



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Desarrollo de liposomas ultraflexibles para una mejor administración de glutatión, pensados para atravesar membranas biológicas y combatir problemas de estrés oxidativo.

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN FARMACIA**

**P R E S E N T A:
NANCY SELENE MUÑIZ URIBE**

ASESOR: DR. ROBERTO DÍAZ TORRES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARIA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.



Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**.

Desarrollo de liposomas ultraflexibles para una mejor administración de glutatión, pensados para atravesar membranas biológicas y combatir el estrés oxidativo.

Que presenta la pasante: **Nancy Selene Muñiz Uribe**

Con número de cuenta: **415089661** para obtener el título de: **Licenciada en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Agosto de 2022.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

| | NOMBRE | FIRMA |
|----------------------|--------------------------------|-------|
| PRESIDENTE | D.A.R. Juan José Díaz Esquivel | |
| VOCAL | Dr. Roberto Díaz Torres | |
| SECRETARIO | M.C. Guadalupe Álvarez Ávila | |
| 1er. SUPLENTE | M.I. Claudia Mariano Hernández | |
| 2do. SUPLENTE | Dra. Gabriela Rodríguez Patiño | |

NOTA: los sindocales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional

Agradecimientos

- 🎧 Quiero agradecer a mi asesor de tesis, el Doctor Roberto Díaz Torres porque siempre tuvo una actitud amable e inspiradora y me acompañó en todo el proceso de investigación y finalizar mi trabajo.
- 🎧 Al programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) proyecto número IN214321 “Estudio de la respuesta antioxidante inducida por nanopartículas de quitosan con glutatión en la osteoartritis, estudio in vitro e in vivo.”
- 🎧 A la Unidad de investigación multidisciplinaria laboratorio número nueve ya que me abrieron las puertas y así poder desarrollar mi investigación y experimentación.
- 🎧 La Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán ya que me brindaron todos los conocimientos y sostén para poder finalizar mis estudios.
- 🎧 A Dios por siempre estar conmigo y darme las fuerzas para salir adelante y poder lograr mis sueños.
- 🎧 Mis madres, Martha y Carmen que lo son todo en mi vida, gracias por siempre darme ánimo para no darme por vencida y luchar por cada meta que tengo en la vida.
- 🎧 A mi papá le doy muchas gracias por todos los consejos que me dio, por ayudarme con mis estudios y apoyarme en todo, por decirme que nunca me tengo que dar por vencida y por siempre decirme que todo en la vida tiene solución.
- 🎧 Mis hermanas, gracias por apoyarme en cada momento que lo necesito, y a cada integrante de mi familia les agradezco ya que me ayudaran a llegar hasta aquí.
- 🎧 Mis amigos: Tanya, Pedro, Alan y Juan gracias a ellos por compartirme todos sus conocimientos, amistad y por cada momento que vivimos en la universidad y actualmente en el trabajo.

Índice de diagramas

| | |
|--|----|
| Diagrama 1. Mezcla de metanol-cloroformo | 53 |
| Diagrama 2. Preparación de solución de sacarina..... | 54 |
| Diagrama 3. Preparación de solución de PBS..... | 55 |
| Diagrama 4. Búfer de reacción..... | 56 |
| Diagrama 5. Preparación de liposomas | 57 |
| Diagrama 6. Porcentaje de encapsulamiento | 59 |
| Diagrama 7. Tamaño de partícula | 60 |
| Diagrama 8. Prueba de hemólisis | 61 |
| | |
| Diagrama de pareto estandarizado 1. Respuesta porcentaje de encapsulamiento (Diseño I). | 67 |
| Diagrama de pareto estandarizado 2. Respuesta tamaño de partícula (Diseño I). | 69 |
| Diagrama de pareto estandarizado 3. Respuesta porcentaje de encapsulamiento (Diseño II). | 73 |
| Diagrama de pareto estandarizado 4. Respuesta tamaño de partícula (Diseño II). | 75 |
| Diagrama de pareto estandarizado 5. Respuesta prueba de hemólisis (Diseño II). | 77 |

Índice de Gráficos

| | |
|--|----|
| Gráfico 1. Efectos principales para la variable de carga de GSH (Diseño I). . | 68 |
| Gráfico 2. Efectos principales para la variable de tamaño de partícula (Diseño I). | 70 |
| Gráfico 3. Efectos principales para la variable carga de glutatión (Diseño II). | 74 |
| Gráfico 4. Efectos principales para la variable tamaño de partícula (Diseño II). | 76 |
| Gráfico 5. Efectos principales para la variable porcentaje de hemólisis (Diseño II). | 78 |
| Gráfico 6. Optimización de la formulación..... | 83 |

Índice de Ilustraciones

| | |
|--|----|
| Ilustración 1. Simulación del proceso de estrés oxidativo en una célula. | 15 |
| Ilustración 2. Efecto de los radicales libre sobre las células. (Casanova M, 2015)..... | 17 |
| Ilustración 3. Función de los antioxidantes para combatir el estrés oxidativo. (Dolz E, 2019). | 17 |
| Ilustración 4. Equilibrio de antioxidantes con radicales libres. (Tremellen, 2008)..... | 18 |
| Ilustración 5. Estructura química del glutatión reducido. (Fernández, j. 2008). | 30 |
| Ilustración 6. Función antioxidante de GSH. (Denzoin A. 2013)..... | 30 |
| Ilustración 7. Estructura química de fosfatidilcolina. (Parada R, 2019)..... | 34 |
| Ilustración 8. Estructura de un liposoma. (Luzardo. 2009)..... | 35 |
| Ilustración 9. Encapsulamiento de acuerdo a su carga. (García M. 2015)..... | 36 |
| Ilustración 10. Tipos de liposomas (Álvarez a. 2015)..... | 37 |
| Ilustración 11. Diferentes tipos de vesículas: SUV o vesículas unilamelares pequeñas, LUV o vesículas unilamelares grandes y MLV o vesículas multilamelares. (Ruano M. 2013). | 39 |
| Ilustración 12. Deformación de vesícula. (Malakar J. 2012)..... | 41 |
| Ilustración 13. Procedimientos para la obtención de liposomas. El método de dispersión simple para obtener MLV. A partir de ellos, el método de extrusión para obtener SUV o el método de sonicación homogeneización para obtener LUV. (Vásquez M. 2015). | 45 |
| Ilustración 14. Mecanismos de interacción. (Clares B. 2003)..... | 47 |
| Ilustración 15. Ejemplo de partículas grandes, movimientos lentos y pequeños. (Marilla J. 2016). | 49 |
| Ilustración 16. Ejemplo de partículas pequeñas, movimientos rápidos y amplios. (Marilla J. 2016)..... | 49 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Especies Reactivas..... | 13 |
| Tabla 2. Relación entre enfermedades y GSH. | 21 |
| Tabla 3. Ejemplo de oxidantes y antioxidantes. | 26 |
| Tabla 4. Sistemas antioxidantes. | 27 |
| Tabla 5. Componentes del sistema antioxidante..... | 28 |
| Tabla 6. Concentración de GSH en el organismo..... | 31 |
| Tabla 7. Tipos de liposomas..... | 38 |
| Tabla 8. Ventajas y Desventajas (mlv, suv y luv)..... | 39 |
| Tabla 9. Diseño de experimentos I..... | 63 |
| Tabla 10. Preparación de sistemas..... | 63 |

| | |
|---|-----------|
| Tabla 11. Ecuación de la recta. | 65 |
| Tabla 12. Porcentaje de encapsulamiento. | 66 |
| Tabla 13. Tamaño de partícula. | 68 |
| Tabla 14. Diseño de experimentos II..... | 64 |
| Tabla 15. Parámetros constantes. | 65 |
| Tabla 16. Porcentaje de encapsulamiento. | 71 |
| Tabla 17. Tamaño de partícula. | 74 |
| Tabla 18. Prueba de hemólisis. | 77 |
| Tabla 19. Respuesta de variable. | 80 |
| Tabla 20. Deseabilidad de la variable de respuesta. | 81 |
| Tabla 21. Deseabilidad de la formulación óptima..... | 81 |
| Tabla 22. Factores óptimos de las variables..... | 83 |
| Tabla 23. Respuesta de variables óptimo. | 83 |
| Tabla 24. Formulación óptima..... | 84 |

Lista de abreviaturas

EO Estrés Oxidativo

RL Radicales Libres

ERO Especies Reactivas del Oxígeno

ADN Ácido Desoxirribonucleico

AOX Antioxidantes

ATP Trifosfato de Adenosina

GSH Glutación

GSSG Glutación Disulfuro

ADH Alcohol Deshidrogenasa

MEOS Sistemas Oxidativos Microsomal del Etanol

MAO Monoamino Oxidasas

GPx Glutación Peroxidasas

NADPH Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

ARN Ácido Ribonucleico

PLs Fosfolípidos

MLV Vesículas multilamelares

OLV Vesículas oligolamelares

UV Vesículas unilamelares

SUV Vesículas unilamelares pequeñas

LUV Vesículas unilamelares grandes

GUV Vesículas unilamelares gigantes

MVV Vesículas multivesiculares

CS Colato de Sodio

DCS Deoxicolato de Sodio

DLS dispersión dinámica de luz

DTNB 5,5'-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)

mg Miligramos

FC Fosfatidilcolina

rpm Revoluciones por minuto

nm Nanómetros

UV-VIS Ultravioleta-visible

Contenido

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUCCIÓN..... | 11 |
| 2 | MARCO TEÓRICO | 12 |
| 2.1 | ESTRÉS OXIDATIVO | 12 |
| 2.1.1 | <i>Radicales Libres</i> | 14 |
| 2.2 | ENFERMEDADES RELACIONADAS AL ESTRÉS OXIDATIVO | 19 |
| 2.2.1 | <i>Envejecimiento.....</i> | 23 |
| 2.2.2 | <i>Cáncer.....</i> | 23 |
| 2.2.3 | <i>Daño Hepático</i> | 24 |
| 2.2.3.1 | Enfermedad hepática alcohólica | 24 |
| 2.2.4 | <i>Esclerosis.....</i> | 25 |
| 2.2.5 | <i>Parkinson</i> | 25 |
| 2.3 | SISTEMA DE ANTIOXIDANTES | 26 |
| 2.3.1 | <i>Inhibitoria</i> | 27 |
| 2.3.2 | <i>Reductores o Neutralizantes.....</i> | 28 |
| 2.3.3 | <i>Reparadores.....</i> | 28 |
| 2.4 | GLUTATIÓN..... | 29 |
| 2.4.1 | <i>Síntesis de glutatión.....</i> | 30 |
| 2.4.1.1 | Funciones del GSH en el organismo | 30 |
| 2.5 | LÍPIDOS..... | 32 |
| 2.5.1 | <i>Fosfolípidos</i> | 33 |
| 2.5.1.1 | Fosfatidilcolina | 33 |
| 2.6 | LIPOSOMAS..... | 34 |
| 2.7 | CLASIFICACIÓN DE LIPOSOMAS..... | 36 |
| 2.7.1 | <i>Composición.....</i> | 36 |
| 2.7.2 | <i>Estructura</i> | 38 |
| 2.7.2.1 | Tipos de liposomas | 38 |
| 2.7.3 | <i>Liposomas Ultraflexibles.....</i> | 40 |
| 2.7.4 | <i>Liposomas cargados</i> | 41 |
| 2.8 | MÉTODOS DE FABRICACIÓN..... | 41 |
| 2.8.1 | <i>Liposomas plurilaminares (MLV)</i> | 42 |
| 2.8.2 | <i>Liposomas unicorpartimentales microvesiculares (SUV)</i> | 43 |
| 2.8.2.1 | Ultrasonidos | 43 |
| 2.8.2.2 | Inyección | 43 |
| 2.8.2.3 | Eliminación del detergente | 44 |
| 2.8.2.4 | Extrusión a alta presión | 44 |
| 2.8.3 | <i>Liposomas unilaminares macrovesiculares (LUV) y vesículas obtenidas por evaporación en fase reversa (REV).....</i> | 44 |
| 2.8.3.1 | Infusión de éter | 44 |
| 2.8.3.2 | Evaporación en fase reversa | 45 |
| 2.9 | INTERACCIÓN LIPOSOMA-CÉLULA..... | 46 |
| 2.9.1 | <i>Endocitosis</i> | 46 |
| 2.9.2 | <i>Fusión directa</i> | 46 |
| 2.9.3 | <i>Transferencia de lípidos.....</i> | 46 |
| 2.9.4 | <i>Adsorción estable</i> | 47 |
| 2.10 | VÍAS DE ADMINISTRACIÓN..... | 47 |
| 2.11 | MÉTODOS DE CARACTERIZACIÓN..... | 48 |
| 2.11.1 | <i>Tamaño de partícula</i> | 48 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.11.2 | Porcentaje de encapsulamiento | 49 |
| 2.11.3 | Porcentaje de hemólisis..... | 50 |
| 2.12 | APLICACIONES DE LOS LIPOSOMAS | 50 |
| 2.13 | VENTAJAS DE LOS LIPOSOMAS..... | 51 |
| 3 | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 51 |
| 4 | HIPÓTESIS..... | 52 |
| 5 | OBJETIVO | 52 |
| 6 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 52 |
| 7 | METODOLOGÍA | 53 |
| 8 | PROCEDIMIENTO | 62 |
| 8.1 | DISEÑO DE EXPERIMENTOS I | 63 |
| 8.2 | DISEÑO DE EXPERIMENTOS II | 64 |
| 9 | RESULTADOS | 65 |
| 9.1.1 | <i>Caracterización de liposomas ultraflexibles (Diseño I)</i> | <i>65</i> |
| 9.1.1.1 | Porcentaje de encapsulamiento (Diseño I) | 65 |
| 9.1.1.2 | Tamaño de partícula (Diseño I) | 68 |
| 9.1.2 | <i>Caracterización de liposomas ultraflexibles (Diseño II)</i> | <i>71</i> |
| 9.1.2.1 | Porcentaje de encapsulamiento (Diseño II)..... | 71 |
| 9.1.2.2 | Tamaño de partícula (Diseño II) | 74 |
| 9.1.2.3 | Porcentaje de hemólisis (Diseño II) | 77 |
| 9.2 | FORMULACIÓN ÓPTIMA | 80 |
| 9.3 | OPTIMIZACIÓN | 82 |
| 9.4 | FORMULACIÓN IDEAL..... | 84 |
| 10 | CONCLUSIONES | 85 |
| 11 | PERSPECTIVAS..... | 86 |
| 12 | REFERENCIAS..... | 87 |

1 Introducción

La nanotecnología es el estudio de fabricación de estructuras en dimensiones de nanómetros por su prefijo “nano” que significa pequeño ($10^{-9} m$), con esta nueva tecnología se pueden elaborar diversos dispositivos. (Maubert, M)

La nanotecnología farmacéutica es el desarrollo de componentes funcionales que se integran en una arquitectura la cual cumple con múltiples funciones, por ejemplo, diagnóstico del cáncer, administración de fármacos a un tejido específico, y la localización de tumores. (Villafuerte, R).

La nanotecnología en farmacia se usa para la prevención, diagnóstico de enfermedades, así como la vehiculización de diversos fármacos que no pueden llegar a su sitio de acción sin modificaciones y tener una funcionalidad en el organismo humano (Villafuerte, R).

Este trabajo se enfocó en el estudio de los liposomas estos son sistemas vesiculares que fueron obtenidos por primera vez por el biofísico británico Bangham en 1960. (Barry, BW 2001). Desde entonces sus características llamaron la atención y se utilizaron como una estrategia para mejorar la administración de fármacos. Sin embargo, no fue hasta inicios de los años ochenta cuando se publicaron por primera vez resultados que mostraban su valor potencial como sistemas de liberación.

Estos sistemas de liberación tienen ciertas ventajas en comparación de las otras formas de administración de fármacos, por ejemplo, evitar al sistema inmunológico, atravesar barreras que el cuerpo utiliza para evitar la penetración de sustancias extrañas. Para la elaboración de liposomas se utiliza como componente principal la Fosfatidilcolina, por eso estos sistemas pueden atravesar membranas biológicas pues también estas barreras están compuestas por fosfolípidos.

El estrés oxidativo es causado por una excesiva producción de radicales libres que no puede ser contrarrestado por el sistema antioxidante, entonces en realidad el medio ambiente, tabaquismo, etc. Provocan el aumento de radicales libres lo que da como consecuencia el estrés oxidativo.

Los radicales libres son moléculas que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo, la función del glutatión es donar un electrón y poder neutralizar los radicales libres para evitar el daño celular.

2 Marco Teórico

2.1 Estrés oxidativo

En el periodo de 1956 -1966 la Doctora Rebeca Gerschman estaba realizando una investigación sobre la toxicidad del oxígeno en el cual formuló una teoría de “Un aumento de la presión parcial del oxígeno o una disminución de las defensas antioxidantes llevan igualmente a daño celular”. Años más tarde el Doctor Helmut Sies con diversas ideas elaboró un concepto ideal para estrés oxidativo, “situación de desequilibrio como un aumento de oxidantes o con una disminución de antioxidantes” (Sánchez J. 2010).

La oxidación es un proceso natural, donde se presenta una pérdida (electrones) relacionada con el proceso que conocemos como reducción. Pero esta oxidación es de gran importancia para la vida, ya que gracias a ella se puede participar en los diversos procesos de obtención de la energía que necesitan nuestras células. Sin embargo, cuando existe un exceso de esta oxidación aparece lo que se conoce como estrés oxidativo (EO).

La exposición a contaminantes, medio ambiente, estilo de vida y situaciones patológicas, pueden generar exceso y acumulación de radicales libres (RL), resultando en el establecimiento de estrés oxidativo. Como dijo Heráclito de Éfeso «τα πάντα ρέει» (ta pánta réei) “todo fluye, nada se detiene”. De la misma forma el oxígeno molecular, clave de la vida en nuestro planeta, fluye a través de nuestro organismo y sus múltiples organelos generando un elevado número de reacciones químicas, constituyéndose en la piedra de bóveda de los procesos de óxido-reducción en distintas estructuras biológicas. El estrés oxidativo se ha relacionado con el envejecimiento y enfermedades crónicas, promoviendo un alto índice de mortalidad en los últimos años. Los antioxidantes son compuestos que impiden los

procesos de oxidación por lo tanto retrasan o previenen el estrés oxidativo.

TABLA 1. ESPECIES REACTIVAS. MODIFICADO DE: HALIWELL B. (2006). REACTIVE SPECIES AND ANTIOXIDANTS. REDOX BIOLOGY IS A FUNDAMENTAL THEME OF AEROBIC LIFE. PLANT PHYSIOLOGY.

| RADICALES LIBRES | | NO RADICALES | |
|---|--|---|--|
| ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO | | ESPECIES REACTIVAS DE ÓXIGENO | |
| <ul style="list-style-type: none"> •Superóxido: O_2^- •Hidroxiilo: OH •Hidroperoxilo: HO_2 •Carbonato: CO_3^- •Peroxilo: RO_2 •Alcoxi: RO •Radical de dióxido de carbono: CO_2 •Oxígeno de orbital único | | <ul style="list-style-type: none"> •H_2O_2 •Ácido hipobromoso: $HOBr^a$ •Ácido hipocloroso: $HOCl^b$ •Ozono: O_3 •Oxígeno de orbital único. O_2^{-1} •Peróxidos orgánicos: ROOH •Peroxinitrito: $ONOO^{-d}$ •Peroxinitrato: O_2NOO^{-d} •Peroxomonocarbonato: $HOOCO_2^{-2}$ | |
| ESPECIES REACTIVAS DE CLORO | | ESPECIES REACTIVAS DE CLORO | |
| <ul style="list-style-type: none"> •Átomo clorinado: Cl | | <ul style="list-style-type: none"> •Ácido hipocloroso: $HOCl^b$ •Nitrilo clorado: $NO_2 Cl^e$ •Dióxido clorinado: ClO_2 •Cloraminas | |
| ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO | | ESPECIES REACTIVAS DE NITRÓGENO | |
| <ul style="list-style-type: none"> •Óxido nítrico •Dióxido de nitrógeno •Radical nitrato | | <ul style="list-style-type: none"> •Ácido nitroso •Cación nitrosilo •Anión nitroxi | |

| | |
|--|---|
| | <ul style="list-style-type: none">•Tetróxido dinitrogenado•Trióxido dinitrogenado•Peroxiacetill nitrato |
|--|---|

2.1.1 Radicales Libres

Para poder entender mejor lo que es el estrés oxidativo conoceremos que son los radicales. Un radical libre es un átomo o molécula con uno o más electrones no apareados en el último orbital con capacidad de neutralizarse entre sí y que al reaccionar con O_2 forman radicales tipo peroxilo, capaz de reaccionar con múltiples biomoléculas a través de su oxidación.

Los radicales libres contienen uno o más electrones impares, con capacidad de neutralizarse entre sí y que al reaccionar con O_2 forman radicales tipo peroxilo.

Dentro de este concepto general, las formas reducidas del O_2 se denominan especies reactivas de oxígeno ERO; en las que se incluyen radicales libres y peróxido de hidrógeno.

Los efectos benéficos de las ERO se presentan a bajas concentraciones, participando en diferentes funciones fisiológicas de la célula; como defensa contra agentes infecciosos y sistemas de señalización celular (mitosis) (Sánchez, V, 2013).

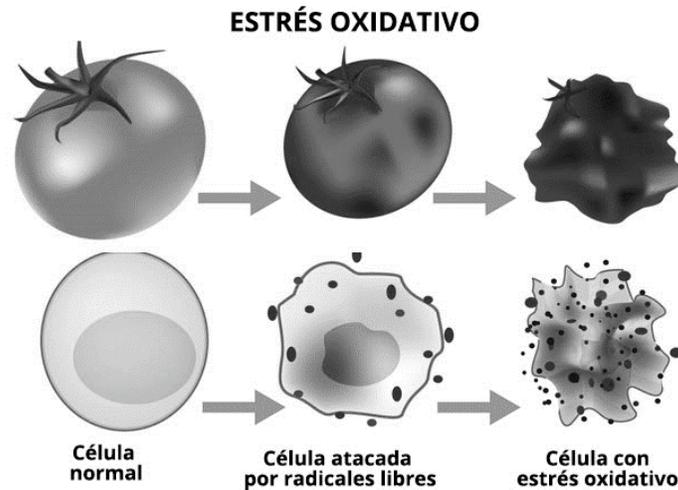


ILUSTRACIÓN 1. SIMULACIÓN DEL PROCESO DE ESTRÉS OXIDATIVO EN UNA CÉLULA.

En contraparte, el efecto dañino de los radicales libres en los sistemas biológicos produce estrés oxidativo (EO) generado por la deficiencia de antioxidantes e incremento de las especies reactivas de oxígeno (ERO).

El estrés oxidativo (EO) es el resultado de reacciones metabólicas que utilizan O_2 y representa una alteración en el equilibrio oxidante/reductor en los sistemas vivos con capacidad de oxidar biomoléculas (lípidos, proteínas, ADN) e inhibir su estructura y función normal. Por lo anterior, es importante resaltar que el equilibrio entre los efectos benéficos y perjudiciales de los radicales libres es un aspecto muy importante para los organismos vivos, el cual se logra mediante mecanismos de “regulación redox” que protegen a los organismos vivos del estrés oxidativo (EO), manteniendo el control del estado redox a través de los antioxidantes (AOX) y secuestrar radicales libres (RL) (Sánchez V. 2013).

Hay una serie de procesos patológicos atribuibles razonablemente al ataque de radicales libres (RL), al menos estarían implicados en algunas de sus fases o secuencias bioquímicas, por ejemplo. Envejecimiento, enfermedades cardiovasculares y deficiencias de vitamina E etc.

Cada vez que respiramos, 20% de lo que inhalamos es oxígeno. El oxígeno es una molécula esencial que pasa del aire en los pulmones a los glóbulos rojos en la sangre. Los glóbulos rojos transportan el oxígeno a cada célula de nuestro cuerpo. Así, el oxígeno proporciona vitalidad a las células al crear la energía necesaria para que las células funcionen (Myra, Marie. 2012).

El oxígeno presente es fundamental para la vida, pero ya que es demasiado tóxico en concentraciones muy elevadas debido a su alta reactividad pueden existir perturbaciones entre las sustancias pro-oxidantes y antioxidantes lo cual genera estrés oxidativo; esto cuando hay un desequilibrio en nuestras células, ya que no hay un balance óxido-reducción existe un aumento de radicales libres o ERO (especies reactivas de oxígeno). La alteración de este balance puede tener diversos grados de magnitud cuando es leve el mismo organismo ayuda a combatirlo con los antioxidantes y restablecer el balance principal; cuando ya hay un estado grave esto ya no basta con el mecanismo de defensa y se originan alteraciones en el metabolismo celular por ejemplo el rompimiento de ADN y la peroxidación lipídica (Avello, M 2006).

El estrés oxidativo puede ser reversible o irreversible todo esto depende de las condiciones del organismo, así como el tiempo en el que esté sometido a este estrés, de los antioxidantes, la edad, la alimentación que lleve cada uno ya que existen ciertos alimentos altos en antioxidantes y también depende de la genética individual (Dorado, C 2003).

El proceso de oxidación crea radicales libres en nuestras células, llevándose a cabo reacciones en cadena, causando el daño oxidativo. La fuente principal de los radicales libres son mitocondrias, peroxisomas entre otras (Justo, R 2002).

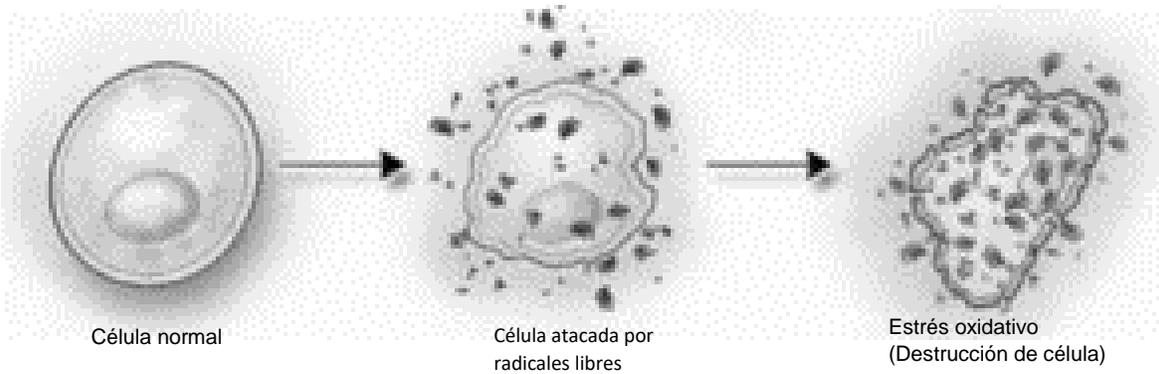


ILUSTRACIÓN 2. EFECTO DE LOS RADICALES LIBRE SOBRE LAS CÉLULAS (CASANOVA M, 2015).

Los radicales libres también son generados por factores como la contaminación ambiental, la exposición a radiaciones ionizantes, el tabaco, los medicamentos, los aditivos químicos en alimentos procesados y algunos xenobióticos como pesticidas, herbicidas y fungicidas.

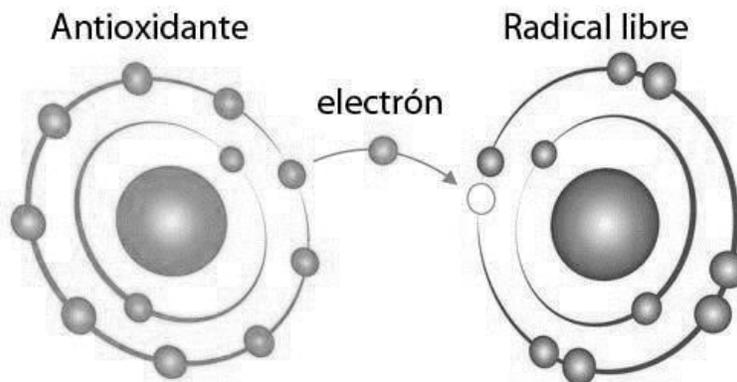


ILUSTRACIÓN 3. FUNCIÓN DE LOS ANTIOXIDANTES PARA COMBATIR EL ESTRÉS OXIDATIVO (DOLZ E, 2019).

La causa del estrés oxidativo depende de diversas situaciones como el medio ambiente, la radiación ultravioleta ha ido en aumento en los últimos años provocando diversas enfermedades asociadas al estrés oxidativo, si la dieta que se

consume no es alta en antioxidantes afecta al organismo por lo cual no se podrá evitar la producción de radicales libres.

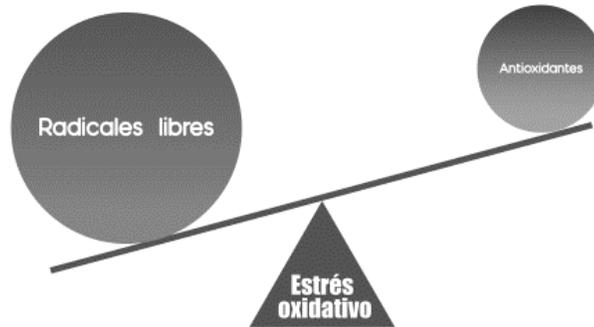


ILUSTRACIÓN 4. EQUILIBRIO DE ANTIOXIDANTES CON RADICALES LIBRES (TREMELLEN, 2008).

Como se observa en la ilustración 4 debe existir un equilibrio entre los antioxidantes y los radicales libres para evitar daños al organismo.



MAPA 1. CAUSAS DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

En el mapa No. 1 se muestran algunas causas que pueden provocar estrés oxidativo.

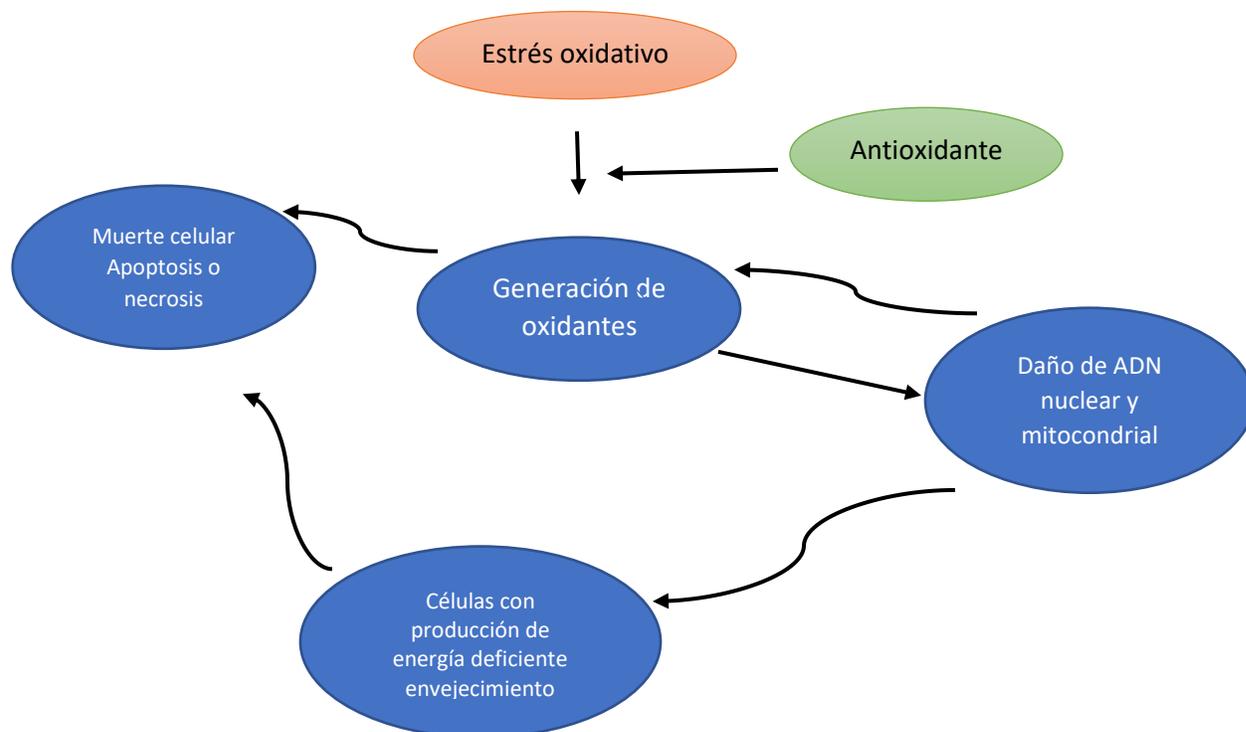
2.2 Enfermedades relacionadas al estrés oxidativo

Existen diversas enfermedades que están relacionadas con el estrés oxidativo que pueden ser relacionadas al medio ambiente o intracelular, y estas afectan a una gran variedad de funciones fisiológicas y participan en el desarrollo de enfermedades de tipo crónico degenerativas (Sánchez, Vicente. 2013).

Los daños son debidos a un ataque incontrolado a la integridad de moléculas celulares importantes, por ejemplo, proteínas, grasas, carbohidratos y ácidos nucleicos de la célula. Con el paso del tiempo el daño acumulado destruye la función celular para después expandirse al exterior y afectar tejidos y órganos, acelerando el proceso de envejecimiento y, en última instancia manifestarse a través de alguna forma de enfermedad degenerativa.

Como se mencionó anteriormente, en condiciones metabólicas normales existe un balance entre los radicales libres y los sistemas de defensa, los antioxidantes y reparación del daño (Elejalde, J 2001).

La mitocondria se considera la generadora de energía central de la célula, ahí es donde se lleva a cabo el proceso de oxidación, se ha investigado que los radicales libres generados en la mitocondria pueden producir un daño a la membrana interna del organelo, a los componentes de la cadena de transporte de electrones y al ADN mitocondrial, de esta forma al dañar a la mitocondria, no solo produce menos ATP sino que también incrementa la producción de ERO y causa un daño oxidativo a la mitocondria (Fainstein, M. 2008).



MAPA 2. CIRCULO VICIOSO DEL DAÑO POR ERO Y EL ENVEJECIMIENTO.

Son muchos los procesos patológicos implicados, así como múltiples los descubrimientos llevados a cabo por diferentes grupos de investigación, por ello sólo es posible recoger unos breves comentarios de algunos de estos procesos patológicos más significativos.



MAPA 3. FACTORES QUE INFLUYEN AL ESTRÉS OXIDATIVO.

Existe una gran variedad de enfermedades que están relacionadas al estrés oxidativo, en la siguiente tabla se mostraran algunas enfermedades, su alteración y su relación con el glutatión.

TABLA 2. RELACIÓN ENTRE ENFERMEDADES Y GSH. MODIFICADO DE: (MARTÍNEZ, J. (2011). EL GLUTATIÓN Y SU ASOCIACIÓN CON LAS ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS, LA ESQUIZOFRENIA, EL ENVEJECIMIENTO Y LA ISQUEMIA CEREBRAL).

| PATOLOGÍA | ALTERACIÓN | RELACIÓN DE GSH |
|-----------|--|---|
| Cáncer | Estado persistente de estrés oxidativo. Aumento de la | Aumentan los niveles de GSSG plasmático por aumento de la actividad |

| | concentración de ROS. | mitótica tumoral. |
|----------------|---|---|
| Aterosclerosis | Aumenta la apoptosis celular | Aumenta la síntesis de GSH para proteger a las células del estrés oxidativo |
| Malnutrición | Aumenta la concentración de ROS que dañan la membrana celular; se produce edema y hay subfunción hepática e inmune. | Disminuye la concentración de GSH , la velocidad de síntesis de GSH. |
| Alcoholismo | Aumenta la generación de ROS y la susceptibilidad del estrés oxidativo Alteraciones a nivel mitocondrial. | Disminuye la concentración de GSH mitocondrial Disminuye la actividad enzimática de metil adenosil-transferasa |
| SIDA | Incremento de procesos oxidativos Se desconocen los mecanismos que alteran la homeostasis del GSH. | Disminuye la concentración de GSH en hematíes y en plasma Disminuye la velocidad de síntesis de GSH |

2.2.1 Envejecimiento

El envejecimiento es un fenómeno biológico inevitable que se relaciona con el decaimiento o la pérdida de las capacidades fisiológicas y bioquímicas del organismo. Existen estudios que describen diferentes teorías del envejecimiento del organismo, las teorías celulares relacionan los cambios que se producen en los elementos estructurales y funcionales de las células como las mitocondrias con el paso del tiempo; todo esto por influencia de los factores ambientales (Martínez, J. 2011).

La teoría más aceptada es la de Denham Herman en 1956 la cual dice que el envejecimiento es el resultado de la acumulación de daño oxidativo en las biomoléculas, principalmente ADN, a lo largo de la vida de un organismo.

Según Harman, el envejecimiento se produce cuando las células se ven sometidas a los daños generados por el ataque constante y vitalicio de los radicales libres.

2.2.2 Cáncer

Es un proceso caracterizado por el crecimiento incontrolado de las células cancerosas. Estudios han reportado los posibles mecanismos implicados en la transformación maligna inducida por los radicales libres, observando que la deficiencia de enzimas antioxidantes desencadena alteraciones características de la transformación celular.

Las células cancerosas producen grandes cantidades de peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que pueden causar daño tisular y mutaciones, promoviendo así el crecimiento y la invasión tumoral. El aumento de GSH en las células tumorales pueden explicarse como resultado del aumento de la actividad mitótica. El cambio en la tasa de la proliferación es consistente con el camino en la concentración intracelular de GSH. Cuando las células tumorales proliferan, se producirá más peróxido y ROS aumentará, por lo que el GSH se oxidará.

El aumento de Glutati3n disulfuro en la sangre que acompa1a el crecimiento tumoral se puede atribuir a la oxidaci3n de GSH en los gl3bulos rojos y al aumento de la liberaci3n de GSSG en diversos tejidos (Elejalde, J. 2001).

2.2.3 Da1o Hepático

El H3gado es esencial para mantener la homeostasia del organismo, este 3rgano se encarga de eliminar o neutralizar las sustancias t3xicas, produce agentes inmunitarios para controlar las infecciones y elimina g3rmenes y bacterias de la sangre (Carrillo Esper 2011).

2.2.3.1 Enfermedad hepática alcoh3lica

El etanol ejerce una toxicidad directa en el h3gado, 3rgano principal donde se lleva a cabo el 95% de su metabolismo. Asociado con cambios en el estado redox y con el estr3s oxidativo. Los cambios en el estado redox est3n mediados por la enzima de alcohol deshidrogenasa (ADH), mientras que el estr3s oxidativo es generado principalmente por la actividad de los sistemas oxidativos microsomal del etanol (MEOS) y su enzima citocromo P450 2 E1 (CYPE1), la cual produce radicales libres.

El da1o causado por el estr3s oxidativo en la Esteatohepatitis alcoh3lica incluye da1o mitocondrial, lo cual a su vez exagera el estr3s oxidativo, por lo que se considera que el da1o mitocondrial es un componente importante en la enfermedad.

El estr3s oxidativo causado por la inducci3n del CYP2E1 y el da1o mitocondrial da como resultado la peroxidaci3n de l3pidos y la alteraci3n membranal.

Adem3s, el acetaldeh3do producido por la oxidaci3n del etanol tiene efectos t3xicos, inhibiendo la reparaci3n de las nucleoprote3nas, disminuyendo la actividad de enzimas y reduciendo la capacidad mitocondrial para reducir el ox3geno durante la respiraci3n.

La oxidaci3n desacoplada de la mitocondria puede interferir con la oxidaci3n del acetaldeh3do, y esto lleva a un c3rculo vicioso por la acumulaci3n progresiva del acetaldeh3do y el aumento del da1o mitocondrial.

El acetaldehído promueve la muerte celular abatiendo la concentración de glutatión reducido (GSH), induciendo lipoperoxidación, e incrementando los efectos tóxicos de los radicales libres. Al unirse a la tubulina de los microtúbulos, el acetaldehído bloquea la secreción de proteínas. El incremento en las proteínas, los lípidos, el agua y los electrólitos, causa que los hepatocitos se agranden, una característica en la enfermedad hepática alcohólica (Fainstein, M 2008).

2.2.4 Esclerosis

La esclerosis lateral amiotrófica es una enfermedad que inicia en la edad adulta media, se caracteriza por una degeneración selectiva y progresiva de las neuronas motoras inferiores de la médula espinal y de las neuronas motoras superiores en la corteza cerebral.

Se sabe que el metabolismo de los aminoácidos excitadores está alterado en los pacientes de esclerosis lateral amiotrófica, dado que las concentraciones de glutamato, aspartato y N-acetilaspártico glutamato están elevadas en el líquido cefalorraquídeo y disminuidas en la médula espinal y la corteza motora, estos cambios han sido interpretados como alteraciones en el transporte de glutamato, lo que produciría eventos neurodegenerativos asociados a daño oxidativo a través de sobreactivación de receptores (Coyle JT, 1993).

2.2.5 Parkinson

La enfermedad de Parkinson es la neuropatía motora progresiva más común en las personas de la tercera edad, esta se caracteriza por temblor y rigidez. Histológicamente, este trastorno presenta una degeneración selectiva de las neuronas dopaminérgicas pigmentadas de la sustancia negra que proyecta sus fibras hacia el núcleo caudado-putamen, se acompaña de una marcada disminución de los niveles estriatales de dopamina (Beal MF, 1993).

Existen diferentes características neuroquímicas de la enfermedad de Parkinson que implican un alto riesgo de ocurrencia de estrés oxidativo y nitrosativo. Entre éstas destaca el aumento en la descomposición de la dopamina producida por la monoamino oxidasa (MAO), lo que resulta en una elevada formación de H₂O₂,

indicando así los procesos metabólicos controlados por la monoamino oxidasa estas constituyen una fuente potencial de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

En el cerebro de pacientes con este trastorno muestran niveles disminuidos de la actividad de la Glutación peroxidasa GPx y del contenido de Glutación reducido GSH en la sustancia negra, así como el aumento en los valores de hidroperóxidos lipídicos y bajas concentraciones de ácidos grasos poliinsaturados. Existen alteraciones en la cadena respiratoria mitocondrial (Behl C, 2005).

Para poder combatir el estrés oxidativo existen sistemas de antioxidantes que ayudarán a prevenir enfermedades o su vez ayudar a eliminar los radicales libres.

2.3 Sistema de Antioxidantes

Para combatir el efecto dañino de los radicales libres, todos los organismos aerobios cuentan con sistemas de defensa antioxidante, que incluyen diversas moléculas, enzimas que previenen el daño oxidativo. Los antioxidantes son la primera defensa celular para combatir el estrés oxidativo.

TABLA 3. EJEMPLO DE OXIDANTES Y ANTIOXIDANTES.

| Oxidantes | Antioxidantes |
|--------------------------|-----------------------|
| Peroxinitrico | Enzimáticos |
| Radical hidroxilo | Superóxido dismutasas |
| Radical alquilo | Catalasa |
| Radical Peroxilo | Glutación peroxidasa |
| Hidroperóxidos orgánicos | |
| Oxígeno | No enzimáticos |
| Perooxidantes | Glutación reducido |
| Radical Superóxido | Tocoferol |
| Peróxido de hidrógeno | Ac. Ascórbico |
| Óxido nítrico | |

Existen sistemas antioxidantes que trabajan mediante dos tipos de mecanismos que permiten eliminar los excesos de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, los de protección estequiométrica y la catalítica. (Tabla 2).

TABLA 4. SISTEMAS ANTIOXIDANTES.

| ESTEQUIOMÉTRICA | CATALÍTICA |
|---|---|
| Protección neutralizante por medio de moléculas pequeñas que inactivan una o dos moléculas de especies reactivas. | Protección catalítica se produce con enzimas que inhiben las reacciones de oxidación y evitan la formación de grandes cantidades de especies reactivas. |

Existe gran cantidad de compuestos antioxidantes, como enzimas, iones metálicos, uratos y otras moléculas endógenas, y moléculas exógenas convencionales, como son las vitaminas y los carotenoides, y no convencionales o menos conocidas (Mates J M. 2009).

Los sistemas antioxidantes se pueden dividir en tres grupos; el primero es del grupo de neutralizantes, que pueden eliminar la formación de radicales libres, incluyendo catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión transferasa. El segundo es responsable de inhibir los radicales libres y el tercer grupo es responsable de reparar el daño de los radicales libres en la membrana celular (Battino M. 2002).

2.3.1 Inhibitoria

La oxidasa del NADPH y el inhibidor de la sintasa del óxido nítrico, estas actúan modulando la actividad de las enzimas responsables de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Battino M. 2002).

2.3.2 Reductores o Neutralizantes

La dismutasa del superóxido, la catalasa y la peroxidasa del glutati3n, que actúan catalizando las especies reactivas, pueden ser citos3licas o de membrana y permiten controlar la producci3n de antioxidantes; característicamente, usan como cofactores oligoelementos como el zinc, el magnesio y el cobre (Battino M. 2002).

2.3.3 Reparadores

Actúan reparando el daño que las especies reactivas de oxígeno y de nitr3geno hayan podido causar al ADN celular o a las membranas; incluyen lipasas, transferasas y proteasas (Battino M. 2002).

TABLA 5. COMPONENTES DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE.

| ENZIMAS | ACCIÓN ANTIOXIDANTE |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> •Dismutasa del superóxido •Catalasa •Peroxidasa de glutati3n •Tioredoxina | <ul style="list-style-type: none"> Remover radical superóxido Convertir H₂O₂ a H₂O Convertir H₂O₂ a H₂O Convertir H₂O₂ a H₂O |
| <p style="text-align: center;">Secuestradores de iones de metales</p> <ul style="list-style-type: none"> •Metalotioneina •Fitoquelantes •Transferrina •Albúmina | <p style="text-align: center;">Quelantes de cinc, cobre y hierro</p> |
| <p style="text-align: center;">Baja masa molecular</p> <ul style="list-style-type: none"> •Uratos (end3genos) •Vitamina C (ex3geno) •Vitamina E (ex3geno) •Carotenoides (ex3geno) •Fitoquímicos (ex3geno) | <p style="text-align: center;">Recicladores de especies reactivas de oxígeno y de nitr3geno</p> |

En este trabajo se utilizó Glutación que es un antioxidante que ayuda a combatir el estrés oxidativo.

2.4 Glutación

El glutación es una molécula que participa en aspectos esenciales de la homeostasis celular. Fue descubierta en 1888 por Joseph de Rey-Pailhade en Francia. Describió que las células de levadura contenían una sustancia formada por sulfuro de hidrógeno cuando eran trituradas en presencia de azufre. Joseph encontró la sustancia en músculo, hígado, cerebro, músculo de pecado y sangre (Meister A.1988).

La estructura fue estudiada por Hopkings, quien propuso que se trataba de un dipéptido formado por glutamato y cisteína y en 1921 lo nombró como Glutación. En 1935 Haring y Mead describe la molécula química correcta como un tripéptido (Sastre J, Pallardo 2005).

La molécula de glutación (GSH) es un antioxidante que puede participar en la inhibición enzimática, reducción de especies reactivas de oxígeno e inactivación xenobiótica, esta controla la permeabilidad de la membrana. Así mismo, el transporte de aminoácidos, actuar como una coenzima, interfiere con la apoptosis celular y el proceso de síntesis de proteínas.

Esta molécula es un antioxidante celular esencial, que está presente en todos los órganos y tejidos, especialmente en el hígado, donde se encuentran las mayores concentraciones (Towsend D. 2003).

El GSH es un tripéptido hidrosoluble de bajo peso molecular, está formado por tres aminoácidos: ácido glutámico (glutamato), glicina y cisteína (Glu-Gly-Cys), se conoce químicamente como Glutación reducido como N-(N-L-gamma-glutamil-L-cisteinil) glicina, con fórmula molecular de $C_{10}H_{17}N_3O_6S$ y peso molecular de $307.33g.mol^{-1}$.

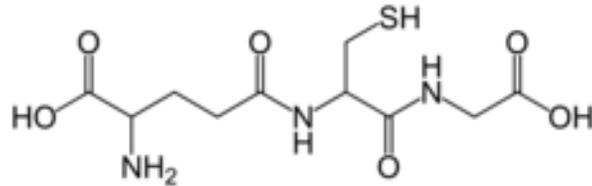


ILUSTRACIÓN 5. ESTRUCTURA QUÍMICA DEL GLUTATIÓN REDUCIDO (FERNÁNDEZ, J. 2008).

2.4.1 Síntesis de glutatión

La síntesis del Glutatión se lleva a cabo en el citosol de todas las células a partir de aminoácidos precursores: glicina, cisteína y ácido glutámico. A pesar de ser sintetizado exclusivamente en el citosol, el GSH se encuentra distribuido en el retículo endoplásmico, el núcleo y la mitocondria.

2.4.1.1 Funciones del GSH en el organismo

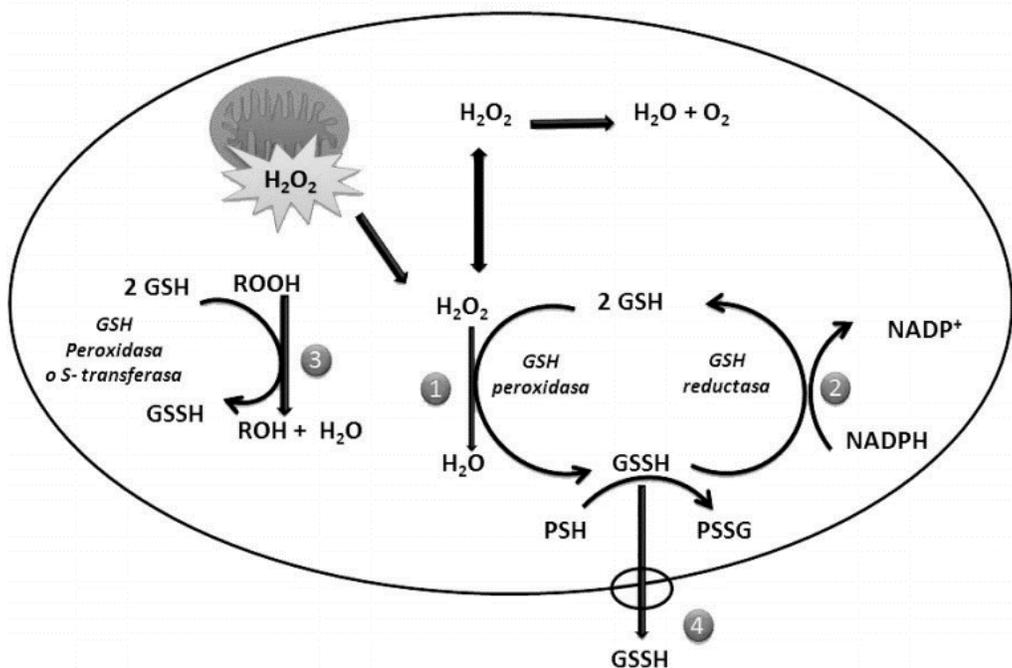


ILUSTRACIÓN 6. FUNCIÓN ANTIOXIDANTE DE GSH (DENZOIN A. 2013).

- 🧪 El peróxido de hidrógeno formado por el metabolismo aeróbico es metabolizado por la enzima Glutación (GSH) peroxidasa formando Glutación disulfuro (GSSG).
- 🧪 Glutación disulfuro (GSSG) formado en la reacción anterior es reducido por la enzima Glutación GSH reductasa utilizando NADPH como cofactor.
- 🧪 Los peróxidos orgánicos formados pueden ser reducidos por Glutación (GSH) peroxidasa.
- 🧪 El Glutación disulfuro (GSSG) formado durante el estrés oxidativo que no puede ser reducido a Glutación (GSH) es exportado de la célula para mantener el equilibrio redox.
- 🧪 Mantiene el balance redox en la célula y la protege del estrés oxidativo, nitrosativo y de los reactivos electrofílicos.
- 🧪 Actúa como coenzima.
- 🧪 Participa en procesos de detoxificación.
- 🧪 Controla la permeabilidad de membrana y el transporte de aminoácidos.
- 🧪 Interviene en el proceso de síntesis de proteínas, ADN y ARN.
- 🧪 Regula la formación y el mantenimiento de la forma activa de las enzimas.

TABLA 6. CONCENTRACIÓN DE GSH EN EL ORGANISMO HUMANO.

| ÓRGANO | [MM] | CONCENTRACIÓN MÁS ELEVADA DEL ORGANISMO PARA PROTEGER DE LA FOTO-RADIACIÓN |
|---------|------|---|
| Hígado | 5-7 | Principal órgano relacionado con la síntesis del GSH. La excreción biliar alcanza una concentración de 10 Mm. |
| Riñón | 3 | Donde más GSH plasmático se consume. |
| Corazón | 2 | |
| Músculo | 1-2 | Su concentración varía según el tipo de fibra muscular. |

| | | |
|----------------|---|--|
| Glóbulos rojos | 2 | Concentración correspondiente a GSH libre; existe, además, una fracción unida a proteínas. |
|----------------|---|--|

En la Tabla No. 6 se indican los lugares del organismo donde el GSH se encuentra en mayor concentración. Dentro de las células, el GSH se encuentran principalmente en mitocondrias, retículo endoplásmico y núcleo.

Con el paso del tiempo las enzimas antioxidantes tienden a aumentar con la edad, con el objetivo de compensar la disminución del GSH hepático, pero con este aumento no alcanza para que ejerza su función de secuestrar los radicales libres generados, pues hay una pérdida de efectividad de las enzimas. Con la edad también existe una disminución de la síntesis proteica. Frente a una diferencia de GSH se observa un aumento de especies reactivas de oxígeno, con el consecuente daño mitocondrial y celular (Palomero J. 2001).

En base a lo anterior, en este proyecto se investigará la producción de los liposomas cargados de glutatión, se eligió que el glutatión estuviera encapsulado en liposomas ya que sus componentes son similares a la membrana celular por lo cual podrá ejercer su función y ayudar al organismo a combatir el estrés oxidativo.

El componente principal de los liposomas son los fosfolípidos, particularmente fosfatidilcolina, la importancia de utilizarla es que pueda traspasar fácilmente la membrana celular.

2.5 Lípidos

Los lípidos son un conjunto de moléculas orgánicas que se caracterizan por la presencia de una o varias cadenas hidrocarbonadas, que presentan uno o varios grupos polares en un extremo de la molécula.

Son sustancias de los seres vivos que se disuelven en disolventes apolares como el éter, el cloroformo y la acetona, y que no lo hacen apreciablemente en el agua. Los lípidos cumplen funciones biológicas diversas; como función energética, estructural, de reserva y transportadora entre otras, los lípidos en función de su

reactividad y al contenido de ácidos grasos se clasifican en saponificables; que estos a su vez se dividen en simples como son los ácidos grasos, acilglicéridos y céricos, y los complejos que son los fosfolípidos y los glucolípidos; estos contienen cadenas largas de ácido carboxílico; y los no saponificables que son terpenos, esteroides y prostaglandinas (Mckee y Mckee, 2003).

2.5.1 Fosfolípidos

Los fosfolípidos son los principales componentes de la membrana celular, estos forman parte de los lípidos estructurales, tienen una característica principal la cual es su carácter anfílico, es decir, un parte de la molécula tiene afinidad por el agua y la otra lipofílica afinidad a grasas.

Su estructura está constituida por glicerina esterificada en el carbono 3 con un grupo fosfato (glicerol-3-fosfato) y en los carbonos 1 y 2 por ácidos grasos. Son moléculas anfipáticas, ya que poseen una región hidrofílica constituida por el grupo fosfato y los sustituyentes se unen a él, y otra región hidrofóbica formada por los ácidos grasos que esterifican a la glicerina. Esta estructura los hace idóneos para formar la estructura de las membranas. Otra de las propiedades de los fosfolípidos (PLs) es que pueden facilitar la estructura basada en bicapas que son la base estructural de los liposomas, por lo cual son vesículas esféricas con un comportamiento interno acuoso.

2.5.1.1 Fosfatidilcolina

La fosfatidilcolina es uno de los principales constituyentes de las bicapas lipídicas de las membranas celulares, por lo cual son muy utilizados ya que pueden atravesar fácilmente las membranas celulares.

También es muy útil ya que tiene un costo muy bajo en comparación a otros fosfolípidos (PLs), su carga neta es neutra, tiene una gran biocompatibilidad. También son útiles para una serie de mensajeros lipídicos y fuente para un gran número de lípidos bioactivos como, lisofosfatidilcolina, ácido fosfatídico (Pubchem, 2017).

Está constituido por un esqueleto de glicerol que presenta el grupo hidroxilo (en posición 3) esterificado por el ácido fosfórico, el cual, a su vez se une a la colina formando la cabeza polar de la molécula y, los otros dos grupos hidroxilo (en posición 1 y 2) esterificados por ácidos grasos cuyas cadenas hidrocarbonadas constituyen la zona apolar de los fosfolípidos y le dan nombre.

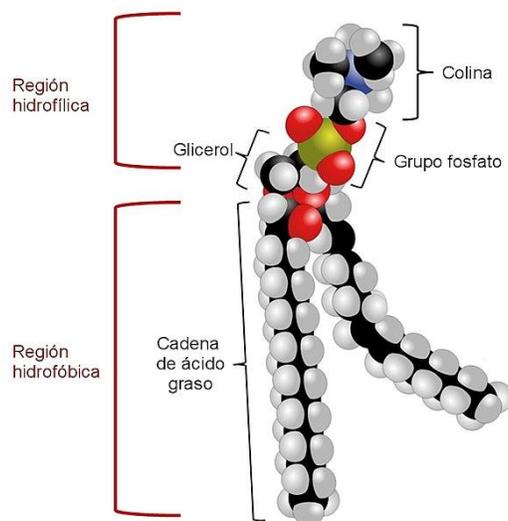


ILUSTRACIÓN 7. ESTRUCTURA QUÍMICA DE FOSFATIDILCOLINA (PARADA R, 2019).

Los liposomas de fosfatidilcolina presentan carga eléctrica negativa, si bien se pueden incluir en su composición lípidos que les confieran carga positiva (Zhanga, 2016). Cuando los lípidos empleados en la formación de los liposomas multilaminares tienen carga, la distancia entre las bicapas aumenta y es mayor la cantidad de sustancia hidrosoluble encapsulada, debido al incremento en el volumen acuoso.

2.6 Liposomas

Los liposomas son sistemas vesiculares que se descubrieron por primera vez por Bandham en 1961 ahí se dio cuenta de que algunos lípidos formaban estructuras membranosas cuando estaban en un medio acuoso, se dieron cuenta que con estos sistemas membranosos podían mejorar la administración de fármacos, pero no fue

hasta los años ochenta que se hicieron más publicaciones y vieron su éxito en sistemas de liberación de fármacos.

Existe una gran variedad de liposomas en la mayoría se utilizan fosfolípidos, pueden ser con la incorporación de colesterol u otros componentes como el colato de sodio para darle diferentes características dependiendo de su función principal.

Los liposomas son estructuras micro o nanoscópicas consistentes en una o varias esferas concéntricas de bicapas fosfolipídicas o lamelares que encierran compartimentos acuosos (Navarro, 2002).

En los liposomas tiene tendencia natural a determinados tejidos y células, esto es una cualidad muy importante ya que eso facilita la administración y eficacia terapéutica del fármaco. Estos poseen la capacidad de incorporar diferentes solutos, tanto en la fase acuosa como en la lipídica, durante su formación.

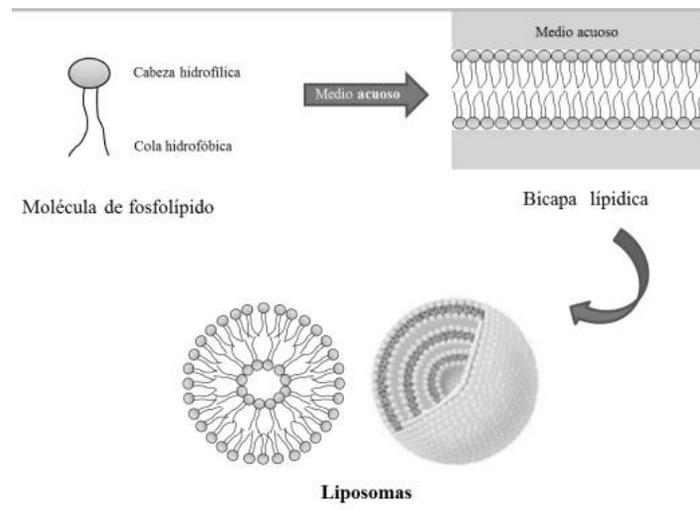


ILUSTRACIÓN 8. ESTRUCTURA DE UN LIPOSOMA (LUZARDOA. 2009).

Los liposomas de acuerdo al principio activo que se va a encapsular dependerá de las características fisicoquímicas de este mismo, ya que si son lipofílicas estas se van a encapsular en las bicapas de los liposomas y si son hidrofílicas estarán en el interior de los liposomas. Una de las ventajas de la utilización de estos sistemas es que, de acuerdo a sus propiedades físicas como la carga superficial, tamaño de

partícula, permeabilidad de la pared y capacidad de carga pueden ser muy fácil de manipular para mejores resultados.

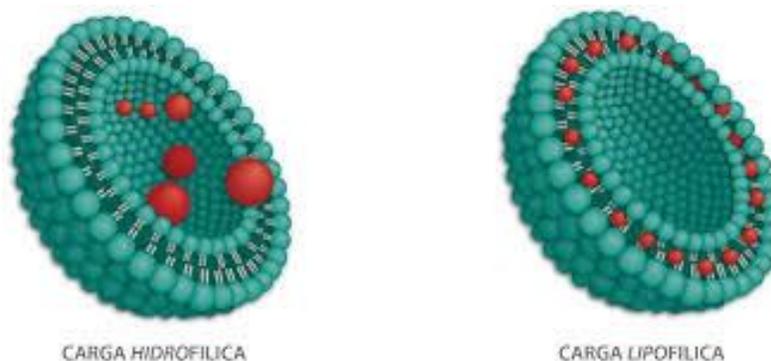


ILUSTRACIÓN 9. ENCAPSULAMIENTO DE ACUERDO A SU CARGA (GARCÍA M. 2015).

De acuerdo a cada una de las características de los liposomas tienen baja toxicidad y así mismo brindan una gran protección al fármaco para que llegue al sitio de acción correspondiente (Iturbe, A. 2018).

2.7 Clasificación de liposomas

2.7.1 Composición

Los liposomas están compuestos por una o varias bicapas de fosfolípidos que están dispersas en un medio acuoso. El diámetro de cada vesícula dependerá de las propiedades fisicoquímicas de los fosfolípidos o el método de fabricación (Sharma, 2010).

De acuerdo a sus características morfológicas se pueden clasificar por su composición, como los fosfolípidos naturales son convencionales, los niosomas utilizan fosfolípidos sintéticos por ejemplo el tween, los liposomas stealth que son recubiertos por polímeros como el PEG y los liposomas catiónicos que son fosfolípidos con carga positiva serían los tensoactivos (Álvarez A. 2015).

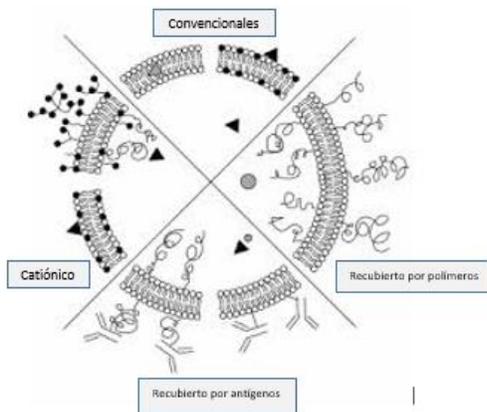
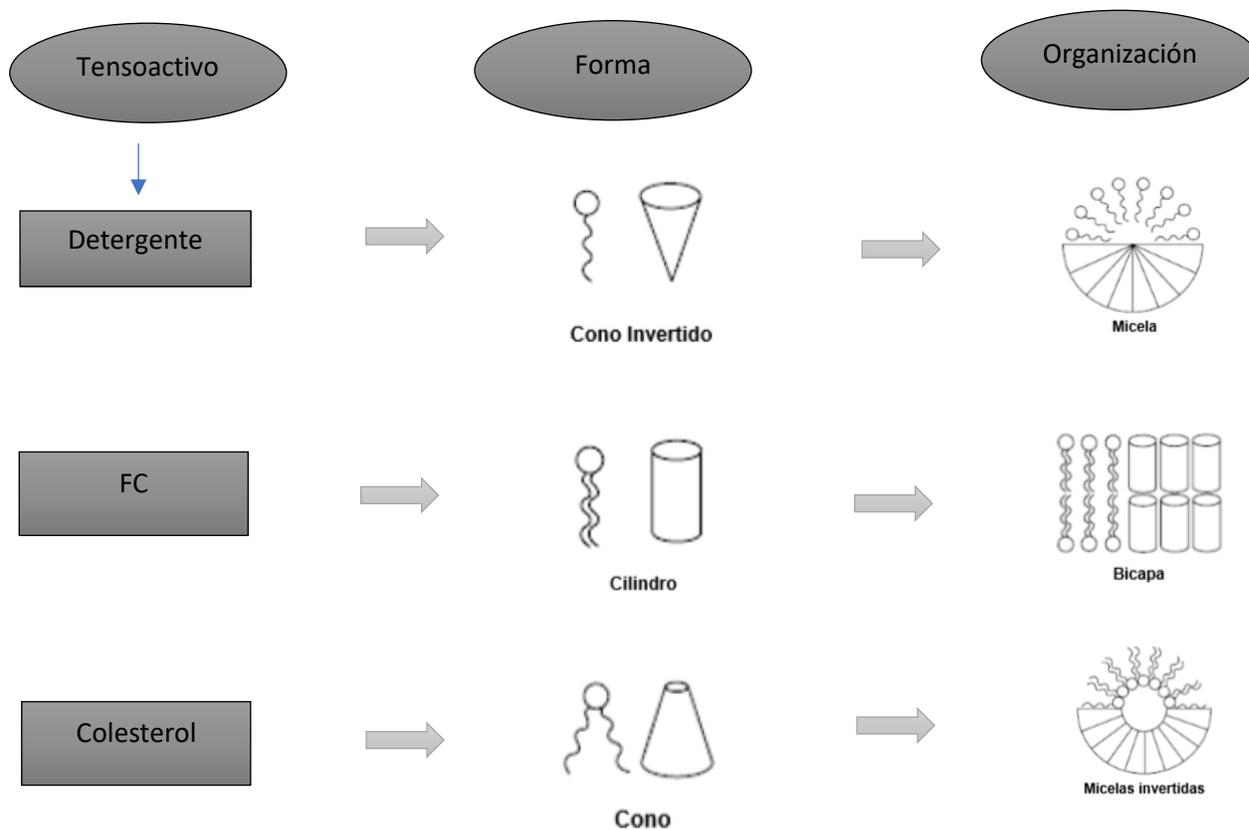


ILUSTRACIÓN 10. TIPOS DE LIPOSOMAS (ÁLVAREZ A. 2015).

Con base a las características morfológicas se pueden clasificar en:



2.7.2 Estructura

2.7.2.1 Tipos de liposomas

Existen diversos criterios para poder clasificarlos por ejemplo su tamaño y el número de lamelas que conforman la pared de la estructura vesicular, también depende del procedimiento por el que se han obtenido. En la Tabla 7 se puede observar la gran variedad de liposomas que hay y su manera de elaborar.

TABLA 7. TIPOS DE LIPOSOMAS.

| Por su tamaño y lamelaridad. | | |
|-------------------------------|---|-----------------------------|
| Abreviatura | Nombre | Tamaño |
| MLV | Vesículas multilamelares | > 0.5 μm |
| OLV | Vesículas oligolamelares | 0.1-1 μm |
| UV | Vesículas unilamelares | Todos los rangos de tamaños |
| SUV | Vesículas unilamelares pequeñas | 40-100 nm |
| LUV | Vesículas unilamelares grandes | > 400 nm |
| GUV | Vesículas unilamelares gigantes | > 1 μm |
| MVV | Vesículas multivesiculares | > 1 μm |
| Por su método de preparación. | | |
| Abreviatura | Nombre | |
| REV | Vesículas uni u oligolamelares obtenidas por evaporación en fase reversa | |
| MLV-REV | Vesículas multilamelares obtenidas por evaporación en fase reversa | |
| SPLV | Vesículas estables plurilamelares | |
| FATMLV | Vesículas multilamelares obtenidas por ciclos repetidos de congelación/descongelación | |
| VET | Vesículas obtenidas por extrusión | |
| LUVET | Vesículas unilamelares grandes obtenidas por extrusión | |
| DRV | Vesículas obtenidas por deshidratación/rehidratación | |

| |
|---|
| Por su comportamiento previsible |
| Liposomas convencionales |
| Liposomas de circulación prolongada o stealth liposomas |
| Liposomas catiónicos |
| Inmunoliposomas |

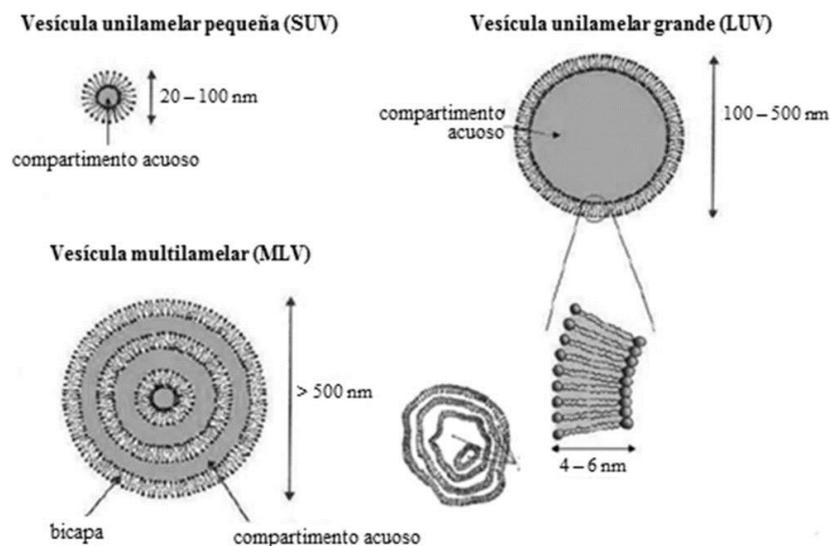


ILUSTRACIÓN 11. DIFERENTES TIPOS DE VESÍCULAS: SUV O VESÍCULAS UNILAMELARES PEQUEÑAS, LUV O VESÍCULAS UNILAMELARES GRANDES Y MLV O VESÍCULAS MULTILAMELARES (RUANO M. 2013).

TABLA 8. VENTAJAS Y DESVENTAJAS (MLV, SUV Y LUV)

| Tipo | Ventajas | Desventajas |
|------|--|---|
| MLV | Retención volumen largo. Retención adecuada Buena calidad. | No tiene tamaño uniforme. Dificultar para retener polímero. Dificultar para entregar la sustancia. |

| | | |
|-----|--|--|
| SUV | Tamaño uniforme | Retiene volúmenes pequeños. Dificulta la retención de polímeros. Se funde con otros polímeros. |
| LUV | Retiene polímeros. Gran retención de volumen. Eficaz retención | No tiene tamaño uniforme. |

El tamaño de los liposomas es de suma importancia ya que su estabilidad y su comportamiento físico influyen importantemente en su tamaño y homogeneidad, esto se ve relacionado a la disminución en la encapsulación, porque estos parámetros influyen en el comportamiento y su destino en la circulación sanguínea.

2.7.3 Liposomas Ultraflexibles

Los liposomas ultraflexibles son vesículas transportadoras, su principal característica es que tienden a deformarse y poder a travesar membranas más fácilmente.

Estos sistemas transportadores de moléculas activas constan de un compartimento acuoso rodeado de una bicapa lipídica. Se caracteriza por tener una elevada flexibilidad gracias a la presencia de tensoactivos o surfactantes que reducen la tensión superficial con el medio y aportan estabilidad a la formulación. Los tensoactivos son moléculas con alto radio de curvatura que desestabilizan la bicapa de las vesículas aumentando su deformabilidad facilitando la penetración, ya que pueden comprimirse hasta diez veces su diámetro (Gupta et al., 2012).

Los liposomas ultraflexibles son la primera generación, los cuales incorporaron en su estructura lamelar tensoactivo como colato de sodio (CS) y deoxicolato de sodio (DCS) son los que le dan la propiedad de ser flexibles, con un grado de deformabilidad de 5 en vesículas de 100nm indicaría que podría pasar por un poro de diámetro de 20nm.

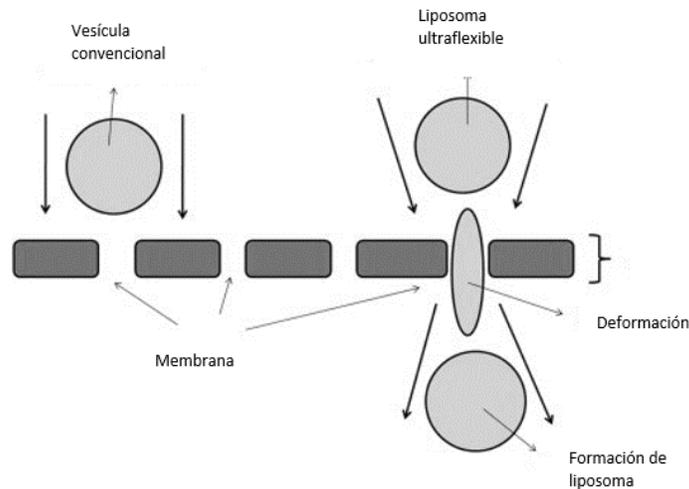


ILUSTRACIÓN 12. DEFORMACIÓN DE VESÍCULA (MALAKAR J. 2012).

2.7.4 Liposomas cargados

La carga que tienen los liposomas se crea por un campo eléctrico que afecta totalmente a su estructura de la bicapa de fosfolípidos, así mismo, a su fluidez o al transporte de moléculas a través de la membrana.

Esta carga superficial es sumamente importante ya que es la que les da estabilidad coloidal a los liposomas ya que los procesos de agregación y fusión de estas están controlados.

2.8 Métodos de fabricación

La elección de métodos de fabricación de liposomas es de suma importancia ya que depende absolutamente de las características fisicoquímicas. Esto comienza desde la fase experimental ya que para elegir el adecuado, no depende solo de una buena

formulación con buena actividad y estabilidad, si no también es importante que sea factible y trasladable, así como, que el precio sea razonable.

Al elegir el proceso adecuado de la fabricación de liposomas debe ser sencillo, estandarizado, reproducible y bajo costo.

Existen diversos procesos de fabricación que van a depender de las características fisicoquímicas que se quieren obtener de los liposomas, pueden ser diferentes como SUV, LUV y MLV.

Al seleccionar cada uno de los componentes y el método de preparación adecuado se deben considerar diversos factores y determinadas características de los liposomas, y se debe considerar lo siguiente:

- 🧪 A mayor concentración de lípidos una mayor proporción de la fase acuosa encapsulada.
- 🧪 La vida media de los liposomas incrementa cuando aumenta la dosis de lípido
- 🧪 El índice de encapsulación es más elevado cuanto más lentamente se realice la hidratación
- 🧪 Otro factor importante es la elección del lípido, estos deben tener una temperatura de transición fácilmente alcanzable, ya que hay diversos métodos que pueden elevar su temperatura corporal, (por ejemplo, la zona cancerígena), con la cual se logra que solo en la zona afectada se libere el principio activo, y así, no será nocivo en otras zonas corporales. (PONS, 1995).

Por lo cual, considerando todos estos factores se eligieron los componentes adecuados para una buena formulación.

2.8.1 Liposomas plurilaminares (MLV)

Es uno de los métodos más conocidos, fue desarrollado por Bangman en 1974, este consta de diferentes etapas:

- A) Mezcla de fosfolípidos con el resto de los componentes de la pared lipídica, estos son solubilizados con un disolvente orgánico volátil.

- B) En el matraz en donde se mezcla todo, se forma una capa de fosfolípidos por evaporación a vacío del disolvente,
- C) La hidratación consta de agregar la mezcla al matraz y dejar en agitación ligera para la formación de suspensiones de liposomas.



A



B



C

2.8.2 Liposomas unicorpartimentales microvesiculares (SUV)

Este tipo de vesículas se obtiene, principalmente por los métodos denominados irradiación con ultrasonidos, inyección de una solución de etanol, eliminación del detergente y por extrusión a alta presión (Puisseux, Delattre, 1985).

2.8.2.1 Ultrasonidos

Es una de las técnicas más frecuentes y más utilizadas y permite la obtención de vesículas, homogéneas en dimensiones rodeadas por una sola capa.

Las frecuencias más empleadas en los dispositivos de sonicación son del orden de 20 KHz. La principal acción de los ultrasonidos a una temperatura de inferior a la crítica de los lípidos, entraña la formación de vesículas inestables, altamente permeables (Kreuschner, 1986).

2.8.2.2 Inyección

Este método consiste en cuatro fases, es una solución tamponada, de una solución etanólica que contiene el fosfolípido y los otros constituyentes de la pared (Batzri, Korn. 1976).

- Disolución de los componentes de la pared, regularmente se utilizan concentraciones de 20 a 40 micromoles de fosfolípidos por mL.

- La solución alcohólica es inyectada rápidamente con la ayuda de una jeringa, en una solución tamponada, donde se forman espontáneamente las vesículas unilaminares.
- La solución es concentrada por ultrafiltración.
- La solución es sometida a diálisis para la eliminación de alcohol.

2.8.2.3 Eliminación del detergente

Otra técnica ampliamente utilizada es la de eliminación de un detergente. El principio del método consiste en la dispersión de los fosfolípidos en agua por formación de micelas mixtas utilizando agentes tensoactivo, por ejemplo, tensoactivo, calatos etc.

Este método se realiza posteriormente por centrifugación, diálisis o filtración a través de geles.

La eliminación se efectúa a velocidad constante y de forma reproducible, se obtienen poblaciones homogéneas con tamaños entre 20 y 100 nm (Maierhofer, 1988).

2.8.2.4 Extrusión a alta presión

Este método consiste en que a través de unos filtros de tamaño pequeño de poro poder reducir los liposomas. Es aplicable a grandes volúmenes de dispersiones lipídicas con alta concentración.

2.8.3 Liposomas unilaminares macrovesiculares (LUV) y vesículas obtenidas por evaporación en fase reversa (REV)

2.8.3.1 Infusión de éter

Este método consiste en inyectar una solución etérea de los fosfolípidos en otra acuosa del agente activo a la temperatura de 55-66 °C, una vez eliminando el

disolvente por evaporación, se obtiene una población heterogénea de LUV. (Martin. K 1981).

2.8.3.2 Evaporación en fase reversa

Es un método en el que se disuelven los fosfolípidos en un disolvente orgánico, al que se adiciona la solución acuosa.

- 🔗 El lípido se disuelve en un disolvente orgánico.
- 🔗 Se mezcla con un medio acuoso formando una emulsión w/o
- 🔗 Se evapora el disolvente no polar.
- 🔗 Se forman LUV

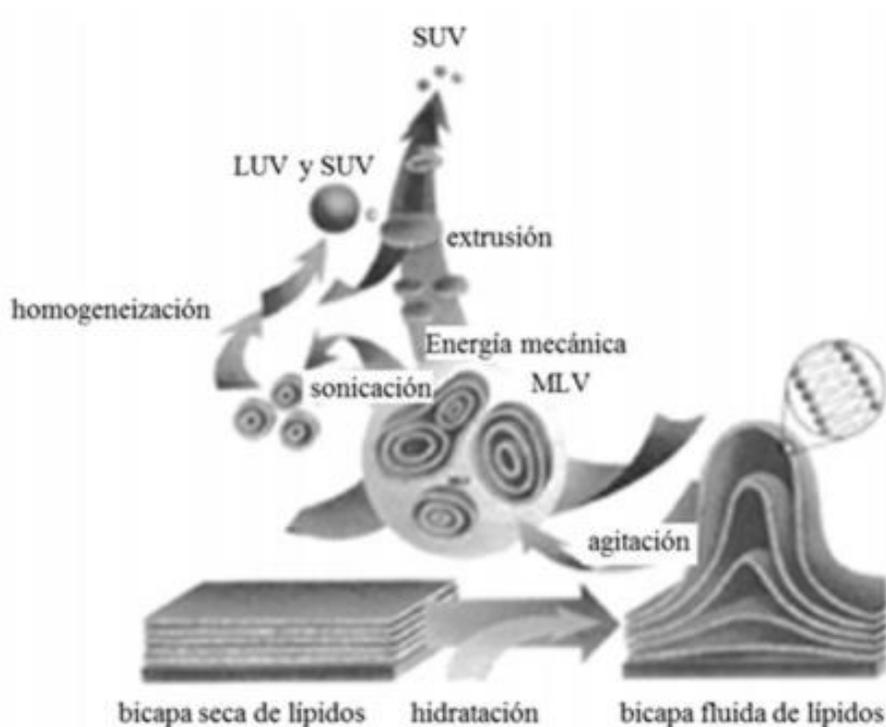


ILUSTRACIÓN 13. PROCEDIMIENTOS PARA LA OBTENCIÓN DE LIPOSOMAS. EL MÉTODO DE DISPERSIÓN SIMPLE PARA OBTENER MLV. A PARTIR DE ELLOS, EL MÉTODO DE EXTRUSIÓN PARA OBTENER SUV O EL MÉTODO DE SONICACIÓN HOMOGENEIZACIÓN PARA OBTENER LUV (VÁZQUEZ M. 2015).

2.9 Interacción Liposoma-Célula

De acuerdo a la investigación existen diferentes formas en que los liposomas interactúan con las células, estas dependen principalmente del diámetro ya que si son menores a 80 nm son mejor captadas por la célula; según resultados del proyecto con un tamaño de partícula más grande aun hacen su efecto de captación de la célula y puede hacer su función principal que es llegar al sitio de acción (Martin. K 1981).

La interacción, así como la permeabilidad y la especificidad están relacionadas con el tipo de liposomas, composición lipídica, carga eléctrica, principio activo, la célula, órgano o tejido diana.

Son cuatro formas principales de la captación de liposomas por las células como:

2.9.1 Endocitosis

Los liposomas pueden penetrar a la célula por endocitosis, es un proceso por el cual las células se pueden incorporar dentro de las células fagocitarias del sistema retículo endotelial. Estas se pueden desintegrar por la acción de las enzimas, liberado el fármaco (Allen .1991)

2.9.2 Fusión directa

Se produce una fusión de las membranas del liposoma con la membrana plasmática celular (Bailey y Cullis. 1997), este método se da por inserción del bioestrato lipídico del liposoma en la membrana plasmática, y a su vez la liberación simultánea del contenido dentro del citoplasma, esto se llama coalescencia, la unión de partículas se lleva a cabo en suspensión coloidal.

2.9.3 Transferencia de lípidos

El intercambio de los lípidos de la bicapa liposomal se da sin adsorción previa ni asociación del contenido, solo es un cambio (Clares B. 2003).

2.9.4 Adsorción estable

Este método consiste en la adsorción de los liposomas mediante fuerzas hidrofóbicas o electrostáticas débiles o interacciones con cada uno de los componentes de la superficie celular.

La principal función de la interacción de los liposomas con las células dependerá principalmente de cada uno de sus componentes del liposoma ya que depende su carga, tipo de célula y del medio extracelular y método de elaboración de estas mismas, carga y fluidez de la pared de los liposomas (Clares B. 2003).

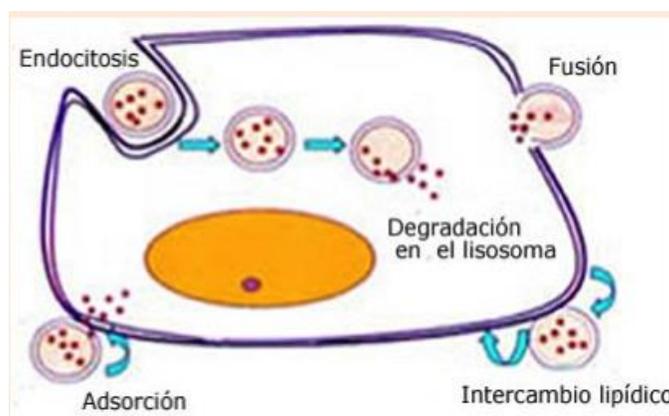


ILUSTRACIÓN 14. MECANISMOS DE INTERACCIÓN (CLARES B. 2003).

Aunque no siempre la elección de los componentes, el tamaño etc. es siempre ideal existen otros métodos para mejorar o poder controlar la especificidad y tipo de interacción del liposoma como:

- 🧪 Tipo y composición
- 🧪 Carga
- 🧪 Alcoholes
- 🧪 Anticuerpos

2.10 Vías de administración

De acuerdo a diversas investigaciones se dio a conocer que cualquier vía de administración es buena para la administración de liposomas; dada las

características fisicoquímicas de estos, su interacción con la membrana celular hace que las estructuras sean, biocomparables y biodegradables.

La gran atribución de los liposomas es que son de gran importancia en la ciencia, ya que pueden ser utilizados con fines terapéuticos o de diagnóstico, son de fácil manipulación sus características fisicoquímicas para una mejor administración y solo adecuar una vía según su fin terapéutico y su uso en el futuro.

2.11 Métodos de caracterización

La caracterización de suspensiones de liposomas tiene por objetivo, conocer con precisión el tipo de estructura obtenida, su composición, tamaño, homogeneidad, estabilidad, volumen de encapsulación (Bangman, 1965). Existen diferentes métodos que se pueden utilizar, en este proyecto se utilizaron las siguientes.

2.11.1 Tamaño de partícula

Se empleó el método de espectroscopia de correlación de fotones; el cual mediante dispersión de luz dinámica puede determinar el tamaño de partícula de los liposomas. Es una técnica que no afecta a la partícula; además, está bien establecida para poder medir el tamaño y distribución del tamaño.

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) es también conocida como correlación fotónica y sirve para medir el tamaño de partícula en el rango submicrónico. Mide la velocidad del movimiento browniano y lo relaciona con el tamaño de la partícula; el movimiento browniano es un movimiento al azar de las partículas debido al choque de las moléculas del solvente alrededor de ellas.

Este equipo puede caracterizar partículas, emulsiones o moléculas que se encuentren dispersas en un líquido, este consiste en el movimiento Browniano de las partículas o moléculas en suspensión, hace que la luz se disperse en diferentes intensidades por lo cual de estas fluctuaciones de intensidad se puede obtener el movimiento browniano y por lo tanto el tamaño de partículas.

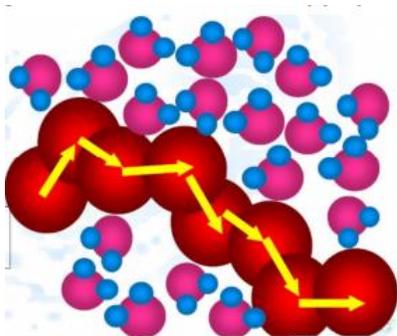


ILUSTRACIÓN 16. EJEMPLO DE PARTÍCULAS GRANDES, MOVIMIENTOS LENTOS Y PEQUEÑOS (MARILLA J. 2016).

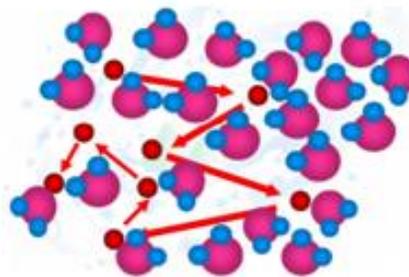


ILUSTRACIÓN 15. EJEMPLO DE PARTÍCULAS PEQUEÑAS, MOVIMIENTOS RÁPIDOS Y AMPLIOS (MARILLA J. 2016).

La tecnología de dispersión de luz dinámica ofrece los siguientes beneficios:

- 🔗 Análisis de tamaño de partícula exacto, confiable y repetible en uno o dos minutos.
- 🔗 Medición en el ambiente nativo del material.
- 🔗 El tamaño de media solo requiere del conocimiento de la viscosidad del líquido.
- 🔗 Las muestras turbias simples, sin preparación, de alta concentración, pueden medirse directamente.
- 🔗 Configuración sencilla y medición totalmente automatizada.
- 🔗 Medición de tamaño de tamaños inferiores a 1 nm.
- 🔗 Medición de tamaño de moléculas con MW < 1000 Da.
- 🔗 Requisito de volumen bajo (hasta 2 µl).

2.11.2 Porcentaje de encapsulamiento

El porcentaje de encapsulamiento se basa en la concentración que existe de principio activo cargado. Para la cuantificación se basa en un método espectrofotométrico, el cual consiste en llevar a cabo una reacción para cuantificar el grupo –SH que se encuentra en la molécula del Glutatión.

La técnica espectrofotométrica comúnmente usada para la determinación de tioles libres está basada en la reacción de Ellman (Ellman, 1959), cuyo principio se fundamenta en una reacción de óxido- reducción entre los tioles libres y el compuesto 5,5'- ditiobis-(ácido 2-nitrobenzoico) o DTNB, que produce 1 mol de ácido 2-nitro-5-mercaptobenzoico (TNB) por cada mol de tioles libres (-SH). El anión TNB genera una coloración amarilla detectada a 405 nm de longitud de onda y que puede ser utilizada para cuantificar la cantidad de grupos -SH presentes en una muestra (Hermanson, 2013).

2.11.3 Porcentaje de hemólisis

La hemólisis está definida como la alteración de la membrana de los eritrocitos dando como resultado la liberación de la hemoglobina y de los componentes celulares en el torrente sanguíneo, esto puede ocurrir si los glóbulos rojos se encuentran en un medio hipotónico, provocando la destrucción de la membrana del eritrocito; aunque la hemólisis no es estrictamente proporcional a la tonicidad de la solución, sino que está definitivamente relacionada con la composición del vehículo, ya que pueden influir los cosolventes, surfactantes, y otro tipo de excipientes, incluso el mismo principio activo; no es un proceso instantáneo ya que requiere tiempo para que se dé la interacción de la formulación con la membrana de los eritrocitos (Gupta K. 1999).

El potencial hemolítico es el porcentaje de hemólisis que puede producir un excipiente, vehículo o formulación. Está basado en un método estándar en el cual se mide la absorbancia de la hemoglobina liberada por los eritrocitos a 540 nm, ya que esta es directamente proporcional a la concentración de hemoglobina en el sobrenadante (Obeng E. 1989).

2.12 Aplicaciones de los liposomas

Como se sabe existe una gran variedad de liposomas con diversas funciones, estos pueden utilizarse como sistemas de transporte y liberación de fármacos. Ayudan a

proteger el principio activo y poder llegar a su sitio de acción por lo cual desde hace años es muy útil. El día de hoy se conocen más variedades que ayudan a los liposomas a que sean más veloces o con ciertas características para que puedan interactuar con las células, los principales son:

- 🧪 Poder dirigir los inmunomoduladores a las células del sistema inmunitario
- 🧪 Liberación controlada del fármaco
- 🧪 Reducción de los efectos no deseados del fármaco
- 🧪 Proteger moléculas sensibles
- 🧪 Mejora la captura intracelular

2.13 Ventajas de los liposomas

- 🧪 Solubilidad perfeccionada de fármacos lipofílicos
- 🧪 Alcance pasivo a las células del sistema inmune
- 🧪 Liberación continua de fármacos para la administración sistémica y local
- 🧪 Mecanismo para evitar o para apuntar a ciertos sitios
- 🧪 Aumentando la eficacia y disminuyendo los efectos no deseados de los mismos, especialmente su toxicidad.

3 Planteamiento del problema

En la actualidad existen diversos problemas por una adecuada administración de fármacos y los cuales puedan llegar perfectamente al sitio de acción y poder ejercer su función. La principal función de los liposomas es poder ayudar a un mejor transporte del principio activo sin ningún inconveniente para una mejor función.

En este proyecto se trabajó con Glutación que es un antioxidante que ayuda a combatir el estrés oxidativo. El glutación es una molécula muy hidrofílica que se produce al interior de las células y que no puede ser administrada desde el exterior de las células pues por ser tan hidrofílica es incapaz de atravesar la membrana celular, ya que como recordaremos, para atravesar las membranas biológicas por

transporte pasivo deben de ser lipofílicas. Los liposomas son el acarreador ideal para este tipo de moléculas pues mimetizan las características de las membranas biológicas. En este caso en especial se utilizarán liposomas ultraflexibles (transfersomas) que tienen mucho mayor poder de penetración celular que los liposomas convencionales pues tienen tensoactivos en su membrana, disminuyendo la tensión interfacial, haciéndola mucho más flexible.

4 Hipótesis

El glutatión es una molécula altamente hidrofílica, la cual para poder ser administrada por vía parenteral tiene que ser capaz de atravesar membranas biológicas para poder ejercer su acción terapéutica, es por esta razón que si introducimos el glutatión en liposomas ultraflexibles podremos mejorar su acción farmacológica, por lo que es importante producir sistemas con el menor tamaño posible, con la mayor carga de glutatión y el menor efecto hemolítico posible.

5 Objetivo

Desarrollar liposomas ultraflexibles mediante la técnica de hidratación de película para una mejor administración del glutatión, pensados para atravesar membranas biológicas y combatir problemas de estrés oxidativo.

6 Objetivos específicos

- 🔧 Optimizar una metodología adecuada para obtener transfersomas con las características deseadas mediante diseño de experimentos.
- 🔧 Caracterizar los liposomas ultraflexibles, evaluando el tamaño de partícula y capacidad hemolítica mediante la técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) y espectroscopia ultravioleta-visible.
- 🔧 Determinan el porcentaje de encapsulamiento de los transfersomas obtenidos mediante la técnica de espectroscopia ultravioleta-visible

7 Materiales

Componentes para liposomas flexibles

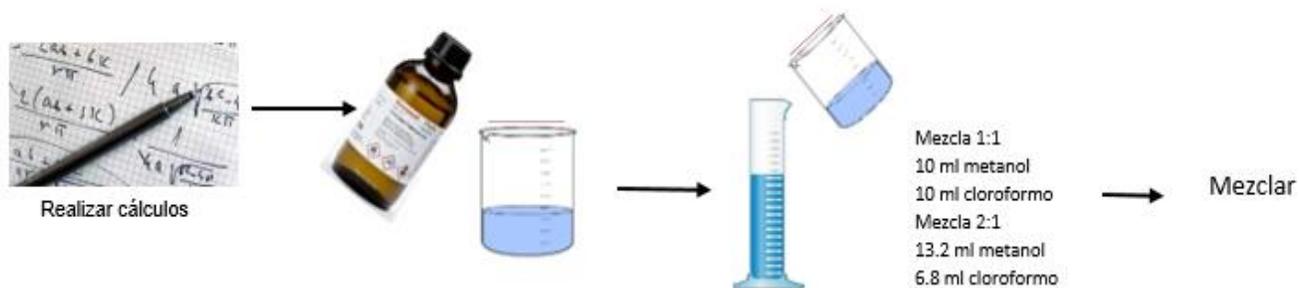
-  L- α -fosfatidilcolina de Soya (Sigma Aldrich, México)
-  Colato de Sodio (Sigma Aldrich, México)
-  Glutati3n (Sigma Aldrich, México)

Solventes y agentes hidratantes:

-  Sacarina 10%
-  Metanol
-  Alcohol Etílico absoluto
-  Cloroformo

8 Metodología

DIAGRAMA 1. MEZCLA DE METANOL-CLOROFORMO



1. Realizar los cálculos correspondientes para las dos soluciones de una mezcla metanol-cloroformo.

Solución 1

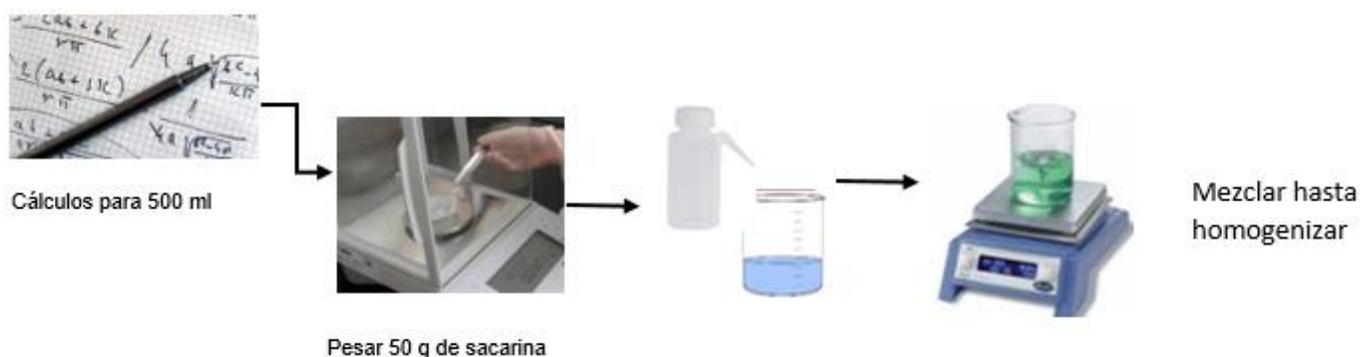
2. Con una probeta medir 10 mL de metanol y agregarlo a un vaso de precipitados A.
3. Con una probeta medir 10 mL cloroformo y agregarlo al vaso de precipitados A.

4. Mezclar para homogenizar los dos solventes.

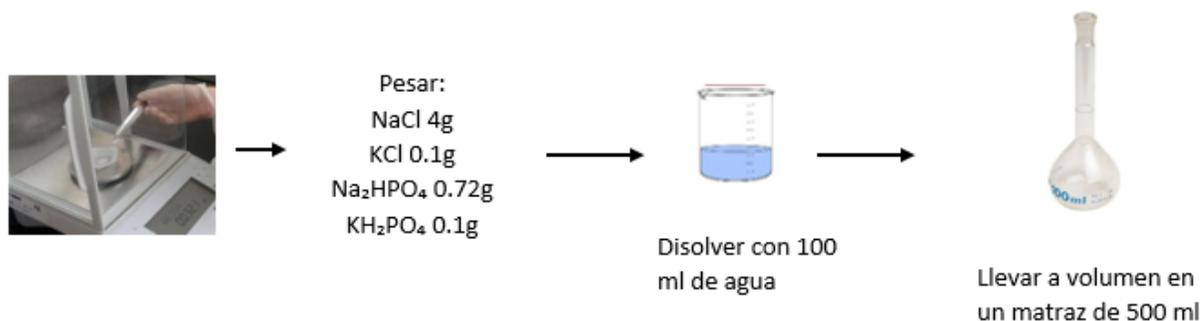
Solución 2

5. Con una bureta medir 13.2 mL de metanol y agregarlo a un vaso de precipitados A.
6. Con una bueta medir 6.8 mL cloroformo y agregarlo al vaso de precipitados A.
7. Mezclar para homogenizar los dos solventes.

DIAGRAMA 2. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE SACARINA



1. Pesar 50 g de sacarina en una balanza analítica.
2. Agregar paulatinamente 500 mL de agua destilada
3. Agregar en un recipiente y rotular para su identificación.

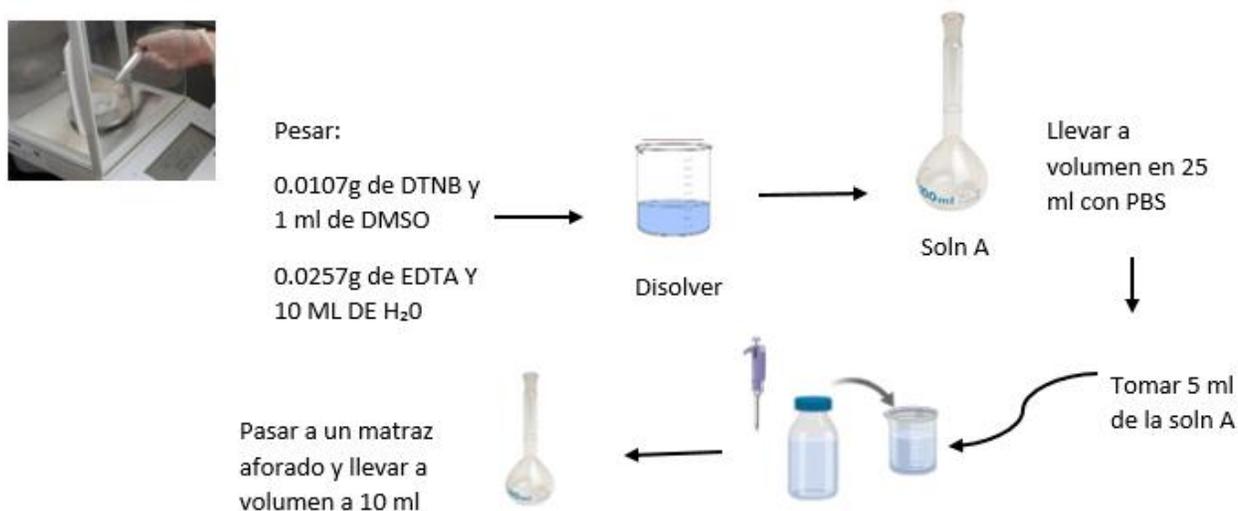
DIAGRAMA 3. PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN DE PBS

1. Pesar en una pesa muestra en una balanza analítica en los siguientes reactivos:

- 4 g de NaCl
- 0.1 g de KCl
- 0.72g de Na₂HPO₄
- 0.1 g de KH₂PO₄

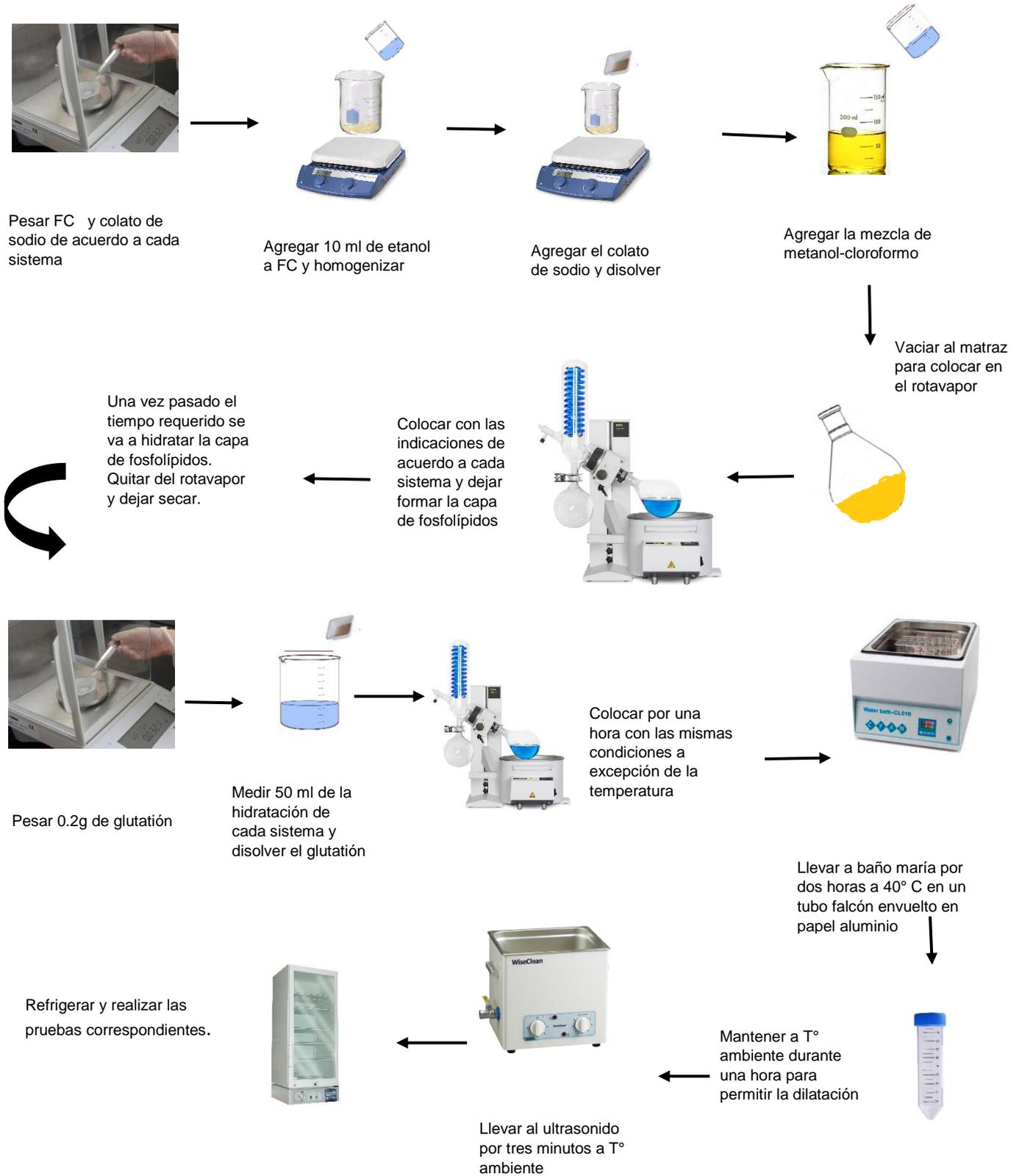
2. Agregar los reactivos en un vaso de precipitados de 500 mL y adicionar agua destilada hasta homogeneizar.
3. Verter a un matraz aforado de 500 mL y llevar a volumen.

DIAGRAMA 4. BÚFER DE REACCIÓN



1. Pesar en un vaso de precipitados 0.0107 g de DTNB en una balanza analítica y disolver en 1 mL de DMSO. (Protegiendo de la luz).
2. Verter a un matraz aforado de 25 mL y llevar a volumen con solución de PBS. (Solución A).
3. Tomar 5 mL de la solución A y trasvasar a un matraz aforado de 10 mL y llevar a volumen.
4. Pesar en un vaso de precipitados 0.257 g de EDTA y disolver en 10 mL de agua. (Solución B).
5. Tomar 250 μ L de la solución B y colocarlo en un matraz de 10 mL y llevar a volumen con PBS.
6. Incubar el matraz a 15°C por 20 minutos (Solución C) Búfer de reacción. (Proteger de la luz).

DIAGRAMA 5. PREPARACIÓN DE LIPOSOMAS



Fase I Fase Lipídica

1. Pesar 143 mg de Fosfatidilcolina en un vaso de pp y añadir 10 mL de etanol y colocar en una parrilla a baja temperatura hasta homogeneizar.
2. Añadir a la mezcla anterior 5 mg de colato de sodio y homogeneizar (Mezcla 1)
3. Preparar una mezcla de MetOH con cloroformo al 66% (13.2 mL/6.8 mL respectivamente) (Mezcla 2)
4. Agregar la mezcla 1 a un matraz para rotavapor después agregar la mezcla 2 y homogeneizar.
5. Prepara el rotavapor a 40° C, 87 rpm
6. Colocar el matraz en el rotavapor por 1 hora con las condiciones ya mencionadas, para la formación de la película de fosfolípidos.

Fase II Hidratación de la película

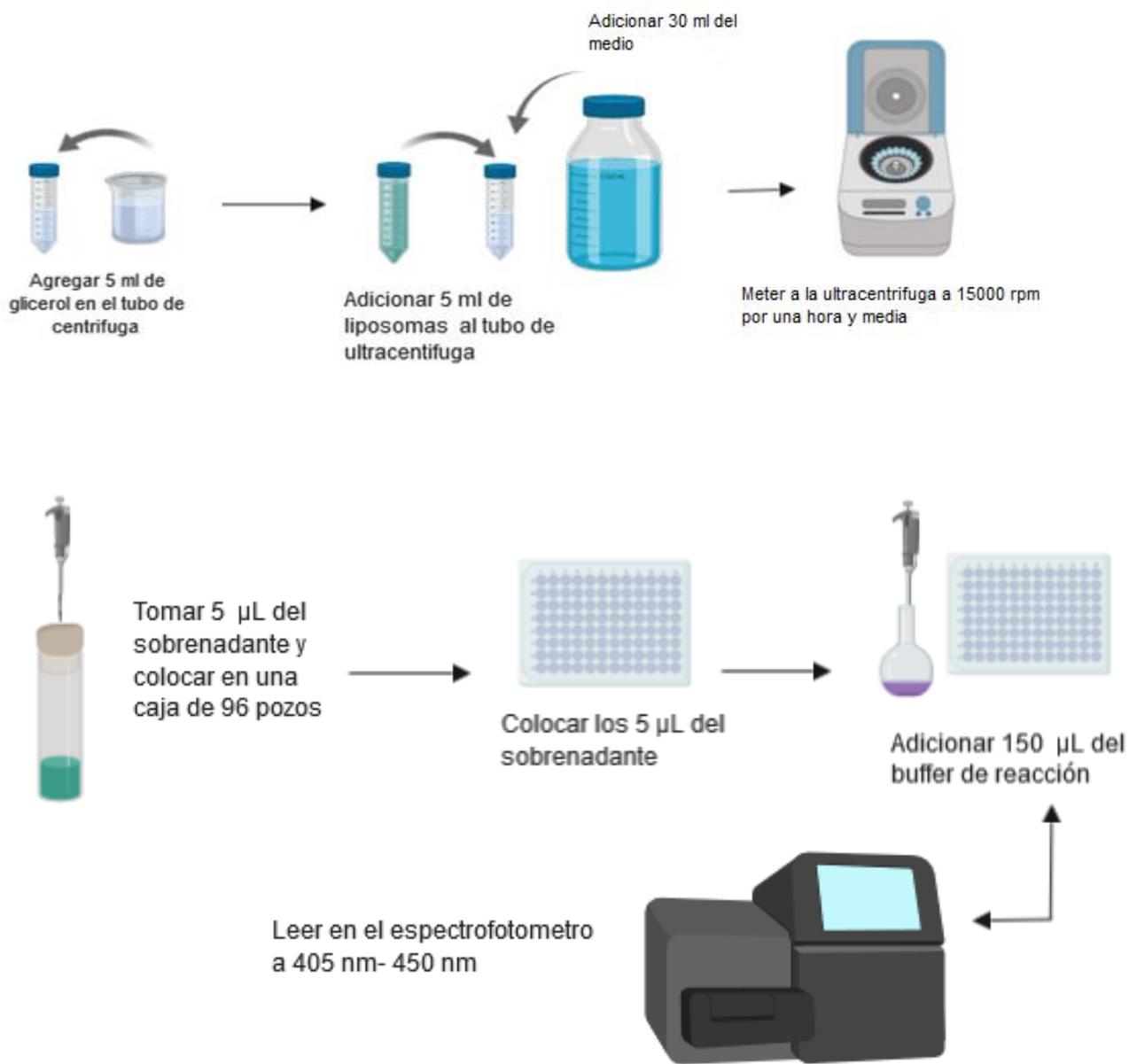
1. Preparar una solución de sacarina al 10 %
2. Quitar el matraz del rotavapor y dejar secar por 15 min.
3. Pesar 0.2 g de GSH y disolverlo con 50 mL de solución de sacarina al 10 %
4. Verter en el matraz los 50 mL de la solución de sacarina al 10% con el GSH.
5. Colocar el matraz en el rotavapor por 1 hora a 87 rpm para que lleve a cabo la hidratación de la película de fosfolípidos.
6. Tapar un tubo falcón de 50 mL con papel aluminio.
7. Una vez terminado la hora, quitar del rotavapor y pasar a un tubo falcón.

Fase III Homogeneización del tamaño de partícula

1. Colocar el tubo falcón a baño maría por 2 horas a 40°C.
2. Retirar del baño maría y dejar 1 hora a temperatura ambiente.

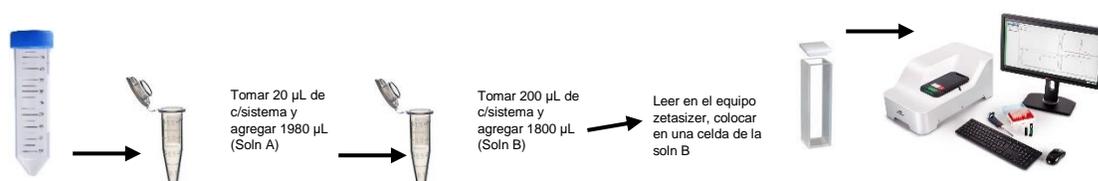
3. Llevar a ultrasonido por 3 minutos a temperatura ambiente para reducir y homogeneizar el tamaño de partícula.
4. Refrigerar y realizar pruebas correspondientes.

DIAGRAMA 6. PORCENTAJE DE ENCAPSULAMIENTO



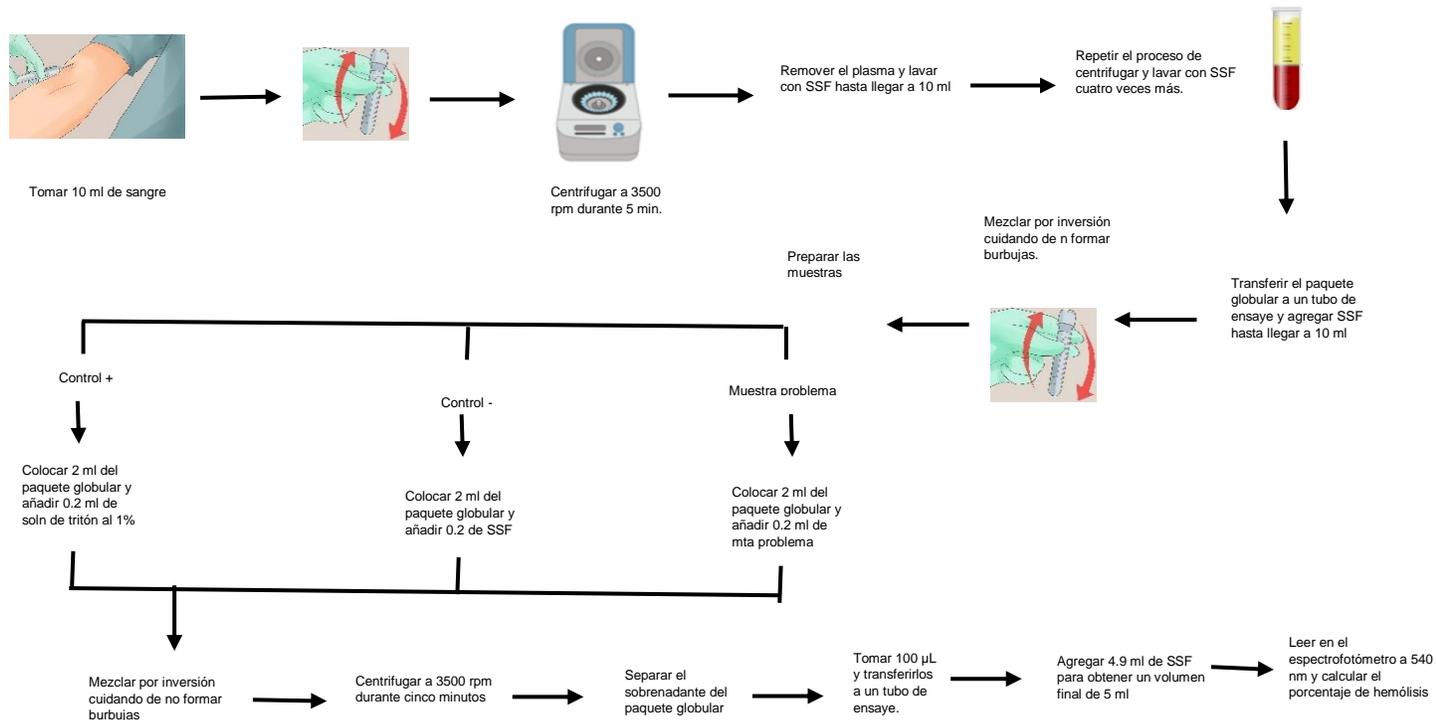
1. Tomar 5 mL de glicerol y verter en un tubo de ultracentrífuga. (No pipetear)
2. Adicionar 5 mL de solución de liposomas de acuerdo a cada sistema.
3. Colocar aproximadamente 20 mL de solución de acuerdo a cada sistema. (sacarina o PBS).
4. Colocar en ultracentrífuga a 15,000 rpm por una hora y media.
5. Tomar 50 μ L del sobrenadante de la solución de liposomas y colocar en una placa de 96 pozos.
6. Añadir rápidamente 150 μ L de Búfer de reacción.
7. Colocar por 15 minutos en la incubadora para que haga reacción.
8. Leer en un espectrofotómetro uv a 405 nm.
9. Cuantificar con una curva de GSH en unidades μ M.

DIAGRAMA 7. TAMAÑO DE PARTÍCULA



1. Tomar 20 μ L con una micropipeta de cada sistema de liposomas y colocarlo en un tubo eppendorf de 2 mL y agregar 1980 μ L de cada medio utilizado en cada sistema. (Soln A)
2. Tomar 200 μ L del tubo de la solución A y verter en otro tubo eppendorf de 2 mL y agregar 1800 μ L de cada medio de cada sistema. (Soln B).
3. Prepara el equipo Zetasizer y colocar en una celda la solución B y leer.

DIAGRAMA 8. PRUEBA DE HEMÓLISIS



1. Obtener 10 mL de sangre en una jeringa esterilizada con heparina.
2. Meter a un tubo de centrifuga a 3500 rpm durante cinco minutos.
3. Con una pipeta remover el plasma.
4. Lavar con solución salina hasta llegar a 10 mL, después de cada lavado centrifugar a 3500 rpm durante cinco minutos.
5. Transferir el paquete globular a un tubo de ensayo y agregar solución salina hasta llegar a 12.5 mL.
6. Mezclar por inmersión cuidando de no formar burbujas.

Control positivo

7. Colocar 2 mL del paquete globular y añadir 0.2 mL de solución de tritón al 1%.

Control negativo

8. Colocar 2 mL del paquete globular y añadir 0.2 mL de solución salina fisiológica.

Muestra problema

9. Colocar 2 mL del paquete globular y añadir 0.2 mL de muestra problema/liposomas.
10. Mezclar por inversión cuidando de no formar burbujas. (Control positivo, control negativo y muestra problema).
11. Centrifugar las tres muestras a 3500 rpm durante cinco minutos.
12. Separar el sobrenadante del paquete globular.
13. Tomar 100 μ L y transferir a un tubo de ensaye limpio.
14. Agregar 4.9 mL de soln salina fisiológica para obtener un volumen final de 5 mL.
15. Leer en el espectrofotómetro a 540 nm y calcular el porcentaje de hemólisis.

9 Procedimiento

Para la realización de este proyecto se hizo un diseño de experimentos el cual consiste en modelos estadísticos clásicos cuyo objetivo es averiguar qué factores influyen en una variable de interés.

En este caso se utilizó para determinar la mejor formulación, pues se obtuvieron seis variables como mg de fosfatidilcolina, mg de colato de sodio, velocidad de rotación, tiempo de rotación, porcentaje de metanol e hidratación. Estas variables se evaluaron con tres variables de respuesta, tamaño de partícula, carga de glutatión y porcentaje de hemólisis.

El diseño de experimentos y análisis estadístico se realizó en el programa statgraphics centurión XV.

9.1 Diseño de experimentos I

Preparación de liposomas ultraflexibles

TABLA 9. DISEÑO DE EXPERIMENTOS I.

| | % alto | % bajo |
|------------------------------------|---------------|---------------|
| Fosfatidilcolina (FC) | 0.1812 | 0.1430 |
| Colato de sodio | 0.0095 | 0.0476 |
| Velocidad de rotación (rpm) | 50 | 90 |
| Tiempo de rotación (h) | 1 | 4 |
| Metanol | 50 | 66 |
| Hidratación | Sacarina 10% | PBS |

En el primer diseño de experimentos se realizaron dos condiciones para evaluar las variables, un porcentaje alto y bajo de cada una a medir.

TABLA 10. PREPARACIÓN DE SISTEMAS.

| Sistema | FC (g) | Colato (g) | rpm | Tiempo (h) | Metanol | Hidratación |
|----------------|---------------|-------------------|------------|-------------------|----------------|--------------------|
| 1 | 0.1430 | 0.0095 | 90 | 4 | 66 | Sacarina 10% |
| 2 | 0.1430 | 0.0476 | 50 | 4 | 66 | PBS |
| 3 | 0.1812 | 0.0095 | 50 | 4 | 66 | Sacarina 10% |
| 4 | 0.1812 | 0.0476 | 90 | 1 | 50 | Sacarina 10% |
| 5 | 0.1430 | 0.0476 | 50 | 1 | 50 | PBS |
| 6 | 0.1430 | 0.0095 | 90 | 1 | 66 | Sacarina 10% |
| 7 | 0.1812 | 0.0095 | 90 | 4 | 50 | PBS |
| 8 | 0.1812 | 0.0476 | 50 | 1 | 66 | PBS |
| 9 | 0.1812 | 0.0095 | 90 | 1 | 66 | PBS |
| 10 | 0.1430 | 0.0476 | 50 | 1 | 50 | Sacarina 10% |
| 11 | 0.1812 | 0.0476 | 50 | 4 | 50 | Sacarina 10% |
| 12 | 0.1412 | 0.0095 | 90 | 4 | 50 | PBS |

En el primer diseño de experimentos se metió al programa statgraphics centurió las seis variables y se realizaron doce corridas con diferentes proporciones de las variables para poder descartar las más importantes y significativas que puedan afectar o ayudar a la formulación de liposomas ultraflexibles.

Para la evaluación de estas variables se realizó la caracterización de cada uno de los sistemas (Tamaño de partícula y Carga de GSH).

9.2 Diseño de experimentos II

Se realizó un segundo diseño de experimento para evaluar dos variables que son significativas, se hicieron nueve sistemas con diferentes proporciones de colato de sodio (mg) y velocidad de rotavapor (rpm).

Preparación de liposomas ultraflexibles

TABLA 11. DISEÑO DE EXPERIMENTOS II.

| Sistemas | Colato de sodio (mg) | Velocidad de rotavapor (rpm) |
|-----------------|---------------------------------|---|
| 1 | 9.53 | 105 |
| 2 | 5 | 90 |
| 3 | 14.06 | 105 |
| 4 | 14.06 | 75 |
| 5 | 14.06 | 90 |
| 6 | 9.53 | 75 |
| 7 | 9.53 | 90 |
| 8 | 5 | 105 |
| 9 | 5 | 75 |

Se realizaron nueve sistemas de liposomas con los variables modificables para evaluar la mejor formulación con respecto a las variables de respuesta.

TABLA 12. PARÁMETROS CONSTANTES.

| Tipo de Hidratación | Sacarina 10% |
|----------------------------|---------------------|
| Tiempo de rotación | 1 hora |
| MetOH | 66% |
| Fosfatidilcolina | 143 mg |
| Temperatura | 40°C |

De acuerdo a las variables de respuesta se puede observar en la tabla No. 14 los parámetros que permanecerán constantes ya que no afectan significativamente a la formulación.

Una vez preparados los nueve sistemas se realizaron evoluciones para poder analizar cada una de las variables y obtener una formulación óptima.

10 Resultados

10.1.1 Caracterización de liposomas ultraflexibles (Diseño I)

TABLA 13. ECUACIÓN DE LA RECTA.

| GSH total esperado p/ 200 mg [mM] | m | b |
|--|----------|----------|
| 13.0157 | 0.0012 | 0.0053 |

Se realizó una curva de GSH para poder obtener los porcentajes de encapsulamiento de cada uno de los sistemas, en unidades [mM].

10.1.1.1 Porcentaje de encapsulamiento (Diseño I)

Cada uno de los sistemas se realizaron tres repeticiones para obtener más datos y pueda ser significativo, como se observa en la tabla No. 11

En el porcentaje de encapsulamiento se busca que cada sistema tenga el 100% o el más cercano.

Cálculos de porcentaje de encapsulamiento

Una vez obteniendo las absorbancias de cada sistema de liposomas se realizó un cálculo para poder obtener el porcentaje de GSH que se encapsuló en el proceso.

Sistema 1

$$x = \frac{0.697 - 0.0053}{0.0012} = 576.4166 \mu M \quad 0.5764 mM$$

$$x = \frac{(0.5764 mM)(5 ml)}{30 ml} = 0.9606 mM$$

$$13.0157 mM \text{ GSH} - 0.9606 mM = 12.9196 mM$$

$$\% \text{ encaps.} = \frac{12.9196 mM}{13.0157 mM} \times 100 = 99.26\%$$

TABLA 14. PORCENTAJE DE ENCAPSULAMIENTO. (DISEÑO I)

| Sistemas | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 |
|----------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | 89.334 | 109.186 | 95.57137406 |
| 2 | 109.241 | 89.379 | 95.88509774 |
| 3 | 88.389 | 89.30330293 | 108.031 |
| 4 | 93.25366032 | 108.757 | 88.983 |
| 5 | 109.769 | 98.75342855 | 89.811 |
| 6 | 108.845 | 93.74665468 | 89.055 |
| 7 | 89.847 | 109.813 | 99.00312699 |
| 8 | 95.00795193 | 89.244 | 109.076 |
| 9 | 109.67 | 98.24122662 | 89.73 |
| 10 | 108.185 | 88.515 | 90.15483864 |
| 11 | 88.38 | 89.20726507 | 108.02 |
| 12 | 90.65423553 | 108.284 | 88.596 |

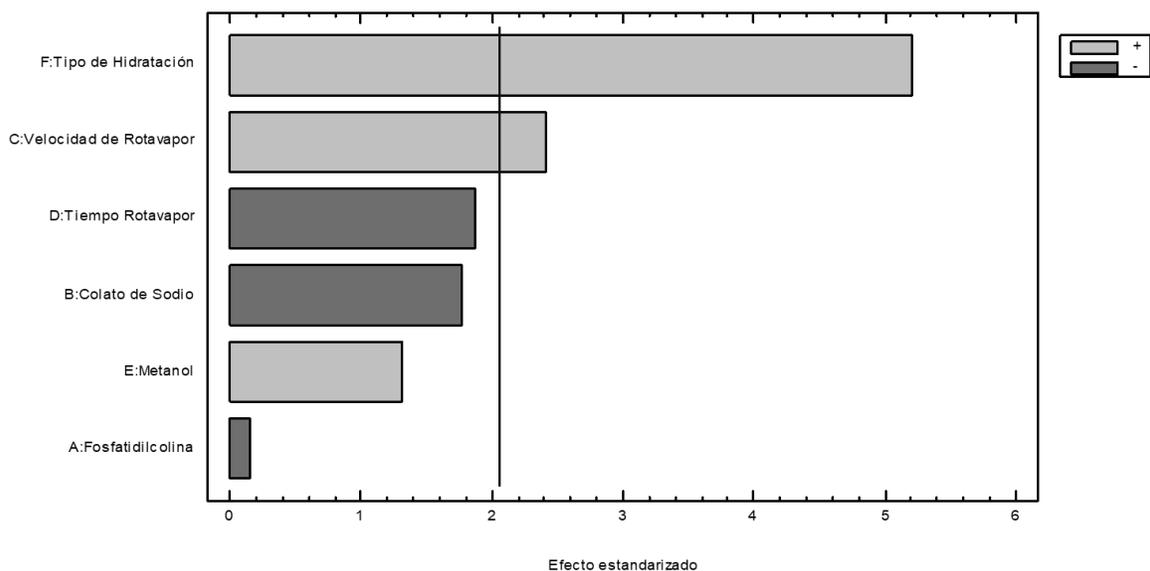


DIAGRAMA DE PARETO ESTANDARIZADO 1. RESPUESTA CARGA DE GSH (DISEÑO I).

Como se observa en el diagrama de Pareto para analizar carga de GSH del primer diseño de experimentos, donde F representa tipo de hidratación, C velocidad de rotavapor, D tiempo de rotavapor, B colato de sodio, E metanol y A fosfatidilcolina. En el diagrama se observa que signos positivos y negativos lo que representa si tiene un efecto positivo o negativo con respecto a carga de GSH.

El gráfico muestra que de acuerdo al efecto estandarizado solo dos variables son significativas con respecto a carga de GSH; ya que el efecto máximo es de 2. Ambas variables son positivas lo cual indica un aumento de carga de GSH, lo cual puede ser favorable para que la carga sea lo más cercano al 100%. Con respecto a las otras variables no son significativas.

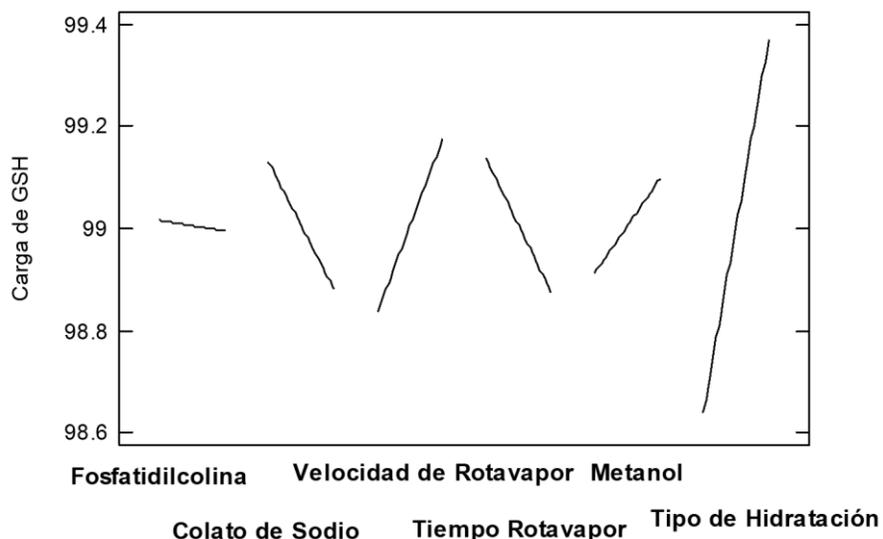


GRÁFICO 1. EFECTOS PRINCIPALES PARA LA VARIABLE DE CARGA DE GSH (DISEÑO I).

En el gráfico No. 1 se puede observar a excepción de una variable las demás son significativas ya que las líneas no son horizontales; en cambio la fosfatidilcolina es horizontal lo que indica que no afecta en el proceso. El tipo de hidratación es la que más afecta al proceso. Otra variable que afecta al proceso es la velocidad de rotavapor

10.1.1.2 Tamaño de partícula (Diseño I)

TABLA 15. TAMAÑO DE PARTÍCULA. (DISEÑO I)

| Sistema | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 |
|---------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | 109.34472 | 120.279192 | 98.410248 |
| 2 | 405.02122 | 445.523342 | 364.519098 |
| 3 | 3000 | 3300 | 2700 |
| 4 | 28.846994 | 31.7316934 | 25.9622946 |
| 5 | 2407.31 | 2648.041 | 2166.579 |
| 6 | 0.8264 | 0.90904 | 0.74376 |
| 7 | 281.58197 | 309.740167 | 253.423773 |

| | | | |
|-----------|-------------|-------------|-------------|
| 8 | 163.74524 | 180.119764 | 147.370716 |
| 9 | 290.5 | 319.55 | 261.45 |
| 10 | 152.8016712 | 168.0818383 | 137.5215041 |
| 11 | 40.5726458 | 44.62991038 | 36.51538122 |
| 12 | 441.01894 | 485.120834 | 396.917046 |

Se evaluaron los doce sistemas de liposomas en el equipo zetasizer, se realizaron tres repeticiones para hacer la evaluación estadística.

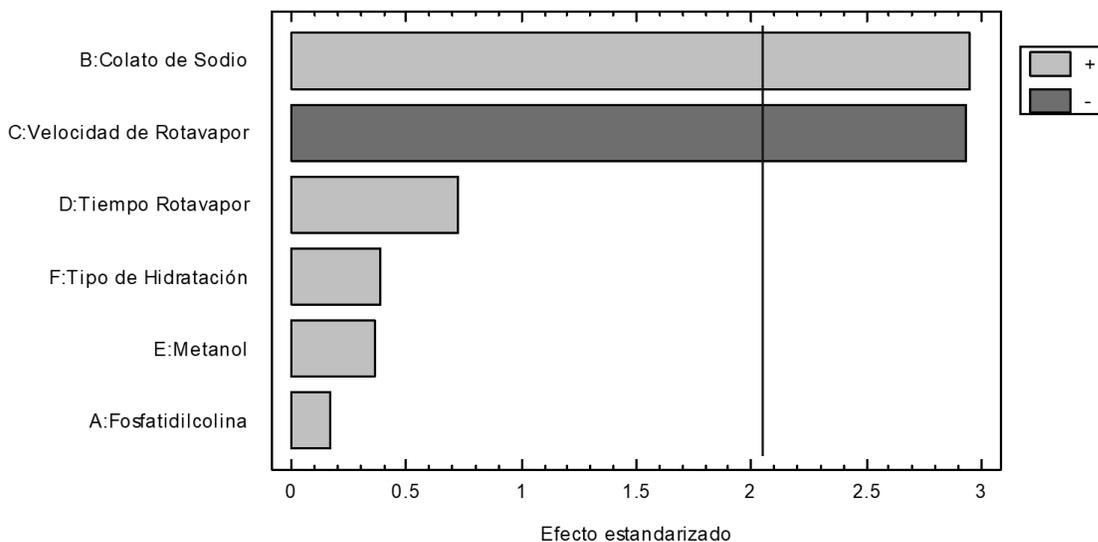


DIAGRAMA DE PARETO ESTANDARIZADO 2. RESPUESTA TAMAÑO DE PARTÍCULA (DISEÑO I).

Como se observa en el diagrama de Pareto para analizar el tamaño de partícula del primer diseño de experimentos donde B representa colato de sodio, C velocidad de rotavapor, D tiempo de rotavapor, F tipo de hidratación, E metanol y A fosfatidilcolina.

En el diagrama se observa signos positivos y negativos lo que representa si tiene un efecto positivo o negativo con respecto a tamaño de partícula.

En el gráfico se muestra que dos variables son significativas con respecto al tamaño de partícula. El efecto estandarizado es de dos por los cual estas dos variables rebasan hasta cinco lo cual está muy por encima. Ambas variables son positivas por lo cual tiene un aumento del tamaño de partícula y lo que se desea es una disminución del tamaño para un mejor resultado.

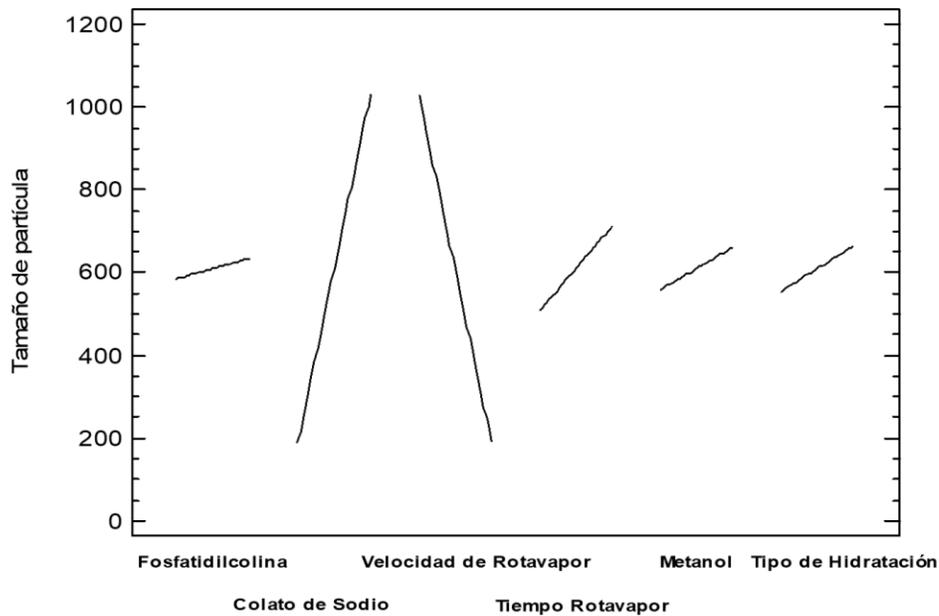


GRÁFICO 2. EFECTOS PRINCIPALES PARA LA VARIABLE DE TAMAÑO DE PARTÍCULA (DISEÑO I).

En el gráfico No. 2 se puede observar que cuatro variables; Fosfatidilcolina, tiempo de rotavapor, metanol y tipo de hidratación no son significativos ya que la línea tiende horizontal y están alineadas alrededor de cero y no influyen al tamaño de partícula. En cuanto a la velocidad de rotavapor y colato de sodio son verticales lo cual quiere decir que son significativas en el tamaño de partícula.

De acuerdo a los resultados arrojados por statgraphics, evaluando las seis variables con las dos variables de respuesta hay cuatro que son significativas con respecto a las variables de respuesta. La velocidad de rotavapor es significativa en ambas (Carga de GSH y Tamaño de partícula) con un aumento y disminución

respectivamente. El tipo de hidratación tiene una respuesta significativa y con una respuesta positiva (aumentando carga de GSH), el colato de sodio es significativa y respuesta positiva, pero de acuerdo al diagrama disminuye el tamaño de partícula.

Conforme a los resultados analizados se concluyó que dos variables son significativas para una formulación adecuada, las cuales son mg de colato de sodio y velocidad del rotavapor, ya que las demás no son significativas con respecto al efecto estandarizado de los diagramas.

En las de más variables no hubo un cambio significativo con el tiempo del rotavapor ya que con una y cuatro horas no afecta el proceso, la mezcla de metanol al utilizar un porcentaje alto y uno bajo tampoco afecta la solubilidad de fosfatidilcolina y el tipo de hidratación, el más adecuado quedo la sacarina al 10%.

Con las dos variables que son significativas para la formulación de los liposomas se realizará un nuevo diseño de experimentos con tres respuestas de variable que son Carga de GSH, tamaño de partícula y porcentaje de hemólisis.

El colato de sodio y velocidad de rotavapor son las variables que estarán en deferentes proporciones y las demás variables se mantendrán constantes (Tipo de hidratación, tiempo de rotación, metanol y fosfatidilcolina) ya que no afectan significativamente a la formulación.

10.1.2 Caracterización de liposomas ultraflexibles (Diseño II)

10.1.2.1 Porcentaje de encapsulamiento (Diseño II)

TABLA 16. PORCENTAJE DE ENCAPSULAMIENTO. (DISEÑO II)

| Sistema | Repetición 1 | Repetición 2 | Repetición 3 |
|---------|--------------|--------------|--------------|
| 1 | 98.57 | 98 | 98.54 |
| 2 | 98 | 98.14 | 98.39 |

| | | | |
|---|-------|-------|-------|
| 3 | 98.36 | 98.34 | 98.31 |
| 4 | 98.31 | 98.61 | 98.50 |
| 5 | 98.14 | 97.86 | 98.38 |
| 6 | 98.30 | 98.65 | 98.57 |
| 7 | 98.38 | 97.85 | 96.02 |
| 8 | 98.49 | 98.10 | 98.27 |
| 9 | 98.14 | 98.26 | 98.38 |

Cada uno de los sistemas se realizó por triplicado para obtener más datos y pueda ser significativo, como se observa en la tabla No. 15.

En la tabla No. 15 se busca los sistemas que tengan un porcentaje igual o mayor a 95 % ya que significa que los sistemas cumplirán su función. Como se observa en todos los sistemas son buenos resultados de encapsulamiento.

Cálculos del porcentaje de encapsulamiento

Sistema 1

$$mM \text{ GSH} = \left(\frac{206 \text{ mg}}{0.05 \text{ L}} \right) \left(\frac{1 \text{ mmol GSH}}{307.32 \text{ mg}} \right) = 13.4127 \text{ mM}$$

- $x = \frac{1.377 - 0.0053}{0.0012} = 1143.08 \mu\text{M} \text{ } 1.1430 \text{ mM}$

$$x = \frac{(1.1430 \text{ mM})(5 \text{ ml})}{30 \text{ ml}} = 0.1905 \text{ mM}$$

$$13.4127 \text{ mM} - 0.1905 \text{ mM} = 13.222 \text{ mM}$$

$$\% = \frac{13.222 \text{ mM}}{13.4127 \text{ mM}} \times 100 = 98.57$$

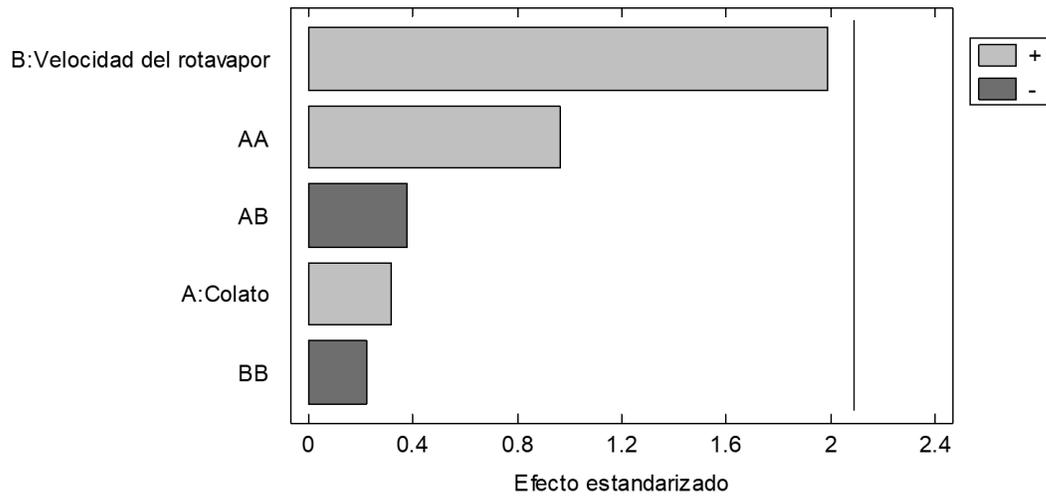


DIAGRAMA DE PARETO ESTANDARIZADO 3. RESPUESTA PORCENTAJE DE ENCAPSULAMIENTO (DISEÑO II).

Como se observa en el diagrama de Pareto para analizar el porcentaje de encapsulamiento del segundo diseño de experimentos donde B velocidad de rotavapor, A colato de sodio, AA interacción de colato de sodio, AB interacción de velocidad de rotavapor y colato de sodio y BB interacción de velocidad de rotavapor.

En el diagrama se observa signos positivos y negativos lo que representa si tiene un efecto positivo o negativo con respecto al porcentaje de encapsulamiento.

Ninguna de las variables es significativa ya que son menores a 2 que es el efecto estandarizado donde A, B y AA tienden un efecto positivo con respecto al porcentaje de encapsulamiento, en cuanto AB y BB tienen un efecto negativo, pero no afecta el encapsulamiento ya que no son significativos.

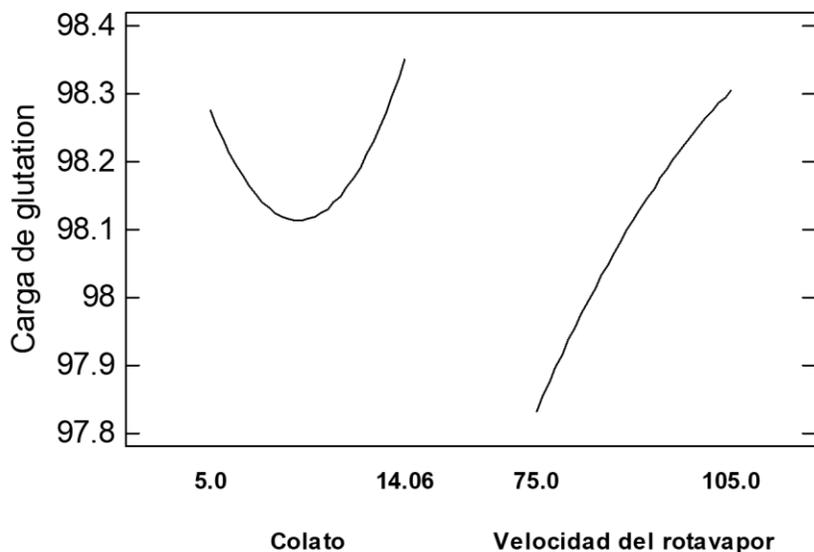


GRÁFICO 3. EFECTOS PRINCIPALES PARA LA VARIABLE CARGA DE GLUTATIÓN (DISEÑO II).

En el gráfico No. 3 se puede observar que la variable colato de sodio en concentraciones de 5 mg aumenta la carga de GSH conforme aumentamos la concentración disminuye la carga y a concentraciones de 14 mg aumenta de nuevo la carga de GSH. Con la velocidad del rotavapor en concentraciones de 75 rpm disminuye la carga de GSH, conforme aumenta la velocidad del rotavapor se observa un aumento de la carga lo cual es favorable ya que para una formulación óptima se requiere una carga de GSH de 100% o cercano.

10.1.2.2 Tamaño de partícula (Diseño II)

TABLA 17. TAMAÑO DE PARTÍCULA.

| Sistema | Repetición 1 (nm) | Repetición 2 (nm) | Repetición 3 (nm) |
|---------|----------------------|----------------------|----------------------|
| 1 | 618 | 689.87 | 546.12 |
| 2 | 339.5 | 347.25 | 331.74 |

| | | | |
|---|-------|--------|---------|
| 3 | 425.2 | 446.36 | 404.03 |
| 4 | 631.2 | 700.25 | 562.14 |
| 5 | 278.3 | 283.84 | 272.759 |
| 6 | 352.4 | 364.18 | 340.61 |
| 7 | 566.9 | 642.92 | 490.87 |
| 8 | 613.8 | 689.23 | 538.36 |
| 9 | 643.5 | 707.43 | 579.56 |

Se evaluaron los nueve sistemas de liposomas en el equipo zetasizer, se realizaron por triplicado para hacer la evaluación estadística.

En la tabla No. 16 se observa el tamaño de partícula, lo ideal es tener un tamaño menor a 400 nm por lo cual los sistemas 3, 5 y 6 son los más adecuados a las características que se desean.

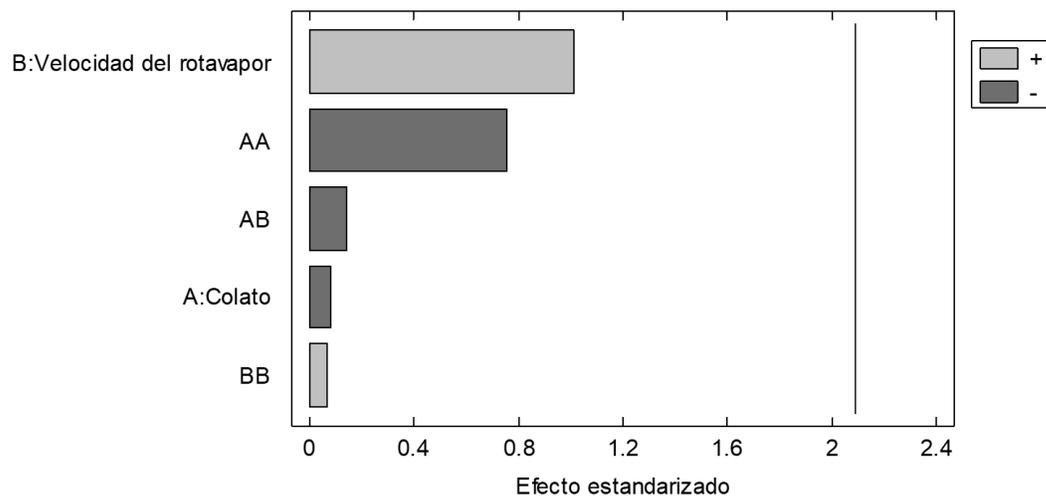


DIAGRAMA DE PARETO ESTANDARIZADO 4. RESPUESTA TAMAÑO DE PARTÍCULA (DISEÑO II).

Como se observa en el diagrama de Pareto para analizar el tamaño de partícula del segundo diseño de experimentos donde B velocidad de rotavapor, A colato de sodio, AA interacción de colato de sodio, AB interacción de velocidad de rotavapor y colato de sodio y BB interacción de velocidad de rotavapor.

Ninguna de las variables es significativa ya que son menores a 2 que es el efecto estandarizado, donde B y BB tienen un signo positivo lo cual favorece en un bajo tamaño de partícula en cambio AA, AB y A tienen un signo negativo, pero no afecta significativamente ya que es muy bajo su efecto.

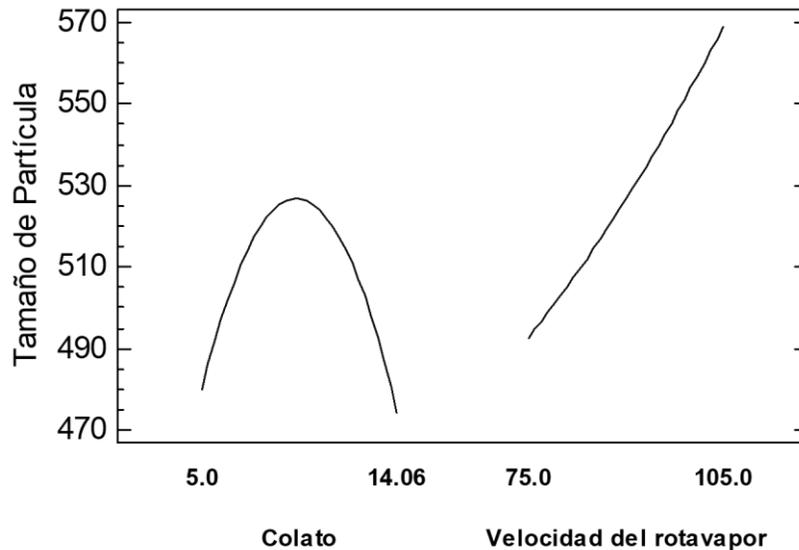


GRÁFICO 4. EFECTOS PRINCIPALES PARA LA VARIABLE TAMAÑO DE PARTÍCULA (DISEÑO II).

En el gráfico No. 4 se observa que la variable colato de sodio en concentraciones de bajas de 5 mg existe un tamaño de partícula bajo, con forme aumenta la concentración el tamaño va en aumento, aunque al llegar a una concentración de 14 mg se ve una disminución del tamaño. En cuanto a la velocidad del rotavapor se observa que a 75 rpm hay un tamaño bajo y conforme aumenta el rpm así mismo aumenta el tamaño de partícula. Lo que se busca son tamaños de partícula bajos.

10.1.2.3 Porcentaje de hemólisis (Diseño II)

TABLA 18. PRUEBA DE HEMÓLISIS. (DISEÑO II)

| Sistemas | Repetición 1 (%) | Repetición 2 (%) | Repetición 3 (%) |
|----------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 2.8 | 4 | 4.4 |
| 2 | 1.2 | 1.6 | 0.8 |
| 3 | 4 | 3.6 | 4 |
| 4 | 1.6 | 2 | 2 |
| 5 | 0 | 1.6 | 1.6 |
| 6 | 1.2 | 0.8 | 0.8 |
| 7 | 2 | 2 | 2 |
| 8 | 1.6 | 1.2 | 1.6 |
| 9 | 3.2 | 3.2 | 3.6 |

Se realizó el porcentaje de hemólisis para observar el comportamiento de los liposomas, y se hizo por triplicado.

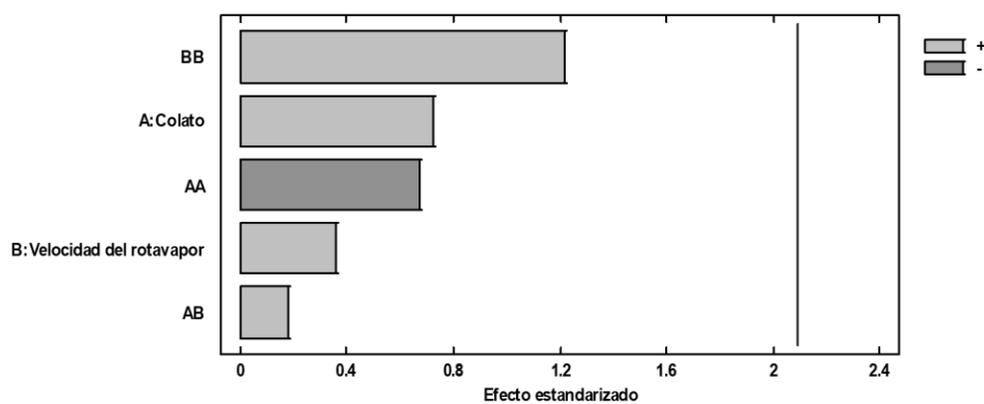


DIAGRAMA DE PARETO ESTANDARIZADO 5. RESPUESTA PRUEBA DE HEMÓLISIS (DISEÑO II).

Como se observa en el diagrama de Pareto para analizar el porcentaje de encapsulamiento del segundo diseño de experimentos donde B velocidad de rotavapor, A colato de sodio, AA interacción de colato de sodio, AB interacción de velocidad de rotavapor y colato de sodio y BB interacción de velocidad de rotavapor.

En el diagrama de Pareto ninguna variable es significativa ya que no supera el efecto estandarizado que es de 2, todas son más bajas. Todas las variables tienen un efecto positivo y favorece que el porcentaje de hemólisis sea menor a 2 con excepción de AA que tiene un efecto negativo, pero al ser más bajo no afecta significativamente.

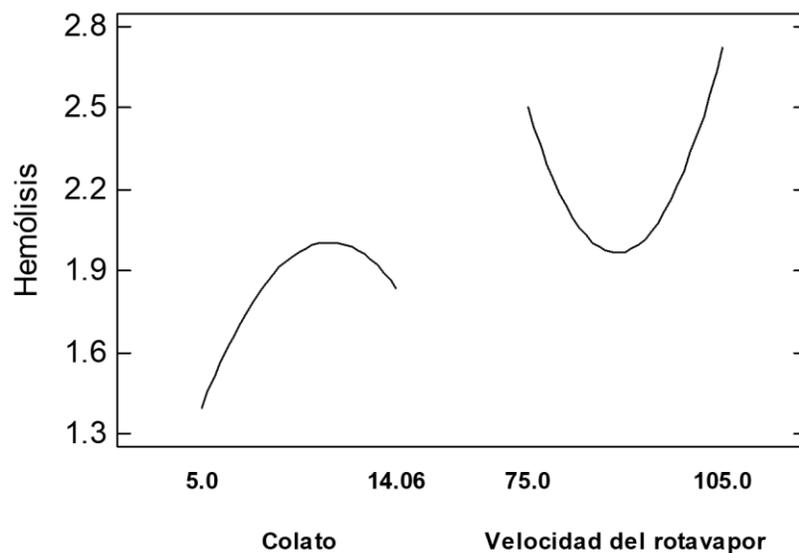


GRÁFICO 5. EFECTOS PRINCIPALES PARA LA VARIABLE PORCENTAJE DE HEMÓLISIS (DISEÑO II).

En el gráfico No. 5 se observa que a concentraciones bajas de colato de sodio 5 mg tiene un porcentaje de hemólisis bajo, con forme va subiendo la concentración va aumentando el porcentaje al llegar a una concentración de 14 mg tiende a disminuir nuevamente. A velocidades bajas de observa un porcentaje alto con forme aumenta se ve una disminución de hasta 90 rpm ya que se ve un aumento de nuevo.

Al analizar las dos variables (mg de colato de sodio y velocidad de rotavapor) se observó que en el gráfico No. 3 en cantidades bajas de colato de sodio hay un porcentaje de encapsulamiento de 98 aproximadamente conforme aumenta la cantidad aumenta un pequeño porcentaje, aunque en 14 mg que es la cantidad más alta se ve una disminución de encapsulamiento. En el gráfico No. 4 en la velocidad del rotavapor se puede observar que a velocidades bajas hay un encapsulamiento de 97% aproximadamente, conforme aumenta la velocidad aumenta la carga de glutatión lo cual es favorable, aunque lo ideal es un porcentaje igual o mayor a de 95% así que eso no afectaría significativamente.

En cuanto al tamaño de partícula lo que se desea es un tamaño bajo por lo cual el gráfico No. 5 se observa que a cantidades bajas de colato de sodio (5 mg) hay un tamaño bajo y conforme aumenta los mg se ve un incremento del tamaño de partícula lo cual ya no es favorable para el sistema ideal. En el gráfico No. 6 se observa que a velocidades bajas existe un tamaño bajo y conforme sube la velocidad así mismo sube el tamaño de los liposomas.

En el porcentaje de hemólisis en el gráfico No. 7 se observa una parábola donde en cantidades bajas hay un porcentaje bajo a cantidades media aumenta y en cantidades altas nuevamente se ve una disminución del porcentaje de hemólisis. En el gráfico No. 8 se observa que en cantidades medias es donde existe un menor porcentaje de hemólisis.

Al analizar las tres variables de respuesta se puede observar que en la fórmula ideal el colato de sodio puede ser en cantidades bajas (5 mg) o altas (14 mg) ya que hay una carga de glutatión mayor a 95%, el tamaño de partícula y porcentaje de hemólisis a cantidades bajas (5 mg) es donde se ve mejores resultados para la formulación, aunque en cantidades altas como bajas hay un resultado ideal lo que se busca en la optimización es que no se requiera ni mucho tiempo ni costos muy elevados de los reactivos por lo cual lo ideal es utilizar 5 mg para la formulación de acuerdo a los gráficos ya mencionados.

En cambio, con la velocidad del rotavapor se observan mejores resultados con velocidades medias ya que hay un tamaño pequeño al igual que el porcentaje de hemólisis y una carga de glutatión mayor a 95%.

Una vez teniendo los resultados en el mismo programa statgraphics se realizó la optimización con los resultados del segundo análisis estadístico para la formulación ideal.

10.2 Formulación Óptima

Datos/VARIABLES:

-  Carga de glutatión (%)
-  Hemólisis (%)
-  Tamaño de Partícula (nm)

TABLA 19. RESPUESTA DE VARIABLE.

| | <i>Mínimo</i> | <i>Máximo</i> |
|---------------------|------------------|------------------|
| <i>Respuesta</i> | <i>Observado</i> | <i>Observado</i> |
| Carga de glutatión | 96.02 | 98.65 |
| Hemólisis | 0.0 | 4.4 |
| Tamaño de Partícula | 272.759 | 707.432 |

De acuerdo a todos los resultados que se metieron al programa se observa el máximo y mínimo que se encontró de cada una de las variables de respuesta, donde en carga de glutatión arrojo un mínimo de 96.06% y un máximo de 98.65%; el porcentaje de hemólisis es bajo fue de 0 y el máximo de 4.4 y en tamaño de partícula el mínimo fue de 272 nm y máximo de 707 nm donde el programa analizó estadísticamente cada uno de los datos.

TABLA 20. DESEABILIDAD DE LA VARIABLE DE RESPUESTA.

| | Deseabilidad | Deseabilidad | |
|---------------------|--------------|--------------|-----------|
| Respuesta | Baja | Alta | Meta |
| Carga de glutatión | 96.02 | 98.65 | Maximizar |
| Hemólisis | 0.0 | 4.4 | Minimizar |
| Tamaño de Partícula | 272.759 | 707.432 | Minimizar |

Se ajustaron las variables en el programa para hacer el análisis estadístico donde se quiere maximizar la carga de glutatión y minimizar el tamaño de partícula y el porcentaje de hemólisis para la formulación adecuada a las especificaciones requeridas.

TABLA 21. DESEABILIDAD DE LA FORMULACIÓN ÓPTIMA.

| | | | | Deseabilidad | Deseabilidad |
|------|--------------------|-----------|---------------------|--------------|--------------|
| Fila | Carga de glutatión | Hemólisis | Tamaño de Partícula | Prevista | Observada |
| 1 | 98.57 | 2.8 | 618.0 | 0.496503 | 0.417056 |
| 2 | 98.0 | 1.2 | 339.5 | 0.697831 | 0.773875 |
| 3 | 98.36 | 4.0 | 425.2 | 0.579316 | 0.374487 |
| 4 | 98.31 | 1.6 | 631.2 | 0.639126 | 0.459748 |
| 5 | 98.14 | 0.0 | 278.3 | 0.676772 | 0.926693 |
| 6 | 98.3 | 1.2 | 352.4 | 0.554102 | 0.801543 |
| 7 | 98.38 | 2.0 | 566.9 | 0.590927 | 0.54089 |
| 8 | 98.49 | 1.6 | 613.8 | 0.614063 | 0.504936 |
| 9 | 98.14 | 3.2 | 643.5 | 0.652946 | 0.318582 |
| 10 | 98.0 | 4.0 | 689.873 | 0.408412 | 0.140351 |
| 11 | 98.14 | 1.6 | 347.254 | 0.567423 | 0.751877 |
| 12 | 98.34 | 3.6 | 446.366 | 0.481365 | 0.458408 |
| 13 | 98.61 | 2.0 | 700.253 | 0.499632 | 0.207012 |

| | | | | | |
|----|-------|-----|---------|----------|------------|
| 14 | 97.86 | 1.6 | 283.841 | 0.582878 | 0.757037 |
| 15 | 98.65 | 0.8 | 364.188 | 0.530538 | 0.864497 |
| 16 | 97.85 | 2.0 | 642.921 | 0.621332 | 0.383331 |
| 17 | 98.1 | 1.2 | 689.236 | 0.601135 | 0.288761 |
| 18 | 98.26 | 3.2 | 707.432 | 0.510861 | 0.00527712 |
| 19 | 98.54 | 4.4 | 546.127 | 0.671145 | 0.0 |
| 20 | 98.39 | 0.8 | 331.746 | 0.592098 | 0.860535 |
| 21 | 98.31 | 4.0 | 404.034 | 0.622458 | 0.380872 |
| 22 | 98.5 | 2.0 | 562.147 | 0.497564 | 0.556038 |
| 23 | 98.38 | 1.6 | 272.759 | 0.56849 | 0.829635 |
| 24 | 98.57 | 0.8 | 340.612 | 0.69715 | 0.874799 |
| 25 | 96.02 | 2.0 | 490.879 | 0.540046 | 0.0 |
| 26 | 98.27 | 1.6 | 538.364 | 0.638242 | 0.596042 |
| 27 | 98.38 | 3.6 | 579.568 | 0.616728 | 0.363407 |

En la tabla se puede observar el estudio estadístico que se realizó en el programa de acuerdo a las especificaciones de la tabla No. 19, de los 27 sistemas se eligió la formulación más acercada a las especificaciones, la mejor es el sistema número 2 en donde se obtuvo una carga de glutatión del 98%, porcentaje de hemólisis de 1.2 y un tamaño de 339.5 nm.

10.3 Optimización

De acuerdo al análisis se observó que la deseabilidad es de 0.697831 donde cumple con los requerimientos ajustados en el programa.

Valor óptimo = 0.697831

TABLA 22. FACTORES ÓPTIMOS DE LAS VARIABLES.

| <i>Factor</i> | <i>Bajo</i> | <i>Alto</i> | <i>Óptimo</i> |
|-------------------------|-------------|-------------|---------------|
| Colato | 5.0 | 14.06 | 5.0 |
| Velocidad del rotavapor | 75.0 | 105.0 | 87.8172 |

Para realizar cada uno de los sistemas estadísticamente se tomó un porcentaje alto y uno bajo en donde se obtuvo la formulación óptima de las dos variables concentración de colato de sodio y la velocidad de rotavapor.

TABLA 23. RESPUESTA DE VARIABLES ÓPTIMO.

| <i>Respuesta</i> | <i>Óptimo</i> |
|---------------------|---------------|
| Carga de glutatión | 98.233 |
| Hemólisis | 1.39977 |
| Tamaño de Partícula | 473.637 |

En la tabla No. 23 se muestra la formulación óptima estadísticamente.

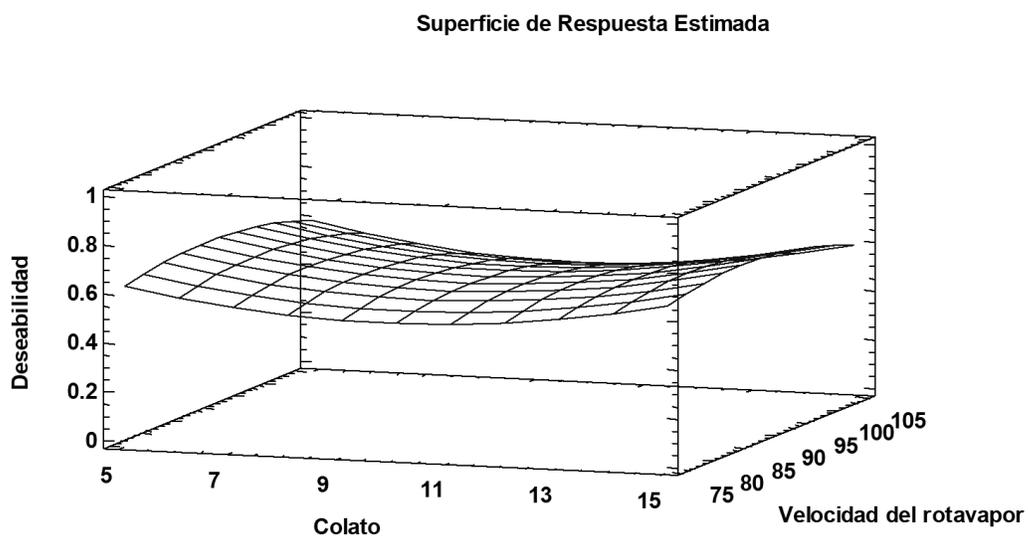


GRÁFICO 6. OPTIMIZACIÓN DE LA FORMULACIÓN.

En el gráfico No. 6 se muestra el diagrama de superficie de respuesta estimada se encuentran tres ejes y mide la deseabilidad (disminución de tamaño de partícula y porcentaje de hemólisis y maximizar el porcentaje de encapsulamiento). La deseabilidad es de 0.697831, en el gráfico podemos obtener los resultados óptimos de la formulación. Los miligramos de colato de sodio son de 5 mg y 87 rpm para obtener un tamaño de partícula bajo, porcentaje de hemólisis bajo y una carga de GSH alto.

10.4 Formulación ideal

Una vez analizando las variables de respuesta se eligieron las mejores de acuerdo a los resultados estadísticos, en cuanto a las variables que no fueron significativas se eligieron de acuerdo a un mejor proceso de elaboración, la cual fue el tiempo de preparación. De las concentraciones de las demás variables se eligieron las menores ya que entre menos costos favorece a la formulación para que sea reproducible.

En la Tabla 24 se muestra las concentraciones de cada componente de la formulación ideal.

TABLA 24. FORMULACIÓN ÓPTIMA DE LIPOSOMAS ULTRAFLEXIBLES DE GSH

| Componentes | |
|------------------------------|--------------|
| Fosfatidilcolina | 181.2 mg |
| Colato de sodio | 5 mg |
| Velocidad de rotación | 87 rpm |
| Tiempo de rotación | 1 h |
| Metanol | 50 |
| Hidratación | Sacarina 10% |

11 Conclusiones

- 🔗 Se desarrolló y optimizó una formulación ideal de liposomas ultraflexibles mediante el método de hidratación de película pensados para atravesar membranas biológicas y tratar el estrés oxidativo.
- 🔗 Los sistemas obtenidos fueron caracterizados en cuanto a tamaño de partícula, cantidad de glutatión cargado dentro de los liposomas y potencial hemolítico.
- 🔗 Se logró obtener una formulación con una carga de GSH mayor al 95% esto es ideal para que ejerza su función. Un tamaño de partícula bajo y homogéneo, así como un porcentaje de hemólisis bajo, lo cual indica que no afecta las células del organismo.
- 🔗 Con respecto al diseño de experimentos en statgraphics y la optimización se realizó el análisis de cada una de las formulaciones y con los resultados arrojados se eligió la formulación óptima. Las condiciones fueron 5 mg de Colato de sodio y 87 rpm.
- 🔗 Se concluyó que las variables; tipo de hidratación, fosfatidilcolina. Mezcla de metanol y tiempo no afecta en cuanto al tamaño de partícula, carga de GSH y porcentaje de hemólisis de GSH.

12 Perspectivas

- 🔗 Realizar pruebas de flexibilidad a la formulación de liposomas.
- 🔗 Llevar a cabo pruebas de estabilidad para observar su comportamiento a diferentes condiciones.
- 🔗 Elaborar cultivos celulares y poder probar la eficacia de los liposomas.
- 🔗 Investigar para la elaboración de un inyectable parenteral de los liposomas.

13 Referencias

- 🔗 Alessandrini González. (2000). Estrés Oxidativo y Envejecimiento. Avances Médicos de Cuba, Centro Internacional de Restauración Neurológica, C. Habana, Cuba.
- 🔗 Alexander RW. (1995). Theodore Cooper Memorial Lecture. Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. Oxidative stress and the mediation of arterial inflammatory response: a new perspective. Hypertension.
- 🔗 Álvarez M. (2012). Clasificación de liposomas por tipo de componente. [Ilustración]. Recuperado de <https://www.google.com.mx/search?biw=1345&bih=593&tbm=isch&sa=1&ei=bJemXLeYl8rt-gSxvaygBA&q=liposomas+tippo+de+componente&oq=liposomas>
- 🔗 Álvarez, A. (2006). Sistemas coloidales. Facultad de Química CU UNAM. http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/Liposomas-Antonieta_668.pdf
- 🔗 Bagatolli, Luis. (2015). Vida ¿Una cuestión de grasa? (2da edición). Córdoba Argentina.
- 🔗 Betbesé AJ, Pérez M, Bak E, Ballús J, Ney A, Mancebo J. (1996). Efectos gasométricos y hemodinámicos de la inhalación de óxido nítrico en pacientes con síndrome de distrés respiratorio agudo. Med Clin (Barc).
- 🔗 Díaz J, Serrano E, Acosta F, Leal M, Martínez P, Jiménez R, Carbonell LF. (1998). ¿Participan los radicales libres en los procesos de peroxidación lipídica? Análisis Clínicos.
- 🔗 Dorado Claudia. (2003). Estrés oxidativo y neurodegeneración. (monografía). UNAM. Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina.
- 🔗 Drago, M., López, M., Saíenz, T. (2006). Componentes bioactivos de alimentos funcionales de origen vegetal. Revista Mexicana Ciencias Farmacéuticas. 37 (4).
- 🔗 Casanova M. (2015). Efecto de los radicales libres sobre las células. [Ilustración]. https://es.123rf.com/photo_85059995_c%C3%A9lula-y

radicales-libres-c%C3%A9lula-sana-atacada-por-los-radicales-libres-y-el-estr%C3%A9s-oxidativo-con-la-destru.html

- 🔗 Elejalde Guerra JI. (2001). Oxidación, entre la vida y la enfermedad. *An Med Interna*. Madrid 18: pp 1-4.
- 🔗 Elejalde, Guerra. (2002). Estrés oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *An. Med. Interna (Madrid)* Vol. 18, N.º 6.
- 🔗 ENAC. (2020). Pruebas de toxicología, prueba de hemólisis. 15 de mayo del 2020, de Instituto valenciano de microbiología Sitio web: <https://www.ivami.com/es/evaluacion-biologica-de-dispositivos-medicos/2457-pruebas-de-toxicologia-hb-evaluacion-biologica-de-productos-sanitarios-hemocompatibilidad-b-prueba-de-hemolisis-b-une-en-10993-4-seleccion-de-ensayos-para-las-interacciones-con-la-sangre-metodo-astm-f756-03-b-acreditada-por-enac-b>
- 🔗 Estrés oxidativo. (s. f.). [Ilustración]. <https://alkanatur.com/blog/alkanatur-espana/que-es-el-estres-oxidativo-y-como-puede-impactar-en-la-salud>
- 🔗 Parada R, (2019). Estructura química de Fosfatidilcolina. [Ilustración]. http://www.wikillerato.org/Estructura_de_la_fosfatidilcolina.html
- 🔗 Fernández, J. (2008). Estructura química del glutati6n. [Ilustración]. <https://www.rgaetan.com/glutation.html>
- 🔗 Fernández, J, García. (2008) Cap.16 Glutati6n. En Konigsberg, M del libro Radicales libres y estr6s oxidativo. Aplicaciones m6dicas (pp 253-267). Manual moderno, M6xico.
- 🔗 Fraenza, Carla Cecilia. (2016) Caracterizaci6n de la din6mica molecular en nanoestructuras supramoleculares globulares mediante relaxometr6a magn6tica nuclear. (Tesis doctoral). Facultad de Matem6tica. Universidad Nacional de C6rdoba.
- 🔗 Galcer6n JM, Mart6nez A. (2000). Fen6menos oxidativos en la fisiopatolog6a vascular. Hipertensi6n y riesgo vascular. Science Direct. 17.
- 🔗 Gerritsen WB, Aarts LP, Morshuis WJ, Haas FJ. (1997). Indices of oxidative stress in urina of patients undergoing coronary artery bypass grafting. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*; 35.
- 🔗 Gonzalez, M. L. V. (2015). Desarrollo y caracterizaci6n de liposomas para aplicaci6n t6pica de f6rmacos. (Tesis Doctoral). Universidad de Barcelona.

-  González I. (2016). Estructura de liposomas. [Ilustración]. Recuperado de <https://www.google.com.mx/search?biw=1345&bih=593&tbm=isch&sa=1&ei=3JamXJeQEMrk->
-  Gonzalo, R. (2019). Nuevas tendencias en dermofarmacia: los transferosomas (Tesis Licenciatura ed.). FACULTAD DE FARMACIA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE.
-  Gutiérrez, Rosario. (2011). Estudios de difusión a través de piel de formulaciones liposómicas de Aciclovir. (Tesis doctoral). Universidad Complutense de Madrid. Facultad de farmacia.
-  Hernann, J (2015). Radicales Libres [Ilustración]. <https://www.engormix.com/ganaderia-leche/articulos/estres-oxidativo-efecto-funcion-t32467.htm>
-  Horie K, Miyata T, Maeda K, Miyata K. (1997). Immunohistochemical colocalization of glycoxidation products and lipid peroxidation products in diabetic renal glomerular lesions. Implications for glycoxidative stress in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Clin Invest*; 100: 2995-3004.
-  Konat GW, Wiggins RC. (1985), Effects of reactive oxygen species on myelin membrane proteins. *J Neurochem*; 45.
-  Lima Hernández, L. “Estrés oxidativo y antioxidantes: Actualidades sobre los antioxidantes en los alimentos”. Centro Nacional de Medicina Natural y Tradicional.
-  Lima, LB. (2002). Curso de Postgrado de Temas Actuales de Nutrición y Alimentación, Facultad de Medicina “Enrique Cabrera”, Ciudad de la Habana, Cuba.
-  Losonczy KG, Harris TB, Havlik RJ. (1996). Vitamin E and vitamin C supplement use and risk of all cause and coronary heart disease mortality in older persons: the Established Populations for Epidemiologic Studies of the Elderly. *Am J Clin Nutr* 64.
-  M.E. Lanioa, M.C. Luzardo. (2009). Las vesículas liposomales: obtención, propiedades y aplicaciones potenciales en la biomedicina. *Rev. Cub. Física* vol .26, No. 1 p 23-30

- 📄 Marta. (2013). Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas. (Tesis doctoral), UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID, Madrid.
- 📄 Martínez, J. (2011). El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. Sitio web: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2011/reb112c.pdf>
- 📄 Martínez, J, Victoria., Juárez, M.(2011).El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. Revista de educación bioquímica.30(2). Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2011/reb112c.pdf>
- 📄 Matos, A. (2011). Valoración de los nutrientes y antioxidantes en la salud humana e industria alimentaria. Universidad Peruana Unión. I Congreso Nacional de Investigación. Perú, Lima.
- 📄 Mayor Oxilia Rosa. (2010). Estrés Oxidativo y Sistema de Defensa Antioxidante. Rev. Inst. Med. Trop. 5(2):23-29
- 📄 Milagros L. (2019). La teoría del estrés oxidativo como causa directa del envejecimiento celular. SciELO. Volumen (16) (5) 699-710.
- 📄 Muzakova V, Kandar R, Vojtisek P, Skalicky J, Cervinkova Z. (2000). Selective antioxidant enzymes during ischemia/reperfusion in myocardial infarction. *Physiol Res*; 49: 315-322.
- 📄 Nath KA, Grande J, Croatt A, Haugan J, Kim Y, Rosenberg ME. (1998). Redox regulation of renal DNA synthesis, transforming growth factor-beta1 and collagen gene expression. *Kidney Int*; 53: 367-381.
- 📄 Navarro, G. (2019). Diseño de liposomas para el transporte de diclofenaco sódico. Colombia. Volumen (37) pp 212-223
- 📄 NSG. (2017). Encapsulamiento De liposomas. [Ilustración]. Recuperado de <https://nosologenes.com/hola-liposoma/>
- 📄 Núñez, A. (2011). Terapia antioxidante, estrés oxidativo y productos antioxidantes: retos y oportunidades. *Rev Cubana Salud Pública*; 37, 644-60.
- 📄 Pastene, E. (2009). Estado actual de la búsqueda de plantas con actividad antioxidante. *Boletín Latinoam Caribe Plantas Med Aromáticas*; 8 (6), pp. 449- 55.
- 📄 Peuchant E, Delmas-Beauvieux MC. (1997). Antioxidant effects of a

supplemented very low protein diet in chronic renal failure. *Free Rad BiolMed*. 22: 313-320.

- 📖 Pressman, AH and Sheila Buff. (2000). *Vitaminas y minerales*. Editorial Pearson Education, México.
- 📖 Romero D, Roche E. *Cardiología*. (1997). Estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología. ENE Ediciones pp 55-88.
- 📖 Romero-Alvira D, Villalba MP, Bueno J. (1991). Papel de la peroxidación y la antioxidación en la etiología de la hipertensión arterial. *Med Clin (Bar)*. 57: 542-551.
- 📖 Romero-Alvira D, Villalba MP, Mur M, Cabeza F, Guerrero L, Simail E et al. (1990). Importancia de los antioxidantes en la alimentación humana. *Med Clin (Bar)*; 94: 69-75.
- 📖 Romero-Alvira D. (1997). *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular*. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología. ENE Ediciones. pp 13-51.
- 📖 Ruano, M. (2013). *Fabricación de liposomas y de cápsulas poliméricas* (Tesis Doctoral ed.). Universidad Complutense de Madrid.
- 📖 Sánchez V. (2019). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedades. *Rev Invest Med Sur Mex*, pp 161-168
- 📖 Sánchez, V, Méndez, N.(2013). Estrés oxidativo, antioxidantes y enfermedad. *Investigación médica sur*.20(3). Recuperado de: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medsur/ms-2013/ms133e.pdf>
- 📖 Sandoval J. (2015). Clasificación por efecto de la naturaleza. [ilustración] Recuperado de https://www.google.com.mx/search?biw=1345&bih=593&tbm=isch&sa=1&ei=VJ2mXPudOc_C-gSqvLLYBg&q=efecto+de+la+naturaleza+de+los+fosfolipidos
- 📖 Sandoval J. (2015). Flexibilidad de liposomas. [ilustración] Recuperado de https://www.google.com.mx/search?biw=1345&bih=593&tbm=isch&sa=1&ei=VJ2mXPudOc_C-gSqvLLYBg&q=efecto+de+la+naturaleza+de+los+fosfolipidos

=VJ2mXPudOc_C-

gSqvLLYBg&q=efecto+de+la+naturaleza+de+los+fosfolipidos

- 🔗 Sandoval, (2015). Diseño y caracterización de un sistema liposomal para la administración transdérmica de un péptido sintético con fines cosméticos. Universidad Nacional de Colombia. (Tesis de Maestría). Colombia.
- 🔗 Sharma, S (2019) Liposomas vesicular system an overview. International journal of pharmacy and pharmaceutical sciences. Volumen (4). pp 11-17
- 🔗 Soraci, L. (s. f.). Función de GSH [Ilustración]. https://www.researchgate.net/figure/Figura-9-Funcion-antioxidante-de-GSH-1-El-peroxido-de-hidrogeno-formado-por-el_fig4_242108790
- 🔗 Turnes, J. (1994). Fuentes intracelulares de especies oxidantes en condiciones normales y patológicas. Antioxidantes y calidad de vida. 1: 16-19
- 🔗 Vallejo E. (2019). Una poderosa herramienta en la medicina preventiva del cáncer: los antioxidantes. El residente. Volumen (12) p 104-111
- 🔗 Vázquez M. (2015). Desarrollo y Caracterización de liposomas para aplicación tópica de fármacos. Universidad de Barcelona.
- 🔗 Vázquez González, Martha Leticia. (2015). Desarrollo y caracterización de liposomas para aplicación tópica de fármacos. UNIVERSITAT DE BARCELONA.
- 🔗 Viada, E. (2017). Estrés oxidativo. ScieLo volumen (21). Recuperado 13 agosto 2019. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1560-43812017000100014
- 🔗 Villa-García, M. (2015). Liposomas como Nanotransportadores de Antioxidantes y Estudio de Tasa de Liberación. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada del IPN, México.
- 🔗 Vulcano, D. (2013). Homeostasis del glutatión. Mayo 4, 2019, de Federación Bioquímica de la Provincia de Buenos Aires Argentina Sitio web: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53529349007.pdf>.
- 🔗 Barry, BW. (2001). Is transdermal drug delivery research still important today?, Drug discov today.