0,012	0,010	
Liposomas PC:CH: 12NBr	<b>C</b>	21:1:1,5	0,10	–	85	4,0	6,1
	<b>D</b>	32:1:3,2	0,13		84	2,6	8,2
	<b>E</b>	7,6:1:1,3	0,23		68	9,0	12
	<b>F</b>	16:1:3,8	0,28		66	4,2	16
Liposomas DOPE:12NBr	<b>G</b>	1:1,6	0,2	5,4	–	–	8,9
	<b>H</b>	1:2,8	0,3	5,0			14
	<b>I</b>	1:4,4	0,4	4,3			19
	<b>J</b>	1:15	0,7	2,2			33
	<b>K</b>	1:25	0,8	1,4			35

### **Medidas de Absorbancia:**

Los espectros de absorbancia fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro CARY 500 SCAN UV-vis-NIR. Los datos se recogieron cada 1 nm y se realizó un barrido desde 200-400 nm. Se utilizó una cubeta de cuarzo estándar de 10 mm de paso de luz. Los blancos se realizaron con disoluciones de Hepes 10mM, todo ello a 303 K.

### **Medidas de Potencial Z:**

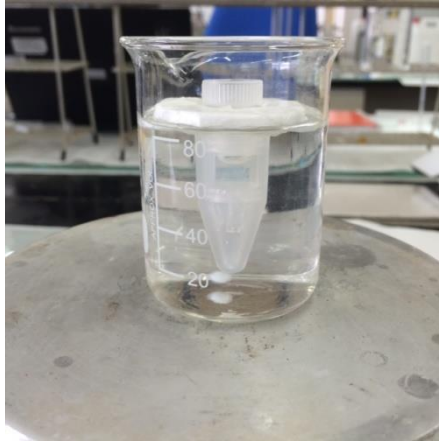
Los experimentos de potencial Z se llevaron a cabo en un equipo Zetasizer Nano ZS Malvern Instrument Ltd. (Reino Unido), el cual mide la movilidad electroforética de la muestra a partir de la velocidad de las partículas, utilizando un velocímetro láser Doppler ( LDV ). Se utilizó una cubeta DTS 1060 con un capilar de policarbonato. Las medidas se realizaron a una temperatura constante de 303K.

### **Medidas de dispersión de luz dinámica (DLS) :**

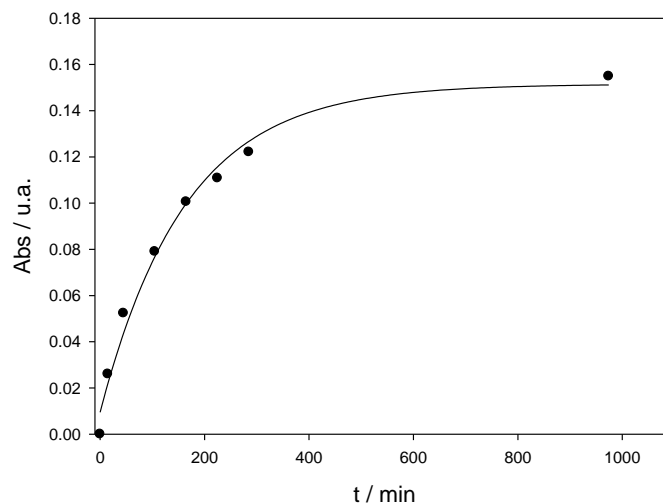
El tamaño y el índice de polidispersión de las muestras se obtuvieron por medio de la técnica basada en la dispersión de luz usando un medidor dinámico Zeta Modelo ZS-90 (instrumento Malvern, Ltd.; Reino Unido ). La muestra fue iluminada con un láser con una disposición de detección fija de 90º al centro del área de la celda, y se analizó la fluctuación en la intensidad de la luz dispersada. Los resultados obtenidos fueron el promedio de 10 medidas.

### **Diálisis**

El % de encapsulación (%EE) del fármaco se determinó mediante un proceso de diálisis. Se tomó una alícuota de 500 µL de liposoma que ya contiene el antibiótico y se puso en una tripa de diálisis. Se usaron dos tipos de tripas (una de PM de 12000 y otra de PM 1000 Dalton). Las tripas se sumergieron en 80 ml de Hepes 10 mM y se mantuvieron así durante todo el proceso de diálisis, con una agitación constante, en oscuridad y a una temperatura de 4°C con el fin de mantener constante la estabilidad de los liposomas ( ver Figura 5).



**Figura 5:** Tripa de diálisis conteniendo una disolución de liposoma, con cefepime, sumergida en Hepes 10 mM.



**Figura 6:** Variación de absorbancia obtenida en el proceso de diálisis (Liposoma PC+CH, Muestra A)

Cada cierto tiempo se toma 1 mL de disolución externa de Hepes y se mide la absorbancia de la misma a 258 nm en un espectrofotómetro HITACHI U 3900. Se repite este proceso hasta obtener un valor de absorbancia constante (ver Figura 6). Posteriormente se calcula el tanto por ciento de antibiótico encapsulado (% EE) mediante la siguiente expresión:

$$\%EE = \frac{\text{volumen total de droga liberada}}{\text{volumen total de droga}} \times 100 \quad (2)$$



Cada vez que retiramos 1mL de disolución del vaso de precipitado para medirle la absorbancia, se adiciona la misma cantidad retirada a la disolución externa para mantener constante el volumen de disolución.

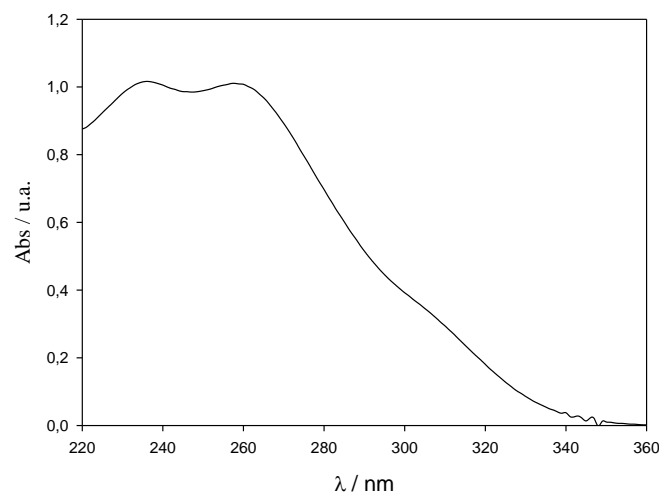
#### **4. Resultados y discusión**

Para llevar a cabo nuestro trabajo, empezamos realizando estudios preliminares sobre el antibiótico cefepima (espectro, coeficiente de extinción molar y estabilidad).

##### ***Espectro de absorción de cefepima***

Se prepararon disoluciones de concentraciones 5, 10, 20, 40 y 60  $\mu\text{g/ml}$  en una disolución tampón de Hepes 10 mM. Se eligieron estas concentraciones en base a los resultados obtenidos por otros autores (Sujith y col,2010; Kant y col,2015 ), según los cuales no se cumple la ley de Lambert-Beer a concentraciones mayores de 50  $\mu\text{g/ml}$  debido, probablemente, a la formación de dímeros entre las distintas moléculas del antibiótico. Sin embargo, en nuestras condiciones de trabajo, dicha ley se cumple hasta una concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$ . Los espectros fueron medidos en un rango de longitud de onda de 200 a 400nm. Como resultado obtuvimos que el cefepima presenta dos picos de absorbancia, uno a 237nm y otro a 258nm (Figura 7).

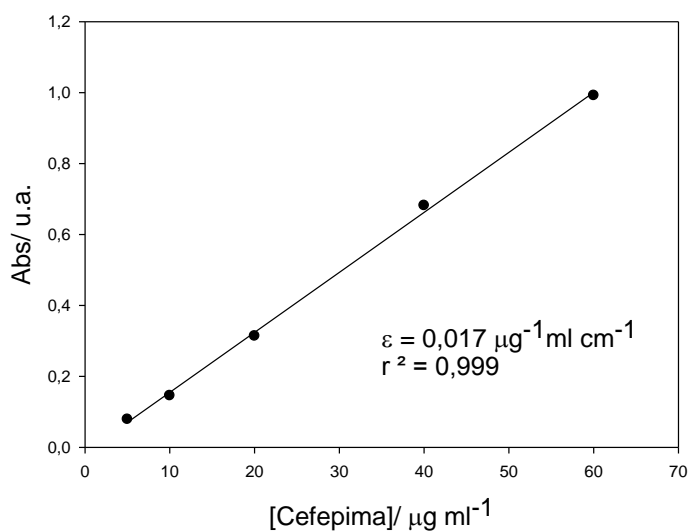
El pico observado a 237nm no se encuentra bien descrito en la bibliografía. Por el contrario, el pico observado a 258 nm, según la bibliografía, corresponde al anillo  $\beta$ -lactámico ( Evagelou y col, 2002).



**Figura 7:** Espectro de cefepima ([cefepima]=60 mg/ml, T=303K, pH=7.4 Hepes 10mM)

### ***Coefficiente de extinción molar del cefepima***

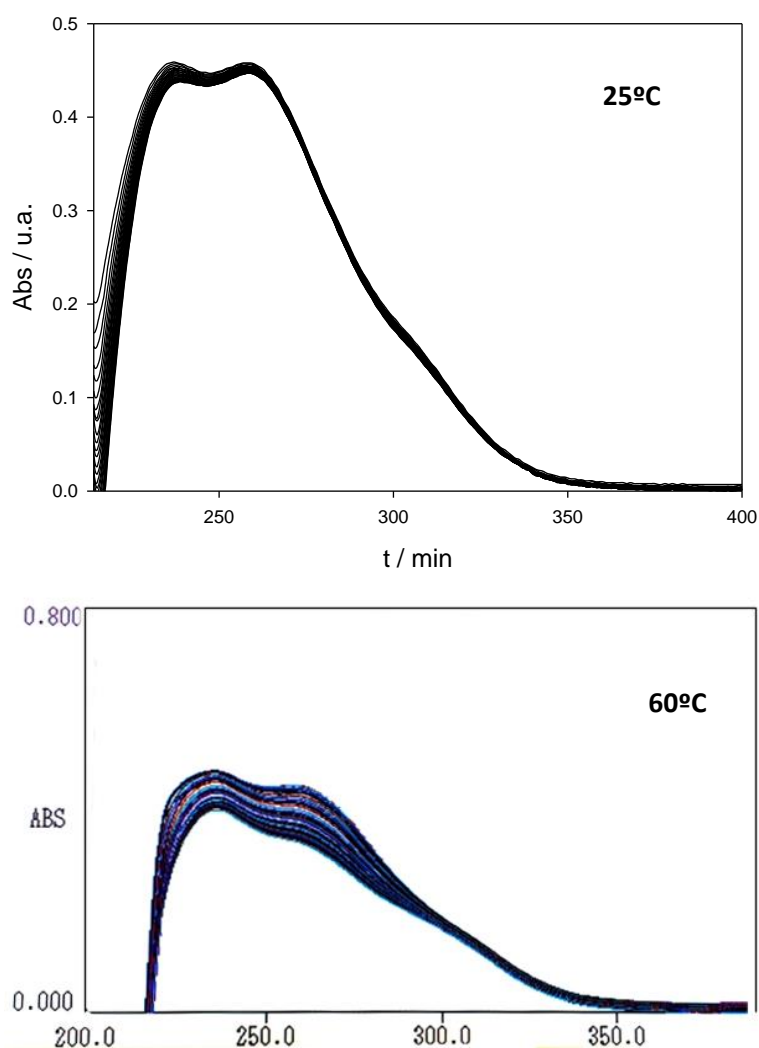
Dado que ninguna bibliografía proporcionaba el coeficiente de extinción molar del antibiótico cefepima, con los datos obtenidos al realizar los espectros de absorbancia obtuvimos dicho coeficiente en nuestras condiciones de trabajo (pH=7.4, Hepes 10 mM). Para ello representamos los valores de absorbancia obtenidos a 258nm y 237nm frente a la concentración de antibiótico. El valor del coeficiente obtenido es de  $0,017 \mu\text{g ml}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , independientemente de la longitud de onda estudiada (Figura 8).



**Figura 8:** Representación de los valores de absorbancia obtenidos a 258 nm frente a la concentración de cefepima.

### **Estabilidad de cefepima**

Se preparó una disolución de cefepima de 20  $\mu\text{g/ml}$  en Hepes 10 mM a un pH constante de 7.4 y se estudió la estabilidad a diversas temperaturas: 25°C, 37°C y 60°C. Para ello se registró el espectro de cefepima a distintos tiempos en un espectrofotómetro HITACHI U 3900. Se utilizó una cubeta de cuarzo termostatzada a la temperatura requerida. Como se ha mencionado anteriormente, el máximo obtenido a la longitud de onda de 258 nm corresponde al anillo  $\beta$ -lactámico del antibiótico. Según la bibliografía, este pico disminuye con el tiempo; mientras que el máximo observado a 237 nm aumenta (Evagelou y col, 2002). Sin embargo, los experimentos realizados aquí muestran que, en nuestras condiciones de trabajo, ambos picos disminuyen a medida que el antibiótico se va degradando (Figura 9).



**Figura 9:** Degradación de cefepima a las temperaturas de 25 y 60° C.

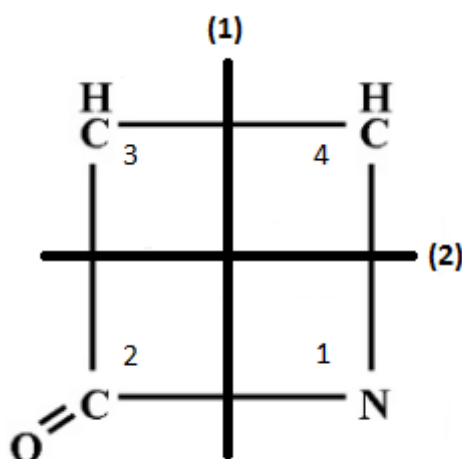
La reacción de degradación de cefepima sigue una cinética de orden uno, es decir, la velocidad con la que se degrada el fármaco es linealmente dependiente de la concentración del mismo. A partir de los datos de absorbancia obtenidos del espectro de absorción UV-Visible y la ecuación integrada de velocidad, se puede determinar la constante de velocidad de degradación del antibiótico ( $k_d$ ), así como su período de semirreacción,  $t_{1/2}$ , a partir de las siguientes ecuaciones:

$$\ln C = \ln C_o - k_d t \quad (3)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_d} \quad (4)$$

donde  $C_o$  y  $C$  representan las concentraciones de cefepima a tiempo  $t=0$  y a tiempo  $t$ .

Según la bibliografía las cefalosporinas sufren dos procesos de degradación diferentes: una hidrólisis que rompe el anillo  $\beta$ -lactámico entre los carbonos 1-2 y 3-4 y una fotólisis que rompe los enlaces que unen los carbonos 1-4 y 2-3 (ver Figura 10) (Rabouan-Guyon y col, 1997). De hecho, la rotura del anillo  $\beta$ -lactámico es la responsable de la coloración amarilla intensa característica de todos los antibióticos beta-lactámicos.



**Figura 10:** Degradación del anillo  $\beta$ -lactámico: (1) Hidrólisis, (2) Fotólisis

Los datos de constantes de velocidad obtenidos a partir de las medidas de absorbancia recogidas a la longitud de onda 258 nm se muestran en la Tabla 2. Los resultados indican que la degradación del antibiótico es más rápida conforme aumenta la temperatura. Nuestros resultados confirman los obtenidos por otros autores, en diferentes búferes que simulan el pH fisiológico, según los cuales el antibiótico cefepima es estable a 4º C, durante 15 días, en oscuridad (Fubara y Notari, 1998; Sprauten y col, 2003). Según nuestros resultados, así como los resultados bibliográficos encontrados, se decidió trabajar con el antibiótico en condiciones de oscuridad y a Tª de 4º C, para evitar en la medida de lo posible dicha degradación y poder llevar a cabo nuestros objetivos.

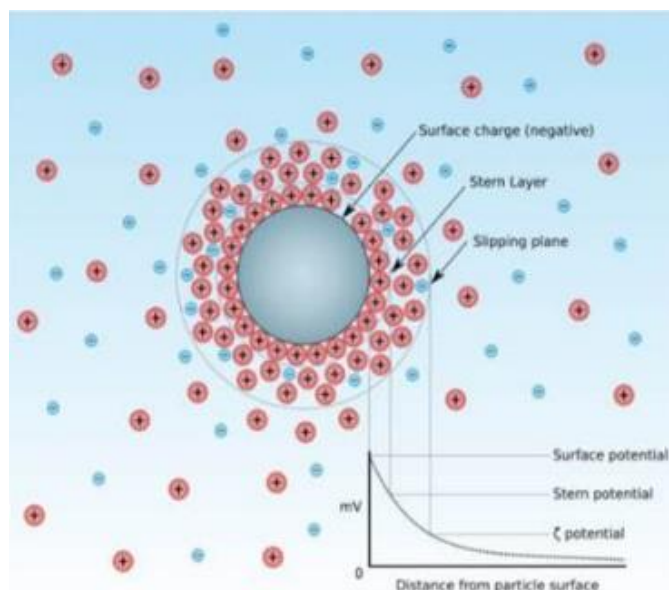
**Tabla 2:** Constantes de velocidad ( $k_d/s^{-1}$ ) correspondientes al proceso de degradación de cefepima y  $t_{1/2}$ .

Tª (ºC)	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)
25	$<9 \times 10^{-6}$	--
37	$7.9 \times 10^{-6}$	24
60	$2.6 \times 10^{-5}$	7.4

Una vez conocidas las características del cefepima realizamos los estudios correspondientes para la obtención de nuestros objetivos.

### **Medidas del potencial Z**

Basándonos en el modelo de la doble capa, el potencial Z describe la intensidad del campo eléctrico estático en el punto donde se unen las dos capas: la capa difusa y la capa Stern (Figura 11). En dicho modelo no podemos medir la carga superficial, ni tampoco el potencial, por lo que utilizamos el potencial Z como medio útil y efectivo de medida para controlar la partícula en cuestión. A partir de él, se puede obtener información acerca de los posibles cambios que se producen en el potencial de la superficie de la partícula (Ostos, 2014).



**Figura 11:** Representación del punto correspondiente al potencial Z en el modelo de la doble capa.

Se llevaron a cabo las medidas de potencial Z de los diferentes liposomas preparados en presencia y ausencia de cefepima. La Tabla 3 recoge los resultados obtenidos. Como se puede observar, el potencial Z depende ligeramente de las cantidades de lípidos utilizados. Así, en el caso de los liposomas aniónicos (PC:CH) un aumento de la cantidad de PC apenas influye en el potencial Z de las vesículas. En el caso de los liposomas catiónicos PC:CH:12NBr, a igualdad de masa de CH y de 12NBr, un aumento de la cantidad de PC disminuye el valor del potencial Z (muestras C y E). El mismo comportamiento se observa cuando se comparan los valores de potencial Z de las muestras D y F. Este hecho puede explicarse si se tiene en cuenta que la fosfatidilcolina utilizada en este trabajo presenta una cierta carga negativa, como demuestran los valores de potencial Z de las muestras A y B. Por el contrario, no parece observarse relación alguna de los valores de potencial Z de estos nanosistemas con el parámetro  $\alpha$  (ver ecuación 1).

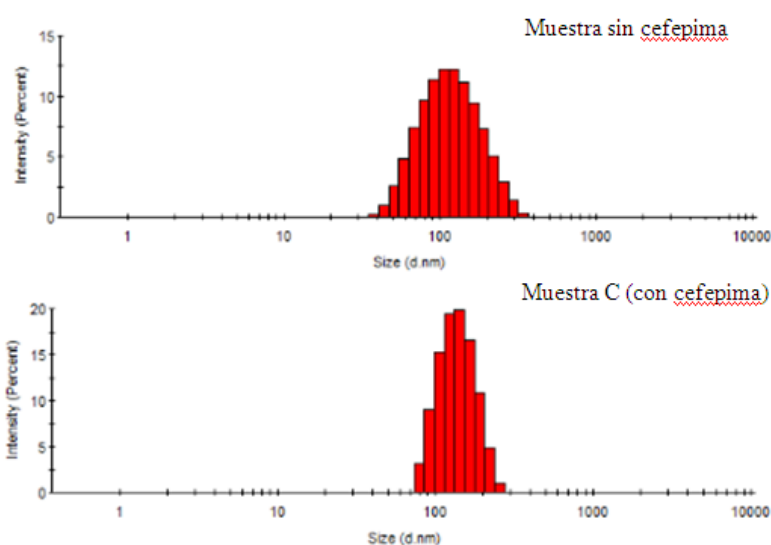
Respecto a los liposomas catiónicos contruidos con DOPE y el tensioactivo catiónico 12NBr, tampoco se observa ninguna relación del valor de potencial Z con la

fracción molar  $\alpha$ . Sólo se observa un ligero aumento del valor de potencial al aumentar la relación de masa 12NBr/DOPE.

Si comparamos los resultados de vesículas catiónicas construidos a partir de los distintos lípidos, a igualdad de fracción molar  $\alpha$ , los liposomas con PC presentan un potencial Z mayor que los que se preparan con DOPE.

### **Medidas de dispersión de luz dinámica (DLS)**

La técnica de dispersión de luz dinámica evalúa el radio hidrodinámico de las partículas que hay en disolución, y su comportamiento en función de la temperatura. El radio hidrodinámico o radio de Stokes-Einstein, está definido como el radio de una esfera rígida hipotética cuya velocidad de difusión es la misma que la media de las velocidades de difusión de sus diferentes orientaciones espaciales. Este parámetro se calcula a partir de datos de coeficientes de difusión obtenidos mediante medidas de DLS. En la práctica las moléculas (en nuestro caso liposomas) no son rígidas ni esféricas, sino que se comportan como especies dinámicas que pueden interactuar con el buffer en el que están disueltas. Por este motivo, el radio calculado es *indicativo* del tamaño aparente teniendo en cuenta los procesos de atracción con las moléculas del buffer. Los datos obtenidos quedan recogidos en la Tabla 3.



**Figura 12:** Distribución intensidad-tamaño de dos muestras de liposomas

La Figura 12 muestra la distribución intensidad-tamaño de algunos de los liposomas preparados en presencia y ausencia de cefepima.

Como se puede observar en la Tabla 3, se han construido liposomas con tamaños similares, del orden de 100nm, con el fin de poderlos usar como nanotransportadores de un antibiótico que se administraría por vía intravenosa. Las proporciones de lípidos utilizadas, así como el método de extrusión usado parecen funcionar en la línea requerida.

**Tabla 3:** Resultados del estudio de caracterización de los diferentes liposomas preparados.

	MUESTRA	Relación masas	$\alpha$	Potencial Z / mV	Tamaño/ nm	Pdi
Liposomas PC:CH	<b>A</b>	5,3:1	–	-24.2±0.8	117.4±0.9	0.1
	<b>B</b>	1,2:1	–	-28.7±0.7	121.4±0.8	0.2
Liposomas PC:CH: 12NBr	<b>C</b>	21:1:1,5	0,10	+45.2±1.4	141.9±1.4	0.2
	<b>D</b>	32:1:3,2	0,13	+41.6±1.9	121.1±1.3	0.2
	<b>E</b>	7,6:1:1,3	0,23	+54.0±3.6	104.3±1.2	0.1
	<b>F</b>	16:1:3,8	0,28	+48.1±1.9	111.0±3.9	0.2
Liposomas DOPE:12NBr	<b>G</b>	1:1,6	0,20	+32.8±1.2	106.9±0.5	0.2
	<b>H</b>	1:2,8	0,30	+28.1±0.4	113.7±1.4	0.3
	<b>I</b>	1:4,4	0,40	+20.5±0.8	100.0±0.5	0.2
	<b>J</b>	1:15	0,70	+21.7±4.4	140.0±8	0.3
	<b>K</b>	1:25	0,80	+37.2±2.1	107.0±2.1	0.2



### ***Índice de polidispersidad (PI)***

El PI permite determinar el grado de homogeneidad que presentan los liposomas en cuanto al tamaño que poseen. Un pequeño valor de PI ( $<0,3$ ) indica una población homogénea de vesículas, mientras que un PI más grande ( $>0,3-0.4$ ) indica heterogeneidad de la misma (Villasmil-Sánchez y col, 2010). Los datos obtenidos en nuestros experimentos quedan recogidos en la Tabla 3. Como se observa, todos los liposomas construidos presentan homogeneidad respecto a su tamaño.

### ***Eficacia de encapsulación***

Como se ha comentado anteriormente, según la bibliografía, la eficacia de encapsulación depende del método de preparación de liposomas utilizado, así como del tamaño del microsistema y de los componentes que lo forman. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 4. Según se aprecia, los liposomas formados con PC encapsulan más cantidad de fármaco que los liposomas construidos con DOPE, ya sean aniónicos o catiónicos.

Si observamos los porcentajes de encapsulación de cefepima obtenidos con los liposomas construidos a partir de PC, CH y 12NB (muestras C-F), también se puede deducir que el mayor porcentaje de encapsulación ocurre cuando la relación en masa PC:CH:12NB es 32:1:3,2 (muestra D), es decir, cuando más cantidad de lípido total hay respecto a la cantidad de colesterol.

Además, si comparamos las Tablas 3 y 4 se observa como el porcentaje de encapsulación de cefepima no presenta ninguna relación con el tamaño de la vesícula, pero si muestra una relación con el valor del potencial Z. Así, se ve cómo, para los liposomas catiónicos, el porcentaje de encapsulación aumenta conforme aumenta el valor del potencial Z.

En cualquier caso, los liposomas construidos en este trabajo encapsulan un porcentaje de cefepima mucho mayor que el porcentaje obtenido por otros autores con el uso de distintos liposomas (Sapateiro y col, 2012).

**Tabla 4:** Porcentaje de encapsulación de cefepima en los diferentes liposomas preparados.

	MUESTRA	Relación masas	$\alpha$	% encapsulación
Liposomas PC:CH	<b>A</b>	5,3:1	–	17±1
	<b>B</b>	1,2:1	–	19±2
Liposomas PC:CH: 12NBr	<b>C</b>	21:1:1,5	0,10	21±1
	<b>D</b>	32:1:3,2	0,13	43±2
	<b>E</b>	7,6:1:1,3	0,23	3.1±0.8
	<b>F</b>	16:1:3,8	0,28	13±1
Liposomas DOPE:12NBr	<b>G</b>	1:1,6	0,20	6.2±0.2
	<b>H</b>	1:2,8	0,30	6.1±0.1
	<b>I</b>	1:4,4	0,40	1.6±0.2
	<b>J</b>	1:15	0,70	8.3±0.4
	<b>K</b>	1:25	0,80	7.1±0.3

## 5. Conclusiones

De todos los resultados obtenidos en este trabajo, caben destacarse dos conclusiones que nos parecen esenciales para la continuación del mismo, ya que mejoran mucho los resultados mostrados hasta la fecha por otros autores.

Las conclusiones obtenidas son:

-Los liposomas construidos con fosfatidilcolina, aniónicos o catiónicos, encapsulan mucha más cantidad del antibiótico beta-lactámico cefepima que los nanosistemas construidos con DOPE.

-En el caso de liposomas preparados con PC, CH y 12NBr, el porcentaje de encapsulación del antibiótico cefepima aumenta, en general, con la cantidad de lípido total y, en particular, con la cantidad de fosfatidilcolina. En consecuencia,

la fosfatidilcolina resulta ser un fosfolípido óptimo para la encapsulación y transporte de cefepima.

- En el caso de liposomas catiónicos, el porcentaje de encapsulación aumenta conforme aumenta el valor del potencial Z.



## 6. Referencias bibliográficas

1. Akbarzadeh A, Rezaei-Sadabady R, Davaran S, et al (2013) Liposome: classification, preparation, and applications. *Nanoscale Res Lett* 8:102. doi: 10.1186/1556-276X-8-102
2. Allen TM, Chonn A (1987) Large unilamellar liposomes with low uptake into the reticuloendothelial system. *FEBS Lett* 223:42–46. doi: 10.1016/0014-5793(87)80506-9
3. Bangham, A.D, Horne R. (1964) Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *JMolBiol* 8:660–668.
4. Barrán Berdón AL (2015) Derivados lipídicos biocompatibles : una mejora en la vectorización del DNA.
5. Burgess S V., Mabasa VH, Chow I, Ensom MHH (2015) Evaluating Outcomes of Alternative Dosing Strategies for Cefepime: A Qualitative Systematic Review. *Ann Pharmacother* 49:311–322. doi: 10.1177/1060028014564179
6. Cárdenas E, Escobar M, Honorato J (2001) Farmacología de cefepima. *Am J Med* 13:57–62.
7. Clares Naveros B (2003) Sistemas de transporte y liberación de fármacos de aplicación tópica: liposomas multilaminares portadores de acetónido de triamcinolona.

8. Evagelou V, Tsantili-Kakoulidou A, Koupparis M (2003) Determination of the dissociation constants of the cephalosporins cefepime and ceftazidime using UV spectrometry and pH potentiometry. *J Pharm Biomed Anal* 31:1119–1128. doi: 10.1016/S0731-7085(02)00653-2
9. Fubara JO, Notari RE (1998) Influence of pH, temperature, and buffers on the kinetics of ceftazidime degradation in aqueous solutions. *J Pharm Sci* 87:1572–1576. doi: 10.1002/jps.2600840504
10. Gabizon A, Papahadjopoulos D (1988) Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc Natl Acad Sci* 85:6949–6953. doi: 10.1073/pnas.85.18.6949
11. Gabizon A, Price DC, Huberty J, et al (1990) Effect of liposome composition and other factors on the targeting of liposomes to experimental tumors: Biodistribution and imaging studies. *Cancer Res* 50:6371–6378.
12. Gregoriadis G and Florence AT (1993) Liposomes in drug delivery. Clinical, diagnostic and ophthalmic potential. *Drugs*. 45:15-28.
13. Han ron, liu Bao-sheng LG and ZQ (2016) Investigation on the interaction between lysozyme with ceftazidime hydrochloride by synchronous fluorescence and fluorescence quenching spectroscopy. *An Int J Rapid Commun* 43:3, 225–230.

14. Kant R, Bodla R, Bhutani R, et al (2015) Journal of Chemical and Pharmaceutical Research , 2015 , 7 ( 6 ): 648-656 Research Article Spectrophotometric absorbance correction method for the estimation of Tazobactam and Cefepime in combined tablet dosage forms. 7:648–656.
15. Ostos FJ (2014) Fenómenos de compactación de un polinucleótido. Estudio de la interacción de ADN con el tensioactivo catiónico  $(C_{18}H_{9}O)N(C_{2}H_{5})_{3}Br$ . Trabajo Fin de Grado. Universidad de Sevilla.
16. Rabouan-Guyon SM, Guet AF, Courtois PY, Barthes DMC (1997) Stability study of cefepime in different infusion solutions. Int J Pharm 154:185–190. doi: 10.1016/S0375173(97)00137-3
17. Ruano Aldea M (2013) Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. 1-359.
18. Sabín Fernández JD (2007) Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas. 1-299.
19. Samad A, Sultana Y, Aqil M (2007) Liposomal drug delivery systems: an update review. Curr Drug Deliv 4:297–305. doi: 10.2174/156720107782151269
20. Sapateiro I, Barbosa E, Almeida L, et al (2012) Preparaton. Characterization and in vitro antimicrobial activity liposomal ceftazidime and cefepime against Pseudomonas aeruginosa strains. Brazilian J Microbiol 43:984–992.

21. Sharma A, Sharma US (1997) International Journal of Pharmaceutics. Int J Pharm 154:123–140. doi: 10.1016/j.ijpharm.2008.07.005
  
22. Sprauten PF, Beringer PM, Louie SG, et al (2003) Stability and antibacterial activity of cefepime during continuous infusion. Antimicrob Agents Chemother 47:1991–1994. doi: 10.1128/AAC.47.6.1991-1994.2003
  
23. Straubinger R et al (1983) Endocytosis of liposomes and intracellular Fate of encapsulated molecules: encounter with a low pH compartment after internalization in coated vesicles. 1069–1079.
  
24. Sujith M, Abraham S, Divakar MC (2010) Visible Spectrophotometric method for the estimation of Cefepime. Hygeia J Drugs Med 2:32–37.
  
25. Villasmil-Sánchez S, Dhimeur W, Ospino SCS, et al (2010) Positively and negatively charged liposomes as carriers for transdermal delivery of sumatriptan: in vitro characterization. Drug Dev Ind Pharm 36:666–675. doi: 10.3109/03639040903419640



