

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotechnológica



FORMULACION Y OPTIMIZACION DE INMUNOLIPOSOMAS, PARA LA
ENCAPSULACION DE LA MACAMIDA SINTETICA *N-3-METOXIBENCIL-
LINOLEAMIDA*, UTILIZANDO FRAGMENTOS (Fab)₂ DEL ANTICUERPO OX26
COMO MOLECULA DE BIORECONOCIMIENTO

Tesis presentada por la Bachiller:
Aranzamendi Zenteno, María Alexandra
Para optar el Título Profesional de:
Ingeniera Biotecnóloga

Asesora:
Dra. Nieto Montesino, Rita Milagros

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Ingeniería Biotecnológica

Expediente N°. 20170000057168

N° Trámite en Fac. 375-2017

Fecha Recep. Fac. 19-12-2017

FORMATO UNICO PARA TRAMITACIÓN DE TÍTULO PROFESIONAL

DE: **ARANZAMENDI ZENTENO, Maria Alexandra**

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE **INGENIERO BIOTECNOLOGO**

"OPTIMIZACION DE UNA FORMULACION DE LIPOSOMAS PARA LA ENCAPSULACION DE FARMACOS HIDROFOBICOS"

DICTAMINADORES: 1) **Q. F. Fernando Torres Vela** 2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, el Jurado Dictaminador del Plan de Tesis informa que: hechas las observaciones y subsanadas las correcciones; consideramos se encuentra APTO para continuar con el trámite de acuerdo al Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

FIRMAS:

 (Devolver antes de 8 días hábiles)

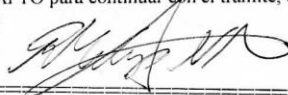
FECHA 16-01-2018

ASESOR: **Dra. Rita Nieto Montesinos**

DICTAMEN ASESORÍA: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como asesora del trabajo de investigación presentado por el recurrente, tengo a bien informar que luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes y debiendo cambiar el título a: **"FORMULACION Y OPTIMIZACION DE INMUNO LIPOSOMAS, PARA LA ENCAPSULACION DE LA MACAMIDA SINTETICA N-3-METOXIBENCIL-LINOLEAMIDA, UTILIZANDO FRAGMENTOS (Fab)₂ DEL ANTICUERPO OX26 COMO MOLECULA DE BIORECONOCIMIENTO"**, considero que el presente trabajo está APTO para continuar con el trámite, en conformidad al Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente

FIRMA



FECHA 24/10/2019

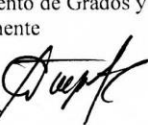
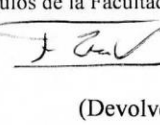
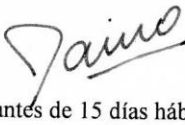
DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) **Q. F. Fernando Torres Vela** 3) **Mgter. Jose Carpio Carpio**
2) **Mgter. Jaime Barreda del Carpio**

DICTAMEN FINAL: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, atendiendo a su designación como Dictaminadores del presente Borrador de Tesis y luego de hechas las observaciones y correcciones pertinentes, cumpliendo con las exigencias mínimas establecidas para un trabajo de investigación de Tesis profesional, es que consideramos APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

FIRMA

(Devolver antes de 15 días hábiles) FECHA

JURADOS: PRESIDENTE **Q.F. FERNANDO TORRES VELA**
VOCAL **MAG. JAIME BARREDA DEL CARRIO**
SECRETARIO **MAG. JOSE CARRIO CARRIO**

FECHA 27/11/19

HORA 20.00

LOCAL B-406

FIRMA DEL DECANO

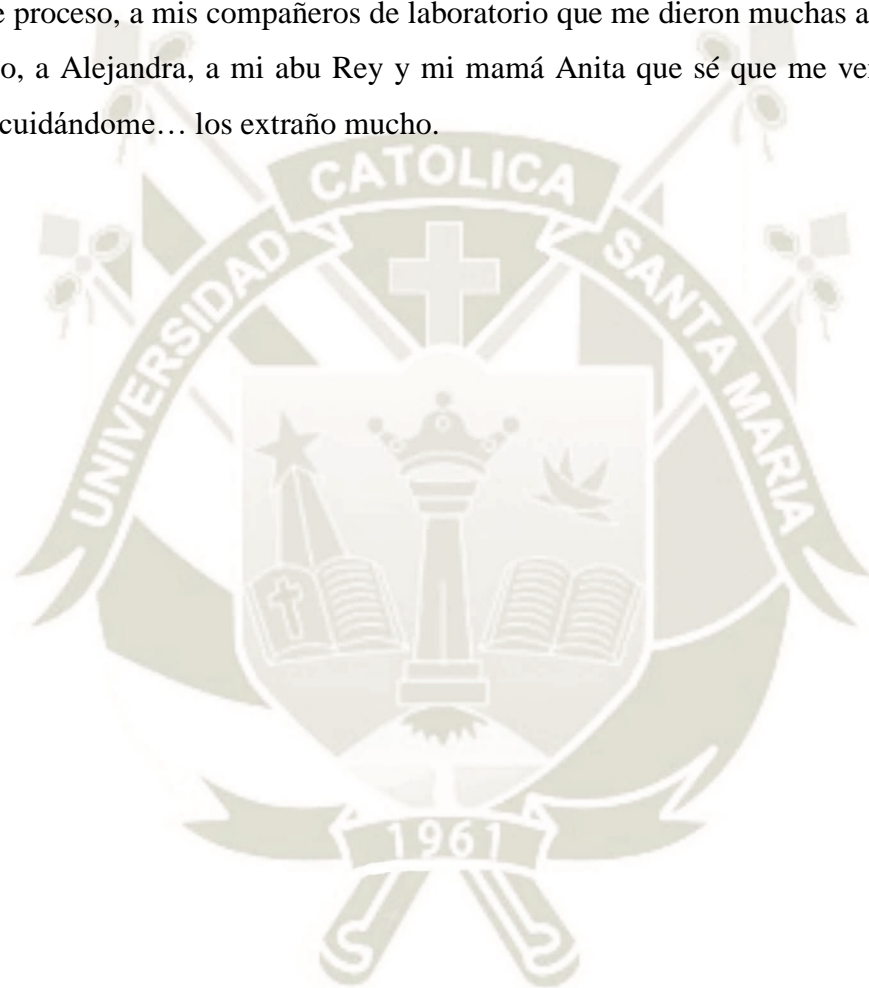


FECHA

DEDICATORIA

A mi familia, que me apoyaron en este proceso, a mis padres Guillermo y Jacqueline, mis hermanos Kerin y Fabrizio, quienes me brindaron el apoyo necesario para la realización de este proyecto.

A mis amigos Jesús, Giancarlo, Gabriela y Alexandra, que me ayudaron en la realización de este proceso, a mis compañeros de laboratorio que me dieron muchas alegrías en este proceso, a Alejandra, a mi abu Rey y mi mamá Anita que sé que me ven desde algún lugar, cuidándome... los extraño mucho.



AGRADECIMIENTOS

A mis padres por brindarme todo para lograr este título profesional, a mis familiares que con su apoyo me dieron el impulso para lograr esta meta.

Al Dr José Villanueva, por su constante apoyo y consejos recibidos durante mi formación académica y la realización de este trabajo.

A mi asesora, la Dra. Rita Nieto Montesinos, por su apoyo y paciencia al otorgarme sus conocimientos sobre nanotecnología.



AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) - Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (FONDECYT), por el financiamiento recibido para el desarrollo de esta investigación, mediante el proyecto: “Diseño, caracterización y evaluación de liposomas a base de macamidas, vectorizados al sistema nervioso central para el tratamiento de la epilepsia 096-2015-Fondecyt”.



FUENTE: CONCYTEC (Consejo Nacional de Ciencia Tecnología e Innovación Tecnológica)

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvi
INTRODUCCIÓN	xvii
HIPÓTESIS.....	xx
OBJETIVOS	xxi
Objetivo General:	xxi
Objetivos Específicos:.....	xxi
CAPITULO I.....	1
1. MARCO TEÓRICO.....	1
1.1 Nanomedicina:.....	1
1.2 Nanovectores	2
1.3 Tipos de nanovectores:	2
1.4 Nanovectores lipídicos:	3
1.5 Fosfolípidos	4
1.6 Liposomas:.....	5
1.6.1 Tipos de liposomas:	7
1.6.1.1 Liposomas o vesículas multilamelares (MLV)	7
1.6.1.2 Liposomas o vesículas unilamelares grandes (LUV)	7
1.6.1.3 Liposomas o vesículas unilamelares pequeñas (SUV)	7
1.6.1.4. Liposomas convencionales	7
1.6.1.5 Liposomas catiónicos	8
1.6.1.6 Liposomas de circulación prolongada, furtivos o liposomas Stealth ..	8

1.6.1.7 Liposomas vectorizados	10
1.7 Inmuno liposomas:	11
1.7.1 Anticuerpo monoclonal OX26:	13
1.8 Métodos de preparación de liposomas:	15
1.8.1 Vesículas multilamelares (MLV):	15
1.8.2 Vesículas unilamelares pequeñas (SUV):	15
1.8.2.1 Formulación de liposomas SUV por ultrasonido:	16
1.9 Características liposomales:	16
1.9.1 Tamaño de vesícula:	16
1.9.2 Índice de polidispersión:	17
1.9.3 Potencial Zeta:	17
1.9.5 Porcentaje de proteínas:	18
1.10 Macamidas:	18
1.10.1 N-3-metoxibencil-linoleamida:	20
1.10.2 Sistema Cannabinoide:	21
CAPITULO II	24
2.1 MATERIALES:	24
2.1.1 Material de laboratorio:	24
2.1.2 Reactivos:	24
2.1.3 Equipos:	26
2.2 LUGAR DE INVESTIGACIÓN	26
2.3 METODOLOGÍA	26
2.3.1 Desarrollo y optimización de liposomas convencionales:	26
2.3.2 Desarrollo y optimización de liposomas furtivos:	27
2.3.3 Desarrollo y optimización de inmunoliposomas:	31
2.3.3.1 Fraccionamiento de anticuerpos OX26	32

2.3.3.2 Acoplamiento de anticuerpos a los inmunoliposomas	32
2.3.4 Caracterización de liposomas convencionales, furtivos e inmunoliposomas	32
2.3.4.1 Medición del tamaño e índice de polidispersión:	33
2.3.4.2 Medición de potencial Zeta:	33
2.3.4.3 Porcentaje de encapsulación de la macamida sintética N-3- metoxibencil-linoleamida:	33
2.3.4.4 Determinación del porcentaje de acoplamiento de los fragmentos F(ab') ₂ en los inmunoliposomas:	33
CAPITULO III	35
3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	35
3.1.1 Desarrollo y optimización de liposomas convencionales:	35
3.1.2 Desarrollo y optimización de liposomas furtivos:	37
3.1.3 Desarrollo y optimización de Inmunoliposomas:	47
3.1.3.1 Fraccionamiento de anticuerpos OX26	48
3.1.3.2 Acoplamiento de anticuerpos a los inmunoliposomas.	49
3.2 CONCLUSIONES:	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS.....	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura: 1.1: Nanovectores orgánicos e inorgánicos	3
Figura: 1.2: Estructura de un liposoma.	6
Figura: 1.3: Clasificación de liposomas según su tamaño y número de bicapas lipídicas	7
Figura: 1.4: Clasificación de liposomas según su funcionalidad	11
Figura: 1.5: Estructura general de las macamidas	20
Figura: 1.6: Estructura química de la macamida N-3-metoxibencil-linoleamid.....	20
Figura 1.7: Órganos en donde se encuentran receptores CB1 y CB2	22
Figura 1.8: Síntesis, liberación, receptación y degradación de anandamida.....	23
Figura: 2.1: Diseño de la estructura de los diferentes tipos de liposomas diseñados en este proyecto.	34
Figura: 3.1: Tamaño e índice de polidispersión de liposomas convencionales	36
Figura: 3.2: Tamaño e índice de polidispersión de liposomas con colesterol y DSPE- PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃	38
Figura: 3.3: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido	41
Figura: 3.4: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido y concentración de DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃	41
Figura: 3.5: Optimización de liposomas furtivos, modificando la amplitud y la temperatura.	44
Figura: 3.6: Conjugación del fragmento F(ab) ^γ ₂ del anticuerpo OX26 y el polímero DESPE-PEG ₅₀₀₀ -COOH-.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1: Formulación de liposomas convencionales.....	26
Tabla 2.2: Formulación de liposomas furtivos	28
Tabla 2.3: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido.	28
Tabla 2.4: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido y la concentración de DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃	29
Tabla 2.5: Optimización de liposomas furtivos, modificando la amplitud del ultrasonido y la temperatura	29
Tabla 2.6: Optimización de liposomas furtivos por concentración de N-3-metoxi bencil-linoleamida.	30
Tabla 2.7: Optimización de liposomas furtivos por concentración del fosfolípido y de N-3-metoxi bencil-linoleamida.....	31
Tabla 2.8: Formulación de liposomas furtivos con el polímero DSPE-PEG ₅₀₀₀ -COOH	31
Tabla 3.1: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de liposomas convencionales.....	36
Tabla 3.2: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de liposomas furtivos ..	37
Tabla 3.3: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa, comparándolo con F1.....	39
Tabla 3.4: Diferencia estadística significativa de tamaño, respecto a la formulación F1.	39
Tabla 3.5: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de la optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido y concentración de DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃	39
Tabla 3.6: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa según el tamaño	42
Tabla 3.7: Diferencia estadística significativa de tamaño, respecto a la formulación F1.6.	42
Tabla 3.8: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de la optimización de liposomas furtivos, modificando la amplitud y la temperatura.	43

Tabla 3.9: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa.	45
Tabla 3.10: Diferencia estadística significativa de tamaño, respecto a la formulación F1.6.3.	45
Tabla 3.11: Tamaño, índice de polidispersión, potencial Zeta y porcentaje de encapsulación según la concentración de macamida.....	46
Tabla3.12: Tamaño, IPD, Potencial Zeta y porcentaje de encapsulación según su concentración de macamida y del fosfolípido.	46
Tabla 3.13: Tamaño, IPD, Potencial Zeta y porcentaje de encapsulación del liposomas furtivos conteniendo el polímero DESPE-PEG ₅₀₀₀ COOH	48
Tabla 3.14: Tamaño, IPD, Potencial Zeta y porcentaje de encapsulación del inmunoliposoma con fragmentos F(ab') ₂ del anticuerpo OX26.....	51
Tabla 3.15: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa.	51
Tabla 3.16: Diferencia estadística significativa de tamaño, entre formulaciones.	52

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1: Tabla de curva de calibración para porcentaje de encapsulación	64
ANEXO 2: Tabla de resultados de porcentaje de encapsulación	64
ANEXO 3: Tabla de calibración para porcentaje de proteínas.....	65
ANEXO 4: Tabla de resultados de absorbancia y porcentaje de proteínas	65
ANEXO 5: Procedimiento de formulación de liposomas.....	66
ANEXO 6: Caracterización de liposomas	68



LISTA DE ABREVIATURAS

MLV:	Vesículas multilamelares
LUV:	Vesículas unilamelares grandes
SUV:	Vesículas unilamelares pequeñas
BHE:	Barrera Hematoencefálica
IPD:	Indicé de Polidispersión
SNC:	Sistema Nervioso Central
DMPC:	Dimiristoil-fosfatidilcolina
DPPC:	Dipamitoil-fosfatidilcolina
T_m:	Temperatura de transición
PEG:	Polietilenglicol
DSPE-PEG-2000-OCH₃:	1,2 – distearoil – sn - glicero- 3-fosfoetanolamine-N-[(polietilen glicol)-2000]
DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH:	1,2 – distearoil – sn – glicero – 3 - fosfoetanolamina -N-[carboxi (polietilen glicol)-5000]
IgG:	Inmunoglobulina G
FAAH:	Enzima Hidrolasa Amida de Ácidos Grasos
PBS:	Tampón Fosfato Salino
EDC:	Hidrocioruro de N- (3- (dimetilamino) propil) -N'-etil-carbodiimida
Sulfo-NHS:	N-hidroxisulfosuccinimida
MES:	Tampón 2-(Nmorfolino) ácido etanosulfónico
HPLC:	Cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de arreglo de diodos

ANOVA:	Análisis de la varianza
DF:	Grados de libertad
SS:	Sumatoria de cuadrados
MS:	Promedio de los cuadrados
F:	Prueba F estadística
GABA:	Ácido γ -aminobutírico
AEA:	Araquidonil-etanolamina o anandamida
NADA:	N-araquidonil-dopamina
2-AG:	2-araquidonilglicerol
NE:	Nodalín éter
VIR:	Virodamida

RESUMEN

Uno de los mayores problemas de la industria farmacéutica es el ingreso de fármacos a través de barreras específicas del organismo como lo es la Barrera Hematoencefálica, la cual evita el ingreso de xenobioticos al Sistema Nervioso Central, es por esto que la Nanomedicina empieza a desarrollar nanovectores con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos adheridos a la superficie de los nanovectores para lograr un tratamiento específico. Esto se traduce en una menor dosis del fármaco y menores efectos secundarios en tejidos periféricos. Los liposomas son nanovectores ampliamente utilizados para la vectorización de fármacos, puesto que son biocompatibles, fáciles de manipular, estables y poseen la capacidad de poder encapsular tanto fármacos hidrofílicos como lipofílicos. La optimización de estos inmunoliposomas comprende las características necesarias para ayudar a que lleguen a la Barrera Hematoencefálica y así minimizar efectos secundarios. Para esto hay que tener en cuenta los parámetros de tamaño, índice de polidispersión, potencial Zeta, porcentaje de encapsulación del fármaco y porcentaje de conjugación del anticuerpo o sus fragmentos, este último siendo medido como proteína, ya que la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida posee un efecto neuroprotector y puede ser utilizada a elevadas dosis para tratar diferentes enfermedades neurológicas es que se decide encapsularla en los inmunoliposomas. Se logró optimizar la formulación de inmunoliposomas que poseen los fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo OX26 y que encapsulan la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida. Estos poseen un tamaño de 133.5 ± 4.2 nm, un índice de polidispersión de 0.28 ± 0.01 , un potencial Zeta de -9.71 ± 0.9 mV, un porcentaje de encapsulación de $78,73 \pm 6.0\%$ y un porcentaje de proteínas

del $64.94 \pm 3.5\%$. Es así que esta formulación puede en adelante ser estudiada en modelos *in vitro* o *in vivo* de enfermedades del Sistema Nervioso Central, en los cuales la macamida antes mencionada tenga propiedades farmacológicas.

Palabras clave: Barrera Hematoencefalica, nanotecnología, anticuerpo OX26, inmunoliposoma.



ABSTRACT

One of the major problems of the pharmaceutical industry is the entry of drugs through specific barriers of the organism such as the Blood Brain Barrier, which prevents the entry of xenobiotics to the Central Nervous System, which is why Nanomedicine begins to develop nanovectors with antibodies or fragments of antibodies attached to the surface of the nanovectors to achieve a specific treatment. This translates into a lower dose of the drug and fewer side effects in peripheral tissues. Liposomes are nanovectors widely used for drug vectorization, since they are biocompatible, easy to manipulate, stable and have the ability to encapsulate both hydrophilic and lipophilic drugs. The optimization of these immunoliposomes includes the necessary characteristics to help them reach the Blood Brain Barrier and thus minimize side effects. For this it is necessary to take into account the parameters of size, polypersion index, Zeta potential, percentage of encapsulation of the drug and percentage of conjugation of the antibody or its fragments, the latter being measured as a protein, since the synthetic macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide has a neuroprotective effect and can be used at high doses to treat different neurological diseases is that it is decided to encapsulate in immunoliposomes. It was possible to optimize the formulation of immunoliposomes that possess fragments F(ab)₂ of the OX26 antibody and that encapsulate the synthetic macamide N-3-methoxybenzyl-linoleamide. These have a size of 133.5 ± 4.2 nm, a polypersion index of 0.28 ± 0.01 , a Zeta potential of -9.71 ± 0.9 mV, an encapsulation percentage of $78.73 \pm 6.0\%$ and a protein percentage of $64.61 \pm 7.4\%$. Thus, this formulation can be studied in *in vitro* or *in vivo* models of diseases of the Central Nervous System, in which the aforementioned macamide has pharmacological properties.

Keywords: Hematoencephalic barrier, nanotechnology, OX26 antibody, immunoliposome.

INTRODUCCIÓN

La Nanomedicina es la rama de la Medicina que utiliza nanomateriales a una escala inferior a 1000 nm, para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades, para poder lograr una medicina personalizada (1–3). Los nanovectores son nanoestructuras solidas o huecas con un diámetro ente 1 a 1000 nm (4). Estos son capaces de transportar y entregar una o más moléculas bioactivas, como agentes terapéuticos o agentes de contraste, para aplicaciones biomédicas (1). Existen diferentes tipos de nanovectores, los cuales se reagrupan en dos: 1) nanovectores inorgánicos, los cuales están fabricados por materiales inorgánicos como son los nanotubos de carbono, plata, oro, entre otros y 2) los nanovectores orgánicos, estos son los más utilizados para la nanomedicina, puesto que son más biocompatibles con el organismo, pues sus materiales son orgánicos (5). De estos lo más empleados son los nanovectores lípidos líquidos y sólidos que suelen presentar una estructura típica de núcleo-cascara (6,7). Estos nanovectores protegen al fármaco y lo hacen menos susceptible de degradarse en diferentes medios, además su estructura y su tamaño es altamente manipulable y pueden ser administrados por vía intravenosa, oral o cutánea. Por ello, pueden encapsular fármacos hidrosolubles como liposolubles (8)

De estos los mas empleados son los liposomas, los cuales son vesículas esféricas, con membranas compuestas de una doble capa de fosfolípidos y un compartimiento interior acuoso (9,10). Esto permite encapsular fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos (11). Los liposomas pueden ser clasificados según su tamaño y sus bicapas lipídicas: a) vesículas multilamelares (MLV), con un tamaño alrededor de 500 nm y con múltiples capas lipídicas; b) vesículas unilamelares grandes (LUV) con un tamaño entre 200 – 1000 nm con una sola capa y c) vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con un tamaño alrededor de 100 nm y una capa lipídica (12). Otra clasificación es por su estructura: a) liposomas convencionales son aquellos que contienen fosfolípidos y pueden o no contener colesterol, transportan el material encapsulado por el organismo, sin embargo son rápidamente reconocidos por el sistema inmunológico; b) Liposomas catiónicos son encargados de vectorizar el material genético, estos contienen en su estructura una carga positiva, lo que ayuda a neutralizar la carga negativa del material genético encapsulado; c) liposomas furtivos, la superficie liposomal puede ser modificada mediante

incorporación de ciertos polímeros como derivados de polietilenglicol, que retardan la opsonización de los liposomas, prolongando su tiempo de vida media y por lo tanto del fármaco encapsulado; d) liposomas vectorizados, también a la superficie liposomal se puede añadir biomoléculas de reconocimiento, que permitirán vectorizar los liposomas y el fármaco encapsulado hacia un tejido específico (5,9).

Al agregar una biomolécula de reconocimiento como anticuerpos o sus fragmentos a la superficie liposomal se obtiene lo que se le denomina inmunoliposomas. Estos son altamente estudiados, dado que se demostró que los anticuerpos o sus fragmentos pueden reconocer ciertos receptores de diferentes órganos y tejidos, como por ejemplo de la barrera hematoencefálica (BHE), del corazón, en células cancerígenas, entre otros, logrando una concentración más elevada del fármaco en los tejidos que expresan estos receptores en relación a los demás liposomas (13).

Para la optimización de cualquier formulación de liposomas es necesario conocer sus propiedades fisicoquímicas, así se tiene que conocer el tamaño de los liposomas. Santos y Guerrero señalaron que los liposomas pequeños (alrededor de 100 nm) son eliminados del organismo más lentamente que los grandes (alrededor de 200 nm), estos liposomas pueden utilizar diferentes rutas para lograr atravesar membranas y barreras con mayor facilidad (11). El índice de polidispersión (IPD) es otra característica importante, ya que esta nos indica que tan homogénea es la población liposomal. Para que estas sean seguras, estables y eficientes se requiere que la distribución de tamaño de partículas sea homogénea y que el IPD no sea mayor a 0.3 (14,15). Otra característica importante es el Potencial Zeta, el cual mide la carga superficial de los liposomas. Esto nos da conocimiento de la estabilidad y la homogeneidad de los liposomas. Diferentes autores reportan que vesículas de carga neutra presentan un mayor tiempo de estabilidad y menor respuesta inmunológica, puesto que la carga negativa y positiva, obtienen una respuesta inmunológica más rápida (8,16). Un potencial zeta entre -20 y +20 mV es deseable y es considerado neutro. El porcentaje de encapsulación es una de las características más importantes, puesto que esta determina el porcentaje del fármaco que se logró encapsular en los liposomas (10). En el caso de utilizar liposomas vectorizados como los inmunoliposomas hay que tener en cuenta una característica más que es el porcentaje de anticuerpo conjugado, referido al porcentaje de proteínas (17).

Diferentes autores utilizaron el anticuerpo OX26, como biomolécula de reconocimiento, este es un anticuerpo monoclonal que deriva de rata y es usado específicamente para receptores de transferrina presentes en células endoteliales de los capilares cerebrales de la BHE humana. Este anticuerpo es frecuentemente utilizado para la vectorización hacia el Sistema Nervioso Central (18). Los inmunoliposomas con este anticuerpo pueden ser utilizados para vectorizar diferentes compuestos.

Las macamidas son metabolitos secundarios encontrados en el extracto pentánico de una planta nativa de los andes del Perú llamada *Lepidium meyenii* (Maca). Esta crece sobre los 4000 metros de altitud y es cosechada y consumida como Medicina Tradicional desde el tiempo de los Incas (19). Esta fue utilizada para tratar problemas de fertilidad, menopausia y reumatismo. Igualmente, es usada para potenciar la virilidad, vitalidad y fuerza física (19). En la actualidad, es altamente usada en bebidas energizantes.

Un estudio realizado en el Instituto del Cerebro del Hospital Israelita Albert Einstein – Sao Paulo, Brasil, demostró, que el extracto pentánico de la Maca a una dosis de 1.0 mg/kg de peso posee un efecto anticonvulsivante. Una de estas macamidas presentes en el extracto pentánico es la macamida N-3-metoxibencil-linoleamida, la cual regula la comunicación sináptica retrograda y podría modular la excitabilidad neuronal, protegiendo a las neuronas de la excitotoxicidad (20).

Posteriormente un estudio realizado en la Universidad Católica de Santa María, demostró que las macamidas sintéticas N-3-metoxibencil-oleamida y N-3-metoxibencil-linoleamida, a una dosis elevada, poseen un efecto anti convulsionante *in vivo*. De estas la más potente es la N-3-metoxi bencil-linoleamida (21).

Con el fin de optimizar el efecto anti convulsionante de la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida *a posteriori*, es que este trabajo plantea desarrollar y optimizar una formulación de inmunoliposomas, encapsulando la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida, utilizando fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo OX26.

HIPÓTESIS

Dado que estudios anteriores, *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el fármaco encapsulado en liposomas vectorizados con fragmentos del anticuerpo OX26, logran atravesar la Barrera Hematoencefálica y llegar al cerebro, es que este proyecto pretende optimizar el efecto anti convulsionante de la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida, encapsulándola en liposomas funcionalizados con fragmentos F(ab)₂ del anticuerpo OX26.



OBJETIVOS

Objetivo General:

Desarrollar y optimizar una formulación de inmunoliposomas, encapsulando la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida, utilizando los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo OX26 como molécula de bioreconocimiento.

Objetivos Específicos:

- Evaluar el impacto de diferentes concentraciones de fosfolípidos, colesterol, polímeros y macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida en el tamaño, índice de polidispersión, potencial Zeta y porcentaje de encapsulación.
- Optimizar los parámetros de la técnica de ultrasonido, para encontrar las características establecidas.
- Evaluar el tamaño, índice de polidispersión, potencial Zeta, porcentaje de encapsulación y el porcentaje de anticuerpo conjugado de los inmunoliposomas.

CAPÍTULO I

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Nanomedicina:

Generalmente las enfermedades se originan por alteraciones en procesos biológicos, ya sea a escala nanométrica o a nivel molecular, como por ejemplo genes mutados, proteínas mal plegadas, infecciones causadas por virus o bacterias o traumas causados al organismo (2).

En tal sentido, a inicios de los años 50 se empezó a estudiar y considerar nuevas técnicas enfocadas en nanoescalas, como la administración dirigida de fármacos y la consiguiente optimización de la biocompatibilidad (3,22,23). Es así que en 1964 se publicó los primeros estudios sobre sistemas nanoparticulados o nanovectores, siendo estos los liposomas (23). En 1970, se logró producir anticuerpos monoclonales, con los que se funcionalizó los nanovectores de forma tal que estos lleven el fármaco encapsulado a un tejido específico (24). En los años 80 fue posible captar imágenes con la primera sonda de microscopia de barrido, lo que no solo brindó información sobre la estructura de los nanovectores, sino que también dio lugar a que la manipulación de las mismas sea más fácil (24). En 1990, Robert A Freitas escribió el primer libro de Nanomedicina, el cual consta de tres volúmenes. El primero redacta los conocimientos básicos de la Nanomedicina, el segundo, habla sobre la biocompatibilidad y el tercer volumen sobre las aplicaciones de la Nanomedicina (15). Ese mismo año se funcionalizó nanovectores utilizando anticuerpos para transportar fragmentos de ADN y genes, al interior de las células (24). En 1997, Desai y colaboradores desarrollaron nanopartículas de sílice encapsulando oxígeno, glucosa e insulina y prolongando el tiempo de vida media de estos (23). En el año 2003, el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos otorgó becas para realizar investigación en Nanomedicina, por ser considerada esta un área de vanguardia que generaría beneficios médicos en los siguientes 10 años (23). Del año 2004 al 2005, el Centro de Cáncer Anderson de la Universidad de Texas inició tratamientos clínicos basados en nanoestructuras conjugadas a anticuerpos y en el 2006, el mismo centro empezó a administrar insulina, haciendo uso de nanoestructuras de oro

conjugadas a anticuerpos (23). En el 2013, Yanan Li y colaboradores, reportaron el efecto sinérgico de la encapsulación de nanovectores de oro y doxorubicina en liposomas termo sensibles. Así esta formulación demostró tener un efecto sinérgico frente a un modelo *in vivo* de neuroblastoma (25).

Actualmente la Nanomedicina es considerada como la fusión de la Nanotecnología y la Medicina (3) y tiene como objetivo utilizar las propiedades y características de los nanomateriales para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades y así lograr una medicina personalizada que optimice los resultados terapéuticos (1–3).

1.2 Nanovectores

Los nanovectores son nanoestructuras solidas o huecas con un diámetro ente 1 a 1000 nm (4). Estos son capaces de transportar y entregar una o más moléculas bioactivas, como agentes terapéuticos o agentes de contraste, para aplicaciones biomédicas (1). Cabe resaltar que en Medicina el tamaño del nanovector a emplear es fundamental, puesto que los nanovectores con un tamaño menor a 10 nanometros (nm) son rápidamente eliminados por el riñón o por extravasación y los nanovectores mayores a 200 nm son filtrados de manera eficiente por el hígado, el bazo o la medula ósea (26).

1.3 Tipos de nanovectores:

En los últimos años se ha logrado obtener diversos tipos de nanovectores, los cuales pueden clasificarse según su composición (figura 1.1), siendo los más estudiados:

- a) Nanovectores inorgánicos: Son los nanovectores que presentan en su composición compuestos inertes y pueden ser (14):
 - Nanotubos de carbono (27)
 - Nanovectores metálicos (de oro, plata, hierro, entre otros) (28,29)
 - Nanovectores súper paramagnéticas de óxido de hierro (SPION) (30,31).
 - Puntos cuánticos (QD) (32)
 - Nanovectores de sílice (33)
- b) Nanovectores orgánicos: Son los nanovectores que contienen esencialmente polímeros o lípidos y pueden ser (14) :

- Nanovectores poliméricos (34–36)
- Nanovectores lipídicos sólidos (SLN) (37)
- Nanocápsulas lipídicas (LNG) (36,38,39).
- Liposomas (10,36)
- Micelas (2,22)

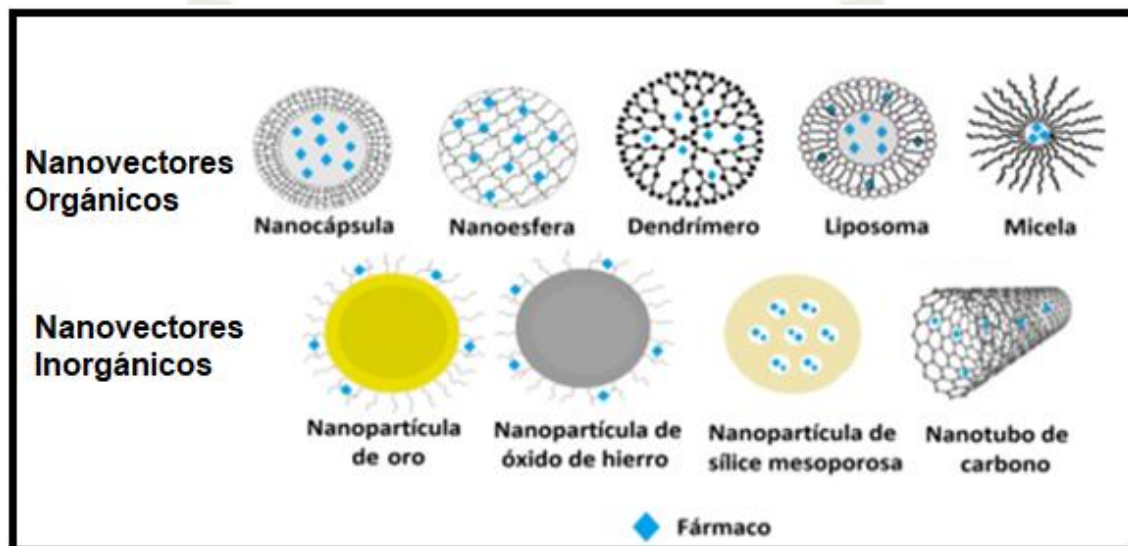


Figura: 1.1: Nanovectores orgánicos e inorgánicos (42)

Los nanovectores orgánicos son biocompatibles, biodegradables y generalmente no tóxicos. Es por esto que a lo largo de los años diversos grupos de investigación prefieren usar estos nanovectores para fines terapéuticos, dentro de ellos los nanovectores lipídicos (12).

1.4 Nanovectores lipídicos:

A lo largo de los años los nanovectores lipídicos más estudiadas fueron los liposomas y los niosomas, cuyas nanoestructuras vesiculares están compuestas por fosfolípidos y lípidos polares anfipáticos respectivamente (6). Así mismo en las últimas dos décadas se han utilizado lípidos líquidos y sólidos para la formulación de nuevos nanovectores lipídicos, como las nanoesferas que presenta una estructura homogénea y nanocápsulas, que presentan una estructura típica de núcleo-cáscara (6,7).

Estos nanovectores protegen al fármaco y lo hacen menos susceptible de degradarse en diferentes medios, además su estructura y su tamaño es altamente manipulable y pueden ser administrados por vía intravenosa, oral o cutánea. Asimismo pueden encapsular fármacos hidrosolubles como liposolubles (11,26). Los nanovectores lipídicos al ser ampliamente estudiados, han originado diferentes métodos de formulación establecidos, lo que hace que su formulación sea más sencilla (28,29).

En la actualidad los nanovectores más estudiados son los liposomas. Estos son altamente biocompatibles y biodegradables puesto que la membrana liposomal es similar a la membrana celular, básicamente compuesta por fosfolípidos (14).

1.5 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son lípidos saponificables, los cuales poseen dos ácidos grasos, que constan de lípidos polares, ya que tienen una región hidrofílica formada por grupo fosfato con carga y una región hidrófila compuesta por etanolamina, colina, serina o inositol (43).

Los fosfolípidos están compuestos por una molécula de glicerol a la que se unen 2 ácidos grasos en las posiciones sn-1 y sn-2, estos ácidos grasos pueden presentar cadenas hidrocarbonadas largas, variando en el grado de insaturación. Sin embargo, se diferencian de los triglicéridos ya que en la posición sn-3 está ligada una molécula de ácido ortofosfórico, en lugar de un tercer ácido graso. Estos grupos fosfato siempre están unidos a diferentes tipos de moléculas, de esta forma, cuando esta molécula corresponde a colina, se forma la fosfatidilcolina (FC) o Lecitina; cuando se une a un aminoácido como serina (FS), se forma la fosfatidilserina; cuando la unión es con etanolamina, se forma la fosfatidiletanolamina (FE) o Cefalina; y cuando se une al polialcohol cíclico inositol, se forma el fosfatidil inositol (FI) entre otros (31,34).

De esta gran variedad de fosfolípidos tenemos los naturales que se encuentran de manera natural, entre ellos los más usados son la fosfatidilcolina de soya o fosfatidilcolina de yema de huevo. Es por esto que al no poseer una composición definida, se sugiere sintetizar nuevos fosfolípidos, que poseen mayor estabilidad y una carga específica. Esta carga puede ser positiva en donde encontramos

estearilamina (SA), una carga negativa, en donde tenemos por ejemplo dimiristoil-fosfatidilglicerol (DMPG), fosfatodicitil (DCP) y una carga neutra que suele ser la mayormente empleada para las formulaciones de liposomas. En este grupo sobresalen dimiristoil-fosfatidilcolina (DMPC) y dipamitoil-fosfatidilcolina (DPPC) (5,13,43). Los fosfolípidos insaturados podrían oxidarse en presencia de oxígeno del aire y por lo tanto podrían llegar a ser tóxicos (5,43).

El cambio de fase de los fosfolípidos del estado de gel, en donde las cadenas hidrocarbonadas del lípido son rígidas, al estado cristal líquido, donde las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos son móviles, se denomina temperatura de transición (T_m) (43). Así el lípido a temperaturas menores de la T_m se encuentra en la fase gel o temperaturas superiores se encuentra en fase cristal líquido. La T_m depende de las propiedades de los fosfolípidos. Los fosfolípidos con cadena corta o insaturaciones en sus cadenas hidrocarbonadas poseen una T_m menor, puesto que las cadenas cortas reducen la tendencia de las colas a interaccionar entre ellas y los dobles enlaces producen torsiones en las colas apolares que facilitan su movilidad (43,45). Los fosfolípidos saturados, presentan una T_m mayor dado que estos presentan una elevada capacidad de agrupación y una baja movilidad (45).

En la formulación de liposomas, los diferentes fosfolípidos se utilizan para conferirle a la estructura unas características fisicoquímicas, estructurales y funcionales, determinando un comportamiento adecuado o necesario para alcanzar su objetivo o la función deseada (43). La densidad de empaquetamiento, flexibilidad, resistencia osmótica, estabilidad "*in vivo*" e "*in vitro*", carga eléctrica, permeabilidad, entre otras, de la bicapa fosfolipídica y el liposoma también serán determinados y condicionados por la composición de la bicapa (22).

1.6 Liposomas:

Los liposomas son pequeñas vesículas (9,10), en donde las colas lipófilas de los fosfolípidos entran en contacto entre sí, formando una bicapa de fosfolípidos (figura 1.2) organizada entre dos compartimientos acuosos. Por lo que pueden encapsular tanto fármacos hidrofílicos como hidrofóbicos (11).

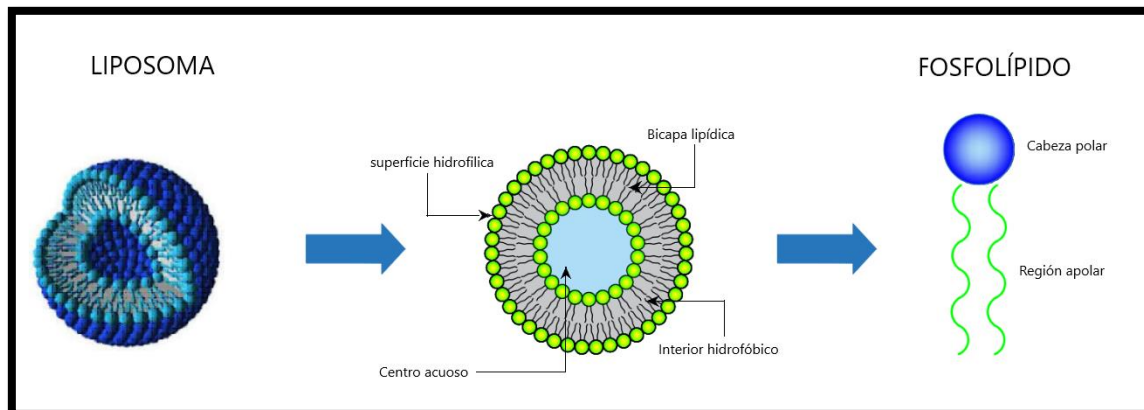


Figura: 1.2: Estructura de un liposoma.

La incorporación de otras moléculas para modificar las características de las bicapas lipídicas como la fluidez de las cadenas hidrocarbonadas, la hidrofiliidad de su superficie, el tamaño de la vesícula, entre otras, es factible (46). Se puede añadir colesterol hasta una proporción de 30 mol% el cual modifica la estabilidad y permeabilidad de la membrana, *in vitro* e *in vivo*, puesto que incrementa la rigidez de las vesículas (26,43). Al añadir agentes antioxidantes como hidroxibutiltolueno (BHT) o hidróxibtilanusol (BHA) se puede lograr reducir los fenómenos de oxidación de los enlaces insaturados de las cadenas acilo de los fosfolípidos (13,43)

La superficie de los liposomas también puede ser modificada mediante incorporación de ciertos polímeros como derivados de polietilenglicol, que retardan la opsonización de los liposomas, prolongando su tiempo de vida media y por lo tanto del fármaco encapsulado. También se puede añadir biomoléculas de reconocimiento, que permitirán vectorizar los liposomas y el fármaco encapsulado hacia un tejido específico (5,9).

Se evidencia que regulando el tamaño, la carga superficial y estructura superficial de los liposomas, se logra retardar o inhibir la eliminación del fármaco, aumentar la concentración del fármaco en el tejido diana, disminuir la dosis administrada y la toxicidad en órganos periféricos (47). Actualmente se disponen de diferentes tipos de liposomas.

1.6.1 Tipos de liposomas:

Inicialmente los liposomas fueron clasificados por su tamaño y número de bicapas lipídicas. Así, hoy se conocen : (48).

1.6.1.1 Liposomas o vesículas multilamelares (MLV)

En su estructura contienen varias capas de fosfolípidos, pudiendo llegar a 14 capas. Estas capas están separadas entre sí por un espacio acuoso (Figura 1.3). El tamaño de este tipo de liposomas es superior a 500 nm (49). Los liposomas MLV generalmente se preparan mediante el método de “Hidratación acuosa de películas lipídicas secas” (48).

1.6.1.2 Liposomas o vesículas unilamelares grandes (LUV)

En su estructura contienen una sola bicapa de fosfolípidos y su tamaño puede variar entre los 200 a los 1000 nm (Figura 1.3) (48,49).

1.6.1.3 Liposomas o vesículas unilamelares pequeñas (SUV)

En su estructura contienen una sola bicapa lipídica y poseen un tamaño alrededor de 100 nm (Figura 3) (48,49).

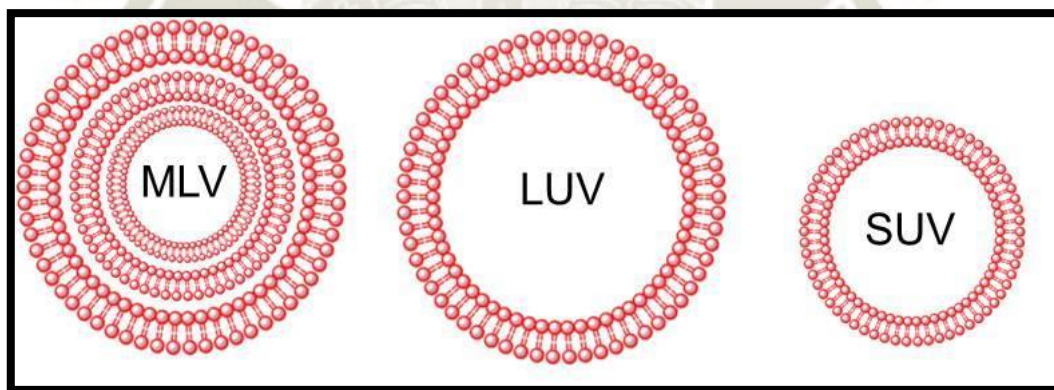


Figura: 1.3: Clasificación de liposomas según su tamaño y número de bicapas lipídicas

Una clasificación más reciente tiene en cuenta la funcionalidad de los liposomas (48). Así se tiene que.

1.6.1.4. Liposomas convencionales

Los liposomas convencionales son liposomas clásicos, con una superficie hidrofóbica, constituidos por diferentes fosfolípidos, de los cuales resalta

la fosfatidilcolina, que puede o no ir acompañada de colesterol, hasta un 30% (46). Un porcentaje menor de colesterol otorga a la membrana liposomal fluidez, sin embargo concentraciones mayores, otorgan a la membrana rigidez, provocando inestabilidad y pudiendo ser recubiertos por proteínas plasmáticas. Así, estos liposomas serían rápidamente fagocitados y eliminados del organismo (figura 1.4) (11,47).

Luego de ser administrados por vía intravenosa, los liposomas son reconocidos por las opsoninas que se adhieren a la superficie liposomal. Posteriormente las opsoninas son reconocidas por el sistema fagocítico mononuclear, el cual captura a los liposomas eliminándolos rápidamente del sistema sanguíneo (44). En tal sentido este tipo de liposomas son usados para el transporte de fármacos antiparasitarios y antimicrobianos, en infecciones localizadas en el sistema fagocítico mononuclear, que se encuentra en órganos como el hígado, bazo y médula ósea (50).

1.6.1.5 Liposomas catiónicos

Son liposomas compuestos básicamente por lípidos catiónicos, entre los que más destacan N-[1-dioleoyloxy)propil]-N,N,N-trimetilamonio (DOTMA), dioleoilfaotildeletanolamina (DOPE) y 1,2-bis(oleoyloxy)-3-(trim etilamonio)propano (DOTAP). Los liposomas catiónicos son utilizados para vectorizar material genético, ya que se da la condensación entre la carga positiva de su estructura y la carga negativa del material genético (figura 1.4) (50). Este tipo de liposomas podrían hacer realidad las terapias genéticas que pretenden optimizar el tratamiento de mutaciones y desordenes genéticos, ya sean congénitos o adquiridos (5,22).

1.6.1.6 Liposomas de circulación prolongada, furtivos o liposomas Stealth

Son liposomas que contienen en la membrana lipídica un determinado porcentaje de lípidos-polímeros, glicolípidos o polímeros hidrosolubles (figura 1.4) (35). Estos poseen una cadena flexible que ocupa un espacio adyacente en la superficie liposomal y tienden a excluir otras macromoléculas de este espacio. Por lo tanto, la unión entre las opsoninas

y la superficie liposomal se ve obstaculizada, inhibiendo la respuesta de los macrófagos (50). Este proceso prolonga el tiempo de vida media de los liposomas y por lo tanto del fármaco encapsulado y su biodisponibilidad (5). Así mismo, la presencia de los polímeros hidrosolubles en la membrana liposomal, retarda el proceso de liberación de los fármacos a partir de los liposomas. Consecuentemente la concentración del fármaco en tejidos periféricos y las posibles reacciones adversas de los fármacos disminuye (18,51). Entre los polímeros más estudiados aquel que presenta un incremento significativo en el tiempo de vida media liposomal es el polietilenglicol (PEG) (34).

Los liposomas que poseen moléculas de PEG en su membrana liposomal experimentan un proceso de vectorización pasiva, el cual fue descrito por Massing y colaboradores (44) La vectorización pasiva es el transporte de nanovectores a través de fenestraciones capilares tumorales y se basa en las propiedades intrínsecas de los liposomas y las características fisiológicas de los tejidos (5). Las propiedades intrínsecas más importantes de los liposomas, son el tamaño y el peso molecular. Estos se ven envueltos en dos procesos; el primero es el secuestro por el sistema endotelial y el segundo el efecto de retención y permeabilidad aumentada (enhanced permeability and retention, EPR) (52). Durante la angiogénesis los nuevos vasos sanguíneos tumorales presentan un revestimiento endotelial discontinuo, lo cual facilita la extravasación de las formulaciones liposomales en el espacio intersticial del tumor (50,53). Dicha vasculatura presenta fugas con un diámetro entre 200 y 600 nm, a través de los cuales los liposomas pasan al espacio intersticial del tumor. Una vez ahí, los liposomas se van acumulando en el tumor debido a la falta de drenaje linfático. Es así que los liposomas podrían constituir un sistema de liberación continua de fármacos en el espacio intersticial del tumor (50,53). Sin embargo aún se desconoce los procesos involucrados en la liberación de fármacos a partir de liposomas (50,53). Es así que este tipo de liposomas representa una alternativa en el diagnóstico y/o tratamiento contra el cáncer. Múltiples estudios han demostrado las ventajas de esta

alternativa frente a los tratamientos convencionales (46). Una de las formulaciones basada en liposomas de circulación prolongada, ya aprobada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y comercializada, es doxorubicina liposomal (Doxil®/Caelyx®). Este medicamento es usado en diferentes tipos de cáncer, donde optimiza las características farmacocinéticas del fármaco libre (52,54).

1.6.1.7 Liposomas vectorizados

Son los liposomas más estudiados en los últimos años, puesto que son liposomas señalizados (5). Poseen la capacidad de reconocer y dirigirse a algunas células y órganos en específico. Este tipo de liposomas se obtienen incorporando determinados elementos de bioreconocimiento a la superficie liposomal (figura 4) (13). Estas moléculas de bioreconocimiento pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, los cuales se dirigen a un receptor de anticuerpo específico en el organismo. Así se tiene el Anticuerpo anti-IL6R, que se une específicamente al receptor IL6R expresado en células cancerígenas y que ha demostrado ser una alternativa en diferentes modelos *in vivo* de cáncer (55). Péptidos o carbohidratos con un sitio de acción específico como el péptido de transducción de proteínas (PTD)_{VIH-1}, que posee una atracción por las células endoteliales microvasculares cerebrales (CEMV) vía el receptor de heparán sulfato expresados en la barrera hematoencefálica (11). Este mecanismo llamado vectorización activa propiciara entonces que el fármaco sea liberado de la formulación liposomal en las células u órganos gracias a la interacción receptor-molécula de bioreconocimiento (34,35)

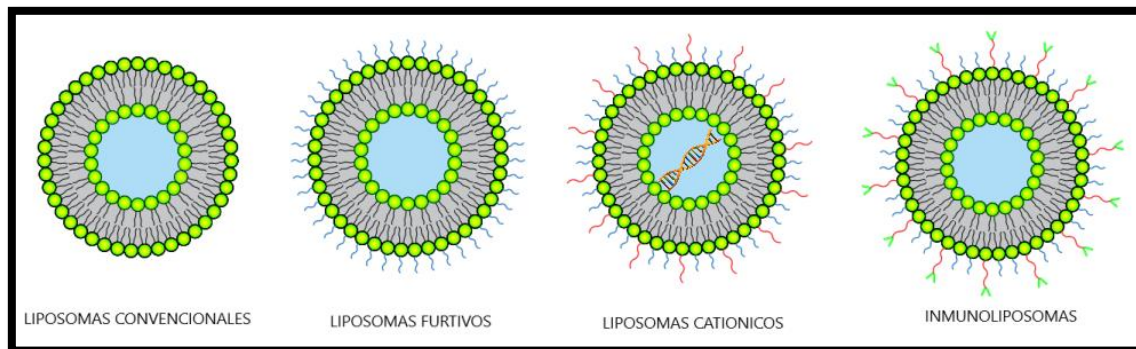


Figura: 1.4: Clasificación de liposomas según su funcionalidad

1.7 Inmuno liposomas:

Los inmunoliposomas son liposomas vectorizados que contienen en su superficie anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que pueden ser fragmentos Fab o fragmentos Fab₂ (56). En los últimos años los inmunoliposomas han sido altamente estudiados, pues se demostró que estos anticuerpos podrían reconocer epitopos de ciertos receptores de la barrera hematoencefálica (BHE), del corazón, en células cancerígenas, entre otros, por lo tanto logrando una concentración más elevada del fármaco en los tejidos diana en relación a los liposomas convencionales y de circulación prolongada (10).

John Park y colaboradores en 2002, formularon liposomas encapsulando doxorrubicina, los cuales fueron funcionalizados con fragmentos F(ab') del anticuerpo Anti-HER2, el cual se une a los receptores HER2 sobre-expresados en tumores. El estudio demostró que los inmunoliposomas inhibieron el crecimiento del tumor 3 veces más que el fármaco libre. Los inmunoliposomas también redujeron la toxicidad en tejidos periféricos en comparación al fármaco libre (57). Andreas Wicki en 2011, demostró que una formulación de inmunoliposomas funcionalizados con el anticuerpo Anti-VEGFR2, cuyo receptor es el factor de crecimiento (EGFR) encontrado en células cancerosas, puede llegar a producir un efecto significativo en la reducción de la carga tumoral en modelos de ratones transgénicos, en comparación al fármaco libre (57).

Teniendo estos y otros estudios como referencia se sostiene que los inmunoliposomas logran realizar la función deseada siendo capaces de dirigirse

al tejido diana después de reconocer los receptores expresados en las células (11). En la actualidad existen 3 mecanismos por los cuales los inmunoliposomas podrían atravesar la membrana celular:

a) Endocitosis mediada por adsorción (AME):

Siendo este proceso el principal mecanismo de internalización de macromoléculas a la célula. Por este mecanismo los liposomas son captados por proteínas, y carbohidratos que están ligados a la membrana citoplasmática de las células. Una vez dentro son captados por los endosomas o sufren un proceso de exocitosis (5).

b) Transporte mediado por transportadores (CMT):

Son el conjunto de mecanismos que regulan el paso de iones y moléculas pequeñas a través de membranas plasmáticas. Este mecanismo se debe a la selectividad de la membrana (5), que requiere de transportadores especializados, los cuales al ser activados, ayudan a transportar ciertas moléculas por rutas de señalización (13).

c) Endocitosis mediada por receptores (RME):

Se genera cuando los receptores se acumulan en regiones definidas de la membrana celular permitiendo la entrada selectiva de moléculas en la célula. Este último es uno de los principales mecanismos de entrega de moléculas por la BHE.(13).

Se sabe que la unión del receptor y el ligando induce a la internalización de complejos, dentro de esta vesícula endocítica; después de esto los receptores pueden mediar los diferentes procesos, incluyendo:

- La transcitosis del receptor al cerebro.
- La transcitosis inversa del cerebro a la sangre
- La endocitosis en el endotelio capilar cerebral sin transporte neto a través de la célula endotelial.

Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal más utilizado para poder ser usado como molécula de bioreconocimiento de la BHE es el anticuerpo OX26 (41,46).

1.7.1 Anticuerpo monoclonal OX26:

Es un anticuerpo monoclonal que deriva de rata y es usado específicamente para receptores de transferrina presentes en células endoteliales de los capilares cerebrales de la BHE humana (59). La transferrina es una glicoproteína endógena que puede penetrar en las células del endotelio cerebral por endocitosis mediada por receptores específicos de la misma transferrina. Esta se encarga de aportar hierro a las células cerebrales para su metabolismo, aunque también interviene en la eritropoyesis y la división celular (59,60). Según X Tang y colaboradores, el anticuerpo OX26 es capaz de unirse a un epítipo extracelular del receptor de la transferrina, que es diferente al sitio de unión de la glicoproteína transferrina, por lo tanto limita los efectos del transporte normal, previniendo la competencia por los sitios de unión entre el anticuerpo OX26 y los ligandos naturales (60). Rita Nieto Montesinos y colaboradores, demostraron que al usar el anticuerpo OX26 en liposomas encapsulando inhibidores de la glicoproteína P, aumentaba significativamente la inhibición de esta y consecuentemente la concentración cerebral de sus sustratos. Estos inmunoliposomas se formularon mediante la conjugación del grupo amino del fragmento Fab₂ y el grupo carboxilo del polímero DSPE-PEG₅₀₀₀ COOH de la membrana liposomal, a través de un enlace amida (58).

Por lo tanto los inmunoliposomas pueden aplicarse para encapsular y vectorizar diferentes fármacos al SNC y tratar diferentes enfermedades como epilepsia, Alzheimer, tumores, entre otros (11).

Hay que tener presente que todos los anticuerpos poseen una fracción Fab y una Fc. La fracción Fc al ser opsonizada, activa simultáneamente fagocitos, acelerando el tiempo de respuesta del sistema inmune y por lo tanto haciendo que nuestros liposomas sean fagocitados en menor tiempo, sin alcanzar su diana terapéutica (11). Por ello se suele fraccionar los anticuerpos, obteniendo solo fracciones Fab para poder ser conjugadas a los liposomas (58). Los fragmentos F(ab)₂ corresponden a dos fragmentos Fab unidos por el puente disulfuro intercatenario, son divalentes con un peso molecular de aproximadamente 110

kDa (61). Estos son generados por la digestión por pepsina de anticuerpos IgG enteros, para eliminar la mayor parte de la región Fc. Son más pequeños que las moléculas IgG enteras y permiten una mejor penetración en el tejido, facilitando así el reconocimiento del receptor (62). Los fragmentos de $F(ab)_2$ no se recomiendan para el bloqueo ya que tienen dos sitios de unión que están disponibles para capturar el anticuerpo. Sin embargo, a diferencia de los fragmentos $F(ab)$, los fragmentos $F(ab)_2$ pueden unir y precipitar antígenos gracias a sus dos sitios de unión (61,62).

Este fraccionamiento del anticuerpo en $F(ab)_2$ o Fab se logra utilizando 2-mercaptoetanol o quimopapaína, pero no todos los anticuerpos pueden ser fragmentados con estos dos (63). Es por esto que se necesita una enzima proteolítica con la capacidad de separar fragmentos $F(ab)_2$ de todas las clases de anticuerpos y en particular de las subclases de IgG. Se utiliza pepsina inmovilizada, la pepsina es una enzima proteolítica que se utiliza rutinariamente para la generación de fragmentos $F(ab)_2$ a partir de inmunoglobulina G (IgG) (62,64). La pepsina tiene la capacidad de romper las cadenas pesadas cerca de la región de la bisagra. Se conservan uno o más de los enlaces de disulfuro que unen las cadenas pesadas en la bisagra, por lo que las dos regiones de Fab del anticuerpo permanecen unidas, produciendo una molécula divalente (que contiene dos sitios de unión de anticuerpos), por lo tanto, la fracción $F(ab)_2$ de las cadenas ligeras permanecen intactas y unidas a la cadena pesada, mientras que el fragmento Fc se digiere en pequeños péptidos (62,63). La Pepsina Inmovilizada ofrece la clara ventaja de eliminar la contaminación enzimática de los fragmentos $F(ab)_2$. Esta reacción sólo se activa a pH ácido y se desnaturaliza irreversiblemente a pH neutro o alcalino. Después de la digestión de la pepsina, los fragmentos $F(ab)_2$ se separan de las IgG no digeridas, y los grandes fragmentos de Fc con la Columna de centrifugación de la Proteína A o de la Proteína G suministrada. La resina de la proteína A o G se une a las moléculas IgG y Fc y la $F(ab)_2$ se recoge rápidamente (62–64).

Como se explicó anteriormente en la Nanomedicina, los liposomas más empleados y estudiados son los liposomas SUV, puesto que poseen un tamaño

adecuado para poder atravesar barreras y lograr un mayor efecto farmacológico. Es por esto que se generaron diferentes formas de preparar liposomas SUV.

1.8 Métodos de preparación de liposomas:

A continuación se describe los métodos de formulación de liposomas MLV y SUV.

1.8.1 Vesículas multilamelares (MLV):

Para formular liposomas MLV se emplea diferentes técnicas entre las cuales resalta la técnica de hidratación de un film lipídico. Ésta parte de una disolución de lípidos en solventes orgánicos como cloroformo o ciclohexano, la cual puede contener colesterol, polímeros y/o fármacos. El solvente se evapora en un rotavapor obteniendo una fina película lipídica sobre las paredes del balón (48,65). Una vez obtenido el film lipídico se procede a hidratar el film lipídico con un solvente polar como agua o una solución tampón. Esta hidratación se realiza por encima de la temperatura de transición del lípido, generando vesículas espontáneamente en donde el solvente acuoso queda atrapado al interior de la bicapa lipídica y el resto en el interior del liposoma (49,65).

1.8.2 Vesículas unilamelares pequeñas (SUV):

Los liposomas SUV se pueden obtener directamente por la técnica de inyección de etanol, eliminación de detergente, o a partir de una formulación de liposomas MLV por extrusión en prensa francesa o ultrasonido.

Por inyección rápida de etanol o éter, los fosfolípidos son disueltos en etanol o éter y esta solución se inyecta a gran velocidad sobre un gran volumen de fase acuosa, de esta forma se forman espontáneamente liposomas tipo SUV (48,66). Por eliminación del detergente, la formación de liposomas SUV se produce por la eliminación de una suspensión previamente preparada de micelas mixtas detergente/ fosfolípidos (48,66). Por extrucción donde los liposomas MLV pasan a través de pequeños orificios, ejercidos por altas presiones, esto genera una población uniforme de liposomas SUV (67).

1.8.2.1 Formulación de liposomas SUV por ultrasonido:

El ultrasonido es la técnica más utilizada para formular liposomas SUV a partir de liposomas MLV, además de ser económica, permite trabajar con volúmenes pequeños y grandes, haciendo que sea fácilmente escalable (68). El ultrasonido es un método validado para la formulación de liposomas y la encapsulación de agentes activos en estos nanovectores, siendo probable que sea la técnica más usada para la formulación de liposomas SUV (68,69). En este método, la formulación es sometida a un baño de ultrasonido o a una sonda de ultrasonido para producir liposomas. El baño de ultrasonido permite un manejo más preciso de la temperatura, y la sonda de ultrasonido permite la regulación de la dispersión de la onda de ultrasonido. Al utilizar una sonda de ultrasonido hay que tener en cuenta parámetros como el tiempo de exposición, la frecuencia de la onda y la temperatura. La técnica de ultrasonido es limitada por su volumen o capacidad limitada para encapsular moléculas grandes (68,69), sin embargo es una técnica de fácil manejo.

1.9 Características liposomales:

Las características de los liposomas son importantes para su clasificación y estas son:

1.9.1 Tamaño de vesícula:

El tamaño de los liposomas y su homogeneidad son de gran importancia, estos están asociadas con el porcentaje de encapsulación, influyendo en el comportamiento y el destino en la circulación sanguínea (17). Santos y Guerrero señalaron que los liposomas pequeños (alrededor de 100 nm) son eliminados más lentamente que los grandes (alrededor de 200 nm), por lo tanto los liposomas pequeños pueden usar diferentes vías para llegar a los tejidos diana (22). Un importante medio de transporte para los liposomas pequeños es la vía endocítica, ya que el tamaño de los liposomas facilita el transporte por las mismas rutas que usan las células endoteliales de la BHE (12). Por otro lado los liposomas con un tamaño aproximado a 100 nm no son capaces de pasar por las fugas capilares, pero pueden llegar a

otros tejidos y órganos como el hígado, el bazo, medula ósea y órganos linfoides (70). A si mismo Suarez y colaboradores, señalan que la liberación del fármaco hidrófilo es más lenta en liposomas de mayor tamaño (14).

1.9.2 Índice de polidispersión:

Para lograr el éxito de las formulaciones liposomales y que estas sean seguras, estables y eficientes se requiere que la distribución de tamaño de partículas sea homogénea. Es así que se mide el rango del tamaño de los liposomas, el cual se denomina índice de polidispersión (PDI). El término de polidispersión se utiliza para describir el grado de no uniformidad de distribución de tamaño de partículas (71). Los índices de polidispersión establecidos para nanovesículas oscila entre 0.0 (poblaciones perfectamente uniformes) a 0.1 (poblaciones altamente polidispersas con múltiples poblaciones). Valores de 0.2 se considera aceptable en la práctica para formulaciones a base de polímeros y hasta 0.3 para formulaciones a base de lípidos (71).

1.9.3 Potencial Zeta:

El potencial Zeta es una propiedad de los materiales que mide el potencial lectocinetico en los sistemas coloidales. En los liposomas el potencial Zeta es medido en la doble capa lipídica (16). Puede servir para controlar la estabilidad y la homogeneidad de los liposomas. Cuando la carga es negativa se tiene una atracción entre partículas, formando floculos, reduciendo su vida media en la sangre y al poseer una carga positiva los componentes tienden a flocular, siendo poco estables, la carga positiva también los hace tóxicos y son eliminados rápidamente de la circulación (16). Por lo tanto vesículas de carga neutra presentan un mayor tiempo de estabilidad y menor respuesta inmunológica (8,16). En el caso de un sistema electrostático combinado y estabilización estérica, un potencial zeta entre -20 y +20 mV es deseable (72).

1.9.4 Porcentaje de encapsulación:

El porcentaje de encapsulación se considera como la eficiencia que tiene el nanovector para lograr encapsular en su interior el fármaco que se encuentra en la solución inicial (46). A menor tamaño, menor porcentaje de encapsulación (10).

1.9.5 Porcentaje de proteínas:

El porcentaje de proteínas mide el porcentaje de anticuerpo conjugado a la superficie liposomal, este se basa en el método de ácido bicinconánico (BCA) (73), con el cual se puede detectar y cuantificar colorimétricamente proteínas totales. Este método combina la reducción del Cu^{+2} a Cu^{+1} en medio alcalino (reacción de Biuret) con la detección selectiva del catión Cu^{+1} utilizando el ácido bicinconánico (74). Esta reacción da lugar a un color púrpura formado por el complejo de BCA unido a Cu^{+1} . Este complejo hidrosoluble absorbe luz a 562 nm. Los responsables de la dar inicio a la reacción son el número de enlaces peptídicos y la presencia de aminoácidos particulares (cisteína, cistina, triptófano y tirosina) (73,74).

Un estudio realizado en la clínica de cáncer en Cleveland, demostró que la dosis de 50 mg/m^2 cada 4 semanas de doxorrubicina, en tratamiento en cáncer de ovario, puede ser minimizada si se administra encapsulada en liposomas, esta llegó a tener el mismo efecto al ser administrada a una dosis de 40 mg/m^2 cada 6 semanas (75).

Estudios anteriores han demostrado que se puede lograr la reducción de la dosis del fármaco administrado, manteniendo el efecto farmacológico deseado. En tal sentido esta estrategia se podría utilizar para vectorizar compuestos lipofílicos como macamidas para tratar enfermedades del SNC (19).

1.10 Macamidas:

Las macamidas son metabolitos secundarios encontrados en una planta de los andes del Perú llamada *Lepidium meyenii* (Maca). Esta crece sobre los 4000 metros de altitud y es cosechada y consumida por sus múltiples propiedades farmacológicas desde el tiempo de los Incas (19).

En la época de los Incas, la Maca fue ampliamente consumida como Medicina tradicional para tratar problemas de fertilidad, menopausia reumatismo y para potenciar la virilidad, vitalidad y fuerza física (19). En la actualidad, es altamente usada en bebidas energizantes (76). La Maca es ampliamente estudiada por incrementar el vigor sexual hasta un 42% en hombres (77). En estudios realizados en ratas macho se evidencia un incremento de la movilidad de los espermatozoides y un aumento en el rendimiento sexual de los animales (78). La Maca también redujo el tamaño de la próstata en ratas, sin afectar los niveles de testosterona (79). La Maca demostró disminuir los niveles de lípidos y glucosa e incrementar los niveles de antioxidantes en ratas con hipertrigliceridémico hereditario (HHTg) (80).

En los estudios realizados en los últimos años, la Maca demostró tener efecto sobre el Sistema Nervioso Central, disminuyendo la ansiedad e incrementando la memoria por ser un neuroprotector (76).

En tal sentido, estudios anteriores evaluaron el efecto neuroprotector del extracto pentánico de la Maca en ratas *Sprague Dawley*. Así, el extracto disminuyó *in vivo* el volumen de infarto cerebral, e *in vitro* demostró inhibir la apoptosis y protegió las neuronas del insulto isquémico (19). En el extracto pentánico se encontraron compuestos solubles como las macamidas (81).

Las macamidas tienen una estructura química general constituida por una fenilamina unida a un ácido graso por un enlace amida. El ácido graso puede contener entre 12 a 24 carbonos y presenta dobles enlaces con configuraciones *cis* y *trans* (21) (Figura 1.5). A la actualidad se han logrado identificar diecinueve macamidas presentes en el extracto pentánico. Todas las macamidas son N-bencilamidas y algunas de estas son insaturadas en el carbono C9, C12 y C15, correspondiendo al ácido oleico, linoleico y linolénico, respectivamente (19,81). De estas macamidas encontradas se lograron sintetizar once de ellas con éxito (19).

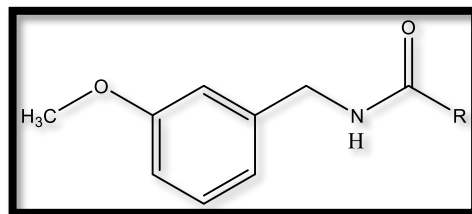


Figura: 1.5: Estructura general de las macamidas (81)

N-3-metoxibencil-oleamida y N-3-metoxibencil-linoleamida poseen un efecto neuroprotector tanto *in vivo* como *in vitro* al poseer un efecto inhibitor en la enzima hidrolasa amida de ácidos grasos (FAAH) que es terminador hidrolítico de la señalización de endocannabinoides. Estos estimulan el Sistema Endocanabinoide (81), teniendo un particular desempeño en muchos sistemas y órganos del cuerpo como pulmones, cerebro, hígado, medula ósea, páncreas, sistema vascular, sistema inmune, entre otros.

En diversos estudios realizados por el doctor Alejandro Pino – Figueroa se señala que entre estas macamidas, la que posee un mayor efecto neuroprotector hasta la actualidad es la N-3-metoxibencil-linoleamida que muestra una inhibición no competitiva dependiente del tiempo, pudiendo tener un potencial efecto neuroprotector, analgésico y antiinflamatorio (82).

1.10.1 N-3-metoxibencil-linoleamida:

La N-3-metoxibencil-linoleamida tiene una estructura conformada por un grupo metoxi en la posición 3 de la fenilamina, la cual está unida mediante un enlace amida a un ácido graso de 18 carbonos con dos dobles enlaces cis en los carbonos 9 y 12 (21) (Figura 1.6).

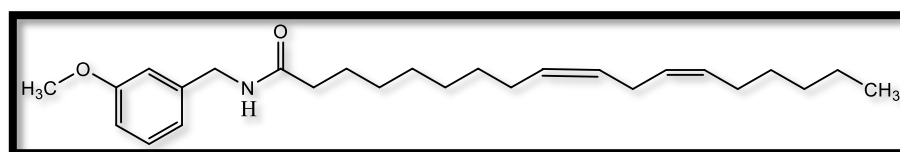


Figura: 1.6: Estructura química de la macamida N-3-metoxibencil-linoleamida (82)

En un estudio realizado en el Instituto del Cerebro del Hospital Israelita Albert Einstein – Sao Paulo, Brasil, se demostró, que el extracto pentánico de la Maca a una dosis de 1.0 mg/kg de peso tiene efecto anticonvulsivante. El mismo estudio sugiere que en conjunto las macamidas regulan la comunicación sináptica retrograda y podría modular la excitabilidad neuronal, protegiendo las neuronas de la excitotoxicidad (20).

Posteriormente un estudio realizado en la Universidad Católica de Santa María, demostró que las macamidas sintéticas N-3-metoxibencil-oleamida y N-3-metoxibencil-linoleamida poseen un efecto anticonvulsionante. De estas la más potente es la N-3-metoxi bencil-linoleamida.

Por tal motivo el presente proyecto propone una formulación de liposomas vectorizados hacia el Sistema Nervioso Central, cargados de la macamida N-3-metoxi bencil-linoleamida, con el fin de estudiar su efecto anticonvulsionante *a posteriori*. Estos contienen como molécula de bioreconocimiento el anticuerpo OX26.

1.10.2 Sistema Cannabinoide:

Es un grupo de receptores cannabinoides endógenos, estos están localizados en el SNC de los mamíferos y en órganos periférico. Están constituidos por lípidos neuromoduladores y sus receptores, teniendo como función principal el cumplimiento de un mecanismo neuromodulador en el SNC (83,84). Los receptores cannabinoides que han sido descritos hasta el momento, son: CB1, CB2, CB3 (GPR55) y CB4 (GPR119); y los endocannabinoides o ligandos endógenos son: Araquidonil-etanolamina o anandamida (AEA), N-araquidonil-dopamina (NADA), 2-araquidonilglicerol (2-AG), nodalín éter (NE) y virodamida (VIR) (21). Posteriormente, se han encontrado compuestos endógenos con efectos parecidos, los cuales no forman parte del grupo de ligandos endocannabinoides, estos fueron llamados compuestos cannabimiméticos. Entre estos tenemos: Homo- γ -linolenoiletanolamida, docosatetraenoiletanolamida, oleamida y palmitoiletanolamida (84,85). Los receptores cannabinoides, pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G. El primer receptor en ser descrito fue el receptor

cannabinoide CB1, el cual es metabotrópico, siendo considerado también como un receptor presináptico, el cual se encuentra en mayor abundancia en el cerebro (figura 1.7). Este tiene una expresión elevada en el hipocampo, cerebelo, cortex, en donde existe la presencia de neuronas, las cuales sintetizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) (86). Es por esto que los receptores CB1 pueden modificar la liberación de este neurotransmisor. El segundo receptor descrito fue el CB2, La distribución de este receptor es distinta y restringida a la periferia, se encuentran principalmente en el timo, bazo, medula ósea, amígdalas, y células del sistema inmunitario (figura 1.7) (85).

Puesto que estos receptores CB2 se hallan de una forma muy enfocada en el sistema inmunológico, es posible brindar una explicación a los diversos efectos de los endocannabinoides sobre la respuesta inmune que tiene nuestro organismo (83,86).

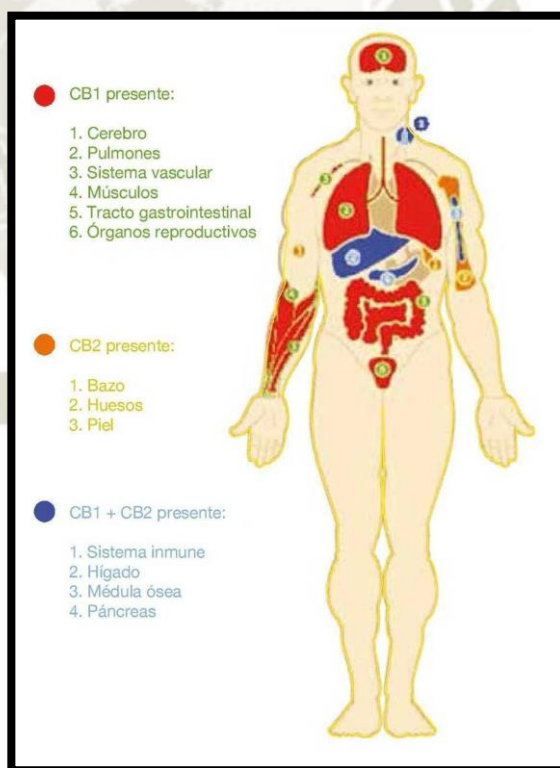


Figura 1.7: Órganos en donde se encuentran receptores CB1 y CB2

Las diversas acciones de los endocannabinoides están limitadas por un proceso de dos pasos, siendo estos la internalización y el catabolismo

(figura 1.8). Posterior a la internalización, los endocannabinoides pueden ser hidrolizados por la enzima amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH) (83–85). Diversas investigaciones indican que las macamidas sintéticas, 3-metoxi-N-benciloleamida y 3-metoxi-N-bencilinoleamida inhiben FAAH

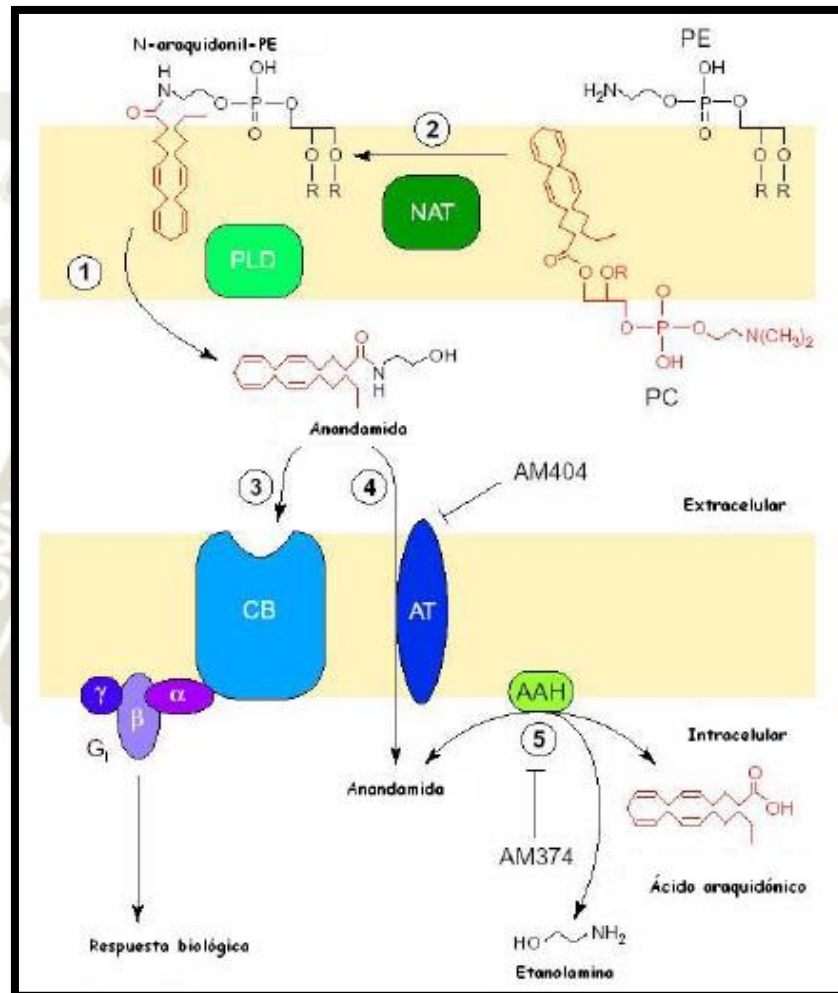


Figura 1.8: Síntesis, liberación, recepción y degradación de anandamida.

1. Hidrólisis de NAPE por la PLD
2. Síntesis de AEA por una N-aciltransferasa
3. Interacción con el receptor CB
4. Recepción por el transportador de Anandamida (AT)
5. Degradación por la amidohidrolasa de ácidos grasos (FAAH)

CAPITULO II

2.1 MATERIALES:

2.1.1 Material de laboratorio:

- Tubos de ensayo
- Tubos de ensayo con tapa rosca
- Tubos Falcon de 10 mL
- Tubos para centrifugación Eppendorf de 1.5 y 2 mL
- Tubos para diálisis (Spectra-Por® Float-A- Lyzer® G2)
- Viales para HPLC
- Frascos herméticos de tapa azul
- Tubos de Ultra filtración 30K
- Balón esmerilado
- Probetas de 25, 100, 500 y 1000 mL
- Micropipetas de 10, 100, 200 y 1000 μ L
- Tips esteriles para micropipetas de 20, 200 y 1000 μ L
- Parafilm (PARAFILM®)
- Celdas de poliestileno para analizador de particulas (Zetasizer ZS90)
- Celdas con cátodos, tipo U para analizador de particulas (Zetasizer ZS90)
- Pastilla magnética
- Foresight™ Columnas de cromatografía preenvasadas para cromatografía de exclusión
- Soporte para tubos de 1.5 mL
- Filtros de 0,22 μ m
- Microplacas Nunc™ MicroWell™ de 96 pocillos
- Espátula
- Gradilla para tubos de ensayo
- Cronómetro

2.1.2 Reactivos:

- Dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) (NANOCS, Estados Unidos)

- Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (*NANOCS*, Estados Unidos)
- (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamine)-N-[(polietilene glicol)-2000] (DSPE-PEG-2000-OCH₃) (*NANOCS*, Estados Unidos)
- 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-[carboxi(polietilene glicol)-5000] (ammonium salt) (DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH) (*NANOCS*, Estados Unidos)
- Colesterol (*SIGMA*, Estados Unidos)
- Macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida (linoleamida) (Massachusetts College of Pharmacy and Health Science, Estados Unidos)
- Macamida sintética N-bencilpalmitamida (palmitamida) (Massachusetts College of Pharmacy and Health Science, Estados Unidos)
- Anticuerpos monoclonales OX26 (THERMO FISHER SCIENTIFIC, Estados Unidos)
- Hidrocloruro de N- (3- (dimetilamino) propil) -N'-etil-carbodiimida (EDC) (*SIGMA*, Estados Unidos)
- N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), (*SIGMA* Estados Unidos)
- 2- (Nmorfolino) ácido etanosulfónico (MES) (*SIGMA*, Estados Unidos)
- Gel dextrano (sephadex G-50 Medium) (*SIGMA*, Estados Unidos)
- Kit de fraccionamiento de anticuerpos (THERMO SCIENTIFIC, Estados Unidos)
- Kit de ensayo de proteínas (QuantiPro™ BCA Assay Kit, Estados Unidos)
- Cloroformo (*SIGMA*, Estados Unidos)
- Metanol grado HPLC (*SIGMA*, Estados Unidos)
- Acetonitrilo grado HPLC (*SIGMA*, Estados Unidos)
- Pastillas para tampón fosfato salino pH 7.2 (PBS) (*MERCK*, Estados Unidos)

2.1.3 Equipos:

- Rota vapor (*Scilogex*)
- Analizador de partículas Zetasizer ZS90 (Malvern)
- Ultracentrífuga (*Scilogex*)
- Agitador magnético placa eléctrica
- Congeladora (*BOSCH, INTELLIGENT freezer 32*)
- Agitador vórtex (*LABNET INTERNATIONAL – S0200-230V-EU*)
- Baño Ultrasonido (*BRANSON 3800*)
- Balanza analítica (*OHAUS Pioneer TM*)
- Sonda de ultrasonido (*Vibra cellTM*)
- Cromatógrafo líquido de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC), (*HITACHI, Primaide*)
- Columna Chromolith® Performance RP-18e 100-4.6 mm

2.2 LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El trabajo de desarrolló en el laboratorio de Neurociencias y Biología Molecular (H – 401) y el laboratorio de Proyecto Mercurio (H – 202) de la Universidad Católica de Santa María – Arequipa.

2.3 METODOLOGÍA

2.3.1 Desarrollo y optimización de liposomas convencionales:

Se prepararon soluciones stock de DMPC y DPPC a una concentración de 25mg/mL y colesterol a una concentración de 15 mg/mL, disueltos en cloroformo. A partir de estas soluciones, se tomó el volumen necesario para llegar a una concentración final de 10 μ mol/mL de fosfolípido, variando la concentración de colesterol como se muestra en la tabla 2.1

Tabla 2.1: Formulación de liposomas convencionales

Formulación	Componentes	Ratio
C1	DMPC:colesterol	100:00
C2	DMPC:colesterol	100:10
C3	DMPC:colesterol	100:20

C4	DMPC:colesterol	100:30
C5	DPPC:colesterol	100:00
C6	DPPC:colesterol	100:10
C7	DPPC:colesterol	100:20
C8	DPPC:colesterol	100:30

Estas soluciones fueron llevadas a un rotavapor a temperatura ambiente, con el fin de evaporar todo el cloroformo hasta la formación de un film lipídico adherido a las paredes del balón.

Seguidamente se añadió tampón PBS a una temperatura mayor a la temperatura de transición de cada fosfolípido (DMPC 40°C y DPPC 50°C). Se llevó a baño de ultrasonido el tiempo necesario para que todo el film se desprendiese de las paredes del balón y posteriormente se dejó en reposo por 10 minutos, tiempo necesario para la estabilización de los liposomas. Después, se llevó la formulación a la sonda de ultrasonido y al baño de ultrasonido, intercalando ambos por ciclos de 3 minutos. Finalmente, se centrifugó a 15000 x g por 10 minutos para eliminar los fosfolípidos que no formaron las liposomas convencionales, los excedentes y el titanio que se desprende de la sonda de ultrasonido.

2.3.2 Desarrollo y optimización de liposomas furtivos:

Se preparó soluciones stock de DMPC y DPPC a concentraciones de 25mg/mL, DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃ y colesterol a concentraciones de 15 mg/mL y N-3-metoxi bencil-linoleamida a una concentración de 1mg/mL. A partir de estas soluciones, se tomó el volumen necesario para llegar a una concentración final de 10 μ mol/mL de fosfolípido, variando la concentración de colesterol y DSPE-PEG₂₀₀₀ como se muestran en la Tabla 2.2. Posteriormente se realizó el mismo procedimiento detallado en el desarrollo de liposomas convencionales.

Tabla 2.2: Formulación de liposomas furtivos

Formulación	Componentes	Ratio
F1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : colesterol	100:10:00
F2	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : colesterol	100:10:10
F3	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : colesterol	100:10:20
F4	DPPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : colesterol	100:10:00
F5	DPPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : colesterol	100:10:10
F6	DPPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : colesterol	100:10:20

Dado que la formulación F1 (DMPC:DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃:colesterol 100:10:00) presentó un tamaño de aproximadamente 100 nm y un índice de polidispersión inferior a 0.3 es que se decide optimizar tal formulación.

Primeramente se evaluó el impacto de la encapsulación de la macamida N-3-metoxi bencil-linoleamida y el tiempo de exposición al ultrasonido en el tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de los liposomas furtivos, como se muestra en la Tabla 2.3.

Tabla 2.3: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido.

Formulación	Componentes	Ratio	Tiempo de exposición a ultrasonido (min)
F1.1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : N-3-metoxibencil-linoleamida	100:10:20	15
F1.2	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : N-3-metoxibencil-linoleamida	100:10:20	30

F1.3	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : N-3-metoxibencil-linoleamida	100:10:20	45
-------------	-----------------------------------------------------------------------------------	-----------	----

Puesto que la encapsulación de la macamida N-3-metoxi bencil-linoleamida incremento el tamaño del liposomas, se redujo el porcentaje de DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃ como se muestra en la Tabla 2.4

Tabla 2.4: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido y la concentración de DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃

Formulación	Componentes	Ratio	Tiempo de exposición a ultrasonido (min)
F1.4	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7.5:20	15
F1.5	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7.5:20	30
F1.6	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7.5:20	45

La formulación F1.6 presento un tamaño de alrededor 100 nm e índice de polidispersión menor a 0.3. Con el objetivo de evitar un posterior incremento de tamaño de partícula por la inserción de los fragmentos de anticuerpos, se decidió modificar la amplitud de la sonda de ultrasonido y la temperatura en el baño de ultrasonido en la formulación F1.6 (Tabla 2.5).

Tabla 2.5: Optimización de liposomas furtivos, modificando la amplitud del ultrasonido y la temperatura

Formulación	Componentes	Ratio	Amplitud (A)	Temperatura (°C)
-------------	-------------	-------	--------------	------------------

F1.6.1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ - OCH ₃ :N-3-metoxibencil- linoleamida	100:7.5:20	70	45
F1.6.2	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ - OCH ₃ :N-3-metoxibencil- linoleamida	100:7.5:20	95	50
F1.6.3	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ - OCH ₃ :N-3-metoxibencil- linoleamida	100:7.5:20	95	55

Puesto que los parámetros de la formulación F1.6.3 presentaron características apropiadas para una posterior administración *in vivo*, con el tamaño menor, IPD menor a 0.3, es que se decidió optimizar tal formulación

Posteriormente se decidió incrementar el porcentaje de encapsulación de la macamida N-3-metoxi bencil-linoleamida, por lo cual se modificó la concentración de la misma y del fosfolípido. La concentración final de fosfolípidos es de 10 $\mu\text{mol/mL}$ (Tabla 2.6) y la concentración final de fosfolípidos es de 15 $\mu\text{mol/mL}$ (Tabla 2.7).

Tabla 2.6: Optimación de liposomas furtivos por concentración de N-3-metoxi bencil-linoleamida.

Formulación	Componentes	Ratio
F1.6.3.1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil- linoleamida	100:7.5:20
F1.6.3.2	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil- linoleamida	100:7.5:30

* Volumen necesario para llegar a una concentración final de 10 $\mu\text{mol/mL}$ de fosfolípido

Tabla 2.7: Optimización de liposomas furtivos por concentración del fosfolípido y de N-3-metoxi bencil-linoleamida.

Formulación	Componentes	Ratio
F1.6.3.3	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7.5:20
F1.6.3.4	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7.5:30

* *Volumen necesario para llegar a una concentración final de 15 µmol/mL de fosfolípido*

2.3.3 Desarrollo y optimización de inmunoliposomas:

Se prepararon soluciones stock de DMPC a concentración de 25mg/mL, DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃, DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH a concentración de 15 mg/mL y N-3-metoxibencil-linoleamida a concentración de 1mg/mL. A partir de estas soluciones, se tomó el volumen necesario para alcanzar la concentración final de 15 µmol/mL de fosfolípido (Tabla 2.8)

Tabla 2.8: Formulación de liposomas furtivos con el polímero DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH

Formulación	Componentes	Ratio
F1.6.3.3.1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ : DSPE-PEG ₅₀₀₀ -COOH:N-3-metoxibencil-linoleamida	100:6.25:1.25:20

Se colocó el volumen en un balón de vidrio para rotavapor y se esperó hasta la formación del film lipídico a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió el tampón MES a pH 5.2, se llevó a baño de ultrasonido a una temperatura de 55°C hasta que el film se desprendiese de las paredes del balón. Se esperó 10 minutos para la estabilización de liposomas y se dio un tratamiento intercalando entre la sonda de ultrasonido con una amplitud de 98 A y el baño de ultrasonido por 45 minutos, para después centrifugar a 15000 x g por 10 minutos.

2.3.3.1 Fraccionamiento de anticuerpos OX26

Se agregó 125 μ L de anticuerpos a la columna Zeba™ de desalinización y se centrifugó a 1500 x g por 2 minutos. La muestra obtenida se colocó en la columna de pepsina ya inmovilizada y se incubó por 3 horas a 120 rpm a 37°C. Para detener la reacción se centrifugó a 5000 x g por 1 minuto y se lavó la resina 2 veces con 130 μ L de PBS, para luego centrifugarla a 5000 x g por 1 minuto, Se homogenizo la muestra obtenida anteriormente con la proteína A durante 10 minutos. Acabado esto, se volvió a centrifugar a 1000 x g por 1 minuto. Aquí se encontró los fragmentos F(ab')₂ ya purificados, los cuales se lavaron 2 veces con 200 μ L de PBS y se centrifugó a 1000 x g por 1 minuto. Para terminar se concentró los anticuerpos con ayuda de los tubos de ultrafiltración 30KD a 15000 x g por 5 minutos.

2.3.3.2 Acoplamiento de anticuerpos a los inmunoliposomas

Para poder acoplar los anticuerpos a los liposomas, primero se tiene que activar el grupo COOH del polímero DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH, para esto se agregó a la formulación de liposomas descrita en la tabla N°8 el reactivo EDC a una concentración de 9.6 mg/mL y sulfo-NHS a una concentración de 10.8 mg/mL. La mezcla se mantuvo en agitación en el vortex por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se realizó una diálisis, colocando la muestra al interior de la membrana y PBS a su exterior. El sistema estuvo bajo agitación continua durante 1 hora. Finalizando, se ajustó el pH de la muestra a 7.4 y se agregó los fragmentos F(ab')₂ del anticuerpo y se llevó a incubación con agitación a 150 rpm a temperatura ambiente por 2 horas. Después se agregó glicina a una concentración de 50mM para y la mezcla se incubó con agitación a 150 rpm a temperatura ambiente por 30 minutos.

2.3.4 Caracterización de liposomas convencionales, furtivos e inmunoliposomas:

2.3.4.1 Medición del tamaño e índice de polidispersión:

Luego de haber finalizado la formulación de liposomas convencionales, furtivos e inmunoliposomas, se midió el tamaño de estos en un analizador de partículas Zetasizer ZS 90. Se colocó 1mL en una celda de poliestireno y esta se colocó en el equipo. El análisis se realizó a una temperatura de 25°C y un ángulo estático de 90°

2.3.4.2 Medición de potencial Zeta:

Para medir el potencial zeta se tomó 1 mL de muestra y se introdujo en la celda capilar de poliestireno diseñada para este análisis y esta celda se colocó en el equipo. El análisis se realizó a temperatura ambiente.

2.3.4.3 Porcentaje de encapsulación de la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida:

Para evaluar la encapsulación de la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida, se sometió los liposomas a lisis usando acetonitrilo y agitando dos veces por 3 minutos, luego se centrifugó a 15000 x g, por 10 minutos. Se tomó una alícuota del sobrenadante, donde se encuentra la macamida sintética N-3-metoxi bencil-linoleamida, y se diluyó 1:100 con metanol. Las muestras se filtraron antes de ser colocados en viales para el análisis cromatográfico. En tal análisis se utilizó una columna Chromolith® Performance RP-18e 100-4.6 mm a una temperatura de 40 °C, con una fase móvil de acetonitrilo: agua ultrapura (80/20, v/v), a un flujo de 1 mL/min. La detección se realizó con un detector de arreglo de diodos a una longitud de onda de 205 nm. El volumen de inyección fue de 20 µL. Todas las corridas duraron 15 minutos.

2.3.4.4 Determinación del porcentaje de acoplamiento de los fragmentos F(ab')₂ en los inmunoliposomas:

Se realizó una cromatografía de exclusión para separar los inmunoliposomas con los fragmentos F(ab')₂ de los liposomas que no se conjugaron a dichos fragmentos. La fase estacionaria fue gel dextrano (sefadex G-50 Medium) y la fase móvil fue PBS. Se tomó 500uL de

inmoliposomas y se añadió al sistema cromatográfico, se recolectaron muestras de 1.5 mL.

La elución de los inmunoliposomas se evaluó realizando un dosaje de los fragmentos $F(ab')_2$, con ayuda de un kit de proteínas. Para ello en un tubo falcón se realizó la mezcla del reactivo A (carbonato de sodio, tartrato de sodio y bicarbonato de sodio en 0,2 M NaOH), el reactivo B (Solución de ácido bicinchonínico al 4% (p/v)) y el reactivo C (4% (p/v) sulfato de cobre (II), solución de pentahidrato). Estos se añadieron en una proporción de 1:1:0.1 respectivamente. Se realizó los estándares a concentraciones de 0, 0.5, 5.0, 10, 20 y 30 $\mu\text{g/mL}$. En una placa de 96 pocillos se agregó 50 μL de cada estándar y cada muestra, posteriormente se agregó 50 μL del mix ya preparado en cada pocillo. La placa fue llevada a incubación por 2 horas a 37°C y se leyó en un lector de placas a 562 nm.

En la figura 2.1, podemos apreciar las diferentes estructuras de los liposomas, hasta llegar a los inmunoliposomas, en la primera figura desde la izquierda tenemos los liposomas convencionales, compuestos por fosfolípidos, seguidamente los liposomas furtivos con el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃, posteriormente el liposoma con el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃ y DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH y para terminar un inmunoliposoma, ya con los fragmentos $F(ab')_2$.

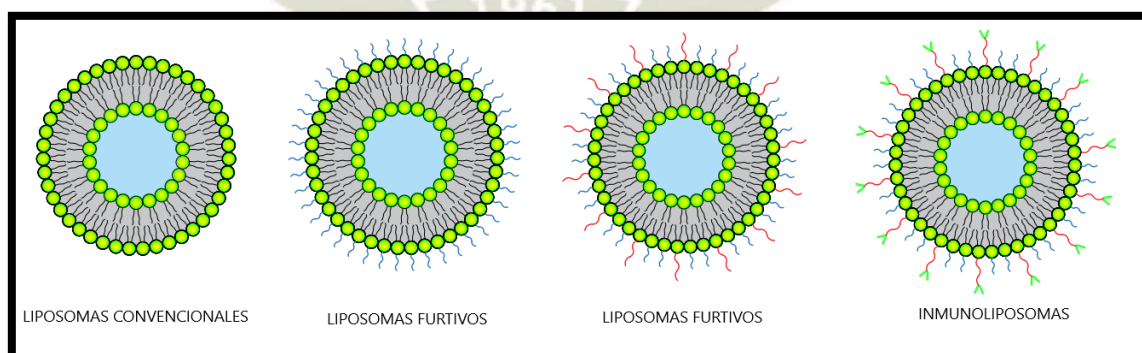


Figura: 2.1: Diseño de la estructura de los diferentes tipos de liposomas diseñados en este proyecto.

CAPITULO III

3.1 RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

El presente estudio se enfocó en el desarrollo y la optimización de una formulación de inmunoliposomas, en los cuales se encapsulo la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida. Diversos estudios demuestran que esta macamida presenta propiedades neuroprotectoras y que a altas dosis calma el status agudo de epilepsia en ratas (20,21,87). Así, los liposomas encapsulando la macamida poseen en la superficie fragmentos (Fab²) del anticuerpo OX26. Los fragmentos (Fab²) permiten una mejor penetración en los tejidos, facilitan su reconocimiento en los receptores de transferrina presentes en células endoteliales de los capilares cerebrales de la BHE humana (62,64). El anticuerpo OX26 es ampliamente utilizado en vectorizaciones hacia la BHE, puesto que estudios anteriores demuestran que tiene pocas repercusiones en órganos periféricos comparado con otros anticuerpos también usados para la vectorización a la BHE (88,89) Dicha formulación deberán presentar diferentes características: 1) un tamaño de alrededor 100 nm, lo cual le facilitara el ingreso a diversas partes del organismo, y podrá atravesar múltiples barreras, tales como la Barrera Hematoencefalica (10,42,43); 2) un índice de polidispersión menor a 0.3, el cual indica la uniformidad de la población liposomal (63). 3) El potencial Zeta debe ser de ± 20 mV, para brindarle estabilidad y homogeneidad a nuestra formulación (64,65); 4) un porcentaje de encapsulación mayor al 60% lo que nos indicará una tasa elevada de encapsulación del fármaco (65) y 5) una conjugación con los fragmentos F(ab²) del anticuerpo OX26, con un porcentaje alto superior al 60%.

3.1.1 Desarrollo y optimización de liposomas convencionales:

Según los datos obtenidos en el presente proyecto, las formulaciones que contienen DPPC presentan un menor tamaño, de alrededor de 100 nm, que las formulaciones que contienen DMPC, (Tabla 3.1). Las formulaciones de fosfolípidos que no contuvieron colesterol, fueron las que presentaron un menor tamaño siendo 189.5 ± 3.1 nm para DMPC y 88.1 ± 3.9 nm para el DPPC (Figura 3.1).

Tabla 3.1: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de liposomas convencionales

Formulación	Componentes	Ratio	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Z (mV)
C1	DMPC:colesterol	100:00	189.5 ± 3.1	0.35 ± 0.02	-5.7 ± 0.3
C2	DMPC:colesterol	100:10	214.5 ± 4.3	0.38 ± 0.05	-1.5 ± 0.5
C3	DMPC:colesterol	100:20	220.6 ± 6.8	0.60 ± 0.09	-1.4 ± 0.3
C4	DMPC:colesterol	100:30	235.6 ± 7.3	0.60 ± 0.06	-1.6 ± 0.2
C5	DPPC:colesterol	100:00	88.1 ± 3.9	0.32 ± 0.04	-7.4 ± 0.8
C6	DPPC:colesterol	100:10	112.6 ± 4.1	0.33 ± 0.08	-1.5 ± 0.3
C7	DPPC:colesterol	100:20	119.4 ± 5.4	0.51 ± 0.06	-1.2 ± 0.1
C8	DPPC:colesterol	100:30	128.8 ± 6.2	0.53 ± 0.07	-1.9 ± 0.3

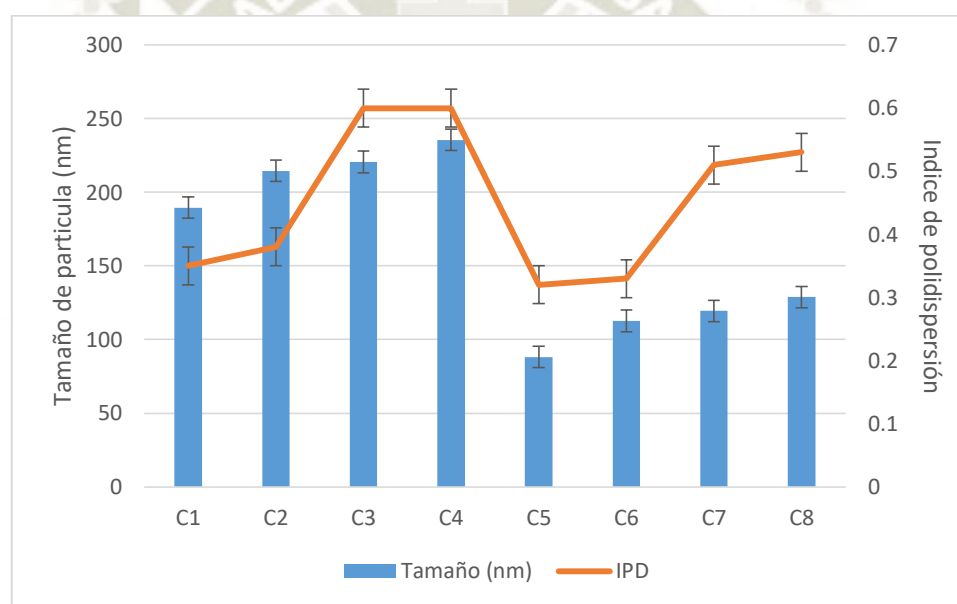


Figura: 3.1: Tamaño e índice de polidispersión de liposomas convencionales

**El eje y de la izquierda tamaño de partícula (nm) y el eje y de la derecha índice de polidispersión.*

Para la estructura base de los liposomas se decidió utilizar fosfolípidos sintéticos y de carga neutra, puesto que un estudio anterior demostró que (DPPC) y (DMPC) presentan una mayor estabilidad y mayor tiempo de vida media en comparación a fosfolípidos naturales como la fosfatidilcolina de huevo y soya (90). DPPC y DMPC, también asemejan condiciones naturales de las células, presentan cadenas hidrocarbonadas de entre 14 a 18 carbonos, se encuentran en estado fluido a la temperatura

de trabajo y su temperatura de transición (DMPC 40°C y DPPC 50°C) es mayor a la corporal, pero es menor a temperaturas desnaturalizantes de diferentes compuestos (45). Estos son propiedades indispensables para ser un fosfolípido funcional. Aunque el colesterol a concentraciones menores del 30% suele atribuir propiedades de flexibilidad y estabilidad a la membrana liposomal, aumenta en gran medida el tamaño de los liposomas a concentraciones mayores del 10% (45), lo cual no ayudó a nuestro propósito principal, que es obtener inmunoliposomas de aproximadamente 100 nm.

3.1.2 Desarrollo y optimización de liposomas furtivos:

En base a la estructura de los liposomas convencionales, se desarrolló los liposomas furtivos y se decidió incorporar el polímero (1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamine)-N-[(polietilenglicol)-2000] (DSPE-PEG-2000-OCH₃) en las formulaciones que no presentan colesterol y las que presentan colesterol al 10 y 20%, para ambos fosfolípidos.

La formulación F1 que corresponde a DMPC:DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃:colesterol, con un ratio de 100:10:00 respectivamente, presento un tamaño de 51.2 ± 2.2 , siendo este el menor tamaño entre todas las formulaciones (Tabla 3.2). Las otras formulaciones elevaron su tamaño a más de 100 nm y presentaron un IPD inferior a 0.3, lo cual nos señala que se trata de formulaciones homogéneas. En todas las formulaciones el potencial Zeta no superó los ± 5.0 mV, lo cual nos indica una carga neutra (Tabla 3.2).

Tabla 3.2: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de liposomas furtivos

Formulación	Componentes	Ratio	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Z (mV)
F1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :colesterol	100:10:00	51.2 ± 2.2	0.21 ± 0.06	-3.5 ± 0.3
F2	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :colesterol	100:10:10	114.1 ± 0.4	0.23 ± 0.01	-4.6 ± 0.5
F3	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :colesterol	100:10:20	117.9 ± 1.4	0.21 ± 0.009	-4.3 ± 0.8

F4	DPPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :colesterol	100:10:00	116.3 ± 1.2	0.27 ± 0.02	-3.2 ± 0.4
F5	DPPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :colesterol	100:10:10	129.4 ± 6.0	0.24 ± 0.02	-4.2 ± 0.2
F6	DPPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :colesterol	100:10:20	137.5 ± 2.8	0.23 ± 0.01	-3.9 ± 0.5

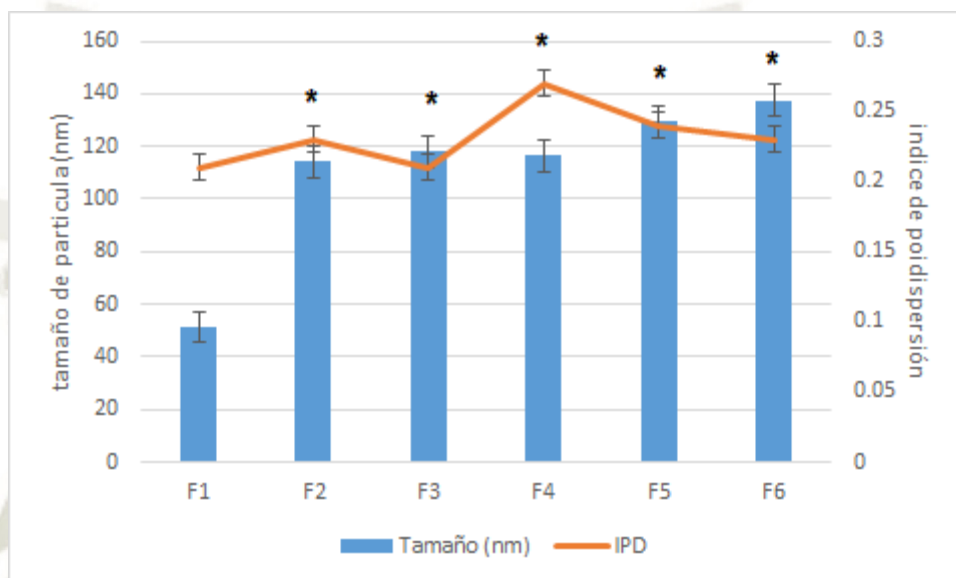


Figura: 3.2: Tamaño e índice de polidispersión de liposomas con colesterol y DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃

*El eje y de la izquierda tamaño de partícula en nanómetros y el eje y de la derecha índice de polidispersión.

*ANOVA: Diferencia significativa comparado con la formulación F1.

Para las formulaciones de liposomas furtivos se decidió incorporar el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃, puesto que diversos estudios demuestran que este logra alargar el tiempo de vida media de los liposomas y por lo tanto del fármaco encapsulado hasta 9 veces más que los liposomas convencionales (18,91). Este polímero hidrófilo, flexible y biocompatible otorga propiedades protectoras al liposoma, previniendo el reconocimiento por las opsoninas y reduciendo su eliminación por parte del Sistema Retículo Endotelial, por lo tanto prolongando su tiempo de vida media. Esto le facilita la llegada al fármaco hacia el tejido diana. Además el polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃, posee un radical final metoxi que le brinda una carga neutra a la formulación (51,91).

La tabla 3.3 muestra los resultados del test de ANOVA y la tabla 3.4 muestra los resultados de la comparación múltiples de *Holm-Sidak* en donde se comparó las formulaciones F2, F3, F4, F5 y F6 con la formulación F1 para ver si presenta una diferencia significativa.

Tabla 3.3: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa, comparándolo con F1.

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	5	14103.4	2810.6	317.3	<0.001
Residual	12	106.6	8.8		
Total	17	14210.1			

DF: Grados de libertad, SS: Sumatoria de cuadrados, MS: Promedio de los cuadrados, F: Prueba F estadística

Tabla 3.4: Diferencia estadística significativa de tamaño, respecto a la formulación F1.

Comparación	Diferencias entre promedios	t	P<0.050
FI vs F2	86.3	35.4	Si
FI vs F3	78.1	32.1	Si
FI vs F4	66.6	27.3	Si
FI vs F5	65.0	26.7	Si
FI vs F6	62.8	25.8	Si

La tabla 3.4 muestra que si hay una diferencia significativa entre las formulaciones respecto a la formulación F1. Por tal motivo, el desarrollo de liposomas furtivos e inmunoliposomas se basa en la formulación F1.

Posteriormente se inició los estudios de encapsulación de la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida, lo cual incremento el tamaño del liposoma en más de 100 nm, por tal motivo se decidió optimizar el proceso de formulacion para reducir el tamaño y el IPD. Para esto se comenzó prolongando el tiempo de exposición de ultrasonido, que inicialmente fue de 15 (Tabla 3.5).

Tabla 3.5: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de la optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido y concentración de DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃

Formulación	Componentes	Ratio	Tiempo exposición ultrasonido (minutos)	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Z (mV)
F1.1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:10:20	15	220.1 ± 2.0	0.18 ± 0.02	-9.2 ± 0.9
F1.2	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:10:20	30	214.0 ± 1.5	0.16 ± 0.006	-10.8 ± 0.6
F1.3	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:10:20	45	188.8 ± 2.3	0.17 ± 0.02	-8.9 ± 0.8
F1.4	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:20	15	119.1 ± 1.4	0.20 ± 0.02	-9.2 ± 0.5
F1.5	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:20	30	112.1 ± 1.5	0.19 ± 0.06	-9.7 ± 0.3
F1.6	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:20	45	105.2 ± 0.7	0.18 ± 0.01	-10.7 ± 0.6

Las formulaciones recibieron intervalos de tiempo de 15, 30 y 45 minutos en el ultrasonido. La formulación F1.3 a pesar de que pasó 30 minutos en el ultrasonido, muestra una disminución de tamaño de 32 nm; con respecto a la formulación F1.1 que solo estuvo 15 minutos en el ultrasonido. (Figura 3.3). Por este motivo se decidió reducir el porcentaje de DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃ en las formulaciones a 7.5%, lo cual redujo considerablemente el tamaño de los liposomas furtivos (Figura 3.4). Este cambio de concentración del DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃ y el incremento del tiempo de exposición al ultrasonido redujo el tamaño hasta 105.28 ± 0.7 en la formulación F1.6, la cual obtuvo un IPD de 0.18 ± 0.01. Aunque la carga del potencial Zeta disminuyó aún más por la adición de la macamida

sintética N-3-metoxibencil-linoleamida, los valores se mantienen dentro de los límites establecidos ± 20 mV.

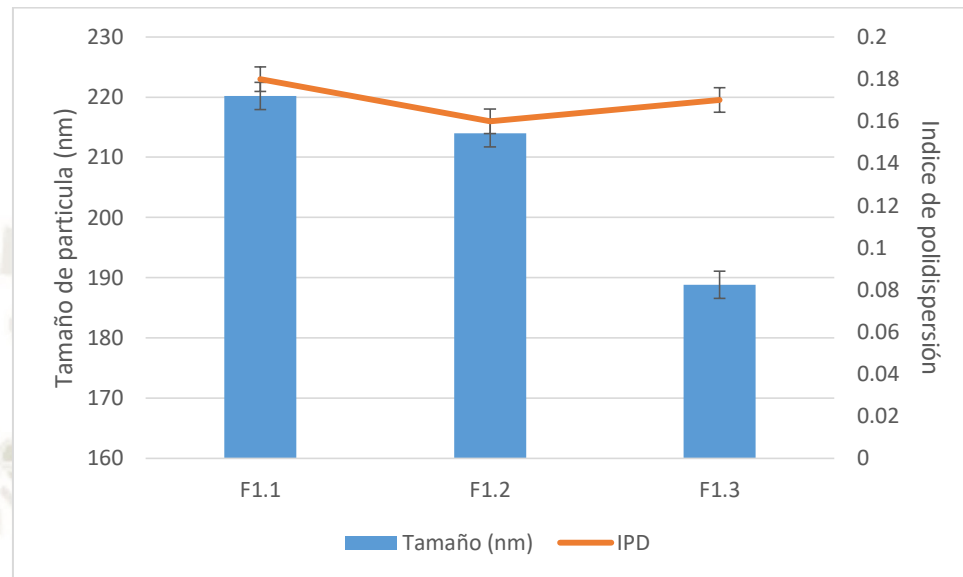


Figura: 3.3: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido

**El eje y de la izquierda tamaño de partícula en nanómetros y el eje y de la derecha índice de polidispersión*

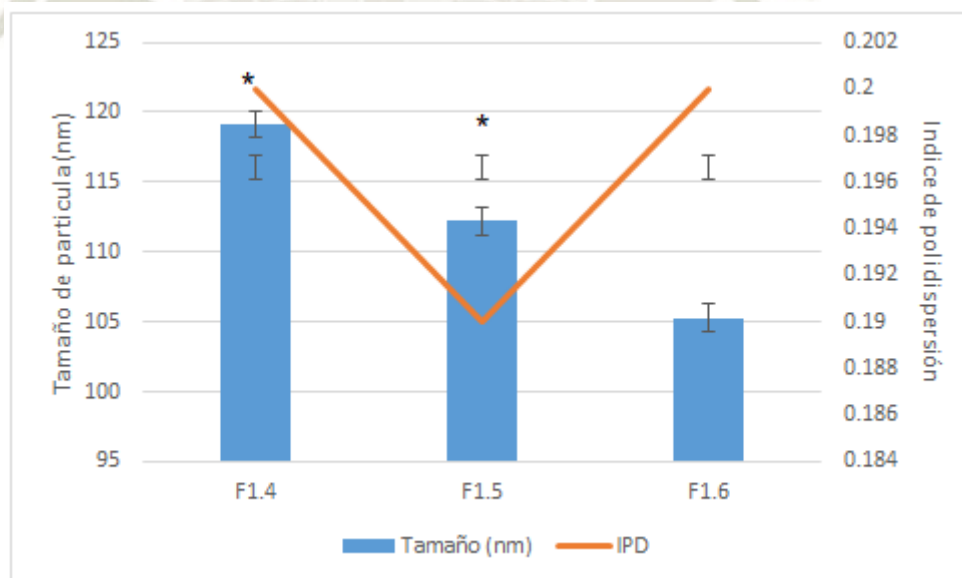


Figura: 3.4: Optimización de liposomas furtivos, modificando el tiempo de ultrasonido y concentración de DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃

**El eje y de la izquierda tamaño de partícula en nanómetros y el eje y de la derecha índice de polidispersión.*

**ANOVA: Diferencia Significativa comparado con la formulación F1.6.*

Como lo resaltan autores como Ram B. Gupta y Vladimir P. Torchilin en libros, uno de los factores más importantes para la optimización de liposomas al usar ultrasonido es el tiempo de exposición al cual es sometido (22,92). Esta es la razón por la cual se decidió someter las formulaciones a tiempos de 15, 30 y 45 minutos.

Como se puede apreciar en la Figura 3.3 hay una diferencia significativa en el tamaño al cambiar la concentración del DSPE-PEG-2000-OCH₃ de 10% a 7.5% e incrementar el tiempo de exposición a 45 minutos. Es por esta razón que se decidió tomar la formulación F1.6 para seguir optimizando. Diferentes autores utilizaron una concentración de DSPE-PEG-2000-OCH₃ a 7.5%, puesto que aún confiere propiedades furtivas, no sobrecarga demasiado la capa superficial del liposoma y brinda un menor tamaño, generando también un IPD menor (93,94).

La tabla 3.6 muestra los resultados del test de ANOVA y la tabla 3.7 muestra los resultados de la comparación múltiples de *Holm-Sidak* en donde se comparó las formulaciones F1.1, F1.2, F1.3, F1.4 y F1.5 con la formulación F1.6 para ver si presenta una diferencia significativa.

Tabla 3.6: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa según el tamaño

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	5	42954.6	8590.9	2055.3	<0.001
Residual	12	50.1	4.18		
Total	17	43004.8			

DF: Grados de libertad, SS: Sumatoria de cuadrados, MS: Promedio de los cuadrados, F: Prueba F estadística

En la tabla 3.7 se aprecia que en todas las formulaciones se encuentra una diferencia significativa al ser comparada con la formulación F1.6. Lo que connota una diferencia del tamaño en la formulación F1.6 con respecto a las demás.

Tabla 3.7: Diferencia estadística significativa de tamaño, respecto a la formulación F1.6.

Comparación	Diferencias entre promedios	t	P<0.050
F1.6 vs F1.1	114.9	68.8	Si
F1.6 vs F1.2	108.7	65.1	Si
F1.6 vs F1.3	83.5	50.0	Si
F1.6 vs F1.4	13.8	8.3	Si
F1.6 vs F1.5	6.9	4.1	Si

Otros de los factores importantes para la optimización de las características físicas de los liposomas al usar ultrasonido es la amplitud de las ondas de la sonda de ultrasonido, a mayor amplitud de onda, menor tamaño del liposoma (2, 84). También hay que tener en cuenta que la temperatura de trabajo debe ser mayor a la temperatura de transición del fosfolípido. Por ello se decidió probar diferentes amplitudes en la sonda de ultrasonido y temperaturas en el baño de ultrasonido. La formulación F1.6, la cual fue escogida anteriormente por sus características, fue expuesta a una amplitud mayor, siendo esta de 95 Amperios (A) y a temperaturas de 50 y 55°C (Tabla 3.8). Cabe resaltar que la amplitud de las formulaciones previas fue de 70 A y la temperatura del baño de ultrasonido fue de 45°C.

Tabla 3.8: Tamaño, índice de polidispersión y potencial Zeta de la optimización de liposomas furtivos, modificando la amplitud y la temperatura.

Formulación	Componentes	Ratio	Amplitud (A)	Temperatura (°C)	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Z (mV)
F1.6.1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:20	70	45	109.9 ± 1.8	0.23 ± 0.03	-10.6 ± 0.9
F1.6.2	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:20	95	50	96.2 ± 1.3	0.20 ± 0.01	-9.2 ± 0.6
F1.6.3	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:20	95	55	90.9 ± 1.6	0.19 ± 0.08	-10.4 ± 0.2

A partir de la formulación F1.6 se logró disminuir el tamaño del liposoma en 19 nm y el IPD en 0.04 unidades en la formulación F1.6.3 (Figura 3.4), la cual fue sometida a una temperatura de 55°C y una amplitud de 95 Amperios. Aunque la diferencia entre los tamaños es pequeña, puede incrementarse al momento de agregar el DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH y los fragmentos F(ab)₂ (80,82).

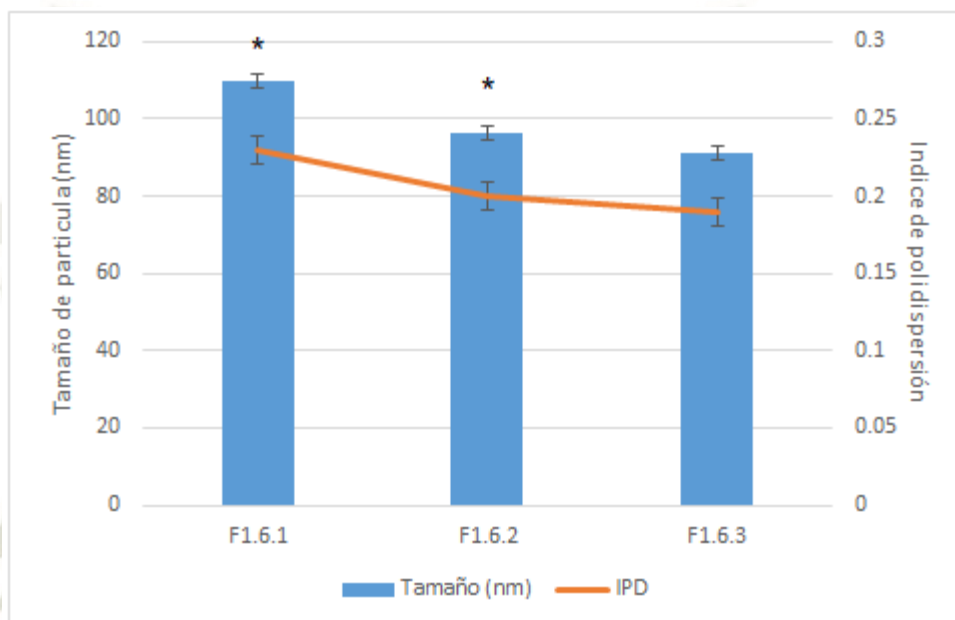


Figura: 3.5: Optimización de liposomas furtivos, modificando la amplitud y la temperatura.

**El eje y de la izquierda tamaño de partícula en nanómetros y el eje y de la derecha índice de polidispersión.*

**ANOVA: Diferencia Significativa comparado con la formulación F1.6.3.*

La amplitud de onda es importante como variable en la optimización de liposomas, puesto que la frecuencia constante de esta puede causar la ruptura de liposomas grandes y enseguida la formación de otros más pequeños, provocando que la homogeneidad de los liposomas sea mayor (2,84). Por este motivo se utilizó 70 A que es la amplitud sugerida por el fabricante de la sonda y 95 A, la amplitud máxima de la sonda sin el riesgo a una ruptura de sonda, demostrando de esta manera que el tamaño sí se ve afectado por la amplitud (13,15,46).

La temperatura de transición también es un factor importante en la optimización ya que a dicha temperatura los fosfolípidos pasan de la fase

sólida a la fase gel, la cual facilita la ruptura de las vesículas grandes con el ultrasonido y la formación de nuevas vesículas con un menor tamaño (97). Por tal motivo se utilizaron temperaturas de 45, 50 y 55 °C, donde también se denota la importancia de estas temperaturas con respecto al tamaño. No se pudo utilizar temperaturas mayores a 60°C ya que la macamida encapsulada en los liposomas podría degradarse.

La tabla 3.9 muestra los resultados del test de ANOVA y la tabla 3.10 muestra los resultados de la comparación múltiples de *Holm-Sidak* en donde se comparó las formulaciones F1.6.1, F1.6.2, con respecto a la formulación F1.6.3, para ver si presentan una diferencia significativa.

Tabla 3.9: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa.

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	2	576.3	288.1	42.8	<0.001
Residual	6	40.3	6.7		
Total	8	616.6			

DF: Grados de libertad, SS: Sumatoria de cuadrados, MS: Promedio de los cuadrados, F: Prueba F estadística

En la tabla 3.10 se aprecia que en todas las formulaciones se encuentra una diferencia significativa. Por lo tanto se decidió tomar la formulación F1.6.3 que posee el menor tamaño.

Tabla 3.10: Diferencia estadística significativa de tamaño, respecto a la formulación F1.6.3.

Comparación	Diferencias entre promedios	t	P<0.050
F1.6.1 vs F1.6.3	18.9	8.9	Si
F1.6.2 vs F1.6.3	5.2	2.4	Si

Hasta esta etapa se tienen los parámetros ya establecidos como amplitud, temperatura y tiempo de ultrasonido. Estos nos brindan un tamaño, IPD y potencial Zeta adecuados para la formulación de los inmunoliposomas y son reproducibles, tal como muestra la formulación 1.6.3. En adelante la

caracterización de liposomas se completara cuantificando el porcentaje de encapsulación de macamida.

Como se muestra en la Tabla 3.11, donde la concentración de fosfolípido es de 10 $\mu\text{mol/mL}$, las concentraciones de macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida fueron de 20 y 30 $\mu\text{mol/mL}$. Aunque, el IPD y el potencial Zeta no se vieron afectados con el aumento de la macamida, el tamaño si mostro un aumento en la formulación que contiene 30 $\mu\text{mol/mL}$ de macamida.

Tabla 3.11: Tamaño, índice de polidispersión, potencial Zeta y porcentaje de encapsulación según la concentración de macamida

Formulación	Componentes	Ratio	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Z (mV)	% Encapsulación
F1.6.3.1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:20	93.4 \pm 1.8	0.18 \pm 0.04	-11.4 \pm 0.1	85 \pm 1.4
F1.6.3.2	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:30	93.9 \pm 1.5	0.24 \pm 0.02	-11.2 \pm 0.9	118 \pm 2.9

Se decidió incrementar el porcentaje del fosfolípido DMPC a 15 $\mu\text{mol/mL}$, puesto que se espera que el porcentaje de encapsulación también se vea aumentado (Tabla 3.12).

La Tabla 3.12 muestra que el aumento de fosfolípido a 15 $\mu\text{mol/mL}$ también ocasiona un aumento en el porcentaje de encapsulación a un 89.86 %, sin un aumento notorio en el tamaño, IPD o potencial Zeta, en la formulación con una concentración de 20 $\mu\text{mol/mL}$ de la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida.

Tabla3.12: Tamaño, IPD, Potencial Zeta y porcentaje de encapsulación según su concentración de macamida y del fosfolípido.

Formulación	Componentes	Ratio	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Z (mV)	% Encapsulación
F1.6.3.3	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:20	94.2 ± 0.8	0.2 ± 0.04	-10.5 ± 0.8	89.86 ± 1.1
F1.6.3.4	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :N-3-metoxibencil-linoleamida	100:7,5:30	100.1 ± 1.1	0.19 ± 0.03	-9.3 ± 0.7	112.15 ± 1.5

Estudios anteriores demuestran que el porcentaje de encapsulación es proporcional al tamaño del liposoma (13,15). Otros estudios mostraron que una encapsulación superior al 60%, es considerada una encapsulación eficiente (26,68). Por lo tanto la formulación F1.6.3.3 muestra las características necesarias de tamaño, IPD, potencial zeta y porcentaje de encapsulación para ser escogida como la formulación base de los inmunoliposomas.

Ya acabada la optimización y la caracterización de los liposomas furtivos, se comenzó los estudios de formulación de los inmunoliposomas.

3.1.3 Desarrollo y optimización de Inmunoliposomas:

La formulación escogida fue la formulación F1.6.3.3, la cual presento un tamaño de 94.21 ± 0.8 nm, un IPD de 0.2 ± 0.04 , un potencial Zeta de -10.5 ± 0.8 mV y un porcentaje de encapsulación de $89.86 \pm 1.1\%$, siendo estos los criterios necesarios para una posible futura administración en animales de experimentación. A esta formulación se agregó el polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH. Los datos obtenidos se muestran en la Tabla 3.13, estas características ayudan en la comprobación de la conjugación del anticuerpo. El polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH aumento considerablemente el tamaño del liposoma en 17.81 nm, el IPD fue de 0.27 ± 0.07 , aun en los límites aceptados. El potencial Zeta fue de -15.65 ± 1.6 , este disminuyo considerablemente volviéndose más negativo que el de los liposomas furtivos.

Tabla 3.13: Tamaño, IPD, Potencial Zeta y porcentaje de encapsulación del liposomas furtivos conteniendo el polímero DESPE-PEG₅₀₀₀COOH

Formulación	Componentes	Ratio	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Z (mV)
F1.6.3.3.1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :DSPE-PEG ₅₀₀₀ -COOH:N-3-metoxibencil-linoleamida	100 : 6.25 : 1.25 : 20	112.0 ± 1.9	0.27 ± 0.07	-15.6 ± 1.6

Se insertó en la superficie el polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH por dos motivos específicos, el primero es que los fragmentos F(ab')₂ del anticuerpo puedan conjugarse con el grupo COOH del polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH, uniéndolo a la superficie liposomal y segundo para que los fragmentos F(ab')₂ estén sobreexpuestos por encima del polímero DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃ ya que la cadena del polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH es más larga por 300 carbonos (21,47,98), teniendo una mayor oportunidad de interactuar con los receptores de la BHE. La carga negativa que presentan estos liposomas es causada por el grupo carboxilo que presenta el polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH, esta otorga una carga negativa mayor al liposoma (16,72).

Posteriormente de la caracterización de los inmunoliposomas de la nueva formulación F1.6.3.3.1, se comienza con el fraccionamiento de los anticuerpos OX26.

3.1.3.1 Fraccionamiento de anticuerpos OX26

Se logró fraccionar los anticuerpos OX26 en fragmentos F(ab')₂ con ayuda del kit de fraccionamiento con pepsina inmovilizada. Se decidió usar este kit, cuyo fundamento es conocido y realiza el corte en el fragmento Fc para separar los fragmentos F(ab')₂ (64).

El fraccionamiento del anticuerpo en F(ab')₂ o Fab se logra utilizando 2-mercaptoetanol o quimopapaína, pero no todos los anticuerpos pueden ser fragmentados con estos dos. Es por esto que se necesita una enzima proteolítica con la capacidad de separar fragmentos F(ab')₂ de todas las clases de anticuerpos y en particular de las subclases de IgG (64). La

enzima proteolítica pepsina logra separar los fragmentos Fc de los fragmentos $F(ab')_2$ y los Fc son posteriormente recolectados. Siendo este uno de los medios de fraccionamiento de anticuerpos más utilizado (79).

El anticuerpo OX26 y sus fragmentos, demostraron ser un anticuerpo específico al receptor transferrina, el cual se encuentra también en la BHE. Estudios anteriores demuestran que al usar este anticuerpo, el fármaco encapsulado no llega en concentraciones altas a los tejidos periféricos y logra que este llegue al cerebro en mayor concentración (61). Innumerables estudios señalan que el anticuerpo OX26 resalta sobre el resto de anticuerpos utilizados como vectorizadores a la BHE, puesto que es específico, fácil de manipular, se puede usar en modelos *in vivo* en ratas y es reproducible en humanos (59,60).

Posteriormente se realizó la conjugación de los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo OX26 a el polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH.

3.1.3.2 Acoplamiento de anticuerpos a los inmunoliposomas.

La conjugación de los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ con el polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH es esencial para la formulación de los inmunoliposomas, para esto se utilizó los reactivos EDC y sulfo NHS, pues estos son activadores del grupo carboxilo y son solubles en medio acuoso (99). Primeramente reacciona el EDC y el grupo carboxilo del polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH, formando un enlace amida entre el hidroxilo negativo del polímero y el grupo inestable de los nitrógenos del EDC, que posteriormente reaccionan con el reactivo sulfo NHS, reemplazando el EDC por su anillo, fijado en el nitrilo, esto estabiliza la reacción amínica que se forma. Posteriormente reacciona con el grupo amino de los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo, permitiendo la conjugación entre el polímero y el fragmento $F(ab')_2$ del anticuerpo, mediante un grupo amida (Figura 3.5)(89).

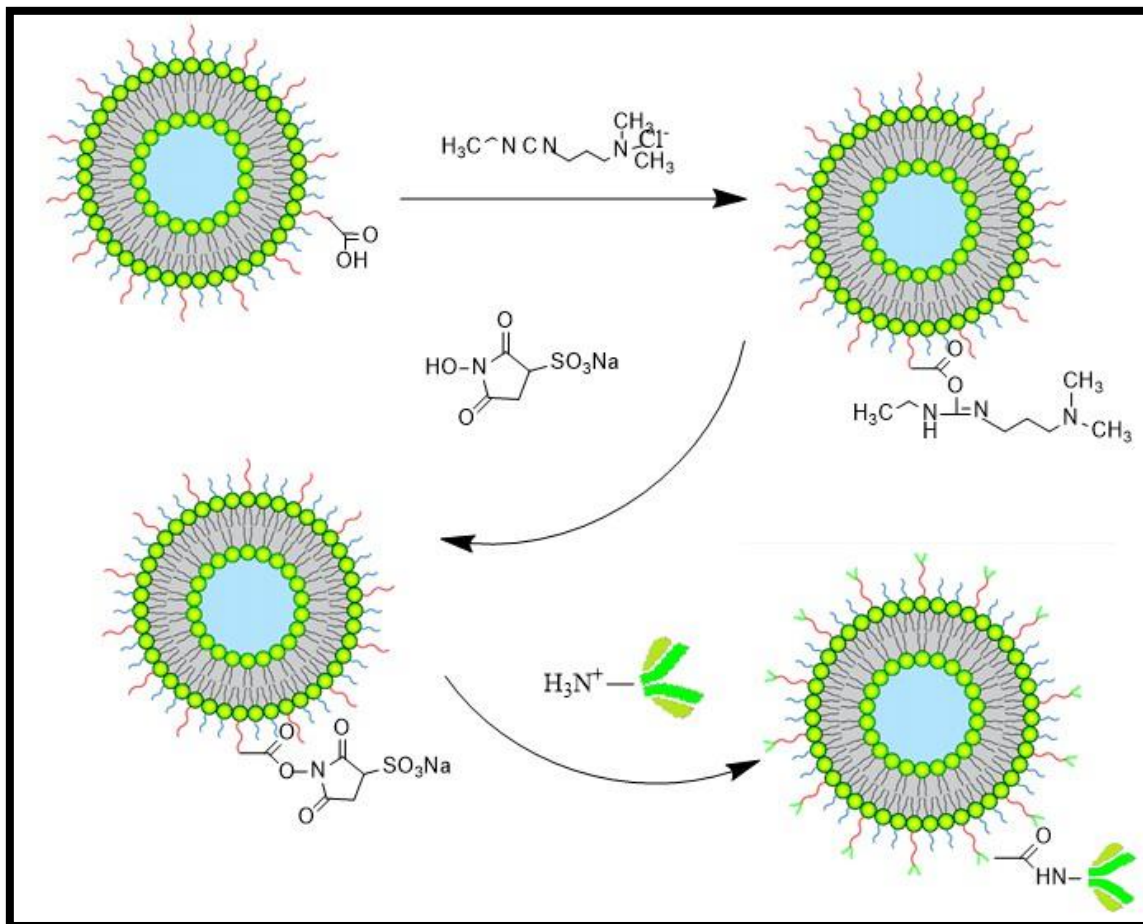


Figura: 3.6: Conjugación del fragmento F(ab)² del anticuerpo OX26 y el polímero DESPE-PEG₅₀₀₀-COOH⁻.

Para lograr separar los liposomas conjugados, los liposomas que no conjugaron y los fragmentos F(ab)² del anticuerpos que no conjugaron es que se realizó una cromatografía de exclusión y para confirmar la conjugación de liposomas se realizó un dosaje de proteínas de la fracción de liposomas conjugados.

En la tabla 3.14 se muestran los valores de la caracterización final de los inmunoliposomas, en donde el tamaño aumento en 21,51 nm con respecto a la formulación F1.6.3.3.1, llegando a ser 133.5 ± 4.2 nm. Este aumento se debió al acoplamiento de los fragmentos F(ab)² del anticuerpo OX26. El IPD aumento a 0.28 ± 0.01 , sin embargo sigue estando en los límites aceptados. El potencial Zeta aumento a -9.71 ± 0.9 , lo que implica que la

mayoría de los grupos carboxilo reaccionaron con los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo OX26. El porcentaje de encapsulación llegó a un $78.73\% \pm 6.0$, este al ser mayor del 60% denota una eficiencia para poder ser utilizado en pruebas *in vivo* y el porcentaje de proteínas es de $64.94 \pm 3.5\%$, lo que denota una eficacia en la conjugación de los fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo OX26.

Tabla 3.14: Tamaño, IPD, Potencial Zeta y porcentaje de encapsulación del inmunoliposoma con fragmentos $F(ab')_2$ del anticuerpo OX26.

Formulación	Componentes	Ratio	Tamaño (nm)	IPD	Potencial Z (mV)	% Encapsulación	% Proteínas
F1.6.3.3.1.1	DMPC:DSPE-PEG ₂₀₀₀ -OCH ₃ :DSPE-PEG ₅₀₀₀ -COOH:N-3-metoxibencil-linoleamida	100:6.25:1.25:20	133.5 ± 4.2	0.28 ± 0.01	-9.71 ± 0.9	78.73 ± 6.0	64.94 ± 3.5

La tabla 3.15 muestra los resultados del test de ANOVA y la tabla 3.16 muestra los resultados de la comparación múltiples de *Holm-Sidak* en donde se comparó la formulación final de liposomas furtivos **F1.6.3.3** (DMPC: DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃: N-3-metoxibencil-linoleamida), con la formulación con el polímero DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH **F1.6.3.3.1** (DMPC: DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃: DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH: N-3-metoxibencil-linoleamida) y con el anticuerpo conjugado **F1.6.3.3.1.1** (DMPC : DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃ : DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH : N-3-metoxibencil-linoleamida: fragmentos $F(ab')_2$) para ver si presenta una diferencia significativa.

Tabla 3.15: Análisis estadístico, test de ANOVA para evaluar la diferencia estadística significativa.

Fuente de variación	DF	SS	MS	F	P
Entre grupos	2	2271.5	1135.7	174.9	<0.001
Residual	6	38.9	6.4		
Total	8	2310.4			

DF: Grados de libertad, SS: Sumatoria de cuadrados, MS: Promedio de los cuadrados, F: Prueba F estadística

La formulación final F1.6.3.3, con el polímero DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH F1.6.3.3.1 y con el anticuerpo conjugado F1.6.3.3.1.1

Tabla 3.16: Diferencia estadística significativa de tamaño, entre formulaciones.

Comparación VS.	Diferencias entre promedios	t	P<0.050
F1.6.3.3.1.1 vs F1.6.3.3	38.8	18.6	Si
F1.6.3.3.1.1 vs F1.6.3.3.1	21.5	10.3	Si
F1.6.3.3.1 vs F1.6.3.3	17.3	8.3	Si

En la tabla 3.16 se muestra la diferencia significativa del tamaño al comparar la formulación final F1.6.3.3 con respecto a las otras dos formulaciones, la que posee el polímero DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH F1.6.3.3.1 y con el anticuerpo conjugado F1.6.3.3.1.1, lo cual señala que si existió una unión de dicho polímero y posteriormente una conjugación exitosa del fragmento F(ab')₂ del anticuerpo OX26.

Por lo tanto la formulación F1.6.3.3.1, la cual contiene DMPC:DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃:DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH:N-3-metoxibencil-linoleamida con un ratio de 100:6.25:1.25:20, respectivamente presento un tamaño final de 133.53 ± 4.2 nm, un IPD de 0.28 ± 0.01, un potencial Zeta de -9.71 ± 0.9 mV, un porcentaje de encapsulación de 78.73% ± 6.0 y un porcentaje de proteínas de 64.94 % ± 3.5. Estas características cumplen con los límites establecidos anteriormente. Por lo tanto esta formulación puede ser estudiada en pruebas *in vitro* e *in vivo*, en enfermedades donde se vio que la macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida posee un efecto neuroprotector.

En conclusión, el presente proyecto propone una formulación de inmunoliposomas cargados de macamida sintética N-3-metoxibencil-linoleamida para posteriores estudios *in vitro* e *in vivo*.

3.2 CONCLUSIONES:

- **Primera:** Se evaluó diferentes formulaciones de liposomas furtivos, de estas se tomó la formulación F1.6.3.3.1, la cual presenta una composición de (DMPC:DSPE-PEG₂₀₀₀-OCH₃:DSPE-PEG₅₀₀₀-COOH:N-3metoxibencil-linoleamida) con un ratio de 100:6.25:1.25:20, respectivamente, teniendo un tamaño de 112.0 ± 1.9 nm, IPD de 00.27 ± 0.07 , potencial Zeta de -15.6 ± 1.6 mV.
- **Segunda:** Se logró optimizar los parámetros de la técnica de ultrasonido, disminuyendo significativamente el tamaño, IPD y potencial Zeta de los liposomas, estos parámetros fueron una temperatura de 55 °C, una amplitud de 95 A y un tiempo de exposición de 45 minutos.
- **Tercera:** Se evaluaron los parámetros de la formulación final de inmunoliposomas, estos presentaron un tamaño final de 133.53 ± 4.2 nm, un IPD de 0.28 ± 0.01 , un potencial Zeta de -9.71 ± 0.9 mV, un porcentaje de encapsulación de $78.73\% \pm 6.0$ y un porcentaje de proteínas de $64.94\% \pm 3.5$.

BIBLIOGRAFÍA

1. Riehemann K, Schneider SW, Luger TA, Godin B, Ferrari M, Fuchs H. Diagnostics and Drug Delivery Nanomedicine — Challenge and Perspectives *Angewandte*. 2009;872–97.
2. Chan WCW, Ph D. Nanomedicine. *The new engl J of Med Rev*. 2010;
3. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Nanomedicine : current status and future prospects. 2017;19(3):311–30.
4. Uría JGV. Nanotecnología, Medicina y Cirugía Mínimamente Invasiva. *Arch ESPAÑOLES Urol*. 2005;58:845–51.
5. Gregoriadis G. Liposome technology, vol 1_CRC [Internet]. Vol. I. 1984. Available from: <http://www.crcnetbase.com.ezlibproxy1.ntu.edu.sg/isbn/978-0-8493-8828-6>
6. Battaglia L, Gallarate M. Lipid nanoparticles: State of the art, new preparation methods and challenges in drug delivery. 2012;(August 2015).
7. Tamman SN. Lipid Based Nanoparticles as Inherent Reversing Agents of Multidrug Resistance in Cancer Lipid Based Nanoparticles as Inherent Reversing Agents of Multidrug Resistance in Cancer. 2018;(September).
8. Dadashzadeh S, Mirahmadi N, Babaei MH, Vali AM. Peritoneal retention of liposomes: Effects of lipid composition, PEG coating and liposome charge. *J Control Release* [Internet]. 2010;148(2):177–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.08.026>
9. Allen TM, Cullis PR. Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2013;65(1):36–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2012.09.037>
10. M.S.Webb, P. Rebstein, W. Lamson MBB. Liposomal drug delivery: recent patents and emerging opportunities. *Recent Pat*. 2007;Formul. 1:185–194.
11. Montesinos rita nieto. Drug Delivery to the Central Nervous System.

- 2010;45(1):249–60. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-529-3>
12. K.Jain K. drug delivery systems. Press H, editor. totowa,NJ (USA): Press, Humana; 2008. 251 p.
 13. Gregoriadis G. Liposome technology, vol 2_CRC [Internet]. Vol. I. 1984. Available from: <http://www.crcnetbase.com.ezlibproxy1.ntu.edu.sg/isbn/978-0-8493-8828-6>
 14. Pohlmann RBSGA. nanocosmetics and nanomedicines. springer, editor. chennai, india; 2011. 365 p.
 15. Jr. RAF. Nanomedicine , Volume I : Basic Capabilities Nanomedicine , Volume I : Basic Capabilities. Vol. I. texas USA; 1999.
 16. Mayoral JB, Moreno AC, Martín-martínez ES. Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas. 2014;
 17. Naveros BC. Sistemas de transporte y liberacion de farmacos de aplicacion topica: liposomas multilaminares portadores de acetono de triamcinolona. españa, granada; 2003.
 18. Hu J, Wang J, Wang G, Yao Z, Dang X. Pharmacokinetics and antitumor efficacy of DSPE-PEG2000 polymeric liposomes loaded with quercetin and temozolomide: Analysis of their effectiveness in enhancing the chemosensitization of drug-resistant glioma cells. *Int J Mol Med*. 2016;37(3):690–702.
 19. Pino-Figueroa A, Nguyen D, Maher TJ. Neuroprotective effects of *Lepidium meyenii* (Maca): *Annals of the New York academy of sciences*. *Ann N Y Acad Sci*. 2010;1199:77–85.
 20. Bach. Taboada Rosell K, Bach. Tejada Sebastiani A del C. “ESTUDIO DEL EFECTO ANTICONVULSIVANTE DEL EXTRACTO PENTÁNICO DE *Lepidium peruvianum* Chacón sp. (MACA) EN RATAS CON EPILEPSIA INDUCIDA POR PILOCARPINA.” UCSM. 2013;

21. Moscoso Palacios RM. ESTUDIO DEL EFECTO ANTICONVULSIVANTE DE LAS MACAMIDAS SINTÉTICAS, 3-METOXI-N-BENCILOLEAMIDA Y 3-METOXI-N- BENCILLINOLEAMIDA, EN UN MODELO DE EPILEPSIA INDUCIDO EN RATAS Sprague-Dawley. 2019;
22. Torchilin V. Drug Carriers. Copyright, editor. london; 2006. 1-723 p.
23. Jr RAF. What is nanomedicine ? 2005;1:2–9.
24. Mg K, Krenn V, Huebner F, Wagner W, Resch R. History and Possible Uses of Nanomedicine Based on Nanoparticles and Nanotechnological Progress Nanomedicine & Nanotechnology. 2015;6(6).
25. Yanan Lia#, Dongsheng Hea#, Jiasheng Tua#, Ru Wanga, Chang Zua, Chen Youa, Wenqian Yanga, Di Shib, Thomas J. Websterb* YS. Comparative effect of wrapping solid gold nanoparticles and hollow gold nanoparticles with doxorubicin-loaded thermosensitive liposomes for cancer thermo-chemotherapy. R Soc Chem peer. 2018;
26. Villafuerte-Robles L. Nanotecnología Farmacéutica. Razón y Palabra. 2009;68(01):1–20.
27. Bianco A, Kostarelos K, Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. Curr Opin Chem Biol. 2005;9(6):674–9.
28. Jiang Z, Le NDB, Gupta A, Rotello VM. Cell surface-based sensing with metallic nanoparticles. Chem Soc Rev [Internet]. 2015;44(13):4264–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/C4CS00387J>
29. Krishnendu S, Sarit S. A, Chaekyu K, Xiaoning L, Vincent M. R. Gold Nanoparticles in Chemical and Biological Sensing. Chem Rev. 2014;112(5):2739–79.
30. Li Z, Barnes JC, Bosoy A, Stoddart JF, Zink JJ. Mesoporous silica nanoparticles in biomedical applications. Chem Soc Rev. 2012;41(7):2590–605.
31. Liong M, Lu J, Kovichich M, Xia T, Ruehm SG, Nel AE, et al. Multifunctional inorganic nanoparticles for imaging, targeting, and drug delivery. ACS Nano.

- 2008;2(5):889–96.
32. Templeton DM, Liu Y. Multiple roles of cadmium in cell death and survival. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2010;188(2):267–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2010.03.040>
 33. Llinàs MC, Sánchez-garcía D. Nanopartículas de sílice: preparación y aplicaciones en biomedicina. 2014;20–31.
 34. Reichel A, Begley DJ. Interaction of Poly (butylcyanoacrylate) Nanoparticles with the Blood-Brain Barrier in vivo and in vitro Interaction of Poly (butylcyanoacrylate) Nanoparticles with the Blood-Brain Barrier in vivo and in vitro. 2016;9(November):209–21.
 35. Das D, Lin S. Double-coated poly (butylcyanoacrylate) nanoparticulate delivery systems for brain targeting of dalargin via oral administration. *J Pharm Sci*. 2005;94(6):1343–53.
 36. Lun H, Yu X, Bendayan R. Nanotechnological advances for the delivery of CNS therapeutics ☆. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2012;64(7):686–700. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.10.007>
 37. Preparación de nanopartículas sólidas lipídicas (SLN), y de Acarreadores lipídicos nanoestructurados (NLC). 2008;
 38. Zara GP, Cavalli R, Fundarò A, Bargoni A, Caputo O, Gasco MR. Pharmacokinetics of doxorubicin incorporated in solid lipid nanospheres (SLN). *Pharmacol Res*. 1999;40(3):281–6.
 39. Xue HY, Wong HL. Solid lipid-PEI hybrid nanocarrier: An integrated approach to provide extended, targeted, and safer siRNA therapy of prostate cancer in an all-in-one manner. *ACS Nano*. 2011;5(9):7034–47.
 40. Swanson GJ. Leon Slauch: Simple life reaps rich rewards. *Water Well J*. 1998;52(12):34.
 41. Vyas TK, Shahiwala A, Amiji MM. Improved oral bioavailability and brain transport of Saquinavir upon administration in novel nanoemulsion formulations.

- Int J Pharm. 2008;347(1–2):93–101.
42. R MLV. Nanopartículas lipídicas sólidas Solid lipid nanoparticles. 2008;
 43. J.Delattre, P.Couvreur, F.Puisieux, J.-R.Philippot FS. les liposomes aspects, technologiques, biologiques, et pharmacologiques. 1993.
 44. Torres J, Durán S. Fosfolípidos : propiedades y efectos sobre la salud. 2015;31(1):76–83.
 45. Merino S. membranas celulares y sintéticas.
 46. Leticia M, Gonzalez V. Desarrollo y caracterización de liposomas para aplicación tópica de fármacos. Univ BARCELONA Fac FARMÀCIA PROGRAMA. 2015;
 47. Sriraman SK, Salzano G, Torchilin V. Drug Delivery to the Central Nervous System. Prim Cerebrovasc Dis Second Ed. 2017;198–201.
 48. Aldea MR, Directores. Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. Curr Opin Biotechnol [Internet]. 2012;7(6):43. Available from: http://digital.csic.es/bitstream/10261/48178/1/biomateriales_web.pdf%5Cnhttp://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/faa321e/pdf/faa321e-TH.3.pdf%5Cnhttp://olimpia.cuautitlan2.unam.mx/pagina_ingenieria/mecanica/mat/mat_mec/m6/Introduccion a los nanomateriale
 49. Eskandar Moghimipour and SH. Liposomes as Drug Delivery Systems: Properties and Applications. Res J Pharm Biol Chem Sci.
 50. Maria Laura Immordino, Franco Dosio and LC. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential. Int J Nanomedicine [Internet]. 2006;1(3):297–315. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2426795/>
 51. Eloy JO, Petrilli R, Topan JF, Antonio HMR, Barcellos JPA, Chesca DL, et al. Co-loaded paclitaxel/rapamycin liposomes: Development, characterization and in vitro and in vivo evaluation for breast cancer therapy. Colloids Surfaces B Biointerfaces [Internet]. 2016;141:74–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.01.032>

52. Brien MERO, Wigler N, Inbar M, Rosso R, Grischke E, Santoro A, et al. Original article Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (CAELYXTM / Doxil □) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer. 2004;440–9.
53. Wicki A, Witzigmann D, Balasubramanian V, Huwyler J. Nanomedicine in cancer therapy : Challenges , opportunities , and clinical applications. J Control Release [Internet]. 2015;200:138–57. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.030>
54. Judson I, Radford JA, Harris M, Blay J, Hoessel Q Van. Randomised phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL 1 / CAELYX 1) versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma : a study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group. 2001;37:870–7.
55. Guo C, Chen Y, Gao W, Chang A, Ye Y, Shen W, et al. Theranostics Liposomal Nanoparticles Carrying anti-IL6R Antibody to the Tumour Microenvironment Inhibit Metastasis in Two Molecular Subtypes of Breast Cancer Mouse Models. 2017;7(3).
56. News-Medical.net - An AZoNetwork Site. Fabricación del Liposoma [Internet]. Available from: [https://www.news-medical.net/life-sciences/Liposome-Manufacturing-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Liposome-Manufacturing-(Spanish).aspx)
57. Park JW, Hong K, Kirpotin DB, Colbern G, Shalaby R, Baselga J, et al. Anti-HER2 Immunoliposomes : Enhanced Efficacy Attributable to Targeted Delivery 1. 2002;8(April):1172–81.
58. Nieto Montesinos R, Béduneau A, Lamprecht A, Pellequer Y. Liposomes Coloaded with Elacridar and Tariquidar To Modulate the P-Glycoprotein at the Blood-Brain Barrier. Mol Pharm. 2015;12(11):3829–38.
59. OTERO DC. TESIS DOCTORAL NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA VEHICULIZAR ACTIVOS FARMACÉUTICOS AL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL. Univ Sevilla. 2018;

60. Jones AR, Shusta E V. Expert Review Blood – Brain Barrier Transport of Therapeutics via Receptor-Mediation. 2007;24(9).
61. Hao HZ, Ang RW, Ei JW, Eng MF, Hao YZ, Ang YY, et al. A Comparative Study of Transfection Efficiency between Liposomes , Immunoliposomes and Brain-specific Immunoliposomes. 2010;38(3):957–66.
62. Abcam. Advantages Of immunoglobulin F(ab) and F(ab')₂ fragments [Internet]. 2019. Available from: <https://www.abcam.com/secondary-antibodies/advantages-of-immunoglobulin-fab-and-fab2-fragments>
63. Technology AG. F (ab) ₂ Fragmentation. :1–12.
64. Gauci PJ, Alderton MR. Pepsin Digestion of Antibodies to Produce Functional Antigen-Binding Fragments (Fab): A Scientific Fantasy ?
65. Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic systems : a review delivery N ,/? 1995;70:95–111.
66. Murillo M, Espuelas S, Prior S, Vitas AI, Renedo MJ, Goñi MM, et al. Liberación controlada de principios activos mediante el empleo de formulaciones galénicas. 2001;45(1):19–34.
67. Akbarzadeh A, Rezaei-sadabady R, Davaran S, Joo SW, Zarghami N. Liposome : classification , preparation , and applications. nanoscale Res Lett. 2013;8(102):1–9.
68. GmbH HU. Preparación de liposomas por ultrasonidos [Internet]. Available from: <https://www.hielscher.com/es/ultrasonic-liposome-preparation.htm>
69. Yolanda Smith BP. fabricacion de liposomas [Internet]. news medical life science. Available from: [https://www.news-medical.net/life-sciences/Liposome-Manufacturing-\(Spanish\).aspx](https://www.news-medical.net/life-sciences/Liposome-Manufacturing-(Spanish).aspx)
70. Brasnjevic I, Steinbusch HWM, Schmitz C, Martinez-Martinez P. Delivery of peptide and protein drugs over the blood-brain barrier. Prog Neurobiol. 2009;87(4):212–51.
71. Mozafari MR, Nanoscience A, Initiative N, Ataei S, Javanmard R, Khorasany S.

- Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems Australasian Nanoscience and Nanotech. 2018;(May).
72. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). 2013;12(April):265–73.
 73. Sigma. Technical bulletin QuantiPro BCA Assay Kit. 2003;715824.
 74. Fernández Emilio, Aurora Galván. Métodos para la cuantificación de proteínas. Dep Bioquímica [Internet]. 2006;1–7. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Métodos+para+la+cuantificación+de+proteínas#1>
 75. Clinic C, Cancer T. Oncologist Optimizing the Dosing Schedule in Ovarian Cancer. Cancer. 2005;205–14.
 76. Sifuentes-penagos G, León-vásquez S, Paucar-menacho LM. Scientia Agropecuaria ARTÍCULO DE REVISIÓN Estudio de la Maca (*Lepidium meyenii* Walp .), cultivo andino con propiedades terapéuticas Study of Maca (*Lepidium meyenii* Walp .), Andean crop with therapeutic properties. 2015;6(2):131–40.
 77. Vega K, Chung A, Villena A, Go C. Effect of *Lepidium meyenii* (MACA) on sexual desire and its absent relationship with serum testosterone levels in adult healthy men. 2002;372:367–72.
 78. Gonzales GF, Nieto J, Rubio J, Gasco M. Effect of Black maca (*Lepidium meyenii*) on one spermatogenic cycle in rats. 2006;38:166–72.
 79. Gonzales GF, Miranda S, Nieto J, Fernández G, Yucra S, Rubio J, et al. Red maca (*Lepidium meyenii*) reduced prostate size in rats. 2005;16:1–16.
 80. Orolin JAN, Skottov N, Sim IM. The Influence of Maca (*Lepidium meyenii*) on Antioxidant Status , Lipid. 2007;500:59–63.
 81. Wu H, Kelley CJ, Pino-Figueroa A, Vu HD, Maher TJ. Macamides and their

- synthetic analogs: Evaluation of in vitro FAAH inhibition. *Bioorganic Med Chem* [Internet]. 2013;21(17):5188–97. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2013.06.034>
82. Almukadi H, Wu H, Böhlke M, Kelley CJ, Maher TJ, Pino-figueroa A. The Macamide N-3-Methoxybenzyl-Linoleamide Is a Time-Dependent Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibitor. 2013;
 83. Berrendero F. Elementos que forman el sistema cannabinoide endógeno. *Guía básica sobre los Cannabinoides*. 2002. 160 p.
 84. Fonseca BM, Correia-Da-Silva G, Almada M, Costa MA, Teixeira NA. The endocannabinoid system in the postimplantation period: A role during decidualization and placentation. *Int J Endocrinol*. 2013;2013.
 85. Alsasua MTD. NUEVAS APORTACIONES AL ESTUDIO DE LOS CANNABINOIDES: 1) EFECTOS VASCULARES 2) CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS MEMORIA. Madrid; 2004.
 86. uxmal Rodriguez, Elisa Carrillo ES. Cannabinoide: neurobiologia y usos medicos. *Onkol Welt*. 2018;09(06):252–3.
 87. Vu H, Avenue L. Fatty Acid Amide Hydrolase (FAAH) Inhibitors : Discovery in *Lepidium meyenii* (Maca) Extracts . Department of Pharmaceutical Sciences Faculty Advisors : Alejandro Pino-Figueroa and Timothy Maher. 2012;
 88. Gaillard PJ, Appeldoorn CCM, Dorland R, Kregten J Van, Manca F, Vugts DJ, et al. Pharmacokinetics , Brain Delivery , and Efficacy in Brain Tumor-Bearing Mice of Glutathione Pegylated Liposomal Doxorubicin (2B3-101). 2014;9(1).
 89. Xiong S, Yu B, Wu J, Li H, Lee RJ. Preparation , therapeutic efficacy and intratumoral localization of targeted daunorubicin liposomes conjugating folate-PEG-CHEMS. 2011;65:2–8.
 90. Li J, Wang X, Zhang T, Wang C, Huang Z. ScienceDirect A review on phospholipids and their main applications in drug delivery systems. *Asian J Pharm Sci* [Internet]. 2015;10(2):81–98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajps.2014.09.004>

91. Vijayakumar MR, Kosuru R, Vuddanda PR, Singh SK, Singh S. Trans resveratrol loaded DSPE PEG 2000 coated liposomes: An evidence for prolonged systemic circulation and passive brain targeting. *J Drug Deliv Sci Technol* [Internet]. 2016;33:125–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2016.02.009>
92. Sahoo SK, Labhasetwar V. A Series of Textbooks and Monographs. *Nanoparticle Technol Drug Deliv.* 2006;1340–148.
93. Belsito S, Bartucci R, U LS. Sterically stabilized liposomes of DPPC r DPPE-PEG : 2000 . A spin label ESR and spectrophotometric study. 2000;33–43.
94. Nicholas AR, Scott MJ, Kennedy NI, Jones MN. Effect of grafted polyethylene glycol (PEG) on the size , encapsulation efficiency and permeability of vesicles. 2000;1463.
95. Pathak DTMDY. *drugs and the pharmaceutical sciences.* volume 166. new york, USA: healthcare USA, inc; 2007.
96. Kontermann RE. Immunoliposomes for cancer therapy *Immunoliposomes for cancer therapy.* 2015;(July).
97. Chen W, Duša F, Witos J, Ruokonen S, Wiedmer SK. Determination of the Main Phase Transition Temperature of Phospholipids by Nanoplasmonic Sensing. 2018;(September):1–11.
98. Milagros R, Montesinos N. Drug delivery to the central nervous system UNIVERSITE DE FRANCHE-COMTE Ecole doctorale : Environnement-Santé . présentée et soutenue par Rita Milagros NIETO MONTESINOS le 19 Février 2014 à Besançon en vue de l ' obtention du diplôme de Docteur de l ' Un. 2015;
99. Chung J, Lim S. conjugated liposomes for the targeted delivery of the poorly water-soluble drug celecoxib. 2011;28(3):220–7.

ANEXOS

ANEXO 1: Tabla de curva de calibración para porcentaje de encapsulación

Concentraciones	Área de Linoleamida			Área de Palmitamida			Ratio		
	I	II	III	I	II	III	I	II	III
300	36180	17768	31209	55393.5	48401.5	50105.5	0.65	0.37	0.62
500	44347	29335	42198	57768.5	48967	45585.5	0.77	0.60	0.93
1000	73894	67685	81086	50631	50651	43379.5	1.46	1.34	1.87
5000	448673	385159	383655	55379.5	49436	44304.5	8.10	7.79	8.66
10000	766908	740955	811221	59129.5	49016.5	45266.5	12.97	15.12	17.92

ANEXO 2: Tabla de resultados de porcentaje de encapsulación

		FORMULACION				
		Liposomas furtivos				Inmunoliposomas
		1.6.3.1	1.6.3.2	1.6.3.3	1.6.3.4	1.6.3.3.1
Área de Linoleamida	I	123617.0	215439.0	154500.0	184133.5	89274.5
	II	122843.5	209373.5	164746.5	169224.5	134283.5
	III	171906.5	197510.0	165294.0	168751.5	115868.0
Área de Palmitamida	I	44879.0	58154.5	52204.5	49197.5	34633.5
	II	48627.5	48537.5	58799.0	45561.0	46292.0
	III	45609.5	46027.0	57092.5	46119.0	48617.5
Ratio	I	2.8	3.7	3.0	3.7	2.6
	II	2.5	4.3	2.8	3.7	2.9
	III	3.8	4.3	2.9	3.7	2.4
Porcentaje de encapsulación	I	83.5	116.8	90.5	114.6	76.9
	II	87.9	119.1	88.7	116.8	79.8
	III	86.2	118.4	89.8	109.1	77.5

ANEXO 3: Tabla de calibración para porcentaje de proteínas

absorbancia	concentraciones			
	5	10	20	30
I	0.0878	0.142	0.178	0.2865
II	0.0861	0.131	0.1688	0.2487
III	0.0856	0.1345	0.1677	0.2463

ANEXO 4: Tabla de resultados de absorbancia y porcentaje de proteínas

Absorbancia bruta	Porcentaje		
	I	II	III
0.2865	62.04		
0.4019		63.91	
0.3988			68.88

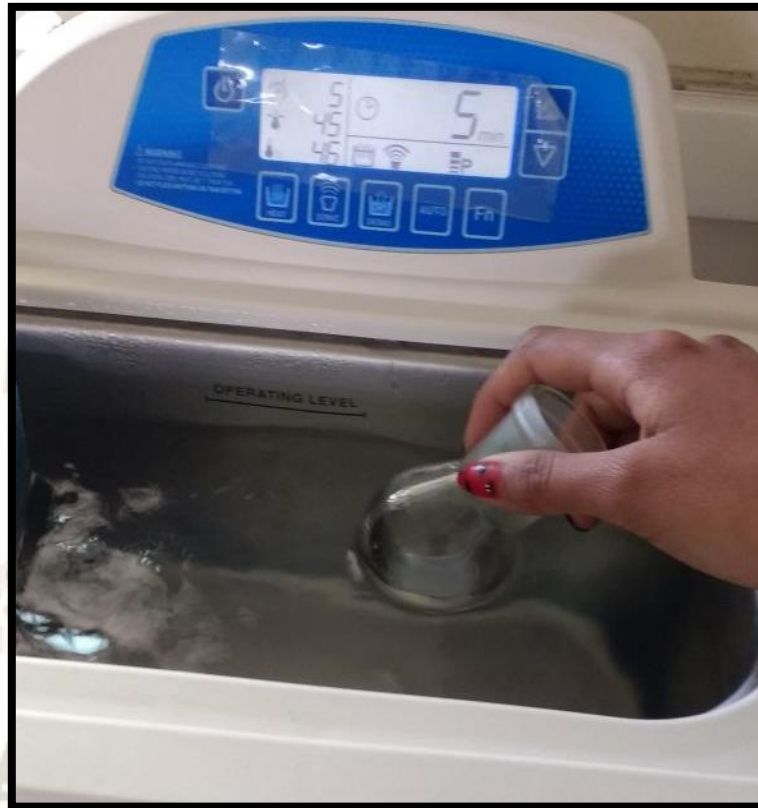
ANEXO 5: Procedimiento de formulación de liposomas



Preparación del film lipídico en rota vapor



Film lipídico adherido al balón



Uso del baño de sonicación

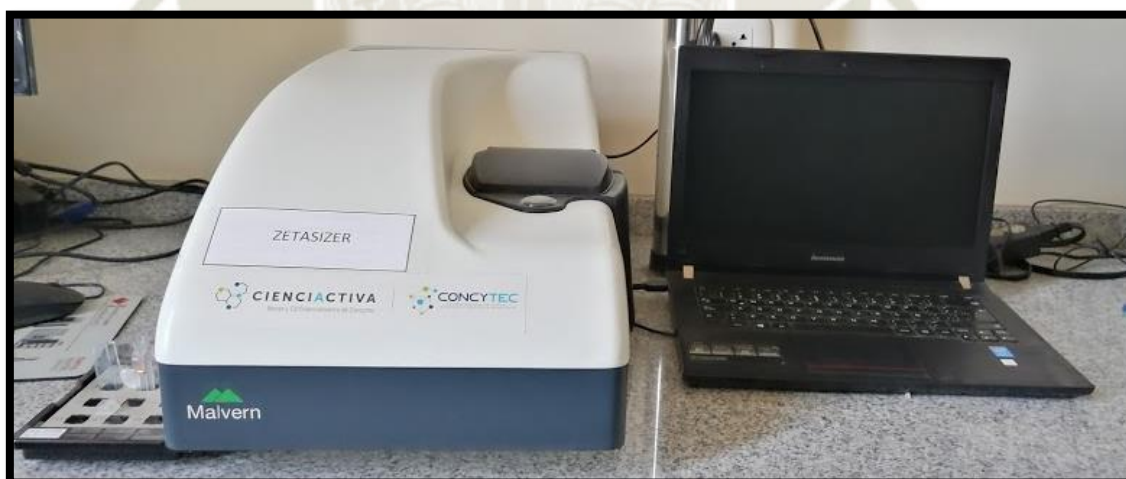


Uso de la sonda de sonicación



Formulación de liposomas terminados y centrifugados

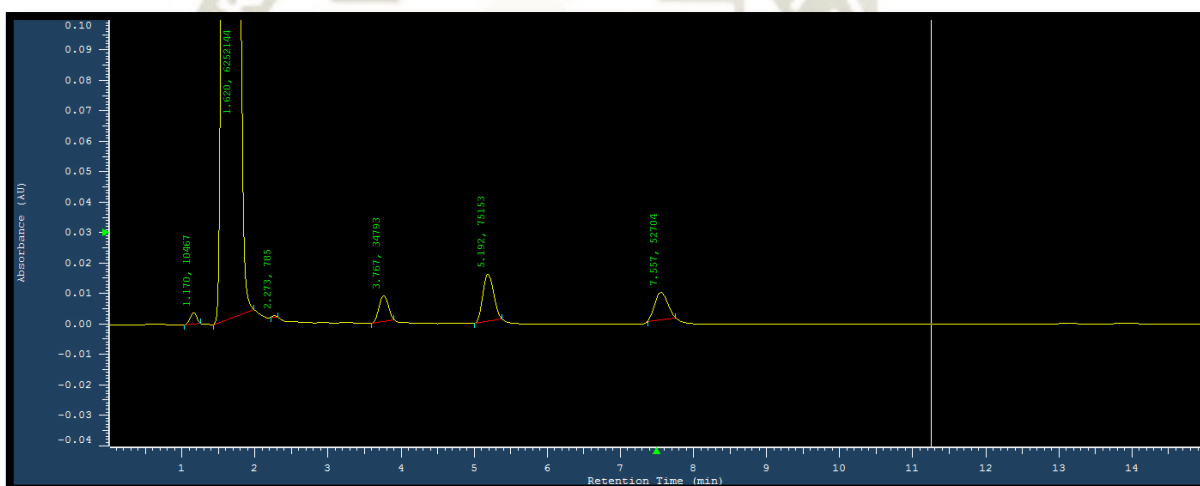
ANEXO 6: Caracterización de liposomas



Analizador de Nanopartículas



celda para medir talla y celda para medir potencial Z



Cromatograma de HPLC. Pico 5.1 la macamida sintética N-3-metoxibencil-
linoleamida, pico 7.5 la macamida sintética N-bencilpalmitamida



Cromatografía de exclusión.



Lector de placas para medición de proteínas.