



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y
APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS

Caracterización de formulaciones liposomales de
polienos mediante detección sintonizable de pulsos
resistivos

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL EN FÍSICA

PRESENTA:

JOSELINE ARELI BAHENA HERRERA

TUTOR:

DR. ARTURO GALVÁN HERNÁNDEZ



Instituto de
Investigación en
Ciencias
Básicas y
Aplicadas

Cuernavaca, Morelos, 2023

Jurado Asignado

Presidente: Dr. Joaquín Escalona

Secretario: Dr. Aldo Figueroa Lara

Vocal: Dr. Arturo Galván Hernández

1er. suplente: Dra. Lucero Díaz Peralta

2do. suplente: Dr. Rodrigo Said Razo Hernández

Lugar donde se realizó la tesis: Centro de Investigación en Ciencias - Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA - UAEM) - Instituto de Ciencias Físicas de la UNAM (ICF).

DEDICATORIA

A mi madre, Josefina

Que siempre me ha dado su apoyo y me ha motivado de todas las maneras posibles para seguir adelante con mis proyectos, gracias a su guía, valores y amor me he convertido en la persona que soy en la actualidad.

A mi hermano, Emmanuel

Quien se ha vuelto uno de los pilares en mi vida, por el amigo en que se ha convertido y el cariño que me ha dado, me enseñaste que unidos la vida es más bonita.

A mi padre, Adelfo

Quien ha estado presente apoyándome tanto como le ha sido posible, las cosas nunca fueron sencillas conmigo, pero aun en la distancia seguías presente.

A Kevin

Por siempre brindarme el apoyo, amor y confianza que necesitaba, por creer en mí y en cada paso de este proyecto, aun cuando yo estaba perdida, por enseñarme que está bien, no estar bien.

“La flor que florece en la adversidad, es la más rara y hermosa de todas.”



Agradecimientos

Al Dr. Arturo Galván Hernández

Asesor de tesis, gracias por su guía, apoyo, enseñanza, por cada reunión y por la amistad formada en todo este tiempo, pero sobre todo por su paciencia a lo largo de este proyecto.

A la Dra. Lucero Díaz Peralta

Gracias por la disposición y tiempo para despejar todas las dudas y por compartirme la emoción con la que realiza sus trabajos.

A los miembros del comité sinodal

Dr. Aldo Figueroa Lara y Dr. Joaquín Escalona Segura, por su disposición a conocer nuevos temas, por su tiempo y las correcciones a este trabajo.

A mis compañeros y amigos, Daniela, Batallar y Jorge

Por su apoyo y amistad a lo largo de estos años, una carrera no se realiza solo, siempre necesitamos amigos y compañeros para apoyarnos. Gracias por ser esas personas para mí.

A Tammy y mis compañeros de laboratorio

A Tammy por su compañerismo y apoyo durante este trabajo, por cada plática sobre libros y tonterías, a mis compañeros de laboratorio por tener la paciencia para explicarme conceptos que desconocía.

Al Instituto de Ciencias Físicas de la UNAM por permitirme usar sus instalaciones y equipo para la realización de este proyecto.

Investigación realizada gracias al PAPIIT de la UNAM IG101923 y al proyecto Fronteras 74484 CONAHCyT. Agradezco a la DGAPA-UNAM y al CONACHyT la beca recibida

Resumen

En esta tesis de licenciatura se presentan resultados experimentales sobre la caracterización de diámetro, potencial zeta y tasa de partículas de la formulación L_1 (DPPC:POPC:COL) y L_1A21 en la cual se ha incorporado el fármaco “Éster metílico de L-histidina de anfotericina B” (A21). El trabajo se divide en dos fases principales. Durante la primera parte del experimento se analiza la formulación L_1 para tener un referente sobre el comportamiento y características de la formulación, en la segunda parte se incorpora el fármaco A21 analizando los cambios que produce en la formulación L_1 . En la ejecución de este experimento fue utilizado el equipo EXOID IZON, para la interpretación de datos recopilados es necesario utilizar el software Exoid Control Suite (ECS) a la par del programa Izon Data Suite (IDS) el cual nos ayudara a analizar los datos obtenidos por el ECS así como con la creación de gráficas y reportes. Se realiza una comparación (prueba T-Student) entre las formulaciones L_1 y L_1A21 para analizar si el cambio presentado es relevante (que se encuentre fuera de los parámetros de cambio en la prueba) tanto en diámetro como en potencial zeta. Finalmente, con la información obtenida se plantea una hipótesis y trabajo a futuro como la creación de nuevos protocolos o la implementación de nuevas técnicas a una misma formulación para obtener caracterizaciones más completas.

Lista de abreviaturas

- A21: Éster metílico de L-histidina de anfotericina B
- AmB: Anfotericina B
- CHCl_3 : Cloroformo
- COL: Colesterol
- DPPC: 2,3-dipalmitoil-sn-glicero-1-fosfocolina
- L_1 : Formulación DPPC: POPC: COL
- L_1A21 : Formulación DPPC: POPC: COL más Diclorato de éster metílico de L-histidina de anfotericina B
- mM: Cantidad de una sustancia igual a una milésima de un mol (10^{-3} molar)
- mV: mili voltio (10^{-3} V)
- nm: nanómetro (10^{-9} m)
- PBS: Solución salina tamponada con fosfato
- POPC: 3-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-1-fosfocolina
- PZ: Potencial Zeta
- TRPS: Detección de pulsos resistivos sintonizable.

Índice general

1. Introducción	1
1.1. Enfermedades micóticas	1
1.2. Polienos	1
1.3. Anfotericina B	2
1.3.1. Mecanismo de acción de la AmB	3
1.3.2. Éster metílico de L-histidina de anfotericina B (A21)	4
1.3.3. Mecanismo de entrega	5
1.4. Liposomas	5
1.4.1. Lípidos	5
1.4.2. Fosfolípidos	6
1.4.3. Características generales de los liposomas	7
1.4.4. Liposomas como mecanismos de entrega	8
1.4.5. Formulaciones liposomales y método de elaboración	9
1.5. Potencial zeta (ζ)	10
1.5.1. Coloides	11
1.5.2. Doble capa	12
1.6. Detección de pulsos resistivos sintonizable (tunable resistive pulse sensing TRPS)	13
1.6.1. Principio de Coulter	14
1.6.2. Pulsos resistivos	15
1.6.3. Geometría del nanoporo	15
1.7. Antecedentes	18
1.8. Hipótesis	19
1.9. Objetivos	19
1.9.1. Objetivos generales	19
1.9.2. Objetivos particulares	19
2. Metodología	20
2.1. Materiales	20
2.1.1. Preparación de la formulación liposomal	21
2.1.2. Incorporación fármaco A21	22
2.2. Método	23
2.2.1. Caracterización fisicoquímica	23
2.2.2. Técnica TRPS	23

3. Resultados	26
3.1. Formulación L_1	26
3.1.1. Diámetro L_1	27
3.1.2. Tasa de partículas	27
3.1.3. Potencial zeta L_1	29
3.2. Formulación L_1A21	30
3.2.1. Diámetro L_1A21	32
3.2.2. Tasa de partículas	33
3.2.3. Potencial zeta L_1A21	34
3.3. Comparación de L_1 y L_1A21	34
3.3.1. Comparación de diámetro	35
3.4. Prueba T-Student	36
3.4.1. Prueba T-Student para diámetro	37
3.4.2. Comparación potencial zeta	38
3.4.3. Prueba T-Student para potencial zeta	39
3.4.4. Hipótesis para el cambio de PZ	40
4. Conclusiones y trabajo a futuro	42
A. Lavado de jeringas micrométricas	43
B. Configuración del nanoporo	44
C. Dificultades	48
C.0.1. Observación	48

Índice de figuras

1.1. Estructura química de Anfotericina B con las tres principales regiones marcadas: cadena poliénica de siete enlaces dobles heptaenos (encerrado en color rojo), grupos de hidroxilo (encerrado en color azul), residuo de micosamina (encerrado en color amarillo). Nota: Imagen creada por la Dra. Lucero Díaz Peralta en ChemDraw, utilizada con permiso.	3
1.2. Modelo clásico de poro formado por AmB. Nota: Adaptado de Vertiz, E. Q. Q. (2023b, agosto 28). Fármacos antifúngicos. Studenta.	3
1.3. Estructura química del A21 con las tres principales regiones marcadas: cadena poliénica de siete enlaces dobles heptaenos (encerrado en color rojo), grupos de hidroxilo (encerrado en color azul), residuo de micosamina (encerrado en color amarillo), Grupo éster metílico de L-histidina (encerrado en azul claro). Nota: Imagen creada por la Dra. Lucero Díaz Peralta en ChemDraw, utilizada con permiso.	4
1.4. Principales lípidos presentes en la membrana.	6
1.5. Esquematación de un fosfolípido.	7
1.6. Esquema de estructuras liposomales; micela (izquierda), liposoma unilame- lar (centro), bicapa lipídica (derecha). Nota: Adaptado de Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept.	8
1.7. Liposomas formulación DPPC:POPC:COL.	11
1.8. Interacción de partículas coloidales. Nota: figura de elaboración propia. . .	12
1.9. Doble capa difusa. Nota: figura de elaboración propia.	12
1.10. Representación de la locación del potencial Z. Nota: figura de elaboración propia.	13
1.11. Esquema de la estructura de las celdas inferior y superior. Nota: figura de elaboración propia.	14
1.12. Esquematación de la interpretación de los bloqueos en la línea basal. Nota: figura modificada a partir de la imagen presente en el manual IZON EXOID.	15
1.13. Geometría del nanoporo al sufrir un estiramiento. Nota: imagen adaptada de "Tunable Resistive Pulse Sensing: Better Size and Charge Measurements for Submicrometer Colloids. Analytical Chemistry"	17
2.1. Estructuras de lípidos utilizados para formulación L ₁	20
2.2. Solución madre de A21.	21
2.3. Esquema del método de evaporación.	21
2.4. Secuencia de resultados en el método de evaporación integrando fármaco A21.	22

2.5. Equipo Izon Exoid, ver cuadro 2.2.	24
3.1. Tamaños de L_1 por fecha.	27
3.2. Gráficas de la tasa de partículas para la formulación L_1 en distintas mediciones (fechas).	28
3.3. PZ de diferentes preparaciones de L_1	29
3.4. Datos obtenidos para la formulación L_1A21	30
3.5. Diámetros promedio obtenidos con distintos NP.	31
3.6. Comparación de PZ obtenidos con distintos NP en distintas mediciones. . .	32
3.7. Tamaños de diferentes preparaciones de L_1A21 con desviación estándar. . .	32
3.8. Gráficas de la tasa de partículas para la formulación L_1A21	33
3.9. PZ de diferentes preparaciones de L_1A21 con desviación estándar.	34
3.10. Comparación de diámetros entre las formulaciones L_1 y L_1A21	35
3.11. Esquema prueba T campana.	36
3.12. Prueba T para diámetro.	37
3.13. Gráfica de campana con valor estadístico $T_{diámetro}$ marcado en color verde. . .	38
3.14. Comparación de potencial zeta entre las formulaciones L_1 y L_1A21	38
3.15. Prueba T para PZ.	39
3.16. Gráfica de campana con valor estadístico $T_{potencial}$ marcado en color verde. . .	40
3.17. Gráfica de campana con valor estadístico $T_{potencial}$ marcado en color verde. . .	41
B.1. Ilustración de la celda superior. Nota: Adaptada del manual de usuario del equipo Izon Exoid.	46

Índice de tablas

1.1. Principales antifúngicos y mecanismos de acción.	2
1.2. Lípidos con cargas.	7
1.3. Estiramiento óptimo en el nanoporo.	17
2.1. Cantidades agregadas de lípidos y fármaco.	22
2.2. Partes para montaje del equipo EXOID.	23
3.1. Diámetro y PZ promedios formulación L ₁	26
3.2. Datos obtenidos para la formulación L ₁	27
3.3. Diámetro y PZ promedios de la formulación L ₁ A21.	31
3.4. Datos usados para prueba T para diámetro.	37
3.5. Datos usados para prueba T en PZ.	39
B.1. Concentración sugerida de partículas de calibración para cada tipo de nanoporo.	46

Capítulo 1

Introducción

Desde su descubrimiento en 1961 por el hematólogo británico Dr. Alec. D. Bangham los liposomas han sido un tema de gran interés y estudio. Se han empleado como modelos de membranas celulares y como vehículos para la administración de fármacos altamente exitosos [1]. Se han logrado varias aplicaciones biomédicas y avances notables en su caracterización. Consisten en una o múltiples bicapas lipídicas concéntricas que debido a sus características anfipáticas permiten encapsular un volumen acuoso, podemos clasificarlos como vesículas unilamelares pequeñas “*small unilamellar vesicle*” (SUV), grandes “*large unilamellar vesicle*” (LUV) y vesículas de muy gran tamaño “*giant unilamellar vesicle*” (GUV). Dadas las características y comportamiento los liposomas prometen ser el portador de fármaco ideal [2, 1].

1.1. Enfermedades micóticas

Las infecciones micóticas sistémicas son ocasionadas por hongos y se pueden clasificar de acuerdo con la capacidad infectiva en dos categorías:

1. Micosis sistémicas por patógenos primarios.
2. Micosis sistémicas oportunistas.

Las micosis sistémicas oportunistas afectan principalmente a pacientes con el sistema inmunológico comprometido debido a enfermedades como SIDA o que presentan neuropatías [3, 4]. Las micosis son tratadas con antifúngicos de amplio espectro, los cuales en su mayoría causan graves efectos secundarios debido a la severa toxicidad que presentan, en algunas ocasiones las micosis generan resistencia a estos antifúngicos. Se presenta una tabla (1.1) con el mecanismo de acción de los principales antifúngicos [5]. En esta investigación nos centramos en polienos como principal tratamiento.

1.2. Polienos

Los antimicóticos cuentan con una amplia variedad de compuestos con distintos mecanismos de acción. Los polienos son moléculas macrómolidas con cadenas insaturadas que

comparten ciertas características físicas entre ellos y presentan diferencias en sus espectros de absorción, aun así presentan un amplio espectro de efectividad en el tratamiento de las enfermedades fúngicas. En este grupo podemos encontrar Nistatina, Natamicina y Anfotericina B.

Los polienos presentan las características de tener poca biodisponibilidad digestiva así como una baja solubilidad en agua, estas características han limitado su uso, uno de los principales y más utilizados es la Anfotericina B debido a su amplio espectro de efectividad y pocas infecciones presentan resistencia [5].

<i>Categoría</i>	Principales antifúngicos	Mecanismo de acción
<i>Polienos</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Anfotericina B • Nistatina 	Alteraciones en la membrana celular que interfieren con las funciones vitales de la célula como reducción de estabilidad estructural en la membrana y aumento de permeabilidad.
<i>Pirimidinas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Fluorocitosina 	Inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos ¹ ^{*1} Biomoléculas grandes que cumplen funciones esenciales en todas las células como almacenamiento y expresión de información genómica.
<i>Azoles</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Miconazol • Ketoconazol • Fluconazol Entre otros	Inhibición de la síntesis de ergosterol
<i>Equinocandinas</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Caspofungina • Anidulafungina • Micafungina 	Inhibición de la síntesis de glucano ² ^{*2} Es un tipo de polisacárido compuesto por una secuencia de moléculas de glucosa (azúcar) unidas entre sí, ejercen funciones de almacenamiento energético o forman estructuras en la célula.

Tabla 1.1: Principales antifúngicos y mecanismos de acción.

1.3. Anfotericina B

Es usada para el tratamiento de micosis sistémicas oportunistas con dosis limitadas debido a las reacciones adversas que generan.

La anfotericina B (AmB) es el antifúngico poliénico de elección para tratar micosis sistémicas debido a que es uno de los antifúngicos de mayor espectro disponibles, es producido por cultivos de bacterias de *Streptomyces nodosus* [6]. Su perfil de efectividad es muy amplio y pocas infecciones presentan resistencia [5]. Presenta baja solubilidad en agua, baja biodisponibilidad¹ digestiva y es un producto sensible a la luz [6].

En su estructura (figura 1.1) cuenta con una cadena poliénica de siete enlaces dobles heptaenos que le confiere un carácter hidrofóbico (encerrado en color rojo) y los grupos

¹Cantidad de fármaco que llega de forma activa a la circulación sistémica y la velocidad a la que esta accede al lugar de acción.

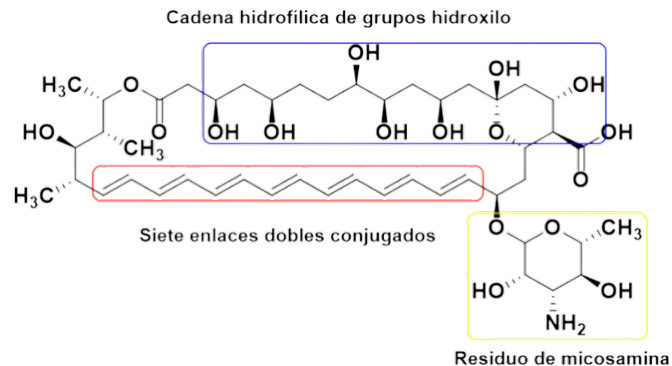


Figura 1.1: Estructura química de Anfotericina B con las tres principales regiones marcadas: cadena poliénica de siete enlaces dobles heptaenos (encerrado en color rojo), grupos de hidroxilo (encerrado en color azul), residuo de micosamina (encerrado en color amarillo). Nota: Imagen creada por la Dra. Lucero Díaz Peralta en ChemDraw, utilizada con permiso.

de hidroxilo que le confiere un carácter hidrofílico (encerrado en color azul) dándole a los grupos hidroxilo de la molécula características anfipáticas y presenta un residuo de micosamina en el extremo de la molécula.

1.3.1. Mecanismo de acción de la AmB

La hipótesis más aceptada del mecanismo de acción de la Anfotericina B propone la unión a los esteroides con los polienos que forman poros hidrofílicos (figura 1.2) también conocido como canal transmembrana, mostrando mayor afinidad por el ergosterol que se encuentra presente en la membrana fúngica generando poros, estos poros permiten el paso de iones y moléculas pequeñas lo cual interfiere con funciones vitales para las células [5, 7].

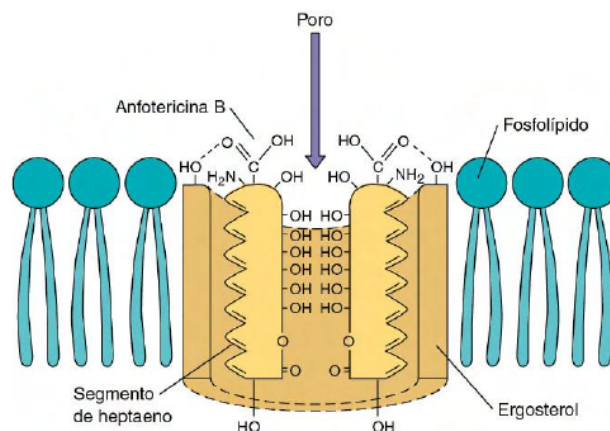


Figura 1.2: Modelo clásico de poro formado por AmB. Nota: Adaptado de Vertiz, E. Q. Q. (2023b, agosto 28). Fármacos antifúngicos. Studenta.

La AmB cuenta con la capacidad de unirse al colesterol (presente en mamíferos) con una menor afinidad comparada con el ergosterol, se cree que esta es la razón de las reacciones adversas [8].

El uso clínico de AmB se ve reducido dado que su toxicidad colateral limita la cantidad de fármaco que puede ser suministrado; provoca reacciones de tipo inmediato como: fiebre, escalofríos, vómitos y cefaleas y también reacciones a largo plazo como una alta nefrotoxicidad [7]. La problemática que gira en torno a la AmB se ha intentado resolver de dos formas principales:

1. Sintetizando derivado de AmB con la misma eficacia.
2. Sistemas de entrega novedosos (e.g liposomas)
3. Buscando nuevos fármacos.

En cuanto a nuevos sistemas de entrega, las formulaciones liposomales de polienos lograron reducir significativamente la toxicidad de fármacos y aumentar la cantidad de dosis tolerada [9].

Sin embargo, hasta ahora no se ha logrado caracterizar y comercializar ningún derivado de AmB aun teniendo candidatos prometedores como el A21 [10].

1.3.2. Éster metílico de L-histidina de anfotericina B (A21)

El Éster metílico de L-histidina de anfotericina B, también conocido como A21 o AmB21 es un antibiótico polieno macrolido derivado de la estructura de la AmB.

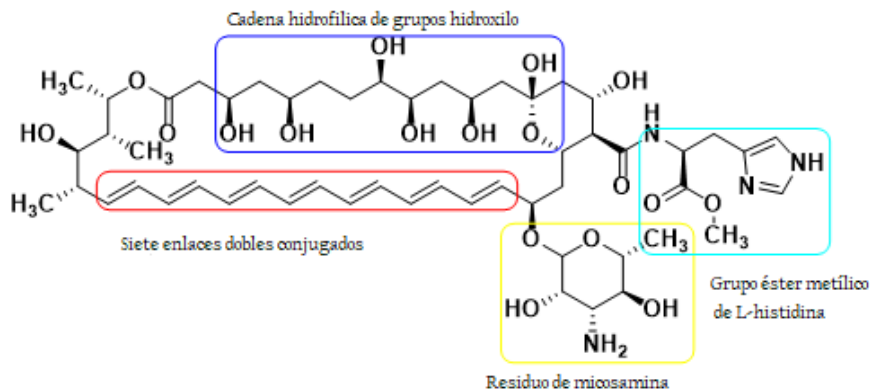


Figura 1.3: Estructura química del A21 con las tres principales regiones marcadas: cadena poliénica de siete enlaces dobles heptaenos (encerrado en color rojo), grupos de hidroxilo (encerrado en color azul), residuo de micosamina (encerrado en color amarillo), Grupo éster metílico de L-histidina (encerrado en azul claro). Nota: Imagen creada por la Dra. Lucero Díaz Peralta en ChemDraw, utilizada con permiso.

Cuenta con una estructura similar (figura 1.3) siendo la principal diferencia en su estructura la presencia del grupo éster metílico de L-histidina que reemplaza al grupo carboxilo

de la AmB, al ser un derivado se plantea que cuenta con el mismo mecanismo de acción, formando poros o canales transmembrales que permiten su unión a los esteroides. [11, 12]

Este derivado muestra diversas características que mejoran su seguridad, así como una mayor solubilidad en soluciones acuosas [10].

1.3.3. Mecanismo de entrega

Aun teniendo un derivado con mejores características es necesario tener un buen mecanismo de entrega que reúna las propiedades adecuadas como: Los nanoportadores son una prometedora forma de entrega de fármacos, en donde se busca reunir las mejores características y propiedades con la finalidad de una mejora significativa en el transporte, estabilidad, tiempo de vida útil, entrega del fármaco y reducción de efectos secundarios. Las formulaciones lipídicas y liposomales de polienos ofrecen una gran alternativa a esta problemática reduciendo significativamente la toxicidad y daños colaterales y permitiéndonos aumentar las dosis suministradas [13], debido a las ventajas que nos ofrecen estas formulaciones nos vemos en la necesidad de buscar formulaciones más estables que podemos caracterizar y elaborar con lípidos que tengan las propiedades adecuadas para el fármaco que será utilizado y para el mecanismo de aplicación que se utilizará.

1.4. Liposomas

Uno de los métodos preferidos para transporte y liberación de fármacos son los nanoportadores las cuales pueden ser pequeñas vesículas formadas a base de polímeros naturales o sintéticos como los liposomas, los cuales podemos elaborar a base de colesterol y una mezcla de fosfolípidos. Esto nos otorga una gran versatilidad debido a que podemos brindarle diversas propiedades a la composición que tenemos para diseñarlos y caracterizarlos de acuerdo con las necesidades que se busca satisfacer.

Están formados por fosfolípidos, los cuales forman espontáneamente pequeñas vesículas al hidratarse con soluciones acuosas, esto debido al carácter anfipático de los fosfolípidos. Podemos definir a los liposomas como una estructura esférica coloidal cuya membrana liposomal generalmente está conformada por una o más bicapas encerrando una sustancia acuosa en su núcleo.

Los liposomas son usados como portadores de numerosas formulaciones y han tenido aplicaciones en las industrias cosmética y farmacéutica, Son considerados poderosos sistemas de entrega debido a la versatilidad que tienen para formar estructuras capaces de encapsular volúmenes acuosos en su interior, esto debido a su carácter anfipático, la biocompatibilidad y biodegradabilidad que presentan, así como su no inmunogenicidad² [14, 15].

1.4.1. Lípidos

Son un grupo de moléculas heterogéneas constituyentes de los seres vivos (grasas, aceites, esteroides, ceras, etc.) que funcionan como componentes estructurales esenciales en las membranas y sus propiedades biofísicas determinan la interacción que tiene con otros

²Capacidad de una determinada sustancia para generar respuestas inmunes.

lípidos y proteínas de su entorno. Presentan la característica de ser insolubles en agua. [16, 17] Existe una amplia composición de lípidos las cuales afectan la eficacia de las formulaciones liposomales [18].

Tenemos tres tipos generales de lípidos que pueden conformar una membrana, como se muestra en la figura 1.4



Figura 1.4: Principales lípidos presentes en la membrana.

1.4.2. Fosfolípidos

Los fosfolípidos son lípidos anfipáticos que se encuentran en cualquier membrana celular, tienen la característica de contar con un grupo polar y un grupo apolar. Son moléculas anfipáticas³, debido a esta característica son ideales para la formación de bicapas, estas se forman de manera espontánea al entrar en contacto con un medio acuoso en donde se agrupan en dos regiones que conforman una bicapa alargada que en algún punto comenzara a curvarse formando una vesícula esférica.

En la tabla 1.2 presentamos algunos lípidos usados para la elaboración de formulaciones liposomales con carga eléctrica.

Las membranas celulares generalmente están hechas de fosfolípidos. Estos últimos presentan un carácter anfipático al tener una cabeza formada por un grupo de fosfatos hidrofílicos de carácter polar y dos colas formadas por ácidos grasos hidrofóbicos de carácter apolar como se muestra en la figura 1.5.

³Molécula o compuesto que tiene propiedades tanto hidrófilas como hidrófobas.

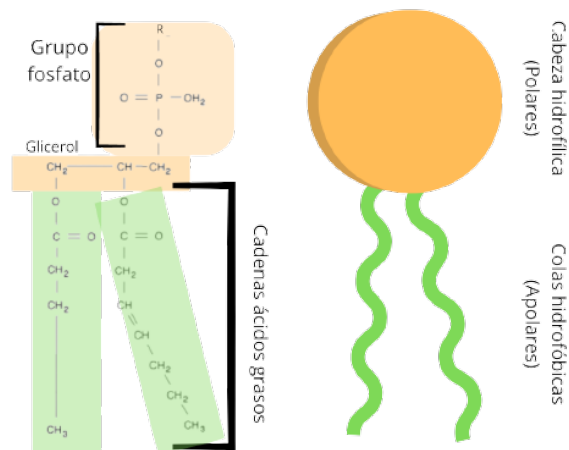


Figura 1.5: Esquematación de un fosfolípido.

Abreviatura	Lípido	Carga
DPPC	1,2-dipalmitoil-sn-glicerol-e-fosfocolina	Neutra
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-glicerol-3-fosfocolina	Neutra
HSPC	Fosfatidilcolina de soja hidrogenada	Neutra
Col	Colesterol	
DSPG	1,2-diestearoil-sn-glicerol-3-fosfoetanolamina	Negativa

Tabla 1.2: Lípidos con cargas.

1.4.3. Características generales de los liposomas

Fueron descritos por primera vez en 1964 por Alec Bangham, quien descubrió que los lípidos secos se organizan espontáneamente de manera desorganizada si se ponen en contacto con una cantidad suficiente de agua [19]. Los liposomas son pequeñas vesículas esféricas compuestas por una bicapa de lípidos que encierran un volumen acuoso en su interior.

Debido a la composición que presentan, cuentan con ciertas similitudes a las membranas celulares, lo que permite la compatibilidad y hace eficaz la entrega de compuestos en los liposomas.

Al estar en contacto con el agua, los lípidos se agrupan formando estructuras particulares en las que podemos encontrar micelas, liposomas unilamelares⁴ o multilamelares⁵ y bicapas como se muestra en la figura 1.6.

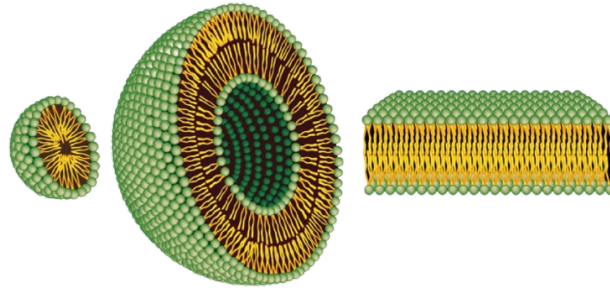


Figura 1.6: Esquema de estructuras liposomales; micela (izquierda), liposoma unilamelar (centro), bicapa lipídica (derecha). Nota: Adaptado de Bitounis D, Fanciullino R, Iliadis A, Ciccolini J. Optimizing druggability through liposomal formulations: new approaches to an old concept.

En la clasificación de liposomas encontramos diversos tamaños:

- Vesículas unilamelares pequeñas por sus siglas en ingles “SUV” menores a 100 nm de diámetro.
- Vesículas unimelares grandes por sus siglas en ingles “LUV” con un diámetro desde 100 nm hasta 1 μm .
- Vesículas unilaminares gigantes por sus siglas en ingles “GUV” con un diámetro mayor o igual a 1 μm de diámetro.

En los lípidos la existencia de una parte polar y otra apolar determina la formación de vesículas, esto debido al autoensamblaje espontáneo debido a la hidratación, el autoensamblaje de lípidos se genera por efecto hidrofóbico, es termodinámicamente espontáneo y estable.

Para utilizar liposomas como transportadores de sustancias a la célula, buscamos alcanzar estabilidad en el tamaño, para esto utilizaremos una técnica de caracterización de formulaciones “*Detección de pulsos resistivos sintonizable*” o TRPS por sus siglas en ingles la cual nos ayudara a determinar el tamaño de estas partículas, si se busca encapsular algún fármaco o compuesto es necesario agregar lípidos que sean adecuados para encapsular este compuesto.

1.4.4. Liposomas como mecanismos de entrega

Los liposomas como métodos de entrega han sido fuertemente estudiados debido a sus propiedades únicas y a la capacidad que tienen para modificarse y obtener las propiedades deseadas.

⁴Con una sola bicapa de lípidos.

⁵Presentan más de una bicapa de lípidos.

Se cree que el mecanismo de acción de las formulaciones liposomales para entrega de AmB es viajando a través de la pared fúngica hasta la membrana en donde es liberado el fármaco [7].

El tamaño óptimo de los liposomas para ser utilizados como vehículos de entrega y transporte de fármacos es de entre 50 a 100 nm de diámetro, entrando en la categoría de SUV y buscando un potencial ζ óptimo⁶ que le otorgue estabilidad a los liposomas. Buscamos este tamaño y potencial zeta (PZ) adecuado para evitar que sean detectados por el sistema inmune, si tenemos un tamaño más grande será detectado y no entregará el compuesto en la zona afectada, si son más pequeños no tendremos la suficiente absorción [9]. En la cuestión de PZ no tenemos definido un rango exacto, pero buscamos que estén en un rango de ± 30 mV, dependiendo la función que se necesite cubrir, con PZ positivos en los liposomas podemos transportar material genético, con PZ negativos podemos transportar fármacos [7, 9].

Las formulaciones lipídicas de polienos han logrado reducir significativamente los daños colaterales de algunos medicamentos y aumentar la cantidad de fármaco que puede ser suministrado [7, 9, 14], esto debido a su mecanismo de almacenamiento y liberación del fármaco.

Se consideran sistemas efectivos de transporte y administración de fármacos, usados principalmente para los siguientes propósitos:

1. Controlar el transporte y liberación de fármacos.
2. Modificar la biodistribución⁷.
3. Dirigir el suministro de fármacos.
4. Mejoras en la solubilidad y biodisponibilidad.

Para ser utilizados con materiales bioactivos es importante caracterizar el tamaño, concentración, tiempo de vida útil. Y la distribución de PZ. Es por esto que se busca estandarizar un protocolo para la elaboración de formulaciones liposomales.[15].

Las bicapas lipídicas pueden encontrarse en estado gel o fluido, esto dependiendo de la composición de los lípidos, la temperatura a la que se encuentren y la temperatura de transición de los lípidos. Al crear las formulaciones liposomales se le puede conferir carga positiva o negativa a los liposomas con base en los lípidos utilizados si son neutros o cargados y con las soluciones hidratantes, esto aumenta la repulsión electrostática entre las bicapas generando un aumento en el volumen acuoso encapsulado.

1.4.5. Formulaciones liposomales y método de elaboración

La selección de lípidos que se utilizan para cada formulación es determinada de acuerdo a las características y propiedades que buscamos optimizar en cada formulación con base en el fármaco que se utilizará. [20] Existen diversos métodos para la elaboración de

⁶Por potencial ζ óptimo entendemos un PZ de -30 mV lo cual es adecuado para transporte de fármacos y altamente estable (no presenta coagulaciones o floculaciones) .

⁷Métodos de seguimiento en el viaje de moléculas de interés biológico.

formulaciones liposomales o liposomas. El más utilizado es el método Bangham o método de hidratación [21, 13]. De manera general, los métodos de preparación de formulaciones liposomales buscan cumplir cuatro aspectos principales:

- Mezcla de lípidos adecuados en un disolvente orgánico
- Dispersión o hidratación en un medio acuoso
- Métodos para unificar o purificar el tamaño de las vesículas resultantes
- Análisis de la formulación resultante con algún software para conteo de partículas.

El método de hidratación consiste en solubilizar los lípidos en un solvente orgánico, se colocan a rota-evaporación en un matraz de fondo redondo sometidos a un cambio de presión para obtener una película delgada. Posteriormente, se hidratan con una solución para regular el pH y para crear una población de liposomas heterogénea, en ocasiones es necesario utilizar métodos adicionales para obtener vesículas más uniformes y pequeñas.[19, 21]

La principal desventaja que presenta el método Bangham es que el método de elaboración no está sistematizado para emplearse a gran escala y los costos de elaboración aún son altos y esto no asegura que la formulación tenga las características deseadas.

Las emulsiones liposomales pueden adquirir distintas coloraciones traslúcidas (figura 1.7b) o lechosas (figura 1.7a), esto dependiendo según el tamaño y aglomeración de las vesículas y la concentración de los lípidos presentes.

Si tenemos una coloración blanca quiere decir que tenemos partículas de diversos tamaños, por lo que la luz que dispersan estas partículas es de diversos colores, y la suma de todos estos colores nos genera el color blanco en la formulación. Al someterla a agitación ultrasónica y obtener partículas más uniformes obtenemos una formulación transparente con cierta coloración azul. Se cree que la forma de interacción de los liposomas con la membrana es mediante la fusión de la bicapa lipídica al entrar en contacto con la membrana celular o que las vesículas pueden ser introducidas a la célula por endocitosis⁸.

Las formulaciones liposomales presentan una gran alternativa para lidiar con la toxicidad colateral de diversos fármacos y para encontrar mecanismos de entrega más efectivos debido a la ventaja de la caracterización y modificación de los componentes de la formulación [14].

1.5. Potencial zeta (ζ)

Es importante conocer y controlar las propiedades fisicoquímicas de un sistema de partículas como lo es el potencial zeta.

La selección de lípidos es esencial para mejorar la eficacia de la formulación; sin embargo, aun con una buena selección de lípidos no garantiza una formulación exitosa, hay una serie de parámetros que se deben controlar como el tamaño y el potencial superficial, dado que cambios pequeños en estas propiedades pueden afectar significativamente en los resultados

⁸Proceso a través del cual una célula introduce material extracelular.



(a) Liposomas coloración lechosa

(b) Liposomas coloración traslucida

Figura 1.7: Liposomas formulación DPPC:POPC:COL.

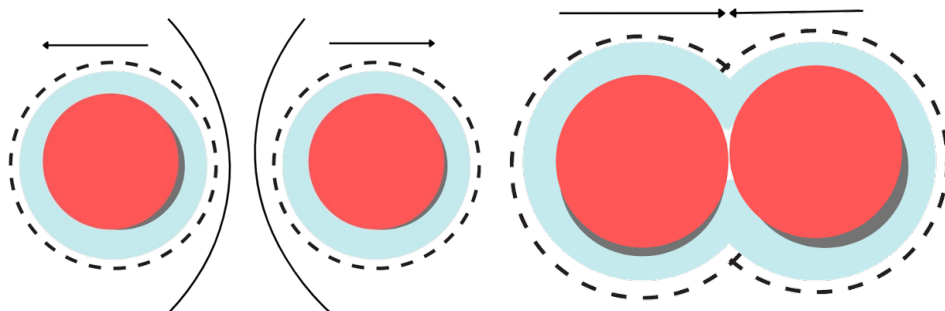
de la formulación liposomal [22, 18].

La medición del potencial zeta se ha convertido en una técnica estándar para la caracterización de nanopartículas. Podemos definirlo como el potencial en el plano de deslizamiento que separa al coloide de los iones asociados del medio de dispersión bajo un campo eléctrico [13] y nos ayuda a determinar la estabilidad en la interacción partícula – partícula en una formulación o un sistema coloidal, caracterizando el potencial superficial y densidad de partículas. Se encuentra altamente influenciado por el solvente en que se encuentre la formulación o coloide y en el caso de formulaciones liposomales por la selección de lípidos [23].

1.5.1. Coloides

Un sistema coloidal está compuesto por dos fases, una fase dispersa y una fase dispersante. Podemos clasificar a los coloides en liófilos (atraen solventes) y en liófilos (repelen solvente) si el solvente es agua se clasifican en hidrofílico e hidrofóbico respectivamente.[24] En un sistema coloidal las partículas tienden a agregarse o formar coágulos; el comportamiento de los coloides en agua está influenciado por su carga electrocinética⁹; esto genera repulsión entre los coloides y evita aglomeraciones, si la carga disminuye significativamente los coloides comienzan a aglomerarse como se muestra en la figura 1.8 [25]. Los coloides generalmente cuentan con una capa eléctrica en la superficie con carga negativa; debido a esta carga, los iones de carga opuesta que se encuentran en el medio acuoso que los rodea se agrupan formando una atmósfera de iones [24].

⁹Parte de la electricidad que estudia el comportamiento de la carga en movimiento y su propagación a través de cuerpo conductor. Parte de la física que estudia el fenómeno que produce la electricidad en movimiento, en el mismo conductor.



(a) Repulsión en partículas cargadas. (b) Atracción en partículas sin carga.

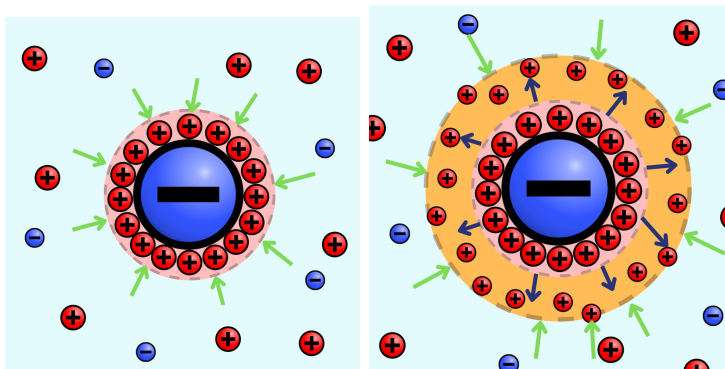
Figura 1.8: Interacción de partículas coloidales. Nota: figura de elaboración propia.

1.5.2. Doble capa

Entendamos el fenómeno de la siguiente manera:

Supongamos que tenemos un sistema coloidal, los coloides llevarán carga negativa, al entrar en contacto con los iones que contiene la fase dispersante, los iones con carga positiva comenzaran a ser atraídos uniéndose a la superficie del coloide. Estos se unen creando una capa ordenada y rígida que cubrirá toda la superficie de la partícula, a esta capa se le conoce como **“capa de Stern”** (1.9a).

La carga del coloide seguirá atrayendo a los cationes que se intentaran unir formando una segunda capa, pero al estar ya unida la capa de Stern sufrirán una repulsión, esto ocasionará que la segunda capa se quede flotando de manera más desorganizada y móvil en una **“capa difusa”** (1.9b).



(a) Capa de Stern pegada a la superficie del coloide. (b) Capa difusa al rededor del coloide.

Figura 1.9: Doble capa difusa. Nota: figura de elaboración propia.

La unión de la capa de Stern y la capa difusa generan lo que conocemos como “doble capa” las dimensiones de esta doble capa así como la carga que presenten estará fuertemente influenciado por el tipo de solución en su entorno y la concentración de iones en ella.

Ahora entendiendo mejor que es la doble capa difusa nos queda preguntarnos ¿en dónde se encuentra el potencial zeta? Y ¿cómo podemos medirlo?

El potencial zeta lo encontraremos entre la capa de Stern y la doble capa difusa (figura: 1.10), podemos definirlo como la diferencia de potencial entre estas capas, es usado como una aproximación de la carga superficial en nanopartículas [26] y nos brinda información relevante sobre la estabilidad del sistema coloidal que se encuentra en movimiento debido a la influencia de un campo electromagnético [27]. Es importante recalcar que el potencial zeta no es el potencial de superficie de la partícula, ni el potencial eléctrico en la capa de Stern; sin embargo, es una buena aproximación para caracterizar las propiedades de la partícula, sobre todo si la partícula esta en una solución.

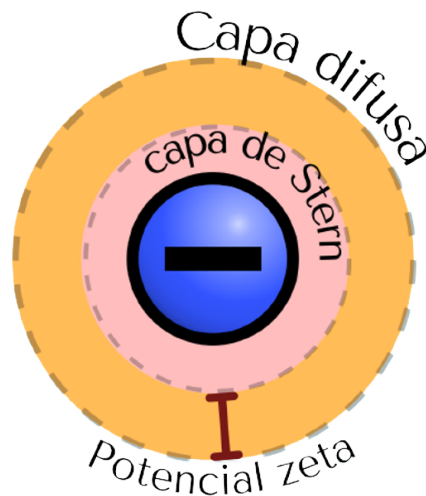


Figura 1.10: Representación de la locación del potencial Z. Nota: figura de elaboración propia.

El PZ, a pesar de ser una buena aproximación, tiene algunos limitantes, siendo el pH el parámetro más influyente para determinar el tamaño de la partícula y el PZ que esta adquirirá. En las soluciones acuosas otros parámetros que influyen son la temperatura y la viscosidad del medio en que se encuentre el sistema coloidal [26].

1.6. Detección de pulsos resistivos sintonizable (tunable resistive pulse sensing TRPS)

Es una técnica que nos permite estimar el valor del PZ de manera experimental. Tenemos dos variables de esta técnica, la detección de pulsos resistivos (RPS) y la detección de pulsos resistivos sintonizable (TRPS). La principal diferencia entre estas técnicas es la ventaja de un nanoporo flexible, con el cual podemos modificar la apertura del nanoporo a las necesidades de la muestra que mediremos. Esta técnica se ha posicionado como un método de caracterización óptimo para partículas en un rango nanométrico hasta micrométrico y nos da la ventaja de analizar un conteo de partículas individuales, es decir, partícula por partícula.

Nos permite analizar distintas partículas coloidales y caracterizar el tamaño, concentración de partículas y estimar el PZ de las partículas.

Para el método de TRPS se utiliza un nanoporo flexible principalmente de poliuretano que cumple el papel de una membrana delgada que permite el paso de una corriente de iones. Se puede modificar la apertura del poro con ayuda del equipo utilizado, a diferencia del RPS en donde tenemos un nanoporo con apertura fija [28, 29, 30].

1.6.1. Principio de Coulter

Este método tiene sus orígenes en el contador Coulter, el cual fue desarrollado a principios de la década de 1950 por Wallace H. Coulter. Fue usado principalmente en el campo de la hematología y fue hasta la década de 1970 cuando se comenzó a emplear en el conteo de partículas como virus, bacterias, vesículas extracelulares y microorganismos. El principio básico de esta técnica es por el conteo y análisis de bloqueos en la corriente iónica [29].

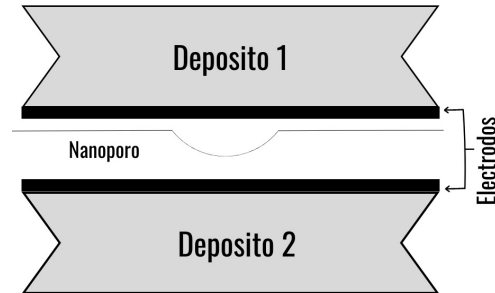


Figura 1.11: Esquema de la estructura de las celdas inferior y superior. Nota: figura de elaboración propia.

Nuestro sistema está basado en dos depósitos en donde podemos colocar una solución acuosa que nos permita el paso de la corriente (generalmente electrolitos). Estos depósitos cuentan con un electrodo, lo cual nos permitirá tener una corriente continua al aplicar una diferencia de potencial (ΔV) entre los depósitos. En la parte media entre los depósitos colocamos el nanoporo que cumplirá el papel de una membrana delgada que permite el paso de electrolitos y, por lo tanto, de la corriente (figura 1.11). Cuando una partícula atraviesa el nanoporo observamos un evento de bloqueo, lo que genera una disminución transitoria en la corriente iónica, lo que conocemos como un “pulso resistivo”, esto podemos visualizarlo de la siguiente manera, dado que el bloqueo lo genera una partícula, esta desplaza un poco de líquido electrolítico lo que genera un aumento en la resistencia del circuito reduciendo temporalmente la corriente ($I = V/R$).

La técnica nos da la ventaja de realizar un conteo de partículas individual analizando una serie de pulsos resistivos continuos que, a diferencia de otros métodos, nos permite obtener resultados individuales. La técnica con ayuda del equipo nos permiten relacionar la cantidad de bloqueos presentes en la línea basal con la cantidad de partículas en la formulación, el tamaño del decaimiento en la corriente iónica, podemos relacionarlo el volumen de la partícula y la duración del bloqueo con la velocidad de la partícula.

1.6.2. Pulsos resistivos

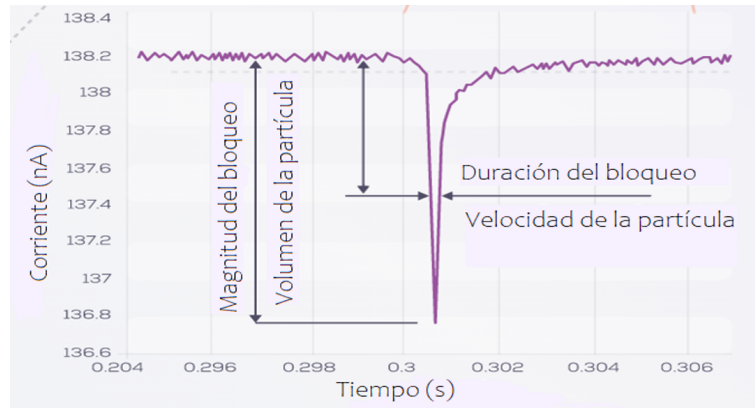


Figura 1.12: Esquematización de la interpretación de los bloqueos en la línea basal. Nota: figura modificada a partir de la imagen presente en el manual IZON EXOID.

El equipo nos permitirá visualizar la cantidad de bloqueos que tenemos presentes en la línea basal en tiempo real, la interpretación de estos bloqueos puede llevarse a cabo de manera muy sencilla.

Siempre tendremos presente en la pantalla la corriente en nano amperes (nA) en el eje “y” y el tiempo transcurrido en segundos (s) en el eje “x”, cada una de las partículas al pasar generara un decaimiento que podemos observar en la pantalla el cual se verá como un pico decreciente en la corriente, podemos interpretar el tamaño o volumen de nuestra partícula en relación con el decaimiento que tuvo la corriente, una partícula más grande generará un mayor desplazamiento de volumen acuoso y esto generará un aumento en la resistencia mayor, lo que genera un decaimiento más grande. La velocidad de la partícula viene dada por el tiempo que duró el decaimiento de corriente, una partícula grande y lenta nos generara un gran decaimiento que dure más, comparado con una partícula pequeña y rápida. En la figura 1.12 tenemos un esquema de la interpretación de un pulso resistivo. Para obtener resultados más acertados es necesario que la línea basal no presente anomalías como saltos en la corriente, inestabilidad en la línea o decaimientos y subidas de corriente muy drásticas, estas alteraciones generan que el nanoporo pueda sufrir obstrucciones y daños que a largo plazo impedirían su uso.

1.6.3. Geometría del nanoporo

Como ya hemos mencionado la técnica TRPS nos da la ventaja de modificar la apertura de la membrana a distintas escalas (existen nanoporos desde los 40 nm hasta 11 μm), esto es posible debido a que nuestra membrana o nanoporo está hecha de un termoplástico que permite la apertura y cierre (nanoporo redimensionable) los cuales se elaboran perforando un elastómero estirado y nos permiten deformarlo por medio de un estiramiento o relajamiento biaxial.[31, 32]

Para obtener las mediciones de tamaño y concentración generalmente nos basamos en un modelo geométrico del nanoporo, al aplicar un estiramiento biaxial en el nanoporo no

abriremos la apertura de forma equitativa, no obtendremos un canal totalmente recto, la geometría que se sugiere es un nanoporo con apertura cónica como se muestra en la figura: 1.13. Debido a la geometría del nanoporo la manera en la que se sugiere se puede aproximar la resistencia es por medio de la ecuación:

$$R = \frac{4\rho L}{\pi AB} \quad (1.1)$$

En donde ρ es la resistividad de los medios electrolíticos, L la longitud de los poros y A,B las dimensiones de los poros, es decir la apertura de las áreas de la mas pequeña a la más grande [33].

Como podemos observar en la figura 1.13 la resistencia sera un gradiente, en donde podemos dividir la sección del nanoporo en pequeños segmentos, el nanoporo presenta la característica de tener segmentos cónicos simétricos, por lo tanto la resistencia cualquier punto "x" del eje Z, desde la apertura del nanoporo la podremos aproximar mediante la ecuación 1.2

$$R = \frac{4\rho(Z_b - Z_a)}{\pi A_z B_z} \quad (1.2)$$

En la ecuación 1.2 notamos que la longitud L ahora se ha representado por $(Z_b - Z_a)$ lo cual indica que ahora trabajamos sobre una distancia a lo largo del eje del nanoporo y A_z , B_z son los diámetros desde la apertura mas pequeña del nanoporo hasta la de mayor tamaño.

Este gradiente de resistencias en los poros cónicos nos permite una sensibilidad mayor a las partícula. Una problemática de los poros redimensionables es el posicionamiento en la ubicación de la partícula a lo largo del eje Z del nanoporo.

Eso puede solucionarse modelando el nanoporo como un conjunto de secciones cónicas, de esta manera podemos conocer la posición, tamaño y velocidad de la partícula. Otra manera de estimar el PZ es por medio de una integral la cual está dada por una integral entre las distancias del nanoporo estirado con respecto al eje "z".

La integral queda de la siguiente manera:

$$R_{poro} = \int_{A_b}^{A_a} \frac{\rho}{A(Z)} dz. \quad (1.3)$$

Con $A(Z)$ el área de la sección transversal del poro en la posición z y ρ es la resistividad del electrolito.

El conocimiento de las dimensiones de los nanoporos y el perfil de resistencia que presentan es un punto clave, esto para seleccionar el nanoporo adecuado a las muestras que se midiran y poder obtener lineas de corriente estables. Es importante que evitemos deformaciones en el nanoporo, al ser de un material moldeable en determinado lapso podría sufrir deformaciones que generen complicaciones al realizar el análisis, es por esto que tenemos un rango de estiramiento óptimo como se muestra en la tabla 1.3

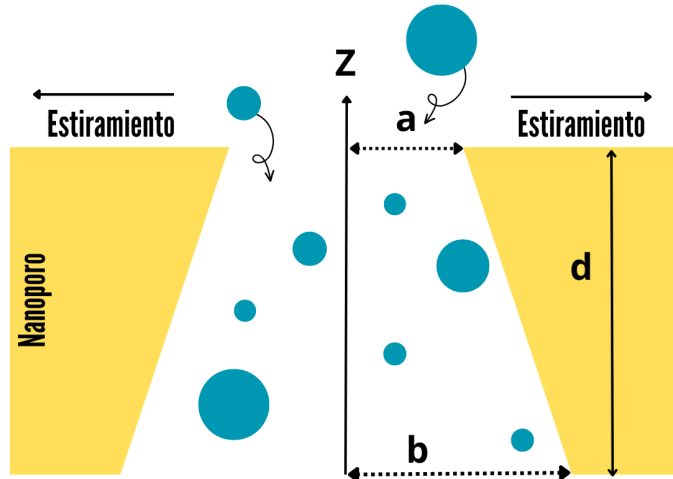


Figura 1.13: Geometría del nanoporo al sufrir un estiramiento. Nota: imagen adaptada de "Tunable Resistive Pulse Sensing: Better Size and Charge Measurements for Submicrometer Colloids. Analytical Chemistry"

Estiramiento en el nanoporo (mm)			
43.5 - 44.0	45.0 - 47.0	48.0	49 - 49.5
Poca tensión aplicada lo que generara inestabilidad en la línea basal y generara demasiados bloqueos al NO TENER UNA APERTURA OPTIMA	Estiramiento optimo para operar.	Trabajar con un estiramiento de 48 mm o mas genera una buena estabilidad en la línea basal pero generará problemas para trabajar en tensiones más bajas posteriormente.	Lineas basales muy estables pero el nanoporo puede sufrir deformacion a largo plazo.

Tabla 1.3: Estiramiento óptimo en el nanoporo.

Concentración

El nanoporo mide la concentración con referencia al flujo impulsado por el cambio de presión, es decir, relacionamos la frecuencia con la que se presentan los pulsos resistivos o bloqueos (f) con la cantidad de partículas que se encuentran en la suspensión coloidal y con la velocidad con la que se desplazan las partículas a través del nanoporo (V_p).

Potencial zeta

La medición del potencial zeta se lleva a cabo al someter la suspensión a un campo eléctrico y medir la velocidad de desplazamiento de las partículas a través del nanoporo, bajo el efecto del campo eléctrico.

Para el campo eléctrico consideramos un campo contante formado por dos placas conductoras paralelas que serán los electrodos superior e inferior del EXOID, el campo estará

dado como:

$$E = \frac{V}{d} \quad (1.4)$$

el voltaje es una variable que nosotros controlamos, tomando el promedio de voltaje en 450 mV y el espesor de la membrana de 300 μm tomando [33] tomando estos datos el campo eléctrico que tenemos tendrá una magnitud promedio de:

$$E = \frac{V}{d} = \frac{450 \text{ mV}}{300 \mu\text{m}} E = 1.5 \frac{\text{mV}}{\mu\text{m}} \quad (1.5)$$

Esta propiedad de las partículas es mayormente experimental debido a que se deduce de la movilidad electroforética (μ_e) la cual se deriva utilizando la siguiente formula:

$$\mu_e = \frac{V}{E} \quad (1.6)$$

Donde V es la velocidad de la partículas y E la intensidad del campo eléctrico, cuando se busca calcular el PZ a partir de esta movilidad teniendo en cuenta que las partículas se encuentran en un medio acuoso hay mas variables que considerar en la ecuación 1.7 se presenta como calcular el PZ a partir de la movilidad electroforética, para esto se emplea la ecuación de Henry.

$$\mu_e = \frac{2\epsilon_r\epsilon_0\zeta f(ka)}{3\eta} \quad (1.7)$$

Con ϵ_r como la permitividad relativa o constante dieléctrica, ϵ_0 permitividad del vacío, ζ el potencial, $f(ka)$ función de Henry y η la viscosidad a temperatura experimental [27]. El equipo que se utilizará ya cuenta con un software de análisis que considera diversas variables y ecuaciones para darnos los cálculos y gráficas de PZ necesarias.

1.7. Antecedentes

La caracterización de partículas ha sido un proceso fundamental para conocer las principales propiedades fisicoquímicas de los elementos presentes en la suspensión coloidal y así definir las principales aplicaciones que podrían tener.

Existen diversas técnicas para la caracterización de partículas, cada una de estas técnicas emplean distintos principios físicos como dispersión de luz o variaciones en el voltaje. El uso de distintas técnicas en conjunto que empleen distintos principios para la caracterización de una sola formulación son utilizadas para tener una caracterización más completa, dado que nos ofrecen distintos tipos de información.

Existen distintas técnicas como dispersión de luz dinámica (DLS), microscopia de fuerza atómica (AFM), detección de pulsos resistivos sintonizable (TRPS), esta investigación se centra en la técnica de TRPS y su uso para la caracterización de una formulación liposomal.

Los dispositivos para conteo y caracterización de partículas en la técnica TRPS tenemos el qNano el cual es una versión anterior al EXOID. Estos dispositivos nos permiten tener un control mediante la visualización en tiempo real de la línea basal y análisis de las partículas. En comparación con otras técnicas como el DLS la técnica TRPS es novedosa dado que el

análisis es por medio de partículas individuales y nos permite determinar subpoblaciones tanto en tamaño como en PZ, nos ayuda a determinar el diámetro de la partícula de forma más certera y no solo una aproximación. [34, 35]

1.8. Hipótesis

El éster metílico de L-histidina de anfotericina B es una potencial alternativa como antimicótico, teniendo en cuenta que comparte características con la AmB por ser un derivado de esta, tendría un comportamiento similar a la AmB, debido a la modificación el A21 presenta mejoras en la solubilidad y reducción en los daños colaterales.

Con la selección de lípidos de la formulación deberíamos poder caracterizar sus propiedades fisicoquímicas de manera adecuada.

1.9. Objetivos

1.9.1. Objetivos generales

En este trabajo se busca caracterizar una formulación liposomal para encapsulamiento y entrega de fármaco con un diámetro promedio de 100 a 150 nm, PZ menor a los -30 mV y estabilidad coloidal en el sistema para evitar coagulaciones y floculaciones con los tiempos de agitación ultrasónica ultrasónica.

El trabajo se dividirá en dos fases: En la primera de ellas se caracterizará la formulación liposomal sin fármaco, con la finalidad de conocer las características y comportamiento inicial de la formulación. Posteriormente se agregará fármaco (A21) durante el proceso de elaboración de la formulación con la finalidad de observar los cambios en las características y comportamiento del sistema, todo esto con ayuda del equipo IZON EXOID.

1.9.2. Objetivos particulares

Desarrollar y estandarizar un protocolo para la elaboración de formulaciones con A21 y desarrollar un protocolo para caracterizar formulaciones liposomales con A21 usando el equipo IZON EXOID.

Capítulo 2

Metodología

2.1. Materiales

Para la elaboración de la formulación liposomal denominada L_1 se utilizó una mezcla de lípidos que consta POPC, DPPC y colesterol suspendidos en cloroformo (CHCl_3) de Avanti Polar Lipids, almacenados a -20°C todos los compuestos se encuentran en una solución madre con una concentración de 25 mg/ml.

Se trabajaron dos formulaciones, en la primera parte de esta investigación utilizamos la formulación L_1 (DPPC:POPC:COL) a una concentración de 12.5 mM en la segunda parte de la investigación buscamos una concentración de 1 mM y se añadió fármaco, se utilizó una solución madre de A21 (Lote A21-29-11-22) a 0.75 mM (figura 2.2).

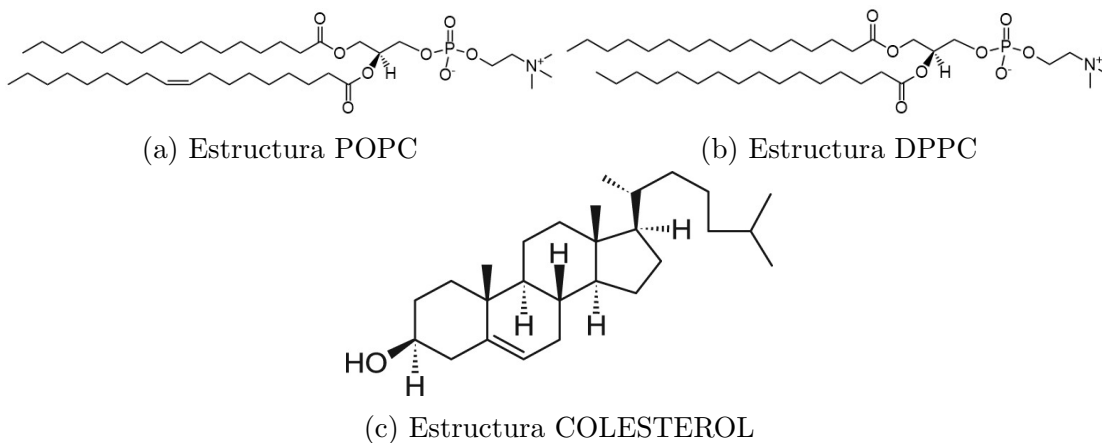


Figura 2.1: Estructuras de lípidos utilizados para formulación L_1 .

Se utilizaron distintos solventes; Para los lípidos se utilizó cloroformo, como solvente del fármaco se utilizó metanol (2.5 mg de A21 en 50 μl de metanol), para el proceso de hidratación de los liposomas se empleó PBS para regular el pH a 7.4 (condiciones fisiológicas) en la formulación.



Figura 2.2: Solución madre de A21.

2.1.1. Preparación de la formulación liposomal

Para elaborar la formulación se utilizó el método de evaporación (figura 2.3), en este método los lípidos están suspendidos en un solvente, se aplica vacío con la finalidad de evaporar el solvente y obtener una película fina adherida al matraz.

Este proceso consta de tres fases principales: mezcla de lípidos, evaporación del solvente, hidratación de la formulación.

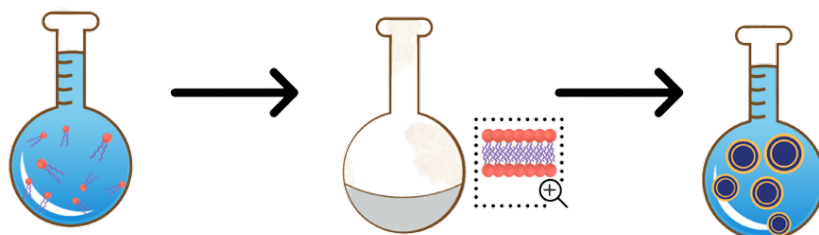


Figura 2.3: Esquema del método de evaporación.

Protocolo para elaboración de formulación L₁:

- Se lavan las jeringas Hamilton siguiendo el procedimiento adecuado señalado en el **anexo B**.
- Los compuestos deben estar a temperatura ambiente, apoyándonos de un vórtex para mezclarlos (al menos 10 segundos) antes de usarse.
- Se colocan los volúmenes señalados en la tabla 2.1 de POPC, DPPC, COL y fármaco en un matraz limpio, si es necesario puede colocarse un poco de CHl_3 y utilizar el vortex para limpiarlo, desechar el CHl_3 de manera adecuada, agregar un poco de CHl_3 en el matraz antes de agregar los lípidos y el fármaco dicho recipiente debe transportarse de manera segura para cubrir de la luz y evitar derrames.

Lípido	Cantidad (μl)
POPC	6.4
DPPC	15.4
COL	4.1
Fármaco A21	
16.1	

Tabla 2.1: Cantidades agregadas de lípidos y fármaco.

- Una vez lista la formulación se lleva al rotavapor. Se utilizan dos presiones: treinta minutos a una presión de 305 mBar, terminado este tiempo se baja la presión a 70 - 75 mBar por treinta minutos, en ambas presiones debemos mantener una temperatura de 40°C y una rotación media. Este proceso provocara que los lípidos generen una película adherida de manera uniforme al fondo del matraz.
- Se hidratan con 1 ml de solución PBS provocando que los lípidos, por efecto hidrofóbico, formen estructuras como micelas y liposomas.
- Finalizado el tiempo en el rota-vapor y después de hidratarse se llevaron al sonicador a una temperatura de 50°C por una hora, con la finalidad de obtener liposomas con tamaños más estables y dispersos.

2.1.2. Incorporación fármaco A21

Se prepara una solución madre de A21 en metanol, se colocan 2.5 mg de A21 y se disuelven en 50 μl de metanol, para disolverse mejor podemos ayudarnos de un vortex. Cuando está lista la mezcla de lípidos L_1 se colocan 16.1 μl de la solución madre de A21 y se llevan al rota vapor siguiendo el procedimiento para elaboración de formulación liposomal. Una vez preparada la solución L_1 A21 con el método de evaporación buscamos obtener resultados en la formulación como en la figura 2.4



Figura 2.4: Secuencia de resultados en el método de evaporación integrando fármaco A21.

Podemos observar en la primer figura la mezcla de lípidos con el fármaco, en la segunda figura la formación de la película adherida al matraz antes de hidratarse y finalmente la formulación L₁A21 después de someterse a un baño ultrasónico.

2.2. Método

2.2.1. Caracterización fisicoquímica

Para realizar la caracterización de la formulación liposomal utilizaremos el equipo IZON EXOID el cual nos permite generar análisis de concentración vs tamaño y tamaño vs potencial zeta.

De igual manera, el equipo nos permite visualizar la línea de corriente en tiempo real, lo que nos ayuda a lidiar con bloqueos o decaimientos en la corriente para obtener mejores resultados.

2.2.2. Técnica TRPS

Para medir el diámetro de los liposomas se utilizó la técnica de “TRPS”, la cual consiste en una variación de voltajes y presiones sobre un nanoporo de poliuretano flexible que cumple el papel de membrana, con esto logramos que las partículas que se encuentran suspendidas en la formulación pasen por el nanoporo generando un bloqueo y un decaimiento en la señal.

Utilizamos el dispositivo experimental IZON EXOID (figura 2.5 (1)) el cual cuenta con diversos elementos principales como un casco metálico cuya principal función es disminuir el ruido, en nuestra línea basal, una celda de fluido superior y una celda de fluido inferior, en donde colocamos una solución que nos ayuda a intensificar la línea de corriente, adicional a esto tenemos nanoporos de poliuretano intercambiables de distintos tamaños.

1	Equipo IZON EXOID
2	Boquilla de presión
3	Casco metálico
4	Celda de fluido superior
5	Nanoporo de poliuretano flexible
6	Celda de fluido inferior

Tabla 2.2: Partes para montaje del equipo EXOID.

Para poder realizar las mediciones se requiere un proceso de hidratación en el nanoporo que se hace en tres partes, principalmente con solución hidratante (SH), solución electrolítica (SE) que se utiliza para la dilución de los liposomas al momento de realizar las mediciones y para permitir el paso de corriente estable generando una línea basal estable y finalmente de un proceso de recubrimiento (COAT) para un mejor funcionamiento del nanoporo.

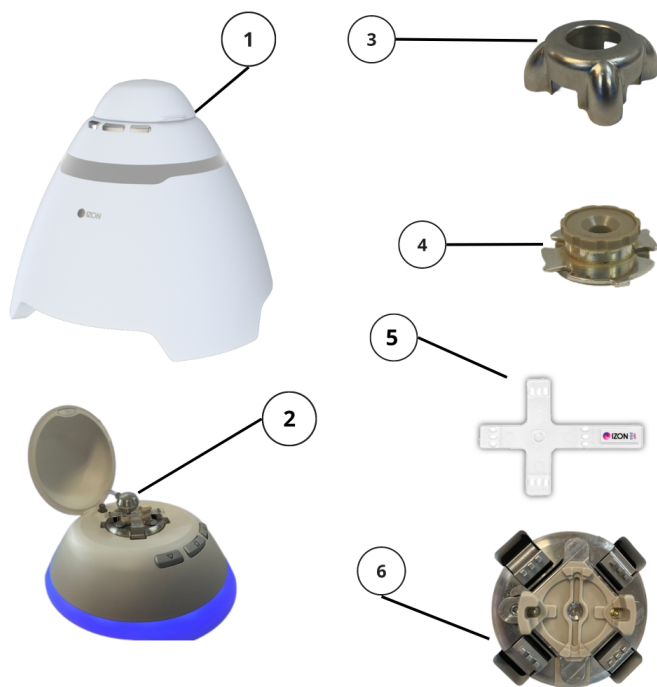


Figura 2.5: Equipo Izon Exoid, ver cuadro 2.2.

El proceso para hidratación y recubrimiento del nanoporo se encuentra mejor explicado en el apéndice B.

Se realizaron análisis de tamaño vs PZ, para mantener resultados dentro de los rangos deseados, se buscó replicar los voltajes utilizados, los cuales variaron en un rango definido de 350 mV a 450 mV. Se utilizaron nanoporos de poliuretano flexible de distintos tamaños, para la primer parte de este experimento en donde solo se busca caracterizar la formulación L_1 se utilizaron nanoporos de 250 y 400 nanómetros con variaciones de voltaje en el rango establecido, para la segunda fase de este experimento ya se contaba con un tamaño promedio de los liposomas presentes en la formulación L_1 , por lo que se usaron nanoporos de tamaños más pequeños de entre 250 y 100 nanómetros manteniéndonos dentro del rango de voltaje establecido, esto con la finalidad de obtener un promedio de partículas dentro de los parámetros ideales de tamaño.

Para poder registrar los bloqueos y corrientes obtenidas es necesario implementar un protocolo donde se defina el procedimiento a seguir en caso de inestabilidad en la línea basal, la falta o exceso de bloqueos, esto con la finalidad de obtener mediciones más precisas y gráficas más estables.

En la elaboración de este protocolo se deben tener en cuenta problemas de hidratación en el nanoporo, la formación de burbujas en la celda superior o inferior que afectan la estabilidad en la línea de corriente, se debe tener en cuenta la apertura óptima para trabajar con los nanoporos (esto con la finalidad de evitar deformaciones en el nanoporo), es importante considerar la temperatura ambiente en la que se estarán tomando las mediciones, dado que

esto afecta el proceso de hidratación y la cantidad de fluido que se encuentra en la celda inferior.

De esta forma con el equipo IZON EXOID (figura 2.5) e implementando los protocolos correspondientes se determina experimentalmente un tamaño promedio y cantidad de partículas presentes en la formulación liposomal L_1 con fármaco presente (A21) como función de una variación de voltaje y presión.

Capítulo 3

Resultados

El propósito principal de este experimento fue caracterizar las propiedades fisicoquímicas de la formulación L_1 , observar y analizar los principales cambios que presenta al encapsular el fármaco A21, para esto se realizaron pruebas con el equipo IZON EXOID que nos permite manipular por medio de diferencia de voltajes y presiones la formulación, los resultados los dividiremos en dos fases.

Para la primer parte de este experimento las metas principales son caracterizar la formulación L_1 y tener un mejor manejo y entendimiento del equipo que se utilizará.

En la segunda fase del experimento se encapsuló el fármaco en la formulación L_1 , se observaron y analizaron los principales cambios en las características de la formulación.

Con los datos de ambas formulaciones se procede a una comparación en los cambios en diámetro y potencial zeta.

Las mediciones se realizaron con variaciones en el voltaje, tiempos de agitación ultrasónica y distintos nanoporos, de igual manera se sugiere la opción de filtrar la formulación con la finalidad de obtener partículas más uniformes y pequeñas, se llevó un registro de tiempo de agitación ultrasónica, los datos del nanoporo, los voltajes y tamaños promedios generados por el programa de análisis de datos proporcionado por IZON.

3.1. Formulación L_1

Para analizar dicha formulación se realizaron variaciones de voltaje en un rango de 350 mV a 450 mV, utilizando un nanoporo de 250 nm, Los datos obtenidos se presentan en el cuadro 3.2 de los cuales obtenemos gráficas para PZ y diámetro, de igual manera podemos generar un diámetro (\emptyset) y potencial zeta (ζ) promedio, los cuales se presentan en la tabla 3.1

$\emptyset_{Promedio}$	$\zeta_{Promedio}$	$\sigma_{diámetro}$
230.75	-37.15	92.60

Tabla 3.1: Diámetro y PZ promedios formulación L_1 .

Fecha	Muestra	Tiempo de agitación ultrasónica (min)	Nanoporo (nm)	ID nanoporo	Estiramiento (mm)	No. partículas	Tasa de partículas	ϕ_{prom} (nm)	ϕ_{mode} (nm)	ζ_{prom} (mV)	ζ_{mode} (mV)	Desv. Est diametro
06/10/2022	L1	120	250	A63181	47	182	21.0	234	149	-24.6	-29.5	154.8
12/10/2022	L1	120	250	A63181	45.5	777	240.2	101	81	-39.5	-46.4	36.1
18/10/2022	L1	60	250	A63181	45.5	1066	585.7	273	195	-54.2	-68.2	109.5
18/10/2022	L1	120	250	A63181	45.5	187	114.8	315	250	-30.3	-35.1	157.8

Tabla 3.2: Datos obtenidos para la formulación L₁.

3.1.1. Diámetro L₁

Los datos presentados en la tabla 3.2 nos permiten generar un histograma de los diámetros obtenidos (figura 3.1), podemos observar que tenemos diámetros promedios en un rango de 101 nm a 315 nm.

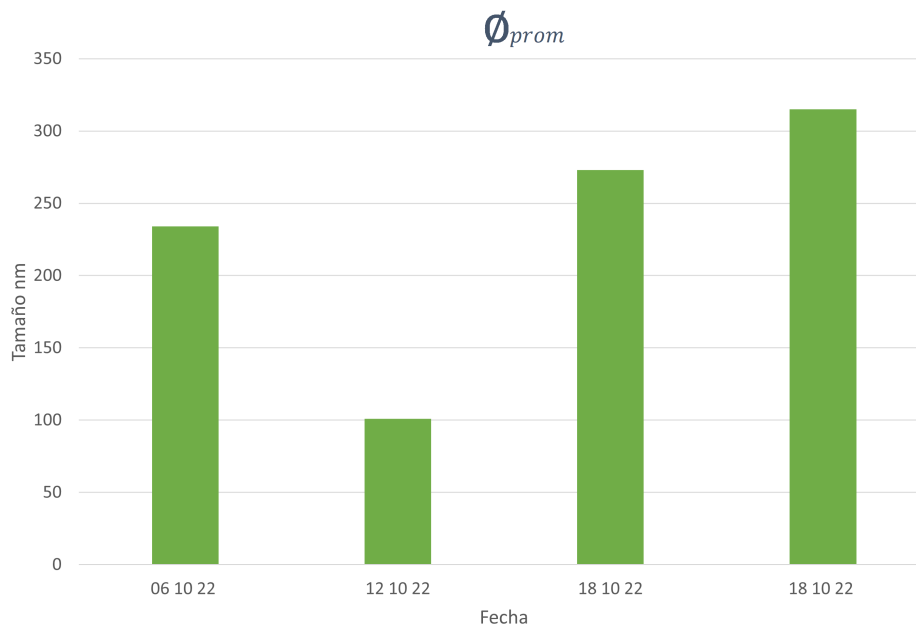


Figura 3.1: Tamaños de L₁ por fecha.

3.1.2. Tasa de partículas

Otro referente que debemos considerar en nuestros resultados es la cantidad de partículas presentes en cada medición. Los reportes generados por el IZON DATA nos generan una gráfica en referencia a la cantidad de partículas que tuvimos presentes en la medición. Buscamos que esta gráfica tienda a una línea continua con pendiente constante, ya que esto nos indicaría que tuvimos una buena cantidad de bloqueos en el tiempo que transcurrió el análisis.

De las mediciones para la formulación L₁ obtuvimos las siguientes gráficas (figura 3.2).

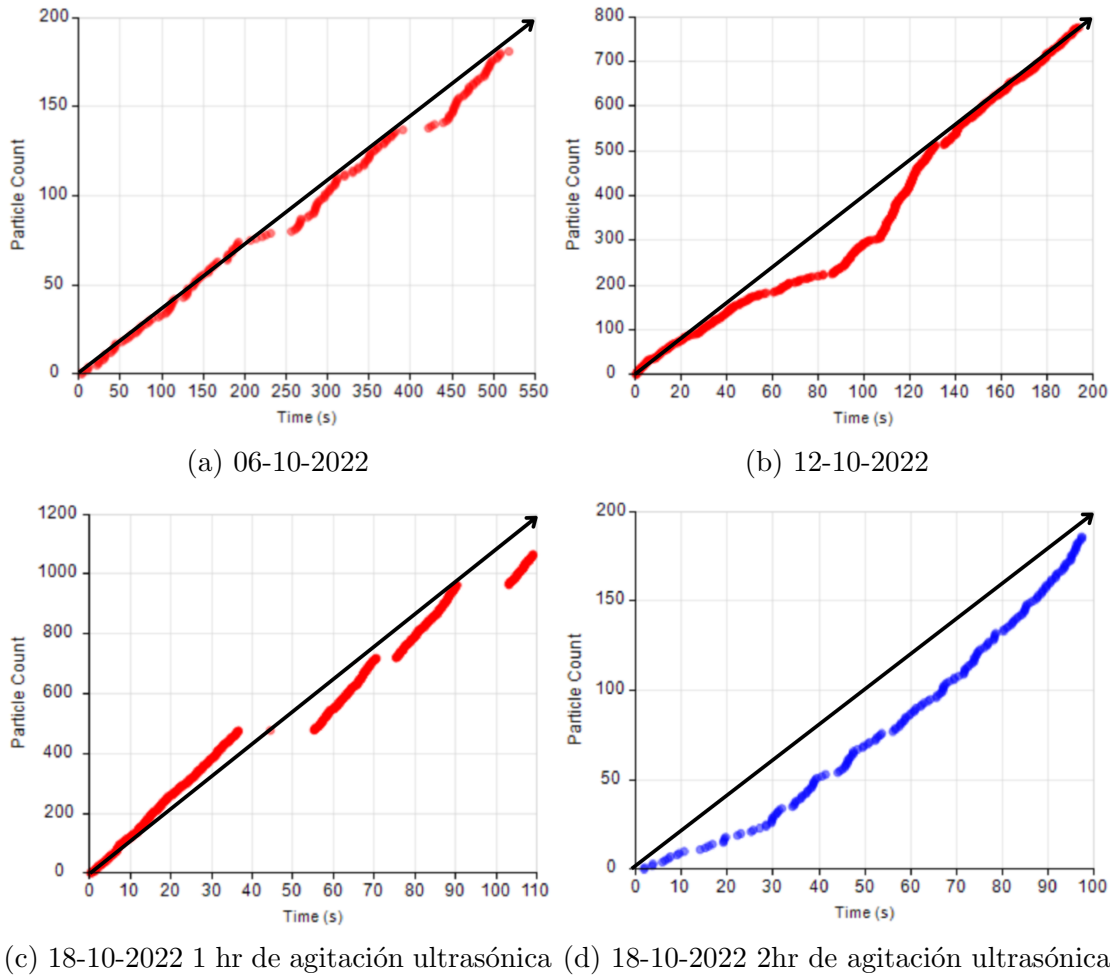


Figura 3.2: Gráficas de la tasa de partículas para la formulación L_1 en distintas mediciones (fechas).

Analizando la figura 3.2a podemos observar que tuvimos una buena cantidad de partículas con dos decaimientos notables, esto podemos adjudicarlo a un bloqueo de gran tamaño que generó inestabilidad en la línea basal, lo que genera que la corriente decaiga y esto produce las curvas de decaimiento en la gráfica. En la figura 3.2b la curva de decaimiento es aún más notable y prolongada, en esta formulación presentamos una mayor cantidad de bloqueos seguidos. En las figuras 3.2c y 3.2d se midió la misma formulación con distintos tiempos de agitación ultrasónica para notar los cambios que presentaba la formulación y así definir un tiempo óptimo de agitación ultrasónica. Como se puede observar con un tiempo de agitación de 60 minutos tenemos una buena cantidad de partículas presentes en la formulación, podemos observar una línea escalonada con tres secciones sin partículas, podemos adjudicarlo a que el nanoporo se tapó, Para estos casos se tiene que utilizar una herramienta especial para aplicar succión en el nanoporo lo que generara que se “destape” permitiendo de nuevo el paso de partículas. Aun así en las secciones de la línea que tenemos presentes podemos notar un flujo continuo de partículas, con la información del cuadro 3.2 tenemos un conteo de partículas alto con un total de 1066 a 60 min de agitación

ultrasónica a diferencia de un tiempo de agitación ultrasónica de 120 min donde podemos visualizar una curva pronunciada en la figura 3.2d con un conteo total de partículas de 187.

El proceso de variación en tiempo del agitador ultrasónico se realizó en otras muestras, esto con la finalidad de determinar cuál es el tiempo óptimo de agitación para formulación, con esto se determinó el tiempo óptimo de agitación para la formulación L₁ que es de **60 minutos**, con este tiempo la formulación obtendrá un color traslúcido azulado permitiendo tener una formulación más estable, es decir que el diámetro de las partículas mayormente esta en el espectro visible, con partículas más dispersas y con una menor cantidad aglomeraciones de partículas lo que genera obstrucciones en el nanoporo.

3.1.3. Potencial zeta L₁

El potencial promedio general de todas las mediciones obtenido fue de -37.15 mV, lo cual está por debajo de nuestro potencial ideal de -30 mV, aun así el resultado no es tan alejado, en la figura 3.3 tenemos presente la gráfica de las diferentes mediciones de acuerdo a las distintas fechas.

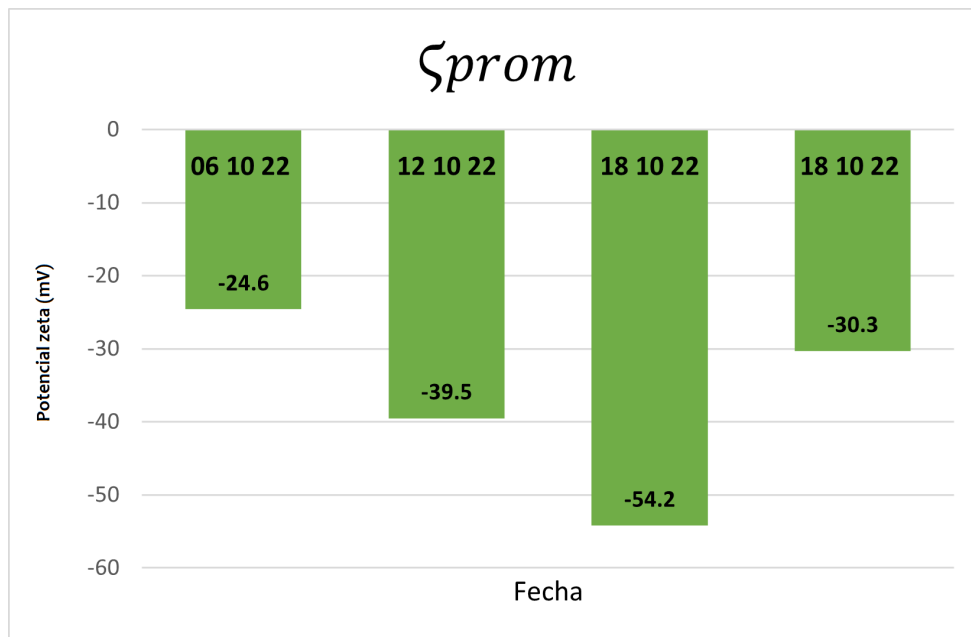


Figura 3.3: PZ de diferentes preparaciones de L₁.

Como podemos observar tenemos variaciones en el potencial zeta, aún teniendo estas variaciones el PZ promedio esta cerca del deseado de -30 mV, Este potencial nos da una alta estabilidad coloidal y es apto para el transporte de fármacos [9, 14].

Como ya se mencionó la relación que tenemos con el PZ y tamaño viene dada por la cantidad de iones que se encuentren fijos en la doble capa difusa. De manera experimental podemos notar que el tiempo de agitación ultrasónica afecta en el tamaño de las partículas y, por lo tanto, en el potencial zeta que estas puedan presentar.

Como podemos observar la caracterización de la formulación L₁ nos da un diámetro promedio y un PZ promedio más negativo que el deseado, la siguiente fase es observar los cambios que presenta dicha formulación al incorporar fármaco.

La formulación L₁ presenta una buena estabilidad coloidal y presenta un mejor comportamiento el día de su elaboración, conforme pasa tiempo en refrigeración presenta una mayor cantidad de aglomeraciones y requiere un mayor tiempo de agitación ultrasónica antes de medirla.

En esta primera fase consideramos dos metas principales, la caracterización de la formulación L₁ y tener un mayor conocimiento y manejo del equipo IZON EXOID, esto con la finalidad de tener un mayor control al usarlo para caracterizar la formulación con fármaco de mejor manera. Para esto se elaboró un protocolo de hidratación de manera adecuada al nanoporo, el cual se presenta en el apéndice B.

3.2. Formulación L₁A21

En la segunda fase del experimento, ya con un conocimiento previo de las características y comportamiento de la formulación L₁ se analizaron los cambios presentados en dicha formulación al encapsular el fármaco.

Para esta parte se utilizaron nanoporos de distintos tamaños desde 250 nm hasta 100 nm, se siguió respetando el tiempo de agitación ultrasónica al elaborar la formulación, ya que se comprobó que es el que nos genera mejores resultados.

Fecha	Muestra	Tiempo de agitación ultrasónica (min)	Nanoporo (nm)	ID nanoporo	Estiramiento (mm)	No. partículas	Tasa de partículas	Φ_{prom} (nm)	Φ_{made} (nm)	ζ_{prom} (mV)	ζ_{made} (mV)	Desv. Est diámetro
07/02/2023	L1A21	60	250	A63181	43.5	57	13.7	201	172	-16.5	-17.9	61.4
13/02/2023	L1A21	60	200	A62157	43.5	47	15.9	83	75	-15.2	-12.7	18.0
16/02/2023	L1A21	60	250	A63177	45.0	448	29.8	125	100	-18.0	-12.9	41.4
21/02/2023	L1A21	60	250	A63177	45.0	345	72.8	203	154	-82.8	-134.8	52.8
28/02/2023	L1A21	60	250	A63177	45.0	324	26.4	243	173	-27.0	-14.6	94.7
06/03/2023	L1A21	60	250	A63177	45.0	580	109.8	202	170	-16.0	78.5	54.4
09/03/2023	L1A21	60	150	A68830	45.5	50	6.4	121	119	-15.1	-8.7	66.6
13/03/2023	L1A21	60	150	A68830	45.5	47	15.9	83	75	-15.2	-12.7	18.0
21/03/2023	L1A21	60	250	A76395	46.0	311	35.6	214	163	20.6	-27.3	102.2
22/03/2023	L1A21	60	150	A77235	45.5	399	118.5	137	111	-19.6	-9.8	88.6
12/04/2023	L1A21	60	100	A64784	45.5	54	7.1	188	161	-27.9	-8.3	37.1
18/04/2023	L1A21	60	100	A64784	46.0	216	41	185	156	-239.2	20.7	36.9
09/05/2023	L1A21	60	150	A77235	46.0	113	43.0	153	128	-26.5	-17.1	61.1
23/05/2023	L1A21	60	150	A77235	46.0	1165	152.9	114	93	-133.3	11.9	35.2
30/05/2023	L1A21	60	100	A64784	46.5	94	14.9	53	34	-18.7	-19.9	27.3
31/05/2023	L1A21	60	100	A64784	46.0	159	33	349	278	51.7	28.3	138.5
06/06/2023	L1A21	60	100	A64784	46.0	19	2.5	313	203	-948.9	-112.5	129.9
12/06/2023	L1A21	60	100	A64784	46.0	104	10.6	181	190	-132.9	-7.6	33.4
07/04/2023	L1A21	60	100	A64784	46.0	171	32.0	178	120	14.1	-25.6	146.2

Figura 3.4: Datos obtenidos para la formulación L1A21.

En esta fase del experimento se lograron obtener una mayor cantidad de datos que se presentan en la tabla 3.4, de esto podemos rescatar el diámetro y potencial zeta promedios generales presentes en la tabla 3.3. Como se puede observar en la tabla 3.4 el tamaño del nanoporo se fue disminuyendo de 250 nm a 100 nm, al trabajar con nanoporos más pequeños debemos encontrar un estiramiento óptimo, se trabajó con un estiramiento desde

45.0 a 46.0 nm en los nanoporos de 100 y 150 nm, al ser nanoporos de un tamaño pequeño se hidrataron con una apertura de 49.0 a 49.5 nm arriesgándonos a tener una deformación a largo plazo en el nanoporo, es por esta razón que solo se utilizó en el proceso de hidratación para obtener líneas basales más estables descartando esas aperturas en el proceso de medición.

$\emptyset_{Promedio}$	$\zeta_{Promedio}$	$\sigma_{potencial}$
175.05	-87.70	74.84

Tabla 3.3: Diámetro y PZ promedios de la formulación L₁A21.

Con la variación en el tamaño del nanoporo podemos observar en las figuras 3.5 y 3.6 que con ciertos tamaños de nanoporo (250 y 150 nm) obtenemos mediciones con un rango de diámetro y PZ similares, mientras que con el nanoporo de 100 nm las variaciones son muy notorias, esto se debe a que un nanoporo de un tamaño pequeño presenta mayor dificultad para hidratarse de manera correcta e incluso la calibración puede tener complicaciones. Los nanoporos de estos tamaños tienden a sufrir una mayor deformación debido a que debemos operar con un mayor estiramiento para tener una línea basal estable y no tener dificultades al medir la formulación.

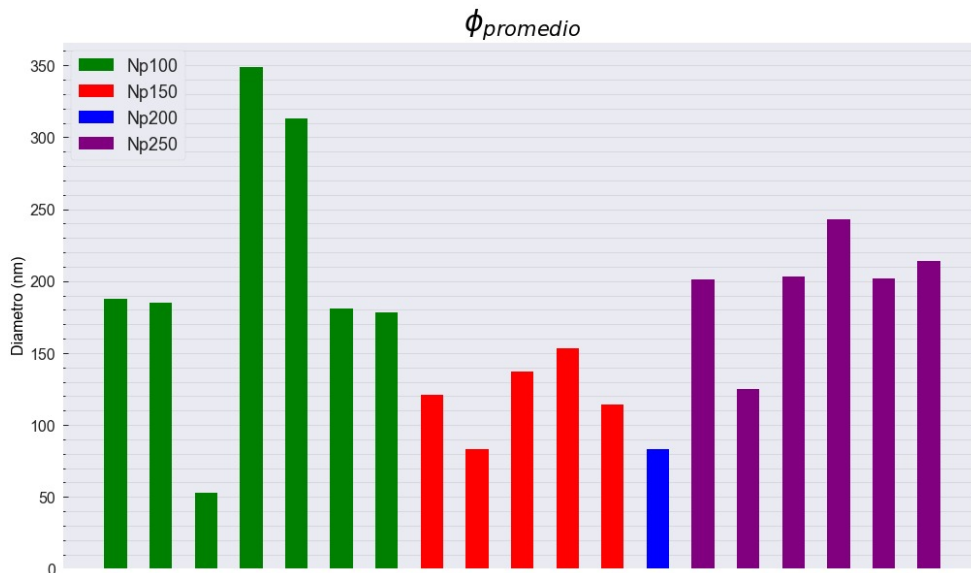


Figura 3.5: Diámetros promedio obtenidos con distintos NP.

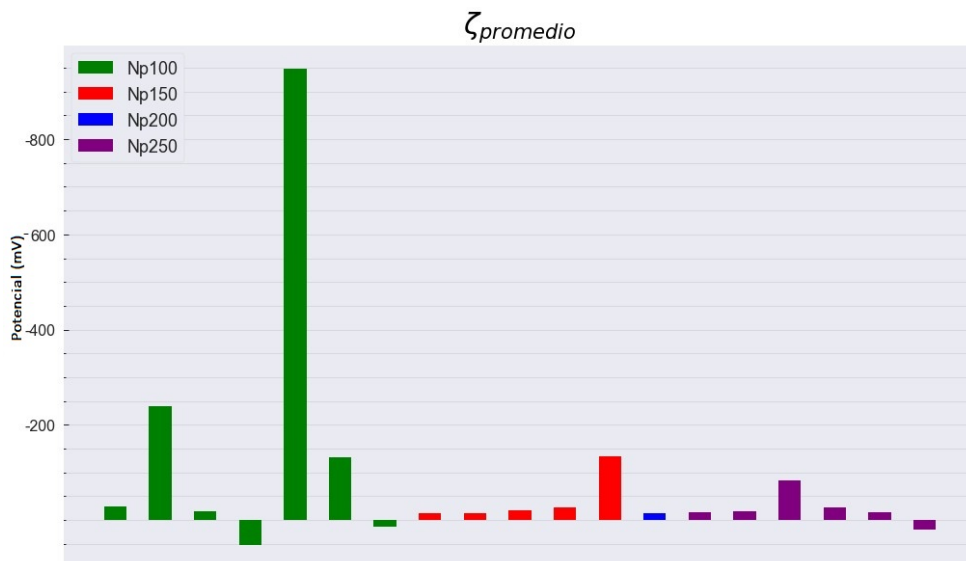


Figura 3.6: Comparación de PZ obtenidos con distintos NP en distintas mediciones.

3.2.1. Diámetro L₁A21

De los datos obtenidos podemos generar la gráfica presentada en la figura 3.7a, en donde se muestran los promedios por día de cada medición, tenemos una variación de diámetros desde los 53 a los 349 nm. Se obtuvo un diámetro promedio de 175.05, se observa una diferencia entre el diámetro promedio de la formulación L₁ y L₁A21

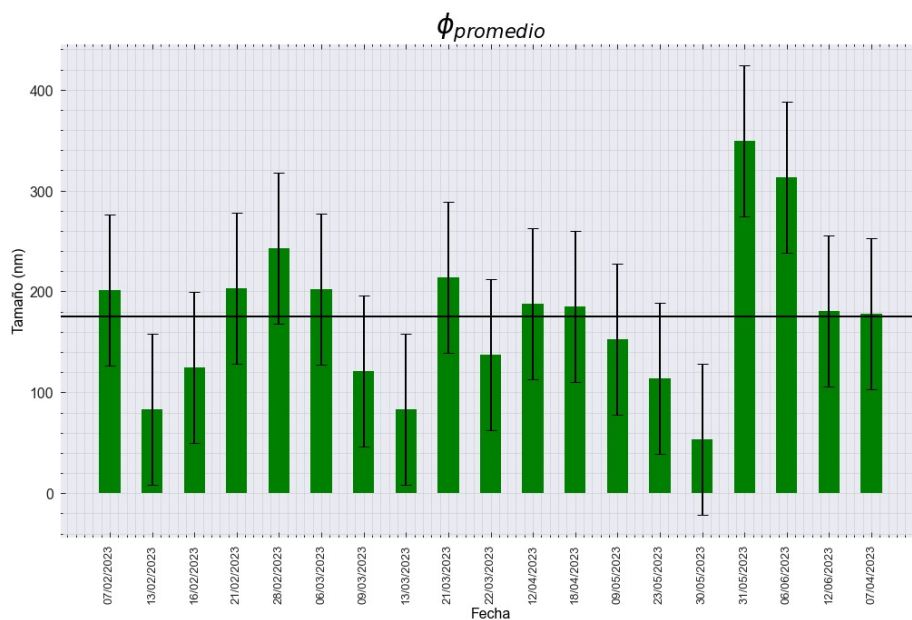


Figura 3.7: Tamaños de diferentes preparaciones de L₁A21 con desviación estándar.

(a) Nota: la línea marcada en el eje horizontal representa el potencial promedio de 175.05 nm.

3.2.2. Tasa de partículas

En esta fase del trabajo notamos una buena cantidad de partículas en la mayoría de las mediciones. Los bloqueos suceden con menor frecuencia, sin generar obstrucciones en el nanoporo que alteraran la línea basal. En cambio, nuestras líneas basales presentaban corrientes inestables en cuestión de voltaje es decir sufrían decaimientos o subidas notorias, analizando las figuras podemos notar que en la figura 3.8a comenzamos con una línea estable con una buena cantidad de partículas detectadas, sufrimos un decaimiento prolongado en la cantidad de bloqueos presentes finalizando con un corte, en esta ocasión podemos adjudicar este corte a que se finalizó el análisis antes de que se completara la medición, esto lo hacemos cuando la línea basal comienza a tener alteraciones drásticas y seguidas que nos alterarían los resultados finales, en la figura 3.8b podemos observar que la línea presenta claras discontinuidades. Se puede observar que inicia de manera continua, en las figuras 3.8c y 3.8d tenemos líneas continuas y con la tendencia lineal que buscamos, aun así podemos observar que en la figura 3.8c tenemos un corte en la línea, esto se debe a que se finalizó la medición antes de terminar de analizar la muestra, la línea basal comenzó a ser muy inestable por lo que lo mejor es detener el análisis.

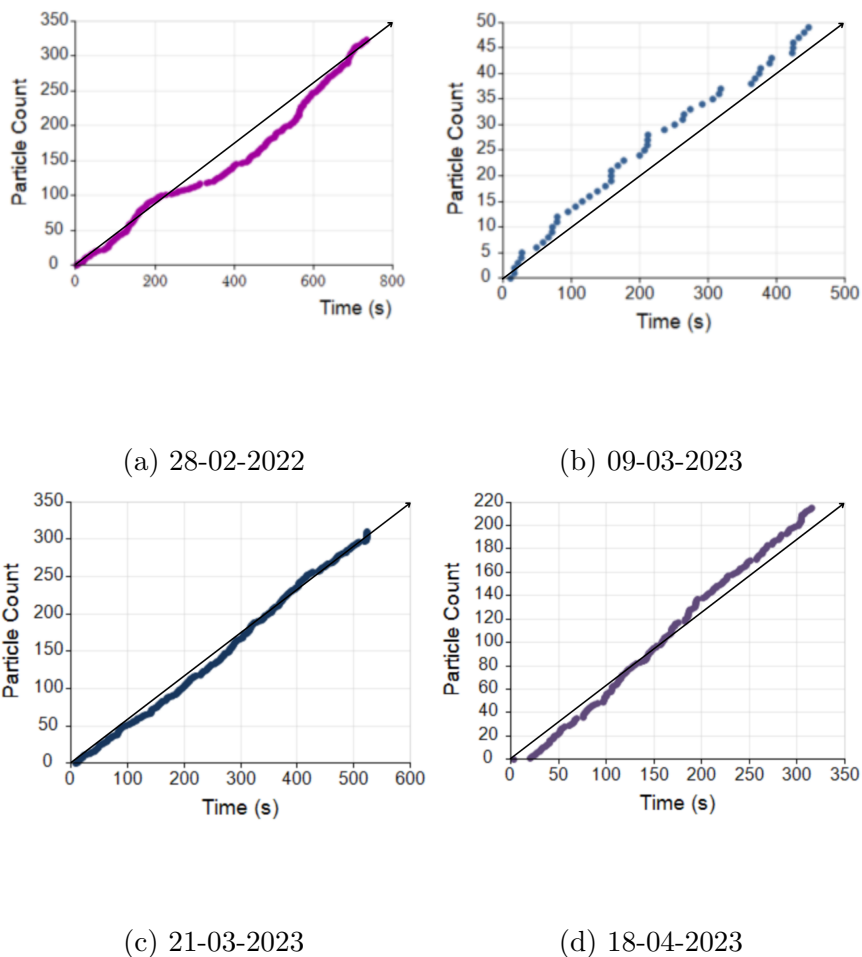


Figura 3.8: Gráficas de la tasa de partículas para la formulación L₁A21.

3.2.3. Potencial zeta L_1A21

El potencial zeta obtenido en esta fase del experimento esta muy por debajo de nuestro PZ deseado, recordando que necesitamos un PZ aproximado a -30 mV para un transporte y entrega óptimo. Con los datos recopilados podemos generar la gráfica 3.9a en donde podemos observar que a diferencia de los datos de PZ en la formulación sin fármaco tenemos presentes potenciales zeta positivos.

Durante las mediciones se logró observar que la formulación requiere al menos un día en refrigeración después de su elaboración para que la formulación tenga mayor estabilidad coloidal, si se mide el mismo día de la elaboración (lo que se hacía generalmente con la formulación L_1) tenemos demasiada inestabilidad en la línea basal (decaimientos y bloqueos frecuentes y duraderos). La hipótesis principal es que no todo el fármaco es encapsulado por lo que habría gran cantidad de partículas presentes en la formulación de diversos tamaños y PZ, lo que nos generaría inestabilidad en el sistema coloidal.

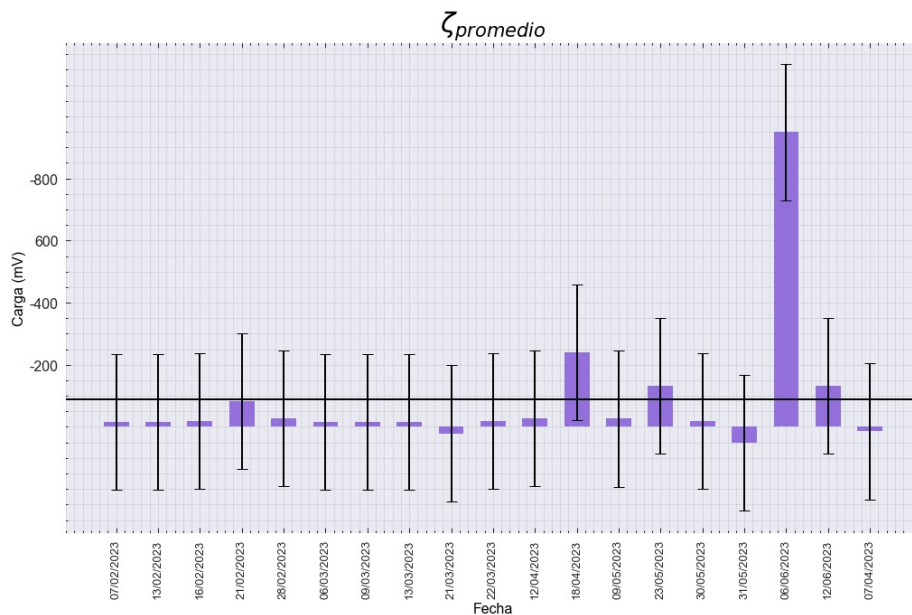


Figura 3.9: PZ de diferentes preparaciones de L_1A21 con desviación estándar.

(a) Nota: la línea marcada en el eje horizontal representa el potencial promedio de -87.70 mV.

3.3. Comparación de L_1 y L_1A21

Para llevar a cabo la comparación se realizó una selección de datos que compartieran similitudes durante la medición, se tomó en cuenta que se midieran con un nanoporo del mismo tamaño y que la variación de voltajes este dentro de los rangos establecidos.

Se seleccionaron los datos medidos con un nanoporo NP250. Para la formulación L_1 se utilizaron las cuatro mediciones obtenidas y para la formulación L_1A21 se llevó a cabo una selección de datos en donde se retiraron los datos que presentaban anomalías como

un potencial zeta positivo o muy negativo.

3.3.1. Comparación de diámetro

Comparando los resultados de L_1 y L_1A21 podemos notar que el diámetro promedio disminuyó al incorporar el A21 acercándose a los 150 nm. La incorporación del fármaco no alteró en gran medida el diámetro de las partículas, pero sí la interacción entre ellas, la formulación requiere de un lapso de reposo para poder analizarla. Esto por una alta actividad manifestada en el día de elaboración de la formulación, como ya se mencionó la hipótesis principal que tenemos es que la incorporación del fármaco en la formulación genera una gran actividad, presentando una gran cantidad de partículas de diversos tamaños y potenciales, esto genera inestabilidad en la línea basal y demasiados bloqueos en el nanoporo ocasionando taponamientos, por lo que necesitaría de un lapso mayor para que la formulación encapsule la mayor cantidad posible de fármaco y podamos realizar una medición sin dificultades generándonos resultados mas confiables.

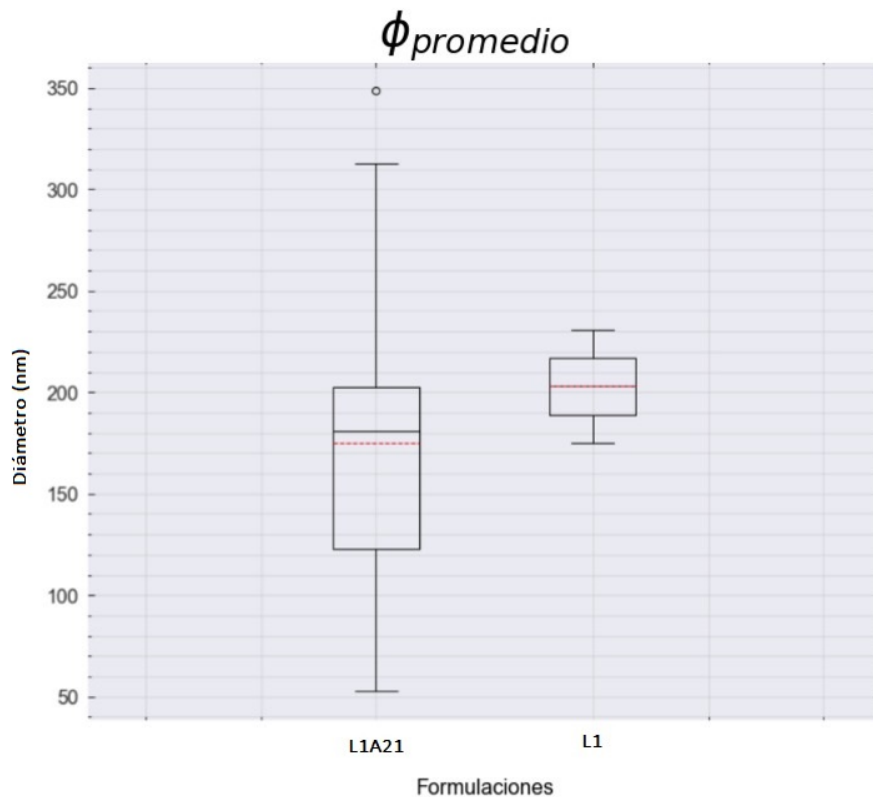


Figura 3.10: Comparación de diámetros entre las formulaciones L_1 y L_1A21 .

(a) Nota: Las barras superiores en la gráfica de caja son los máximos y mínimos sin datos atípicos, la línea punteada roja dentro de la gráfica representa la media, la línea negra continua dentro de la gráfica representa la mediana, la caja indica el intervalo en donde se encuentran los datos y los puntos que se encuentran aún más alejados son considerados valores atípicos.

En la figura 3.12 se presenta un diagrama de cajas en donde se marcan la media (línea roja punteada) y la mediana (línea negra) respectivas de cada formulación.

En la formulación L₁A21 podemos observar una anomalía cercana a los 350 nm.

Para tener un análisis completo se realizó una prueba T-Student. Esta es una herramienta usada en estadística para analizar dos grupos de datos y determinar si son distintos entre sí.

3.4. Prueba T-Student

Es una prueba de estadística utilizada para determinar si los cambios entre las medias de dos poblaciones son significativas o no, esto mediante el planteamiento de dos hipótesis.

H_0 : hipótesis nula, es decir, las medias de ambas muestras son iguales.

H_1 : hipótesis alterna o de diferencias, es decir, las medias son significativamente distintas.

Se estable un valor P o nivel de la significación de $P < 0.05$, también conocido como valor α .

Para muestras tenemos 6 grados de libertad con un valor de α de 0.05.

Para derivar el valor crítico de las colas, las cuales vienen dadas por $\alpha/2 = 0.025$ y los grados de libertad.

Utilizamos una tabla de distribución t de student en donde encontramos que para seis grados de libertad con un valor de $\alpha/2$ de 0.025 nos corresponden valores críticos en las colas de **2.447** esto podemos observarlo con una gráfica de campana.

Para que nuestra hipótesis se cumpla y no tengamos cambio significativo, el valor T estadístico debe encontrarse en el rango de las dos colas, figura 3.11.

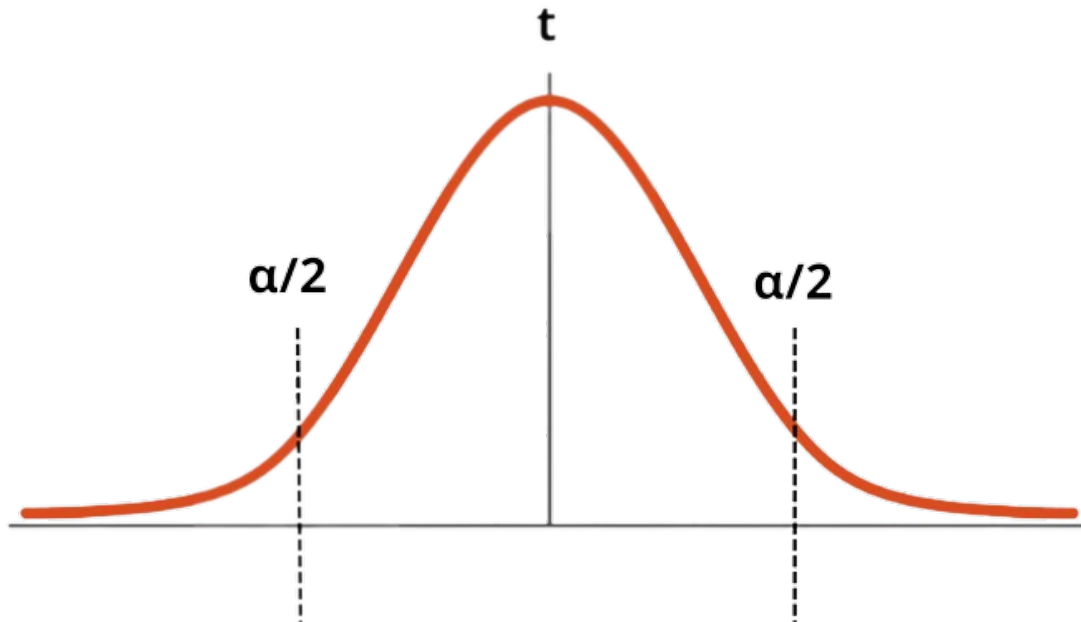


Figura 3.11: Esquema prueba T campana.

3.4.1. Prueba T-Student para diámetro

Datos para diámetro	
L ₁	L ₁ A21
234	201
101	125
273	243
315	202

Tabla 3.4: Datos usados para prueba T para diámetro.

Para la prueba T-Student hicimos una selección de datos, se usaron datos que se hayan medido con un nanoporo del mismo tamaño y con voltajes usados similares. Los datos de los diámetros usados se presentan en el cuadro 3.4.

Se consideró una prueba en donde las muestras no están relacionadas, esto debido a que las muestras no presentan dependencia entre sí.

Hipotesis nula: los promedios son iguales		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	L1	L1A21
Media	230.75	192.75
Varianza	8576.25	2422.91667
Observaciones	4	4
Varianza agrupada	5499.583333	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	0.724659018	
P(T<=t) una cola	0.247968264	
Valor crítico de t (una cola)	1.943180281	
P(T<=t) dos colas	0.495936528	
Valor crítico de t (dos colas)	2.446911851	

Figura 3.12: Prueba T para diámetro.

De esto podemos concluir que el cambio en el diámetro debido a la presencia del A21 no es significativo, por lo que la incorporación del fármaco no afecta de manera significativa en el diámetro de las partículas, esto lo podemos notar en el valor estadístico T presente en la figura 3.12, para mayor claridad podemos observarlo en la gráfica de campana presente en la figura 3.13.

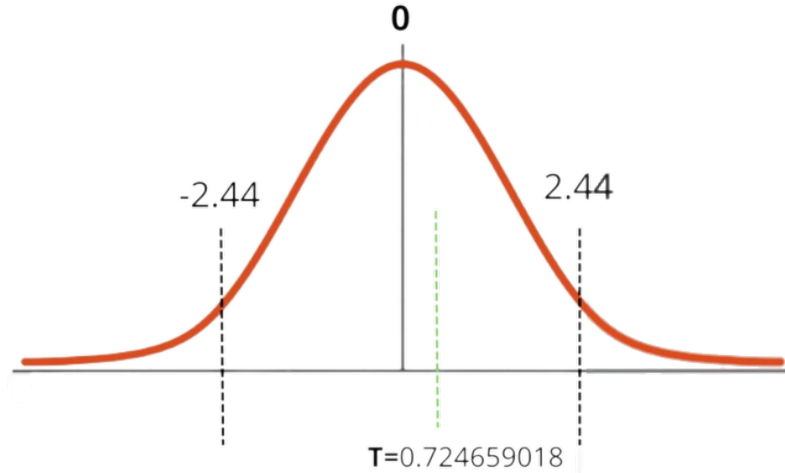


Figura 3.13: Gráfica de campana con valor estadístico $T_{diametro}$ marcado en color verde.

3.4.2. Comparación potencial zeta

Analizando los datos de la formulación L_1A21 podemos observar tres anomalías, la incorporación del fármaco genera un cambio significativo en el potencial zeta.

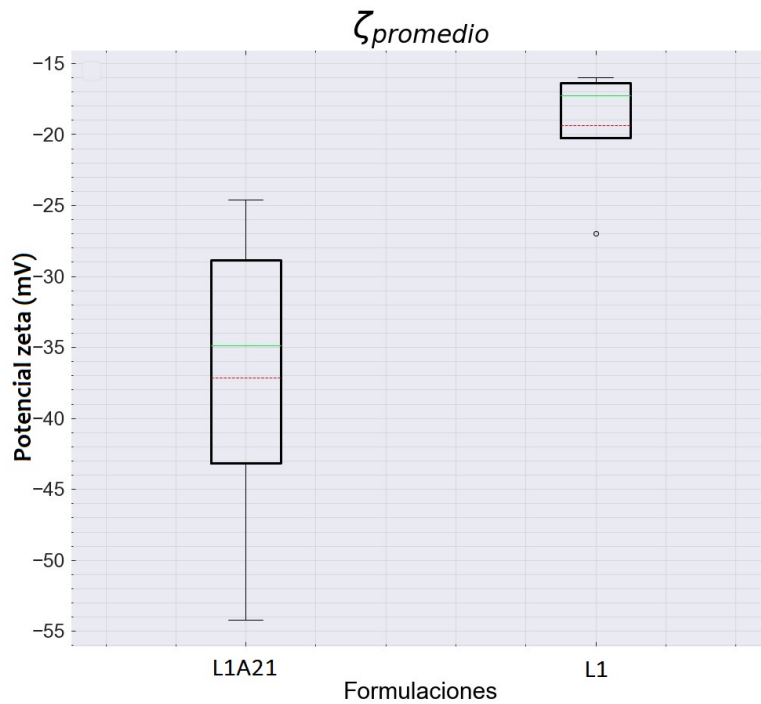


Figura 3.14: Comparación de potencial zeta entre las formulaciones L_1 y L_1A21 .

3.4.3. Prueba T-Student para potencial zeta

Se utilizaron los datos correspondientes a las mismas muestras analizadas en el diámetro, los valores se presentan en el cuadro 3.5.

Datos para potencial zeta	
L ₁	L ₁ A21
-24.6	-16.5
-39.5	-18.0
-54.2	-27.0
-30.3	-16.0

Tabla 3.5: Datos usados para prueba T en PZ.

Respetando la misma hipótesis se obtuvieron los siguientes resultados:

Hipotesis nula: los promedios son iguales		
Prueba t para dos muestras suponiendo varianzas iguales		
	L1	L1A21
Media	-37.15	-19.375
Varianza	166.8833333	26.5625
Observaciones	4	4
Varianza agrupada	96.72291667	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	6	
Estadístico t	-2.555994501	
P(T<=t) una cola	0.02157039	
Valor crítico de t (una cola)	1.943180281	
P(T<=t) dos colas	0.043140781	
Valor crítico de t (dos colas)	2.446911851	

Figura 3.15: Prueba T para PZ.

Para este análisis observamos que la incorporación de fármaco, si interfiere en el PZ que tienen las partículas, se nota una disminución en los valores del PZ.

Recordando que el potencial zeta depende de la doble capa, la hipótesis principal es que la incorporación y encapsulamiento del A21 afecta en el potencial del coloide, lo que genera que tenga mayor o menor atracción en la capa de Stern y en la doble capa difusa lo que nos da como resultado la variación en el potencial zeta.

El cambio es significativo, lo podemos notar en la gráfica 3.16 en donde observamos que el valor estadístico de T está fuera de las colas, dándonos como resultado una variación en las medias significativa.

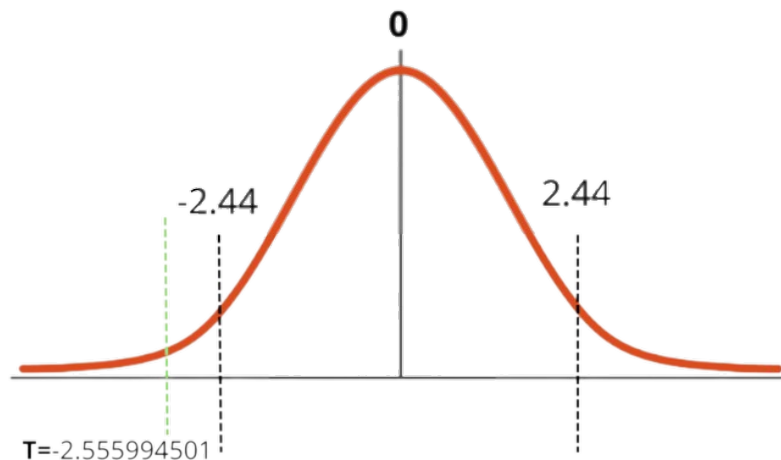


Figura 3.16: Gráfica de campana con valor estadístico $T_{potencial}$ marcado en color verde.

3.4.4. Hipótesis para el cambio de PZ

Como ya se mencionó la hipótesis principal es que la incorporación de fármaco interfiere con la carga superficial del coloide, lo que afecta en la atracción de iones para la doble capa difusa y por lo tanto el PZ que presente la partícula, esto nos lleva a preguntarnos ¿el fármaco A21 por sí solo tiene carga? En la figura 1.3 tenemos la estructura del A21 en donde podemos observar cuatro grupos principales encerrados, en color amarillo tenemos un residuo de micosamina, el fármaco podría obtener carga en el nitrógeno de este residuo. Se obtiene carga (generalmente positiva) debido a una protonación, el nitrógeno se protona en pH ácido y en algunas ocasiones podría protonarse en pH neutro, lo que podría darle un carácter positivo al A21.

Esto generaría que al encapsular el fármaco, suponiendo que adquirió carga positiva interfiere con la carga negativa del coloide y esto genera una menor atracción en la doble capa difusa, lo que genera un cambio en el potencial zeta.

Teniendo el concepto de fuerza electromotriz ¹ que se expresa como:

$$\epsilon = \int_L \vec{E} \cdot d\vec{l} \quad (3.1)$$

Tenemos dos factores que podrían alterar los resultados, el campo eléctrico (\vec{E}) y la distancia recorrida (L), siguiendo con la hipótesis de la alteración en la carga del coloide podemos imaginar que tenemos una interacción como en la figura 3.17.

La distancia entre la capa de Stern y la capa difusa determina el potencial zeta que tendremos.

La separación entre estas capas se determina por la fuerza de atracción que tenga el coloide con el resto de los iones, como ya se mencionó se adhiere una capa de iones fija a la superficie de manera organizada y fija, aun así la fuerza del coloide sigue atrayendo más iones lo que forma la capa difusa, si la carga del coloide disminuye se vera afectada la capa

¹El trabajo por unidad de carga realizado por el campo eléctrico cuando desplazamos una carga a lo largo de la trayectoria L

difusa, pues no tendrá la suficiente fuerza de atracción para atrapar una gran cantidad de iones, por lo tanto, la distancia entre ambas capas disminuirá de manera significativa lo que causara una disminución en el potencial zeta, recordando que este potencial es la diferencia entre la capa difusa y la capa de Stern.

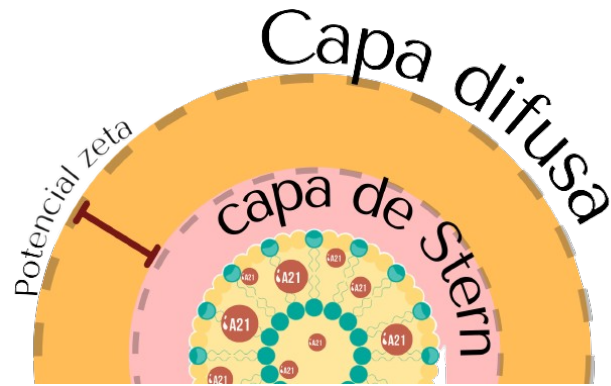


Figura 3.17: Gráfica de campana con valor estadístico $T_{potencial}$ marcado en color verde.

Capítulo 4

Conclusiones y trabajo a futuro

Podemos concluir que el uso de la técnica TRPS resultó eficiente para conocer las propiedades fisicoquímicas (tasa de partículas, diámetro y PZ) de las formulaciones estudiadas. Aun así es necesario implementar más técnicas a una misma formulación para tener una caracterización más completa. La implementación de agitación ultrasónica durante 60 min resultó óptima para obtener una formulación estable sin coágulos ni floculaciones, esto gracias a diversas pruebas realizadas con distintos tiempos de sonicación ultrasónica.

De la comparación de las formulaciones L_1 y L_1A21 podemos concluir que el potencial zeta (-19.375 mV) y diámetro (192.75 nm) promedio obtenido de la formulación con fármaco aún está lejos de los ideales buscados, pero ya contamos con un referente a las características y comportamiento de la formulación.

En el trabajo a futuro se espera implementar un nuevo paso en la elaboración de la formulación o encontrar alternativas para obtener partículas de menor tamaño, así como resolver el problema que presenta la formulación al ser sometida en agitación ultrasónica después de la fecha de elaboración, se plantea la idea de implementar otra técnica para tener una nueva perspectiva sobre las características y comportamiento de la formulación.

Apéndice A

Lavado de jeringas micrométricas

SIEMPRE QUE SE UTILICE CLOROFORMO O METANOL SE DEBE TRABAJAR CON LA CAMPANA DE EXTRACCIÓN ENCENDIDA

1. Antes de usarse, las jeringas deben enjuagarse con cloroformo/metanol 1/1 v/v.
2. Se utilizará un vaso de precipitado limpio en el cual se colocará el cloroformo/metanol.
3. Las jeringas se enjuagarán llenándolas por completo en 10 repeticiones.
4. Cada descarga de volumen se desechará en una charola metálica.
5. Enjuagar la aguja de la jeringa con un flujo continuo por los menos 10 segundos, esto dentro de la charola metálica.
6. Dejar secar las jeringas dentro de la campana.
7. Vaciar el exceso de solvente en los recipientes adecuados.
8. Al finalizar el uso de las jeringas debe repetirse el proceso de lavado.
9. Guardar y almacenar las jeringas en su lugar.

NOTAS:

- En caso de que las jeringas estén “Tapadas” retirar el émbolo por completo, colocar de nuevo y verificar que se desbloqueó.
- En caso de que el émbolo este “apretado” llenar la jeringa por la parte posterior con la piseta y posteriormente insertar el émbolo para retirar el fluido. Repetir 10 veces y después enjuagar las jeringas a un cuarto de su capacidad (1 a 3 repeticiones).

Apéndice B

Configuración del nanoporo

Utilizar dos pipetas para medir 75 y 35 μl **NO MEZCLAR LAS PUNTAS DE SOLUCIÓN DE HIDRATACIÓN (SH), SOLUCIÓN DE MEDICIÓN (SM), PARTÍCULAS DE CALIBRACIÓN (CPC), RECUBRIMIENTO (COAT) Y FORMULACIÓN A MEDIR.**

En todo momento utilizar la técnica de pipeteo inverso en el equipo IZON EXOID. Explicada en el anexo B

1. Encender el ordenador, se abre el software. Colocar el cable de corriente en el equipo y encender.
2. Asegurarse que tenga conexión con el equipo.
3. Abrir el apartado “*Detalles de la investigación*” e ingresar el número de nanoporo (NP) y el número de identificación, por ejemplo: (A63187).
4. Abrir la tapa del Exoid y retirar la jaula de Faraday y la celda superior, es importante que para este momento podamos observar la línea de corriente¹. Colocar el poro con el número de serie hacia arriba, asegurándose que los orificios de nanoporo coincidan de manera correcta con los dientes de agarre que tiene el Exoid.
5. Presionar “*configurar*”, con esto el nanoporo comenzará a estirarse un poco, (en caso de que no lo haga modificar la apertura del poro entre un 47 - 49 nm), esta apertura dependerá del NP con que estemos trabajando, para nanoporos de tamaños grandes (NP200 o NP250) es recomendable utilizar una apertura de 47 nm para hidratar, con nanoporos más pequeños (NP100 o NP150) es recomendable utilizar **SOLAMENTE PARA HIDRATAR** una apertura de 49 nm.
6. Para dar inicio a la hidratación con **solución de hidratación SH** se colocarán los 75 μl de SH en la celda inferior, procurando no tener derrames ni burbujas, ya que esto puede afectar la medición.

¹En caso de que el equipo no detecte línea de corriente, se recomienda cerrar el software y volver a abrir, esto solucionará el problema y aparecerá la línea de corriente, en caso de que no suceda llamar al Doctor encargado de laboratorio.

7. Colocar la celda superior. Se colocará embonando la celda con las barras que tiene el Exoid (mostrado en la figura B.1, debe embonar las barras del equipo con la sección señalada con la flecha) , se girará un poco en sentido de las manecillas de reloj hasta escuchar un ligero “pop”, podemos visualizar en la pantalla como la línea de corriente es un poco más estrecha y estable.
8. Una vez colocada la celda superior se coloca la jaula de Faraday y se procede a colocar los 35 μl de SH en el orificio de la celda superior, procurar no tener derrames, en caso de que un poco de SH haya caído fuera de la boquilla secar con un paño, Se cierra la boquilla de presión y la tapa del Exoid, dar “Inicio” en el software.
9. Terminado el proceso de hidratación con SH el sistema nos pedirá retirar el nanoporo, desmontamos la parte superior, antes de bajar la apertura del nanoporo, con la pipeta se retirará la mayor cantidad de los 75 μl de SH en la celda inferior, retiramos cuidadosamente el nanoporo, secamos la celda inferior, lavamos el nanoporo y la celda superior con H_2O_d , secamos perfectamente con paños y si es necesario con aire comprimido.
10. Colocar el nanoporo seco, dar clic en aceptar, se modificará la apertura del nanoporo automáticamente, una vez estirado el nanoporo se colocara SM como se describió en los pasos **6, 7 y 8**, en todo momento el software le mostrará en la pantalla el porcentaje de avance en la hidratación e indica lo que necesite ajustar².
11. Después de este proceso ya no se retirará la SM hasta el proceso de limpieza del nanoporo. Es importante revisar constantemente que la celda inferior del nanoporo no se quede sin SM, esto puede suceder debido a que el análisis está durando demasiado tiempo o a cambios en la temperatura del entorno, el equipo necesita condiciones de temperatura y humedad óptimas para un mejor funcionamiento. La temperatura ambiente de 5 a 40 °C es segura para el funcionamiento del EXOID; sin embargo, el funcionamiento a 5-25 °C es recomendado por el manual operativo y una humedad relativa del 20 al 80 %
12. Para calibrar se realizará el procedimiento de limpieza. Se retirará la celda superior, se limpiará el nanoporo, pero en esta ocasión **NO SE RETIRARÁ EL NAOPORO NI EL SM DEL CANAL INFERIOR**. El sistema preguntará si se necesita hacer el procedimiento de recubrimiento, eso puede hacerse o no dependiendo del caso, cuando se trabajen con muestras biológicas es necesario colocar el recubrimiento (COAT).
13. Para el proceso de pre-calibración se colocarán los 35 μl de las partículas de calibración (la concentración y tamaño de estas partículas es variable dependiendo el nanoporo utilizado, en la tabla B.1 se muestran las concentraciones sugeridas para cada tipo de nanoporo) en la celda superior. Ya montado todo se comienza la calibración, en la parte de la calibración el equipo nos arrojará un rango de partículas

²En algunas ocasiones el nanoporo puede presentar problemas para hidratar con SM y no concluirá el ajuste automático y no nos dejara avanzar, en estas ocasiones podemos saltarnos al paso de análisis, reintentar la hidratación desde el principio o probar con un nuevo nanoporo

medibles, esto nos servirá para que cuando realicemos el análisis de nuestra muestra tengamos un punto de referencia en la apertura del nanoporo.

14. Una vez terminado el proceso de pre-calibración podemos comenzar el análisis deseado, el equipo nos ofrece dos tipos de análisis "*Tamaño contra concentración*" y "*Tamaño contra PZ*", en cualquiera de los dos análisis el equipo nos pide una calibración, en el análisis de tamaño y concentración se varían presiones y en el análisis de tamaño y potencial zeta la variación ocurre en el voltaje.



Figura B.1: Ilustración de la celda superior. Nota: Adaptada del manual de usuario del equipo Izon Exoid.

Tamaño de nanoporo	Rango de medición (nm)	Partículas de calibración	Concentración/ mL
NP100	50-330	CPC100, 200	5×10^{10}
NP150	70-420	CPC100, 200	5×10^9
NP200	85-500	CPC200, 400	5×10^9
NP250	110-630	CPC200, 400	2×10^9
NP300	150-900	CPC400, 500, 800	1×10^9
NP400	165-1100	CPC400, 500, 800	5×10^8
NP600	275-1570	CPC500, 800, 1000	5×10^8
NP800	385-2050	CPC800, 1000	1×10^8
NP1000	490-2900	CPC1000, 2000	5×10^7
NP2000	935-5700	CPC2000, 4000	5×10^6
NP4000	1990-11300	CPC4000	5×10^5

Tabla B.1: Concentración sugerida de partículas de calibración para cada tipo de nanoporo.

B.1: Limpieza del nanoporo.

Una vez terminadas las mediciones se procederá a limpiar el nanoporo.

- Se retirarán la formulación liposomal de la celda superior y se agregará SM durante dos minutos a una presión de 2500 Pa, Este paso se repetirá durante tres ocasiones **NO DAR CLIC EN EL ANÁLISIS DE LIMPIEZA.**
- En la tercera repetición se dará inicio al análisis de limpieza, una vez terminado el análisis, el sistema pedirá cambiar la SM por dH₂O en la celda superior e inferior, la apertura se modificará en el software.
- Cuando ambas celdas ya contengan dH₂O se da inicio de nuevo al análisis.
- Una vez terminado este proceso, se retira la boquilla de presión (no retirar si la presión no es cero). Se desmonta por completo el nanoporo; Se limpia la celda superior, el nanoporo y el canal inferior.
- Se guarda el nanoporo seco en la bolsa correspondiente, se coloca la celda superior, la jaula y la boquilla de presión. Se cierra el software. **SIEMPRE REVISAR QUE EL EQUIPO QUEDE APAGADO Y DESCONECTADO.**

B.2 Técnica de pipeteo inverso

1. Coloque una punta desechable en el cono de la pipeta.
2. Presione totalmente el botón del pistón hasta el **SEGUNDO TOPE**.
3. Sumerja la punta en el líquido y vuelva a subir el pistón lentamente hasta la posición superior.
4. Para dispensar, apoye el extremo de la punta contra la pared del recipiente y presione el pistón solo hasta el **PRIMER TOPE**.
5. Retire la punta del recipiente receptor sin expulsar el líquido que queda.
6. Si lo desea, devuelva el exceso de muestra de la punta al recipiente de la muestra original.

Apéndice C

Dificultades

Para este experimento se presentaron distintas problemáticas en torno al potencial zeta, esto debido a que al no ser un valor estandarizado y fijo cuenta con dos dependencias principales:

- Dependencia de la sustancia en la que se encuentre suspendido.
- La concentración y soporte del electrolito en que se encuentre la formulación (pH).

Para trabajar con esto se consideraron protocolos para la elaboración de la formulación y para realizar las mediciones.

Es importante aplicar un recubrimiento al nanoporo al momento de hidratarse, para la formulación L₁A21 este paso es de suma importancia, ya que esto no ayuda a hidratar mejor el nanoporo y lograr que el nanoporo no se obstruya, es importante filtrar las soluciones SH, Cout, dH₂O y SM antes de medir con ellas.

Es necesario dejar en refrigeración la formulación L₁A21, esto para conseguir una mayor estabilidad en la formulación y en las partículas, el tiempo apto para medir dicha formulación son 1-5 días después de elaborarla, después de este lapso la formulación puede presentar inestabilidad (bloques demasiado grandes) o ausencia de partículas.

C.0.1. Observación

Es preferible colocar la formulación L₁A21 en agua caliente (50° C) y utilizar el vortex, si se utiliza sonicador NO SONICAR MÁS DE 20 MIN. Esto debido a que la formulación comienza a perder la coloración característica del A21 y comenzamos con ausencia de partículas.

Bibliografía

- [1] Sharma, Vikash Kumar y Manoj Kumar Agrawal: *A historical perspective of liposomes-a bio nanomaterial*. Materials Today: Proceedings, 45, Febrero 2021.
- [2] Bozzuto, Giuseppina y Agnese Molinari: *Liposomes as nanomedical devices*. International Journal of Nanomedicine, 10:975, Febrero 2015. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4324542/>.
- [3] Sánchez-Saldana, Leonardo y Galarza, Carlos y Matos Sánchez Rebeca: *Enfermedades micóticas sistémicas o profundas: paracoccidioidomicosis*. Dermatol. peru, páginas 59–74, 2010.
- [4] Brown, Gordon D., David W. Denning, Neil A. R. Gow, Stuart M. Levitz, Mihai G. Netea y Theodore C. White: *Hidden Killers: Human Fungal Infections*. Science Translational Medicine, 4(165):165, 2012.
- [5] Cuenca-Estrella, Manuel: *Antifungal agents in the treatment of systemic infections: Relevance of mechanism of action, activity profile and resistances*. Rev. Esp. Quimioter., 23(4):169–176, 2010.
- [6] Ruiz-Camps, Isabel y Manuel Cuenca-Estrella: *Antifúngicos para uso sistémico*. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin., 27(6):353–362, 2009.
- [7] Rivera-Toledo, Evelyn, Alan Uriel Jiménez-Delgadillo y Patricia Manzano-Gayosso: *Antifúngicos poliénicos. Mecanismo de acción y aplicaciones*. Revista de la Facultad de Medicina UNAM, 63(2):7–17, 2020.
- [8] Botero, Martha C, Marcela Puentes-Herrera y Jorge A Cortés: *Formas lipídicas de anfotericina*. Revista chilena de infectología, 31:518–527, Octubre 2014.
- [9] Daraee, Hadis, Ali Etemadi, Mohammad Kouhi, Samira Alimirzalu y Abolfazl Akbarzadeh: *Application of liposomes in medicine and drug delivery*. Artif. Cells Nanomed. Biotechnol., 44(1):381–391, 2016.
- [10] Antillón, A., Alexander de Vries, Marcel Espinosa-Caballero, José Marcos Falcón-González, David Romero, Javier González-Damián, Fabiola Eloisa Jiménez-Montejo, Angel León-Buitimea, Manuel López-Ortiz, Ricardo Almeida Magaña, Siewert J Marink, Rosmarbel Morales-Nava, Xavier Perirole, Jorge Reyes-Esparza, Josué Rodríguez

- Lozada, Tania Minerva Santiago-Angelino, María Jesús González González, Ignacio Regla, Mauricio Carrillo-Tripp, Mario Fernández-Zertuche, Lourdes Rodríguez-Fragoso y Iván Ortega-Blake: *An Amphotericin B Derivative Equally Potent to Amphotericin B and with Increased Safety*. PlosOne, 11, 2016.
- [11] Baginski, M y J Czub: *Current Drug Metabolism*. 10:459–469, 2009.
- [12] Antillon, A, A de Vriesf, M Espinosa-Caballero, J M Falcon-Gonzalez, D Flores-Romero, J Gonzalez-Damian, F E Jimenez-Montejo, A Leon-Buitimea, M Lopez-Ortiz, R Magana, S J Marrinkf, R Morales-Nava, X Periole, J Reyes-Esparza, J Rodríguez Lozada, T M Santiago-Angelino, M C Vargas Gonzalez, I Regla, M Carrillo-Tripp, M Fernandez-Zertuche, L Rodríguez-Fragoso y Ortega-Blake: , I. *PLoS One*. 11(9):1–38, 2016.
- [13] Liu, Peng, Guiliang Chen y Jingchen Zhang: *A review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and future perspectives*. *Molecules*, 27(4):1372, 2022.
- [14] Guimarães, Diana, Artur Cavaco-Paulo y Eugénia Nogueira: *Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications*. *International Journal of Pharmaceutics*, 601:120571, Mayo 2021.
- [15] Shah, Sanket, Vivek Dhawan, René Holm, Mangal S Nagarsenker y Yvonne Perrie: *Liposomes: Advancements and innovation in the manufacturing process*. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 154-155:102–122, 2020.
- [16] Cox, Michael y David Nelson: *Lehninger. Principios De Bioquímica 7 Ed.* Ediciones Omega, 2019.
- [17] Carvajal Carvajal, Carlos: *Lípidos, proteínas y aterogénesis*. EDNASSS, 2020.
- [18] Beltrán-Gracia, Esteban, Adolfo López-Camacho, Inocencio Higuera-Ciapara, Jesús B Velázquez-Fernández y Alba A Vallejo-Cardona: *Nanomedicine review: clinical developments in liposomal applications*. *Cancer Nanotechnol.*, 10(1), 2019.
- [19] Trucillo, Paolo, Roberta Campardelli y Ernesto Reverchon: *Liposomes: From Bangham to Supercritical Fluids*. *Processes*, 8(9), 2020, ISSN 2227-9717.
- [20] Nagavarma, B.V.N, Hemant Yadav, A Ayaz, L Vasudha y H Shivakumar: *Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles- A review*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5:16–23, Enero 2012.
- [21] Amarandi, Roxana Maria, Alina Ibanescu, Eugen Carasevici, Luminita Marin y Brindusa Dragoi: *Liposomal-based formulations: A path from basic research to temozolomide delivery inside glioblastoma tissue*. *Pharmaceutics*, 14(2):308, 2022.
- [22] Németh, Zsófia, Ildikó Csóka, Reza Semnani Jazani, Bence Sipos, Henrik Haspel, Gábor Kozma, Zoltán Kónya y Dorina Gabriella Dobó: *Quality by design-driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives*. *Pharmaceutics*, 14(9):1798, 2022.

- [23] Midekessa, Getnet, James Godakumara, Kasun y Ord, Janeli Viil, Freddy Lättekivi, Keerthie Dissanayake, Sergei Kopanchuk, Ago Rincken, Aneta Andronowska, Sourav Bhattacharjee, Toonika Rincken y Alireza Fazeli: *Zeta potential of extracellular vesicles: Toward understanding the attributes that determine colloidal stability*. ACS omega, 5(27):16701–16710, 2020.
- [24] Atkins, Peter y Julio De Paula: *Atkins' physical chemistry*. Oxford University Press, Londres, Inglaterra, 8ª edición, 2006. 714-717.
- [25] *Coagulation & Flocculation*. <http://www.zeta-meter.com/coag.pdf>, 1993. Accessed: 2022-11-10.
- [26] Smith, Mackensie C., Rachael M. Crist, Jeffrey D. Clogston y Scott E. McNeil: *Zeta potential: a case study of cationic, anionic, and neutral liposomes*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 409:5779–5787, Julio 2017.
- [27] Bhattacharjee, Sourav: *DLS and zeta potential – What they are and what they are not?* Journal of Controlled Release, 235:337–351, Agosto 2016.
- [28] Vogel, Robert, Frank A. W. Coumans, Raluca G. Maltesen, Anita N. Böing, Katherine E. Bonnington, Marike L. Broekman, Murray F. Broom, Edit I. Buzás, Gunna Christiansen, Najat Hajji, Søren R. Kristensen, Meta J. Kuehn, Sigrid M. Lund, Sybren L. N. Maas, Rienk Nieuwland, Xabier Osteikoetxea, Rosalie Schnoor, Benjamin J. Scicluna, Mitch Shambrook, Jeroen de Vrij, Stephen I. Mann, Andrew F. Hill y Shona Pedersen: *A standardized method to determine the concentration of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing*. Journal of Extracellular Vesicles, 5:31242, Enero 2016.
- [29] Sivakumaran, Muttuswamy y Mark Platt: *Tunable resistive pulse sensing: potential applications in nanomedicine*. Nanomedicine, 11:2197–2214, Agosto 2016.
- [30] Willmott, Geoff R.: *Tunable Resistive Pulse Sensing: Better Size and Charge Measurements for Submicrometer Colloids*. Analytical Chemistry, 90:2987–2995, Febrero 2018.
- [31] Weatherall, Eva y Geoff R. Willmott: *Applications of tunable resistive pulse sensing*. The Analyst, 140:3318–3334, 2015.
- [32] Willmott, Geoff R y Peter W Moore: *Reversible mechanical actuation of elastomeric nanopores*. 19:475504–475504, Octubre 2008.
- [33] Kozak, Darby, Will Anderson, Matthew Grevett y Matt Trau: *Modeling Elastic Pore Sensors for Quantitative Single Particle Sizing*. The Journal of Physical Chemistry C, 116:8554–8561, Marzo 2012.
- [34] Garza-Licudine, Edolfo, Darrel Deo, Sam Yu, Asma Uz-Zaman y William B. Dunbar: *Portable nanoparticle quantization using a resizable nanopore instrument - the*

IZON qNano™. Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual International Conference, 2010:5736–5739, 2010.

- [35] *Beyond Bulk Estimates: How TRPS Outperforms DLS*. <https://www.izon.com/trps/compare-dls-and-trps>.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
CONTROL ESCOLAR DE LICENCIATURA



VOTOS DE APROBATORIOS



**SECRETARIA EJECUTIVA
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS**

P R E S E N T E

Por medio del presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la **C. BAHENA HERRERA JOSELINE ARELI** con número de matrícula **10018792** cuyo título es:

Caracterización de formulaciones liposomales de polienos mediante detección sintonizable de pulsos resistivos

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **LICENCIADO EN CIENCIAS ÁREA TERMINAL EN FISICA**

Cuernavaca, Mor a 21 de marzo de 2024

Atentamente
Por una humanidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

DR. JOAQUÍN ESCALONA SEGURA	(PRESIDENTE)
DR. ALDO FIGUEROA LARA	(SECRETARIO)
DR. ARTURO GALVÁN HERNÁNDEZ	(VOCAL)
DRA. LUCERO DÍAZ PERALTA	(SUPLENTE)
DR. RODRIGO SAID RAZO HERNÁNDEZ	(SUPLENTE)

MIE/VRRC/eae





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ARTURO GALVAN HERNANDEZ | Fecha:2024-03-21 09:22:45 | Firmante

h9CIY2OKUnNYu4jitKOQegL8o9PHKQ8BVLTKZGenwt7FEyQRwgC5WADFf8AslXTIzHrMHNHOiEUCN+HCyDkXSpj24sQlshfg4olA7JgD/jmuPrvAZ4775cURUg0Xd4o2l0dsYfErThk+3QRIVGEnSDZmshcpvDT5lcy7g3fpaJipMOhTLLzCMICV3aRD6mMi+kkE3g0e90Xj+q12SGxGjjkSKLUOd6EMU5NL60tdhLxAc4by6Zez8g6CvoVPrDHP7yrEJ+XQNaHtCgHDV5noFtdZOCg4qInxNI0sWUzUixj6YjHUTZ1EiljG6rPOpHSOwae6Uhrf91sRtyJfgcg==

LUCERO DIAZ PERALTA | Fecha:2024-03-21 13:33:21 | Firmante

KUUJ7g0xRMYdCdhSzt949kzBlwocNK1TIXjuC7Nmjow006oaxmu1tdp0w9LzxF0TlzxopTl4Bls62Wf3hq1GTFJogam9H9yAYECxoQDeeSpNWtm2u3bLpDshvV3yCDEP8vMFWcJagegb06vMD6PYTVutUwPRTKnoq+3gnseAva+QnETT43jzOpof5KbLuHVBdtKlqB3QNw3jCh+84Az/8uClS/yStMRzvPjjYk9aWmj0dgwx1D6C7hgMKbu7dKFCByKb17luJMGR AZ4dXdljtTothWWWkwebXptW1bGNkIiUx/laWWW/dA0dBmA5pLoUS0Yxr1j0y5p1KowtolgEwA==

ALDO FIGUEROA LARA | Fecha:2024-03-21 22:09:24 | Firmante

WcNGF3mmRdu7K6ztMp4rhJONQ/n8y8+ggBpMD4LdvitHStjcdXq6gORJKXOXVhIGGkAHvAJN6Y6ef1UE3PiD2CCD/sXHkDrtzUNDHuKkVotTop0QIfGW1bCSE5c2tlgOST5Ag+SMfEkmx1K4YcJrzFH7xjwMm0hqAgtntgu+dGVu3yCEm5ekiNcx12bXZAmcV3GFxf8YUqh0UKUSo4/VvSgB/odlQR5WUmuNoFNlvJBdJ+lqEYflicS2+VZLinFMjPyx9SB6PopVMLm/vY7pwxliQF20FJPSi4dWqtmJ99gea76ElZ9WUKNrtKyk3S5thkhwwpTBolO8NuhBhJoOg==

JOAQUIN ESCALONA SEGURA | Fecha:2024-03-22 09:48:32 | Firmante

wZTIama0WTr6mSBvZhp7/mWY1Nc1NV7at9cG82ylAD0RQc3ZPcjegNOxfiFkTsnym9kRUthAnyMnssutzT29m+DWI4Gu0Lr+C4s+QPp4VXn4pXS2cybqv1NNDUuSLTJGc33K21Z0XjQApl9MlaiqGBnjhzF0U8UHm7qssClRuvknJy3xCzZplZiDYE4uxPof55UuH61ehhfDjwSJKgZLlH2bhlo5fCBLPI/Bgo9d9icDfEgrnrlZLxnSSNWTmsJiBkgceBoCw3pEG6jKgd1q1LqthSkwFqVAbon2PM9hGjupCkP4jyXN1Qw7GWbXvw6G3P+XkqQLNRx6cDg==

RODRIGO SAID RAZO HERNANDEZ | Fecha:2024-03-22 10:38:05 | Firmante

knStfMsQb/y8VkbZiiwcs0Nr+fgG6WHzQtktKTSPPddhFM7COisxkWE0SGnOD4w/hHpyb1nbj+zLTAihROQHfYrN09DvNiHJ4dzBMH53J/Hb7gvDYriZPTZkuGxAKMbbj360gtLpOz9L6alFVRMUok/3iLc9kTw1Hv3FRG6wWupwA4jrmhbhUVVXXmEstof92rbjWM6yxGD1G6Vupz1Y447xQm4KLXRkNVZNghDYmpwL/2x6qkNjdaC7AF3iMNI09NysAgkzkPeGfBs75Cmy5vhYXL5FSm3nYdadhTUeVw7ec44t92bPIMAbQNLkSB0B5Kqngw8zJjmALrEfw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[pwLf9xEbc](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NVjj7eQJiUs7Gt6ysoEZdaFuyPNbKol0>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029