



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE
LIPOSOMAS PARA SU USO COMO FORMA FARMACÈUTICA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:

PABLO ADRIAN MARTÍNEZ ROCHA

TUTOR:

Silvia del Socorro Pérez Casas



Ciudad Universitaria, CD. MX.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: SILVIA DEL SOCORRO PEREZ CASAS
VOCAL: Profesor: VERONICA CERRILLA SOSA
SECRETARIO: Profesor: NELLY NORMA CASTRO TORRES
1er. SUPLENTE: Profesor: JORGE ESTEBAN MIRANDA CALDERON
2° SUPLENTE: Profesor: FRANCISCA MORAYNA GUTIERREZ LUNA

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIO-FISICOQUÍMICA L-302 EDIFICIO F
FACULTAD DE QUÍMICA
CIUDAD UNIVERSITARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

ASESOR DEL TEMA: DRA. SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS -----

SUPERVISOR TÉCNICO: M. EN C. ELIZABETH URÍA CANSECO -----

SUSTENTANTE (S): PABLO ADRIAN MARTÍNEZ ROCHA -----



UNAM - Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS©
PROHIBIDA SU REPRODUCCION TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.



AGADECIMIENTOS A LAS INSTITUCIONES

El siguiente trabajo fue realizado gracias a:

La facultad de química Dra. Silvia del Socorro Pérez Casas, responsable del laboratorio de Biofísicoquímica y del proyecto PAIP 5000-9020, otorga los equipos y materiales necesarios para la realización de este trabajo.

La asesoría técnica de la M. en C. Elizabeth Uría Canseco del laboratorio de Biofísicoquímica, Facultad de química.

La ayuda técnica del Dr. Javier de la Mora y de la QFB. Teresa Ballado Nava del laboratorio 222 del Dr. Georges Dreyfus en el Instituto de Fisiología Celular.

La Facultad de Medicina, Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería en Proteínas, al Dr. Ismael Bustos Jalmes por el préstamo de equipo Nanosizer μ V.

Al Dr. Rafael Iván Puente Lee de la Unidad de Servicio de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) en el Edificio Mario Molina por la obtención de microscopias electrónicas de barrido.

Dra. Francisca Palomares Alonso por el apoyo de estudios in vivo realizados en el Instituto de Neurología.



ÍNDICE

Índice de figuras	9
Índice de tablas	12
Índice de gráficas	14
Índice de ecuaciones	15
Abreviaturas	16
Capítulo 1 Introducción	17
1.1 Objetivos generales	20
1.2 Objetivos particulares	20
1.4 Hipótesis	20
Capítulo 2 Antecedentes	21
2.1 Neurocisticercosis (etiología, desarrollo)	22
2.2 Forma farmacéutica y elementos que lo componen	25
2.2.1 Lípidos (fosfatidilcolinas)	25
2.2.2 Ensamble de liposomas y funciones (acarreadores)	28
2.2.3 Liposomas (forma farmacéutica) y la interacción con el cuerpo--	29
Capítulo 3 Materiales	30
3.1 DMPC	30
3.2 DPPA	31
3.3 PBS	31
3.4 Cloruro de sodio (NaCl)	32
3.5 Praziquantel	32
3.6 Aceite de moringa	33
Capítulo 4 Fundamentos de las metodologías	34
4.1 Preparación de liposomas	34
4.2 Dispersión dinámica de luz (Tamaño de partícula)	36
4.3 Microscopia electrónica de barrido (morfología y tamaño)	39
4.4 Calorimetría diferencial de barrido	40
4.5 Determinación de peso seco para el estudio de la eficiencia del tratamiento	46



Capítulo 5 Equipos y reactivos	48
Capítulo 6 Metodología	49
6.1 Preparación de película	49
6.2 Determinación de incorporación(DSC)	51
6.3 Determinación de tamaño de partícula(DLS)	52
6.4 Determinación de morfología y tamaño(SEM)	53
6.5 Determinación de estabilidad	53
Capítulo 7 Resultados	54
7.1 DMPC hidratado con agua	54
7.1.1 Termogramas	54
7.1.2 Estabilidad del sistema	57
7.2 DMPC: PZQ hidratado con agua	57
7.2.1 Termogramas	57
7.2.2 Estabilidad del sistema	59
7.3 DMPC: ACEITE DE MORINGA hidratado con agua	60
7.3.1 Termogramas	60
7.3.2 Estabilidad del sistema	61
7.4 DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con agua	62
7.4.1 Termogramas	62
7.4.2 Estabilidad del sistema	63
7.5 Parámetros termodinámicos de los sistemas hidratados con agua-	64
7.6 Tamaño de partícula para los sistemas hidratados con agua	65
7.7 Morfología y tamaño de partícula para los sistemas hidratados con agua	66
7.8 Estabilidad física de los sistemas hidratados con agua	68
7.9 DMPC hidratado con PBS	69
7.9.1 Termogramas	69
7.9.2 Estabilidad del sistema	70
7.10 DMPC: PZQ hidratado con PBS	71
7.10.1 Termogramas	71
7.10.2 Estabilidad del sistema	72
7.11 DMPC: ACEITE DE MORINGA hidratado con PBS	72



7.11.1 Termograma	72
7.11.2 Estabilidad del sistema	73
7.12 DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con PBS	74
7.12.1 Termograma	74
7.12.2 Estabilidad del sistema	75
7.13 Parámetros termodinámicos de los sistemas hidratados con PBS	76
7.14 Tamaño de partícula para los sistemas hidratados con PBS	76
7.15 Morfología y tamaño de partícula para los sistemas hidratados con PBS	77
7.16 Estabilidad física de los sistemas hidratados con PBS	79
7.17 DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con NaCl 50mM	80
7.17.1 Termograma	80
7.17.2 Estabilidad del sistema	81
7.18 DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con NaCl 150mM	82
7.18.1 Termogramas	82
7.18.2 Estabilidad del sistema	83
7.19 Parámetros termodinámicos de los sistemas hidratados con NaCl	83
7.20 Tamaño de partícula para los sistemas hidratados con NaCl	84
7.21 Morfología y tamaño de partícula para los sistemas hidratados con NaCl	85
7.22 Estabilidad física de los sistemas hidratados con NaCl	86
7.23 DMPC: DPPA 10%: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con agua	87
7.23.1 Termogramas	87
7.23.2 Estabilidad del sistema	88
7.24 Tamaño de partícula para los sistemas con DPPA	88
7.25 Morfología y tamaño de partícula para los sistemas con DPPA	89
7.26 Estabilidad física del sistema con DPPA	89



7.27 Evaluación in vivo en ratones de liposomas de PZQ con Aceite de moringa -----	90
Capítulo 8 Conclusiones -----	92
Capítulo 9 Perspectivas y sugerencias -----	93
Capítulo 10 Interés comercial -----	94
Capítulo 11 Bibliografía -----	95



Índice de figuras

Figura 1:(A) Morfología. (B) Ciclo de vida de *Taenia solium* (García I. 2009, Merck Sharp y Dohme Corp.).

Figura 2.1: Representación de dos cisticercoides de *Taenia solium* en etapa de larva.(CDC/ Dr. George R. Healy)

Figura 3A: Resonancia magnética nuclear en la región frontal derecha subcortical. 3B: La misma imagen anterior esta vez en señal T2. (Alberto Fica C., Marcelo Castro S., Andrés Soto S., Carlos Flores M., Carolina Oelker B. y Thomas Weitzel “Neurocysticercosis - an neglected disease in Chile”)

Figura 4: Resonancia magnética cerebral, corte axial potenciado en T2. (Carlos Hugo Zapata, Sergio Alberto Vargas, Carlos Santiago Uribe, .” Neurocisticercosis racemosa (sic), diagnóstico orientado por neuroimágenes”)

Figura 5. A y B Resonancia magnética de quistes de neurocisticercosis espinal intradural. (Klonddy Heredia Moy, Ifigenia Oviedo Gamboa,Sindy Vanessa Panozo Borda,William Zegarra, Santiesteban,Rodolfo Ricaldez Muñoz, Tania Villarroel Arze “Spinal neurocysticercosis: imaging diagnosis, report of a clinical case”)

Figura 6: Estructura general de los fosfolípidos. (*OpenStax, Biología*)

Figura 7: Estructura de un liposoma. (Akbarzadeh, A. et al. (2013) “Liposome: Classification, preparation and applications”)

Figura 8: Estructura de Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC). (PubChem)

Figura 9: Estructura de 1,2-Dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfato. (Echelon Biosciences)

Figura 10: Estructura del cloruro de sodio. (Sigma aldrich)

Figura 11: Estructura del praziquantel. (Pubchem)

Figura 12: Semillas del árbol de moringa oleífera. (FAO)

Figura 13: Componentes básicos de un equipo para dispersión dinámica de luz. (Facultad de medicina)

Figura 14: Microscopio electrónico de barrido. (EcuRed)

Figura 15: Procesos exotérmicos y endotérmicos por la técnica de DSC. (Rabek J.F. “Experimental Methods in Polymer Chemistry”)



Figura 16: Esquema representativo del calorímetro. (Intek Group SAS)

Figura 17: Perfil de transición de fase de liposomas de DMPC. (Facultad de química)

Figura 18: Calorímetro diferencial de barrido (Facultad de química)

Figura 19: Representación esquemática del proceso de toma de muestra en ratón.

Figura 20: Preparación de liposomas por el método de hidratación de película delgada. (Figura tomada y traducida desde de Araújo Lopes et al. (2013).)

Figura 21: Representación gráfica del proceso para la técnica de DSC. (Facultad de química)

Figura 22: Representación gráfica del proceso para la técnica de DLS. (Facultad de medicina)

Figura 23: Representación esquemática de la alineación de las cadenas de acilo para formar una doble capa de moléculas. (Costas Demetzos (2008) Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability)

Figura 24: A y B Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (30mM). (Edificio H Mario Molina)

Figura 25: C y D Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (30mM): PZQ (Edificio H Mario Molina)

Figura 26: E y F Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (40mM): PZQ (Edificio H Mario Molina)

Figura 27: G y H Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (40mM): ACEITE DE MORINGA (Edificio H Mario Molina)

Figura 28: I y J Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (40mM): PZQ: ACEITE DE MORINGA (Edificio H Mario Molina)

Figura 29: A y B Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC. (Edificio H Mario Molina)

Figura 30: C y D Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: PZQ. (Edificio H Mario Molina)



Figura 31: E y F Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: MORINGA. (Edificio H Mario Molina)

Figura 32: G y H Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: PZQ: ACEITE. (Edificio H Mario Molina)

Figura 33: A y B Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: PZQ: ACEITE (NaCl 50mM). (Edificio H Mario Molina)

Figura 34: C y D Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: PZQ: ACEITE (NaCl 150mM). (Edificio H Mario Molina)

Figura 35: A y B Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: DPPA10%: PZQ: MORINGA (Edificio H Mario Molina)



Índice de tablas

Tabla 1: Clasificación de lípidos.

Tabla 2: Clasificación de liposomas por tamaño.

Tabla 3: Principales componentes del aceite de moringa.

Tabla 4: Parámetros termodinámicos para el sistema DMPC.

Tabla 5: Estudio de estabilidad del sistema DMPC.

Tabla 6: Parámetros termodinámicos del sistema DMCP: PZQ.

Tabla 7: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ.

Tabla 8: Parámetros termodinámicos de los sistemas de DMPC: MORINGA.

Tabla 9: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: MORINGA.

Tabla 10: Parámetros termodinámicos del sistema DMPC: PZQ: MORINGA.

Tabla 11: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ: MORINGA.

Tabla 12: Resultados termodinámicos de todos los sistemas de liposomas caracterizados por DSC.

Tabla 13: Tamaños de partícula de los sistemas liposomales hidratados con agua.

Tabla 14: Parámetros de estabilidad de los sistemas liposomales.

Tabla 15: Parámetros termodinámicos de los sistemas liposomales hidratados con PBS.

Tabla 16: Estudio de estabilidad del sistema DMPC.

Tabla 17: Parámetros termodinámicos del sistema DMPC: PZQ.

Tabla 18: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ.

Tabla 19: Parámetros termodinámicos para los sistemas de DMPC: MORINGA hidratados con PBS.

Tabla 20: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: MORINGA.



Tabla 21: Parámetros termodinámicos obtenidos por DSC para los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con PBS.

Tabla 22: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ: MORINGA.

Tabla 23: Parámetros termodinámicos de los sistemas liposomales.

Tabla 24: Tamaños de partícula de los sistemas hidratados con PBS.

Tabla 25: Estabilidad física para los sistemas de hidratados con PBS.

Tabla 26: Parámetros termodinámicos de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con NaCl 50mM.

Tabla 27: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 50mM.

Tabla 28: Parámetros termodinámicos de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con NaCl 150mM.

Tabla 29: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con NaCl 150mM.

Tabla 30: Resultados termodinámicos de todos los sistemas de liposomas caracterizados por DSC.

Tabla 31: Tamaños de partícula obtenidos por DLS para los sistemas hidratados con disoluciones de NaCl.

Tabla 32: Estabilidad física de los sistemas hidratados con las disoluciones de NaCl.

Tabla 33: Parámetros termodinámicos de los sistemas de DMPC: DPPA10%: PZQ: MORINGA.

Tabla 34: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: DPPA10%: PZQ: MORINGA.

Tabla 35: Tamaños de partícula por el método de DLS del sistema liposomal.

Tabla 36: Parámetros de estabilidad para el sistema liposomal.

Tabla 37: Resultados estadísticos de la evaluación in vivo.



Índice de graficas

Gráfica 1: Termograma para el sistema DMCP.

Gráfica 2: Termograma para el sistema DMCP: PZQ.

Gráfica 3: Termogramas para todos los sistemas DMCP: PZQ.

Gráfica 4: Termogramas de los sistemas de DMPC: MORINGA.

Gráfica 5: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA.

Gráfica 6: Termogramas de los sistemas de DMPC.

Gráfica 7: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ hidratados con PBS.

Gráfica 8: Termogramas de los sistemas de DMPC: MORINGA hidratados con PBS.

Gráfica 9: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con PBS.

Gráfica 10: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 50mM.

Gráfica 11: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con NaCl 150mM.

Gráfica 12: Termogramas de los sistemas liposomales de DMPC: DPPA10%: PZQ: MORINGA.

Gráfica 13: Determinación estadística del peso seco de los grupos de ratones con los tratamientos.



Índice de ecuaciones:

Ecuación 1: $d(H) = \frac{kT}{3\eta\pi D}$ (Ecuación de Stokes-Einstein)

Ecuación 2: $\frac{\text{calor}}{\text{tiempo}} = \frac{q}{t}$ (Flujo de calor)

Ecuación 3: $\frac{\text{incremento de temperatura}}{\text{tiempo}} = \frac{\Delta T}{t}$ (Velocidad de calentamiento)

Ecuación 4: $C = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \frac{q}{T_f - T_i} = \frac{\delta q}{dT}$ (Capacidad térmica)

Ecuación 5: $\left(\frac{dq}{dt}\right)_p = \frac{dH}{dt}$ (Equivalencia entre flujo de calor y entalpia)

Ecuación 6: $\Delta \frac{dH}{dt} = \left(\frac{dH}{dt}\right)_{\text{muestra}} - \left(\frac{dH}{dt}\right)_{\text{referencia}}$ (Diferencia de calor entre referencia y muestra en DSC)



ABREVIATURAS

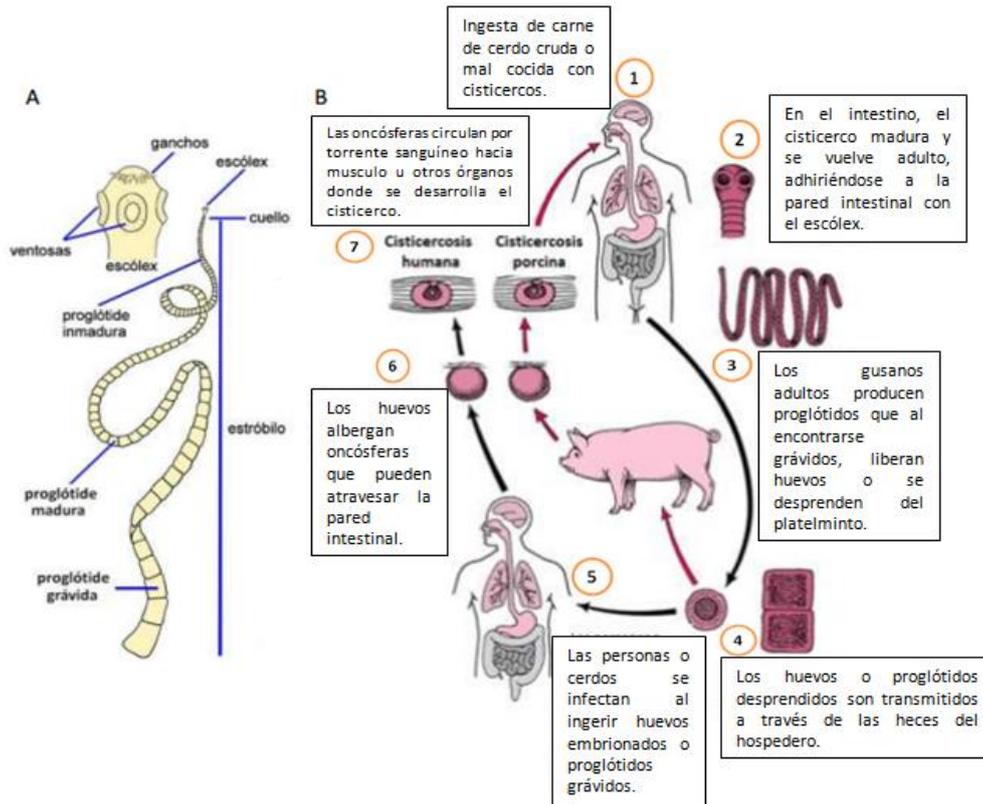
ΔH	Entalpía
BSE	Electrones retrodispersados
CMC	Carboximetilcelulosa
DLS	Dispersión dinámica de luz
DMPC	Dimiristoilfosfatidilcolina
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
GUV	Vesículas unilamelares gigantes
LUV	Vesículas unilamelares grandes
MLV	Vesículas multilamelares
NCC	Neuricisticercosis
OLV	Vesículas oligolamelares
PZQ	Praziquantel
SE	Electrones secundarios
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas
T_{1/2}	Temperatura media
T_m	Temperatura de transición principal
T_p	Temperatura de pretransición
T_s	Temperatura de subtransición



CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN

La teniasis es una parasitosis intestinal, causada por la forma adulta del género *Taenia*, con tres especies: la *Taenia solium*, que se adquiere por la ingestión de carne de cerdo con cisticercos vivos, insuficientemente cocida o cruda; la *Taenia saginata*, por la ingestión de carne de res con cisticercos vivos, insuficientemente cocida o cruda; y la *Taenia asiática* menos frecuente. En el ciclo de vida de la *Taenia* el hombre participa como huésped definitivo de las especies *Taenia solium* y *Taenia saginata*; el cerdo y el bovino son intermediarios durante el desarrollo del parásito más específicamente en la fase larvaria del metacéstodo (cisticerco).

El hombre puede participar como hospedero definitivo o también convertirse en hospedero intermediario desarrollándose el parásito dando lugar a la cisticercosis humana, enfermedad parasitaria causada por la presencia de las larvas de *Taenia solium* en los tejidos y órganos; se adquiere por la ingestión de huevos de *Taenia solium* provenientes del cerdo y estas a su vez acaban el desarrollo en el humano expulsando la fase adulta del parásito, a través del consumo de alimentos contaminados, o por la cohabitación con una persona portadora de la *Taenia solium*, ya que este parásito es adquirido por una mala higiene de las personas dando lugar a los diferentes ejes para adquirir la enfermedad uno de los más conocidos es el de ano-mano-boca causando la cisticercosis también a las personas con las que conviven.



El problema de la cisticercosis porcina se identifica principalmente en los cerdos criados rústicamente con las personas conviviendo diariamente en contacto con materia fecal contaminada por huevos de *Taenia solium*, ya que éstos no están adecuadamente confinados, ya que la fase de huevo de la *Taenia solium* es infecciosa para los seres humanos, desarrollándose la cisticercosis, potencialmente mortal, de ahí su importancia médica.

En 2010, la OMS añadió la cisticercosis por *Taenia solium* a la lista de las principales enfermedades tropicales desatendidas y estableció una hoja de ruta con dos objetivos: elaborar una estrategia validada para combatir y erradicar la teniasis/cisticercosis por *Taenia solium* y ampliar las intervenciones, ya que son enfermedades parasitarias que podrían ser evitables y controlables mediante acciones conjuntas de los sectores público, social y privado, impartiendo información educativa al respecto y



en función de una vigilancia epidemiológica eficaz, atención médica oportuna y adecuada, verificación sanitaria eficiente, para así poder educar a la población con respecto a estas enfermedades.

Neurocisticercosis (NCC) es una enfermedad parasitaria causada por el establecimiento de larvas de *Taenia solium* en el sistema nervioso central, que afecta frecuente y gravemente la salud humana en los países en desarrollo.

Para el diagnóstico de la neurocisticercosis (NCC) se requiere de extractos antigénicos obtenidos de los cisticercos de *Taenia solium*, lo cual presenta dificultades técnicas por la difícil consecución de cerdos naturalmente infectados. Sin embargo, los extractos antigénicos obtenidos de *Taenia crassiceps* muestran una alta homología con los de *Taenia solium*, brindando ventajas en la producción de antígenos para la implementación en técnicas serológicas.

El praziquantel ha sido utilizado para el tratamiento de esta enfermedad, usado con lípidos se ha demostrado que aumenta la biodisponibilidad. El praziquantel tiene el efecto de aumentar la permeabilidad de calcio en las tenias provocando una parálisis al parásito. El aceite de moringa se ha utilizado desde la antigüedad para el tratamiento de diferentes malestares. Por otro lado, se buscan diferentes alternativas para diseñar una formulación farmacéutica que aumente la biodisponibilidad del fármaco en el torrente sanguíneo. En este trabajo se presenta el diseño de una suspensión de praziquantel, aceite de moringa en liposomas de dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), que es caracterizado por diversas técnicas fisicoquímicas y probado in vivo para determinar su biodisponibilidad.



OBJETIVOS

1.1 OBJETIVOS GENERALES

- Elaborar un sistema estable formado por liposomas de DMPC que contenga el praziquantel y aceite de moringa
- Determinar los parámetros fisicoquímicos de los sistemas formados por DMPC, praziquantel y aceite de moringa.
- Determinar la eficiencia in vivo en un modelo de actividad cisticida.

1.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Preparar liposomas de DMPC, DMPC: PZQ, DMPC: Aceite de moringa y DMPC: PZQ: Aceite de moringa.
- Determinar los parámetros termodinámicos de los liposomas, como son ΔH , $T_{1/2}$ y T_m por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).
- Determinar el tamaño de partícula de los liposomas formados, por Dispersión Dinámica de luz (DLS).
- Determinar la morfología de los liposomas elaborados por medio de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

1.3 HIPOTESIS

- En los sistemas liposomales de DMPC el PZQ se encapsulará en el centro acuoso, mientras que el aceite de moringa se incorporará entre las cadenas de acilo de los fosfolípidos que forman la bicapa.
- La estabilidad física y la polidispersidad del sistema liposomal mejorarán mediante el uso de diferentes medios de hidratación.
- El sistema liposomal mejorará la eficiencia del fármaco en pruebas in vivo.

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

Cisticercosis

Concepto y etiología:

La cisticercosis se caracteriza por la afectación de órganos y tejidos por la larva cisticercoide de *Taenia solium* es un cèstodo zoonótico que produce dos enfermedades en el ser humano: teniasis en su fase adulta y cisticercosis en la fase quística larvaria. Aunque la cisticercosis se puede producir en cualquier tejido, las larvas tienen especial tropismo por tejido subcutáneo, muscular y sistema nervioso central (SNC).



Figura 2: Representación de dos cisticercoides de *Taenia solium* en etapa de larva.(CDC/ Dr. George R. Healy)

Se produce fundamentalmente en aquellas áreas donde la convivencia de cerdos y humanos es estrecha. Aunque su incidencia ha disminuido mucho en países desarrollados en las últimas décadas, esporádicamente se pueden presentar casos en individuos con mayor riesgo, especialmente pastores y granjeros. Sin embargo, es una infección frecuente en Centroamérica, Sudamérica, el sudeste asiático y China. También se considera endémica en el África subsahariana, aunque existen menos datos en estas zonas. Actualmente, el incremento de los flujos migratorios de estas zonas ha provocado el aumento del número de casos en aquellos países donde la transmisión es baja.



2.1 NEUROCYSTICERCOSIS

Las manifestaciones clínicas de la neurocisticercosis pueden abarcar desde una infección completamente asintomática hasta una enfermedad grave. La localización de los quistes en el parénquima cerebral, en el espacio extraparenquimatoso o en ambos va a determinar las características de los síntomas. En el cerebro se presenta en dos formas: parenquimatosa (sustancia gris cerebral) y extraparenquimatosa o racemosa (intraventricular, subaracnoideo, intraocular y espinal)

-Neurocisticercosis parenquimatosa

Esta es la forma más frecuente y se produce habitualmente entre 3 y 5 años tras la infección. La principal manifestación son las convulsiones. Se calcula que el 30% de los pacientes de zonas endémicas con epilepsia tienen neurocisticercosis, siendo especialmente frecuente en la epilepsia de presentación en la edad adulta. Las convulsiones suelen ser focales con generalización secundaria y habitualmente responden a los antiepilépticos. Los pacientes con lesiones calcificadas o con múltiples quistes tienen mayor riesgo de presentar convulsiones recurrentes.

Otros síntomas asociados a lesiones ocupantes de espacio pueden aparecer, como déficits focales, ya sean motores o sensitivos. En ocasiones, la presencia de múltiples quistes con una intensa respuesta inflamatoria puede dar lugar a un cuadro clínico similar a una encefalitis subaguda, provocando epilepsia, focalidad neurológica, alteración del nivel de conciencia o hipertensión intracraneal.

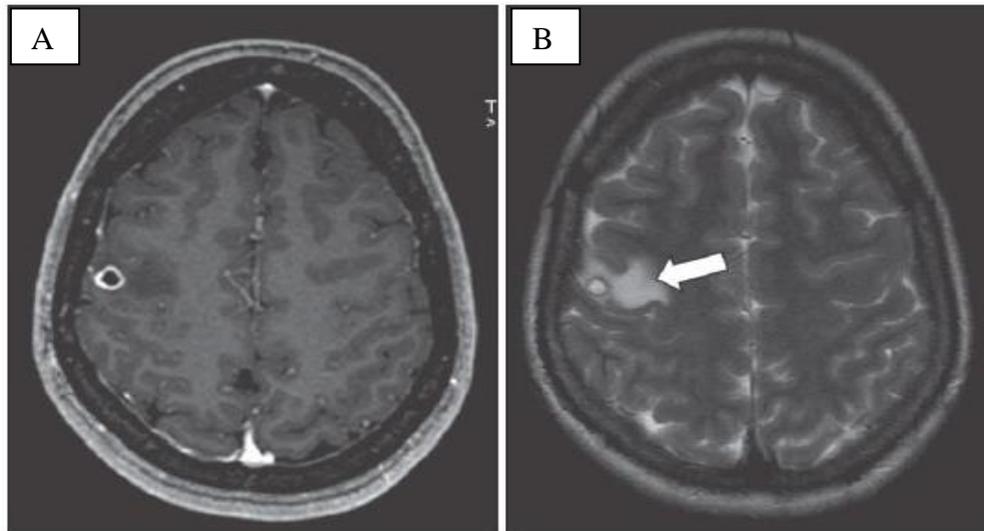


Figura 3A: Resonancia magnética nuclear en la región frontal derecha subcortical. B: La misma imagen anterior esta vez en señal T2. La RMN en la región frontal derecha subcortical presenta quiste parenquimatoso. La RMN con T2 permite apreciar mejor el edema parenquimatoso. (Alberto Fica C., Marcelo Castro S., Andrés Soto S., Carlos Flores M., Carolina Oelker B. y Thomas Weitzel “Neurocysticercosis - an neglected disease in Chile”)

-Neurocisticercosis extraparenquimatosa

Se caracteriza por la afectación de los espacios intraventricular y/o subaracnoideo. La presencia de quistes en los ventrículos se asocia típicamente al desarrollo de hidrocefalia obstructiva, con cefalea, náuseas y vómitos, alteración del nivel de conciencia o pérdida de visión con papiledema debido a una obstrucción del flujo del LCR durante los cambios de posición (síndrome de Brun). La presentación puede ser subaguda o crónica, aunque la afectación del cuarto ventrículo se relaciona con una instauración rápida.

Los quistes situados en el espacio subaracnoideo, especialmente a nivel basal, pueden crecer de forma desproporcionada y agrupada, en forma de racimo, sin observarse escólex en su interior, dando lugar a la llamada neurocisticercosis racemosa. La hipertensión intracraneal con hidrocefalia es una manifestación frecuente de esta forma clínica. La inflamación asociada a estos quistes se asocia también a aracnoiditis crónica, que puede presentarse con meningitis, accidente cerebrovascular o vasculitis cerebral.

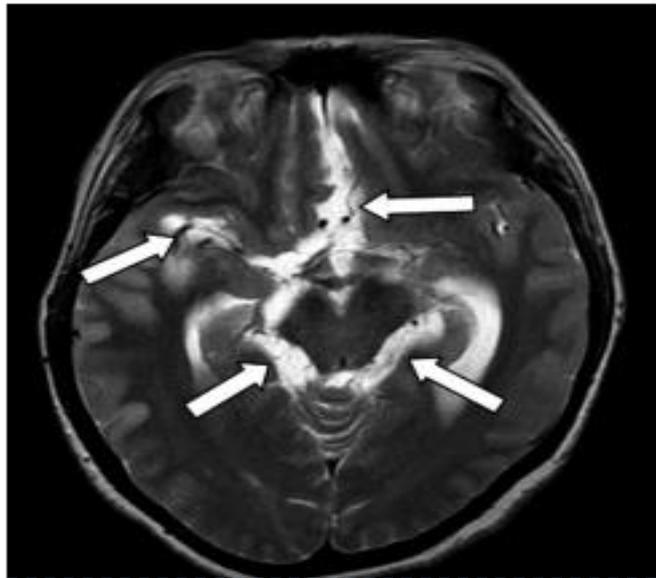


Figura 4: Resonancia magnética cerebral, corte axial potenciado en T2. En la cual se observan múltiples dilataciones en las cisternas de la base, de la lámina terminal y la Silvana derecha, debidas a quistes de cisticercosis racemosa (flechas). (Carlos Hugo Zapata, Sergio Alberto Vargas, Carlos Santiago Uribe, ." Neurocisticercosis racemosa (sic), diagnóstico orientado por neuroimágenes")

-Neurocisticercosis espinal

La médula espinal también puede afectarse por los quistes de *Taenia solium*, aunque es infrecuente. Puede producirse por la diseminación de la neurocisticercosis racemosa de los espacios subaracnoideos basales. Los pacientes pueden presentar dolor radicular, parestesias o síntomas motores y/o alteraciones de esfínteres.

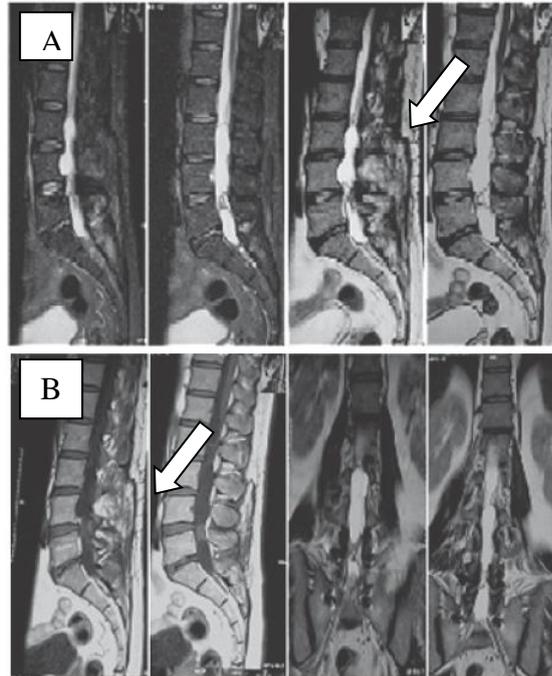


Figura 5. A y B Resonancia magnética de quistes de neurocisticercosis espinal intradural. (Klonddy Heredia Moy, Ifigenia Oviedo Gamboa, Sindy Vanessa Panozo Borda, William Zegarra, Santiesteban, Rodolfo Ricaldez Muñoz, Tania Villarroel Arze “Spinal neurocysticercosis: imaging diagnosis, report of a clinical case”)

2.2 Forma farmacéutica y elementos que lo componen

2.2.1 Lípidos

Los lípidos son moléculas orgánicas que se encuentran en la naturaleza comprenden uno de los cuatro grupos de compuestos que se encuentran en los tejidos de los seres vivos, los carbohidratos, proteínas y ácidos nucleicos. No hay una definición simple para el término “lípidos” (del griego grasa), aunque su definición se basa en sus propiedades fisicoquímicas como un grupo de biomoléculas, insolubles en agua y solubles en disolventes no polares como cloroformo, hexano, entre otros.

Los lípidos biológicos constituyen un grupo químicamente diverso de compuestos cuya característica común y definitoria es su insolubilidad en agua. Son componentes estructurales de la membrana celular; un alto porcentaje de la membrana celular y de otras membranas dentro de las células están compuestas de lípidos. Las funciones biológicas de los lípidos son igualmente diversas. En muchos organismos las grasas y los



aceites son las formas principales de almacenamiento energético, mientras que los fosfolípidos y los esteroides constituyen la masa de las membranas biológicas.

Tabla 1: Clasificación de lípidos.

	Ceras	Son ésteres lineales de alcoholes y ácidos carboxílicos de cadena larga
A.- Esteres hidrolizables	Grasas y aceites	Son triglicéridos (triacil-gliceroles). - Son ésteres de un triol (glicerina) y ácidos carboxílicos de cadena larga (ácidos grasos). - Pueden ser saturados o insaturados (tener dobles ligaduras).
	Fosfolípidos	Fosfoglicéridos.- son ésteres de un triol (glicerina), con un ácido graso saturado, un ácido graso insaturado y un diéster fosfórico. Esfingolípidos.- son ésteres de un amino-alcohol (esfingosina) y ésteres fosfóricos.
B.- Compuestos que no se pueden hidrolizar	Prostaglandinas	Proviene del ácido graso araquidónico, tienen un anillo de ciclopentano
	Terpenos	Consisten en dos o más unidades de isopreno
	Esteroides	Son triterpenoides muy modificados

Los fosfolípidos son ésteres de ácidos carboxílicos, además de ser diésteres del ácido fosfórico, contienen un grupo fosfato. Están localizados principalmente en las membranas celulares de las células

animales. Son moléculas anfífilas cuya parte hidrofóbica está constituida por dos o más colas hidrocarbonadas. Pertenecen a una gran familia de ácidos grasos. Su principal característica es que juegan un papel importante en las células de los seres vivos debido a su estructura y metabolismo.

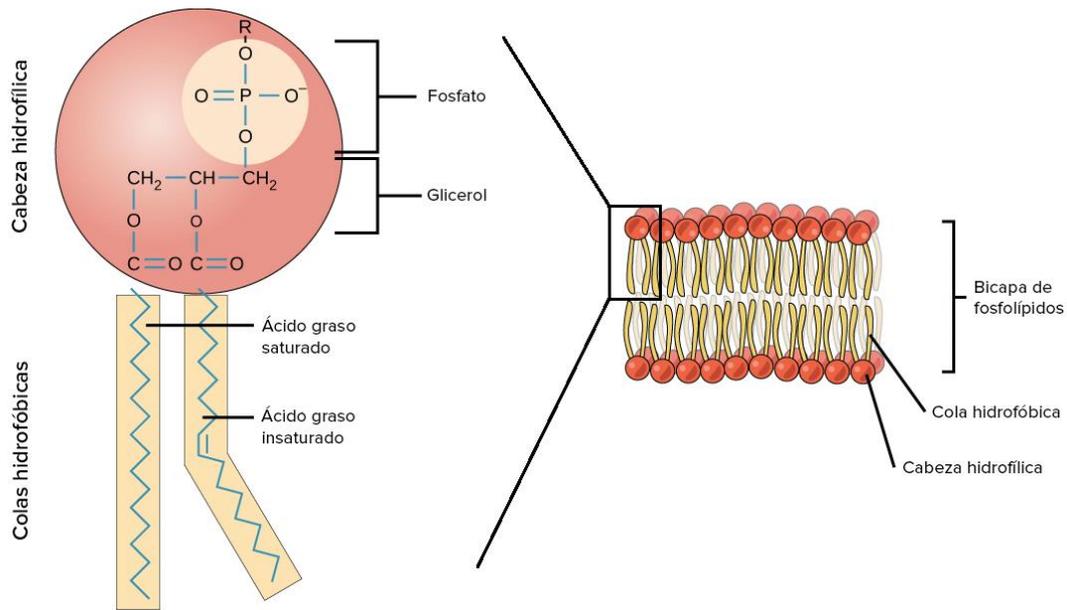


Figura 6: Estructura general de los fosfolípidos. Representación gráfica de la parte hidrofílica e hidrofóbica que componen a un fosfolípido. (*OpenStax, Biología*)

Las fosfatidilcolinas son fosfolípidos derivados de ácidos grasos de cadena larga, compuestos por dos cadenas de acilo y un componente de glicerol que une a las dos cadenas con una cabeza polar de fosforilcolina, las cuales se diferencian por el número de carbonos que pueden ir de 12 a 18 carbonos por mencionar algunos, ya que dependen directamente del ácido graso del que provienen, algunos ejemplos son Dimiristoílfosfatidilcolina (14 C), Dipalmitoílfosfatidilcolina (16 C) y Diestearoílfosfatidilcolina (18 C). Las fosfatidilcolinas son un producto de separación de la lecitina, que es una mezcla de lípidos saponificables derivada de tejidos animales y vegetales.

2.2.2 Ensamble de liposomas y funciones

Los liposomas se consideran modelos de gran importancia para el estudio de membranas biológicas, debido a que tienen muchas propiedades fisicoquímicas similares a las membranas celulares, tales como la permeabilidad de la membrana, la fluidez dimensional, la actividad osmótica, la interacción con varios solutos, las características de la superficie y la composición química. La fluidez de sus membranas y su estructura que se cierra en presencia de un medio acuoso son parámetros esenciales para el estudio de la membrana biológica, por ello tienen muchas aplicaciones en el campo de la biotecnología.

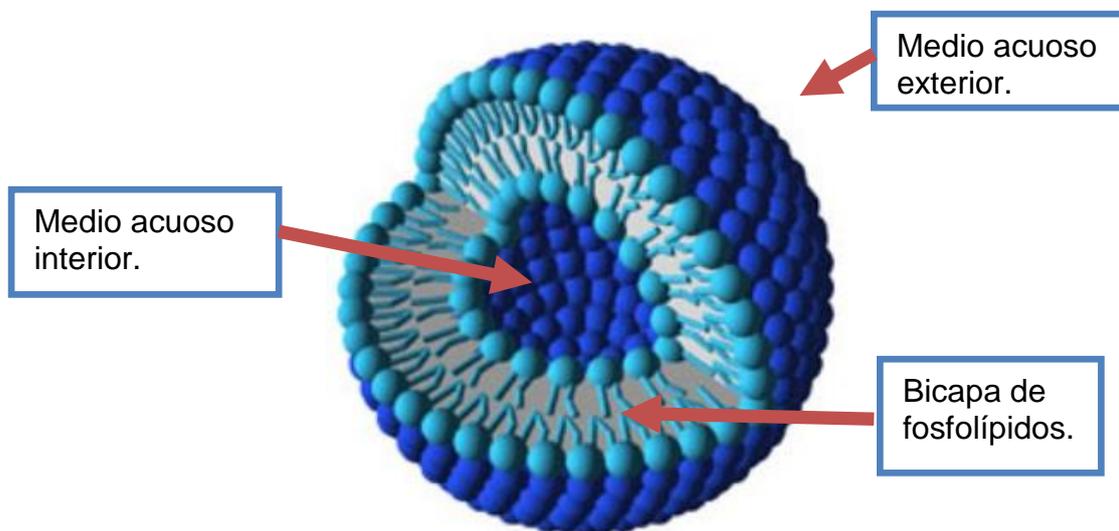


Figura 7: Estructura de un liposoma. Representación de los componentes que forman un liposoma. (Akbarzadeh, A. et al. (2013) "Liposome: Classification, preparation and applications"

Los liposomas son sistemas vesiculares constituidos por moléculas anfífilas (normalmente fosfolípidos) que forman una doble capa mediante un autoensamblaje que orienta la fracción polar de las moléculas hacia el medio acuoso interno y externo de la estructura. Debido al orden que adquiere el liposoma, éstos adoptan preferentemente una forma esférica, que posee una región hidrosoluble en el interior del liposoma así como en el exterior, y regiones liposolubles entre las cadenas hidrocarbonadas de la membrana formada; pueden estar formadas por una o más bicapas de fosfolípidos.



Debido a la estructura y orientación de los liposomas, estos adquieren la capacidad de encapsular fármacos de carácter hidrofóbico en la doble capa de fosfolípidos. Los liposomas, también tienen afinidad por aquellos fármacos de carácter hidrofílico, pues presentan un centro acuoso dentro del cual se almacena el fármaco hidrosoluble. Su estructura y fluidez puede ser completamente controlado.

Los liposomas pueden ser clasificados basándose en el método de preparación, por el número de bicapas presentes en la vesícula o por el tamaño. Siendo esta última la clasificación más empleada:

Tabla 2: Clasificación de liposomas por tamaño

Clasificación	Tamaño de partícula aproximado	Esquema representativo
SUV (Vesículas unilamelares pequeñas)	20-100 nm	
LUV (Vesículas unilamelares grandes)	>100 nm	
GUV (Vesículas unilamelares gigantes)	>100 nm	
OLV (Vesículas oligolamelares)	100-500 nm	
MLV (Vesículas multilamelares)	>500 nm	

2.2.3 Liposomas y la interacción con el cuerpo

En medicina, se sabe que los liposomas son una herramienta poderosa para el tratamiento de enfermedades porque pueden fungir como acarreadores de fármacos, son generalmente aceptados como modelos



para estudios in vitro de las propiedades y estructuras de las membranas celulares. Su habilidad para atrapar, secuestrar y transportar moléculas con actividades terapéuticas ya sea a un sitio específico del cuerpo o liberar su contenido en condiciones fisiológicas, para el diseño de formulaciones farmacéuticas, ha derivado en investigaciones para mejorar la manera de utilizarlas, mediante el estudio de sus propiedades fisicoquímicas. Algunos liposomas se han diseñado para contener inmunógenos específicos que se han probado en el tratamiento del cáncer. Otros, además, se han usado para el transporte dérmico y transdérmico de componentes activos y también de manera oral, entre otros tenemos: analgésicos, antiinflamatorios, anti-arrugas, insulina, anti-cancerígenos y pomadas contra el acné. Finalmente hay muchos estudios sobre encapsular y transportar material genético, lo que nos llevaría a hablar de terapia génica (así hay menos susceptibilidad a la degradación por parte de nucleasas o ARN nucleasas).

CAPÍTULO 3 MATERIALES

3.1 DMPC

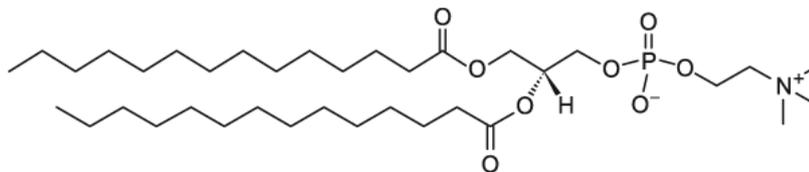


Figura 8: Estructura de Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) (PubChem)

Un fosfolípido que se utiliza en liposomas para el estudio de membranas biológicas es el Dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) el cual por debajo de los 22.5 °C (llamada temperatura de transición), forma una bicapa que se encuentra puramente en estado “gel” mientras que por encima de ésta, la fase predominante es “líquido cristalino”, por lo cual a ésta se le llama temperatura de transición. Su fórmula química es $C_{36}H_{72}NO_8P$ y su masa molar 677.933 g/mol.

3.2 DPPA

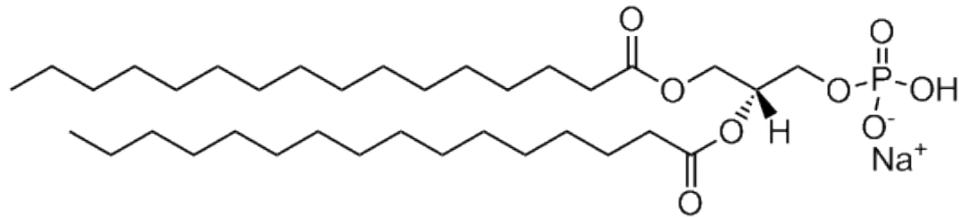


Figura 9: Estructura de 1,2-Dipalmitoil-sn-glicerol-3-fosfato (Echelon Biosciences)

Es un componente principal de membranas de célula con papeles importantes biofísicos y metabólicos. DPPA ha sido implicado en muchos aspectos de bioquímica y fisiología de célula de animal, incluyendo la proliferación de células y la diferenciación, la transformación de la célula, la progresión de un tumor y la señalización de supervivencia, su fórmula química es $C_{35}H_{68}O_8PNa$ y su masa molar es 670.873g/mol.

3.3 PBS

La Solución Salina Amortiguada por Fosfatos (PBS) constituye una solución que mantiene el pH en cierto rango y es comúnmente empleada para procedimientos bioquímicos. La osmolaridad y concentración de iones (Cl^- , Na^+ y K^+) de la solución utilizada en este trabajo, es muy semejante a la del líquido extracelular de los mamíferos. Esta solución se prepara a partir de cloruro de sodio, fosfato de sodio y, en algunas formulaciones, con fosfato de potasio; es isotónica y no tóxica para las células de los mamíferos, se emplea como vehículo neutro para células, ya que no modifica el perfil de expresión y funcionamiento celular normal. También es empleada comúnmente para lavar células a través de centrifugación y puede ser empleada como diluyente en procedimientos de desecación de biomoléculas, ya que las moléculas de agua presentes en el PBS se adhieren alrededor de la biomolécula permitiendo inmovilizarla a una superficie sólida formando una monocapa de agua evita que la biomolécula sea desnaturalizada (o sufra modificaciones conformacionales) en el proceso de desecación. Los amortiguadores a



base de carbonatos también son empleados para este procedimiento, aunque con menor éxito.

3.4 Cloruro de sodio (NaCl)



Figura 10: Estructura del cloruro de sodio.(Sigma aldrich)

Es un polvo blanco, cristalino, higroscópico, fácilmente soluble en agua, prácticamente insoluble en alcohol, sus propiedades físicas son punto de ebullición 1413°C, punto de fusión 804°C, densidad 2.17g/cm³, solubilidad 360 g/l en agua a 20°C. Mediante el uso de la fuerza iónica aumenta la densidad de carga superficial ya que se forma una doble capa eléctrica alrededor de cada vesícula para mejorar la estabilidad.

3.5 Praziquantel (PZQ)

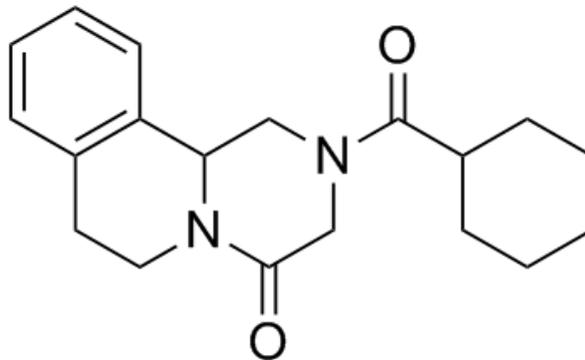


Figura 11: Estructura del praziquantel. (Pubchem)

El praziquantel es un polvo cristalino blanco de sabor amargo. El compuesto es estable en condiciones normales y funde entre 136-140 ° C con descomposición, es fácilmente soluble en cloroformo y dimetilsulfóxido, es soluble en etanol y muy poco soluble en agua. El praziquantel es un antihelmíntico; en concentraciones bajas aumenta la actividad muscular seguida por contracciones y parálisis espástica. En dosis altas origina vacuolización, vesiculación y desintegración del

tegumento de los parásitos. Estos efectos del praziquantel se atribuyen a su capacidad para aumentar la permeabilidad de la membrana en algunos cationes monovalentes y divalentes, especialmente el calcio. Se absorbe rápido y por completo en el tubo digestivo y alcanza concentraciones plasmáticas máximas (1 $\mu\text{g/ml}$) en 1 a 3 h después de administración oral. Se distribuye en todo el organismo y en el líquido cefalorraquídeo alcanza concentraciones hasta de 15 a 20% de las observadas en el plasma, sufre un efecto de primer paso en el hígado, donde se metaboliza en derivados monohidroxilados y polihidroxilados. Se elimina rápido por la orina, y el total de sus metabolitos en lapso de cuatro días. En mujeres en etapa de lactancia, una parte se puede eliminar en la leche. Su vida media biológica es de 0.8 a 1.5 h.

3.6 Aceite de moringa



Figura 12: Semillas del árbol de moringa oleífera. (FAO)

Según la revista Mexicana de Biodiversidad (2011), la Moringa Oleífera es un árbol multiusos para las zonas tropicales secas, es un alimento nutritivo y benéfico que ofrece características muy atractivas para establecer su cultivo en comunidades sostenibles en el trópico seco de México y otros países de Latinoamérica.

Históricamente el aceite de semilla de moringa se ha utilizado para ayudar a curar enfermedades de la piel, gota, dolor en las articulaciones, el escorbuto, inflamación, dolor de estómago, reumatismo y muchas otras condiciones.



Las semillas maduras producen el 38%- 40% de aceite comestible llamado aceite “ben” o “behen” por su alta concentración de ácido behénico.

El aceite “ben” exprimido de las semillas de moringa oleífera, conocido también como el árbol de rábano picante, árbol de aceite ben o árbol de baqueta. El aceite de moringa se caracteriza por una vida útil extraordinariamente larga y un sabor suave, pero agradable. Los componentes del aceite son los siguientes:

Tabla 3: Principales componentes del aceite de moringa

Componentes	Porcentaje
Ácido olèico	65.7%
Ácido palmítico	9.3%
Ácido esteárico	7.4%
Ácido behenico	8.6%

El aceite de moringa se obtiene de las semillas de la misma planta (vainas) cuando están maduras. En algunos casos las familias cosechan vainas verdes y las cuecen para consumirse (como si fueran habas) en otros casos las usan como guisantes, y en otras ocasiones las consumen asadas y la semilla seca la consumen cruda para regular algunos malestares. Directamente los frutos secos (semillas) contienen altos niveles de vitamina C y cantidades moderadas de vitaminas del complejo B y minerales necesarios en la dieta.

La semilla de moringa tiene un grano bastante blando, por lo tanto el aceite se puede extraer a mano o en forma artesanal usando una prensa de rosca.

CAPÍTULO 4 FUNDAMENTOS DE LAS METODOLOGIAS

4.1 Preparación de liposomas

Existen algunas técnicas de preparación de liposomas para encapsular que pueden dividirse en:



Primer método los liposomas se obtienen por transferencia de fosfolípidos de una fase orgánica en una fase acuosa.

Segundo método las películas lipídicas se depositan primero sobre un substrato y luego se hidratan para originar liposomas.

Los métodos de preparación también se clasifican en función del tamaño medio, polidispersidad y lamellaridad de los liposomas obtenidos, ya que el control sobre estos parámetros sigue siendo un desafío con casi todos los métodos de preparación.

En este trabajo se utilizó el denominado método de dispersión simple que es el más conocido y sencillo. Se realiza en varias etapas:

La primera etapa es la disolución del fosfolípido en diclorometano, la segunda etapa consta de la evaporación del disolvente en el rotavapor para la obtención de la bicapa lipídica. Las disoluciones de los fosfolípidos que pretenden utilizarse se mezclan en proporción adecuada, para su aplicación dependiendo del tipo de liposoma con el que se quiere trabajar. La tercera etapa consta de la hidratación de la bicapa lipídica para regular la fuerza iónica en medios polares como disoluciones de cloruro de sodio, agua, solución amortiguadora. La hidratación debe hacerse por encima de la temperatura de transición del lípido con ayuda de una agitación vigorosa. De esta forma, parte del agua queda atrapada en la bicapa lipídica y el resto queda inmerso en el interior del liposoma, el cual se forma espontáneamente en contacto con el medio acuoso. Los liposomas obtenidos de esta forma son fundamentalmente SUV según lo reportado en la teoría pero como se forman espontáneamente no existe un control directo del tamaño promedio obtenido, por ello hay que utilizar posteriormente la técnica de la extrusión para que el tamaño de los liposomas sea más homogéneo.

La cuarta etapa es sonicar, se realiza para ayudar a la estabilidad del sistema y a temperatura ambiente con una duración de 30 minutos.



Finalmente el último paso es la extrusión de liposomas modificando la temperatura a nuestra conveniencia, las vesículas unilamelares y multilamelares se hacen pasar por un filtro de policarbonato de un tamaño de poro definido (en este trabajo se han utilizado 100nm de diámetro) para obtener SUVs; la mayoría de los liposomas de la disolución así obtenidos serán unilamelares y con un diámetro homogéneo promedio de 100nm.

Para la administración de fármacos, el tamaño deseado de liposomas oscila alrededor de los 100 a 200 nm ya que los sistemas con este tamaño de partícula tienden a ser más estables y además se evita la degradación por parte del sistema inmunológico innato del individuo porque los macrófagos podrían fagocitarlo. Por lo tanto, la reducción del tamaño y la lamelaridad de los liposomas se llevan a cabo típicamente sometiéndolos a homogeneización por sonicación y extrusión.

4.2 Dispersión dinámica de luz (Tamaño de partícula)

El tamaño de partícula se puede monitorear usando la metodología de dispersión dinámica de la luz, conocida también como Espectroscopia de Fotocorrelación o Dispersión Cuasi Elástica, pertenece a un conjunto de técnicas basadas en el estudio de la interacción radiación-materia.

Tiene un fundamento teórico basado en:

- 1) La teoría de dispersión de Rayleigh (para partículas pequeñas y esféricas)
- 2) La teoría de Mie (partículas esféricas de tamaño superior a la longitud de onda)
- 3) La teoría de Stokes-Einstein (la cual no considera la estructura molecular sino las fluctuaciones del índice de refracción).

Todo esto permite obtener información dinámica de las partículas coloidales que se mueven al azar (movimiento Browniano) como el coeficiente de difusión y el radio hidrodinámico. El fenómeno físico de dispersión que se debe a la interacción radiación-materia se monitorea



por la intensidad dispersada debida a la fluctuación que generan las partículas, la cual llega al detector, ésta varía con el tiempo.

La Dispersión dinámica de la luz mide el movimiento Browniano y lo relaciona con el tamaño de las partículas. Esto lo hace iluminando las partículas con un láser y analizando las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersada. El movimiento Browniano es el movimiento aleatorio de las partículas, que se debe a las interacciones (choques) de las moléculas del disolvente y las partículas suspendidas en él.

Si una pequeña partícula es iluminada por una fuente de luz tal como un láser, la partícula dispersará la luz en todas las direcciones. Si una pantalla se mantiene cercana a la partícula, esta pantalla puede ser iluminada por la luz dispersada. Considerando ahora la sustitución de una partícula individual por miles de partículas estacionarias, la pantalla mostrará patrones de manchas, es decir, un patrón que consiste en áreas brillantes y oscuras, esto se muestra gráficamente debido a que la luz dispersada al llegar a la pantalla con la misma fase actúa de manera constructiva y forma un área brillante. Las áreas oscuras de las adiciones de fase son mutuamente destructivas y se cancelan una con la otra.

Dado que las partículas están en constante movimiento, el patrón de manchas también se moverá. A medida que las partículas se mueven alrededor, la fase constructiva y destructiva de la luz dispersada hará que las áreas brillantes y oscuras crezcan y disminuyan en intensidad, es decir la intensidad en un punto determinado fluctuará (la fase de adición de las partículas que se mueven están en constante evolución y formación de nuevos patrones). Entonces lo que se mide son las fluctuaciones de la Intensidad de la luz dispersada.

Como ya se ha mencionado la dispersión dinámica de Luz, mide las fluctuaciones que resultan del movimiento Browniano, mediante la intensidad de dispersión con respecto al tiempo, para determinar el coeficiente de difusión translacional (D), y el radio hidrodinámico. La velocidad del movimiento Browniano es definida por una propiedad



conocida como coeficiente de difusión traslacional. Una vez determinado el coeficiente de difusión, es posible conocer el tamaño de las partículas en la disolución mediante la ecuación de Stokes-Einstein (suponiendo a dilución infinita y la ausencia de interacciones entre las partículas esféricas).

$$d(H) = \frac{kT}{3\eta\pi D}$$

Donde:

$d(H)$ es el diámetro hidrodinámico, D es el coeficiente de difusión traslacional, k es la constante de Boltzman, T es la temperatura absoluta, η la viscosidad de la dispersión y $\pi, 3.141592\dots$

En la figura 13 se observan los componentes principales. (1) Un rayo láser que es la fuente de luz que ilumina la muestra contenida en (2) una celda. Para soluciones diluidas la mayor parte del rayo láser pasa a través de la muestra, pero una fracción es dispersada por las partículas de la muestra en un ángulo θ . (3) Un detector, es usado para medir la intensidad de luz dispersada en un ángulo de 175° . La intensidad de la luz dispersada debe estar en el rango específico para que el detector lo pueda medir exitosamente. Si la señal es muy grande el detector puede ser saturado, por lo cual es necesario usar (4) un atenuador para reducir la intensidad del rayo láser y por lo tanto la intensidad de la luz dispersada. (5) Un Correlacionador, es el dispositivo en el que la señal de Intensidad de Dispersión que viene del detector, se hace pasar por un tablero de procesamiento de señal digital (compara la intensidad de dispersión en intervalos de tiempo consecutivos para derivar la velocidad a la que la intensidad es variable). Finalmente los datos obtenidos son analizados mediante un software en (6) una computadora y se obtiene el tamaño de partícula.

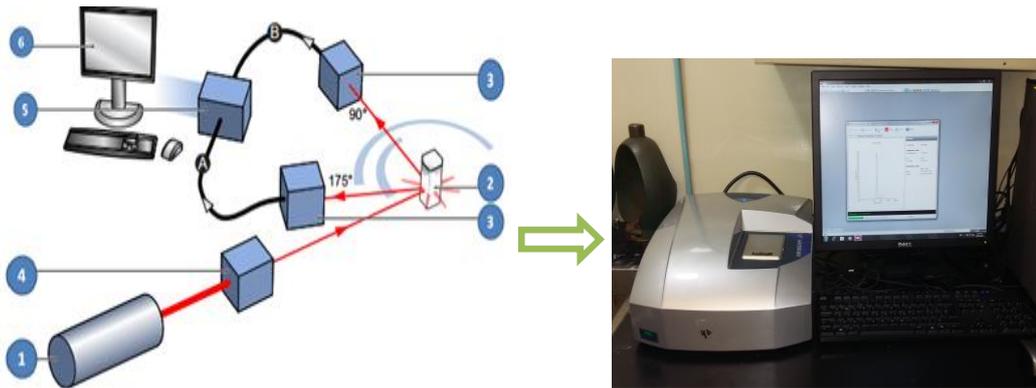


Figura 13: Componentes básicos de un equipo para dispersión dinámica de luz. (Facultad de medicina)

4.3 Microscopia electrónica de barrido (Morfología y tamaño)

El microscopio electrónico de barrido convencional (SEM) es un instrumento cuyo funcionamiento se base en el barrido de una superficie de una muestra, por medio de un haz de electrones cuyo diámetro es disminuido.

En SEM, la imagen se forma punto por punto escaneando un enfoque de haz de electrones a través de la superficie de una muestra sólida. Los electrones primarios penetran en la muestra sólida y son desviados por una gran cantidad de procesos de dispersión elástica. El espectro de energía de electrones que salen de la muestra es recogido por el detector. El sistema da como resultado información específica y dos tipos diferentes de contraste. El contraste topográfico surge principalmente de la señal de electrones secundarios (SE). La topografía de la superficie cuasi tridimensional puede grabarse principalmente debido a SE, es decir, todos los electrones emitidos con energías de salida por debajo de 50 electronvoltio se puede dejar el espécimen solo desde dentro de una fina capa superficial de unos pocos nanómetros de espesor. En este caso, el contraste de la imagen depende del rango angular seleccionado de los electrones recogidos. Además, material de contraste o el contraste atómico numérico se puede obtener mediante el análisis de la energía superior de electrones retrodispersados (BSE), es decir, electrones con energías entre 50 eV y la energía primaria, cuando pasan a través de la

superficie. Este contraste corresponde a un aumento en la intensidad al aumentar la masa atómica media. Una de las características más ventajosas del análisis SEM es la pronunciada profundidad de foco en combinación con el particular método de formación de imágenes: las áreas presentan sombras mientras las áreas empalmadas aparecen oscuras.



Figura 14: Microscopio electrónico de barrido.(EcuRed)

4.4 Calorimetría diferencial de barrido

Capacidad térmica

El flujo de calor está dado en unidades de calor “q” suministradas por unidad de tiempo. La velocidad de calentamiento es el incremento de temperatura T por unidad de tiempo, t:

$$\frac{\text{calor}}{\text{tiempo}} = \frac{q}{t} = \text{Flujo de calor}$$

$$\frac{\text{incremento de temperatura}}{\text{tiempo}} = \frac{\Delta T}{t} = \text{Velocidad de calentamiento}$$

Al dividir el flujo de calor (q/t) entre la velocidad de calentamiento ($\Delta T/t$) tenemos el calor suministrado, dividido entre el aumento de temperatura. La respuesta del sistema al flujo de calor se describe mediante una



importante propiedad termodinámica denominada capacidad térmica que es una propiedad extensiva definida mediante la relación

$$C = \lim_{\Delta T \rightarrow 0} \frac{q}{T_f - T_i} = \frac{\delta q}{dT}$$

Si se transfiere una cierta cantidad de calor al sistema (δq) su temperatura va a aumentar por una cantidad (dT), y la cantidad de calor que se transfiere para conseguir un cierto aumento de la temperatura se denomina capacidad térmica.

El valor de la capacidad térmica depende de las condiciones experimentales bajo las cuales se determina. Las condiciones más comunes son volumen constante o presión constante, para las cuales la capacidad térmica se denota mediante C_v y C_p respectivamente, que también pueden denotarse por:

$$C_v = \left(\frac{\partial U}{\partial T} \right)_v \quad y \quad C_p = \left(\frac{\partial H}{\partial T} \right)_p$$

La capacidad térmica se utiliza en técnicas ampliamente conocidas y caracterizadas, una de las técnicas más frecuentes que se utilizan es la calorimetría diferencial de barrido usada para determinar los efectos térmicos sobre una gran variedad de materiales, incluyendo a los sistemas biológicos. La calorimetría diferencial de barrido involucra aplicaciones como:

- 1) Caracterización térmica de procesos complejos, como la desnaturalización de proteínas.
- 2) Transición vítrea de polímeros.
- 3) Determinación del efecto de hidratación, pH, disolvente y tipo de composición, en una transición de fase.

La DSC monitorea los efectos del calor asociado con las transiciones de fases y las reacciones químicas como una función de la temperatura. En el DSC la diferencia en el flujo de calor de una muestra y una referencia que es un material inerte a la misma temperatura, es registrada como una



función de la temperatura. La temperatura de ambos celdas incrementa a una tasa constante, ya que el DSC trabaja a presión constante, permitiendo la determinación del flujo de calor el cual es equivalente al cambio de entalpia:

$$\left(\frac{dq}{dt}\right)_p = \frac{dH}{dt}$$

Donde dH/dt es el flujo de calor medido en función del tiempo. La diferencia de flujo de calor entre la muestra y la referencia es:

$$\Delta \frac{dH}{dt} = \left(\frac{dH}{dt}\right)_{muestra} - \left(\frac{dH}{dt}\right)_{referencia}$$

Y puede ser positivo o negativo, presentando en el termograma procesos endotérmicos como exotérmicos. En un proceso endotérmico el calor es absorbido, y por lo tanto, el flujo de calor a la muestra es mayor que el de la referencia, entonces $\Delta dH/dt$ es positivo. Algunos ejemplos de estos procesos endotérmicos son las transiciones en el DNA, desnaturalización de proteínas, deshidratación, reacciones de reducción, y algunas reacciones de descomposición. En un proceso exotérmico, tal como la cristalización, algunos procesos de entrecruzamiento, reacciones de oxidación y algunas reacciones de descomposición, el $\Delta dH/dt$ es negativo como se muestra en la figura 15.

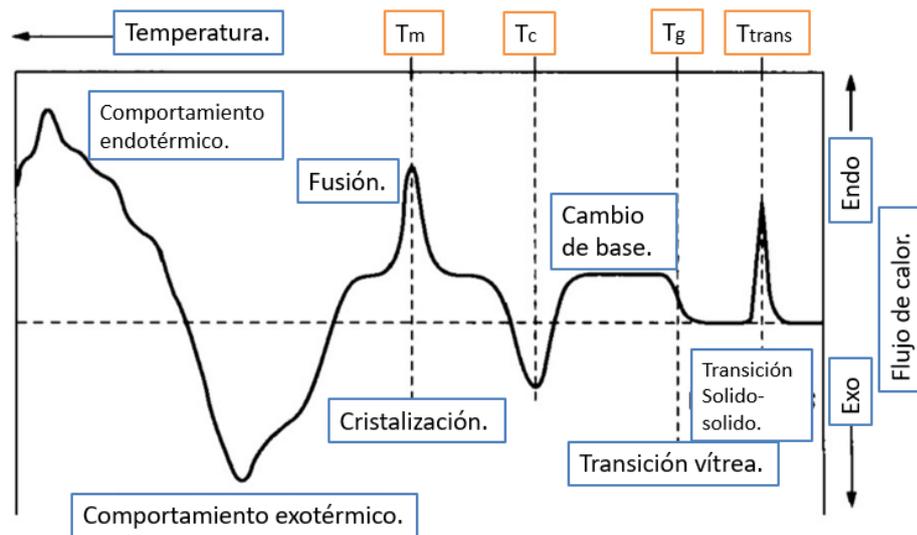


Figura 15: Procesos exotérmicos y endotérmicos por la técnica de DSC. (Rabek J.F. "Experimental Methods in Polymer Chemistry")

El calorímetro consiste de una celda para la muestra y otra para la referencia mostrado en la figura 16. Ambos están contruidos de platino para permitir una temperatura de operación alta. Bajo cada celda hay una resistencia y un sensor de temperatura. Se hace pasar una corriente eléctrica a las dos resistencias para aumentar la temperatura a la tasa seleccionada. La diferencia en la potencia para las dos celdas, necesaria para mantenerlas a la misma temperatura y es usada para calcular $\Delta(dH/dt)$.

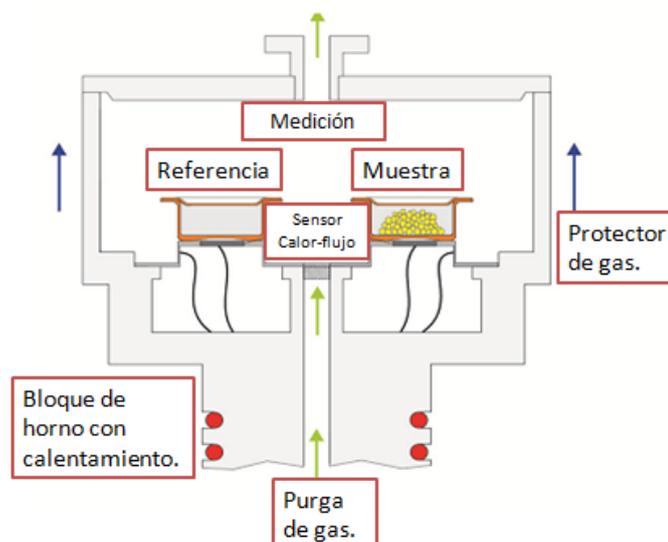


Figura 16: Esquema representativo del calorímetro. (Intek Group SAS)

La DSC proporciona información precisa, rápida y fácil, acerca de las propiedades físicas y energéticas de un material, explora la temperatura y mide la diferencia entre los flujos de calor a una muestra y una referencia que está bajo el mismo programa de temperatura, a presión atmosférica constante.

A partir de DSC se analizan las fases y las transiciones de fase que sufren estructuras complejas como los liposomas al cambiar la temperatura. La respuesta del sistema es monitoreada dando por resultado una traza calorimétrica como la que se presenta en la figura 17, donde el área bajo cada una de las curvas representa el cambio de entalpia asociado a cada una de las transiciones.

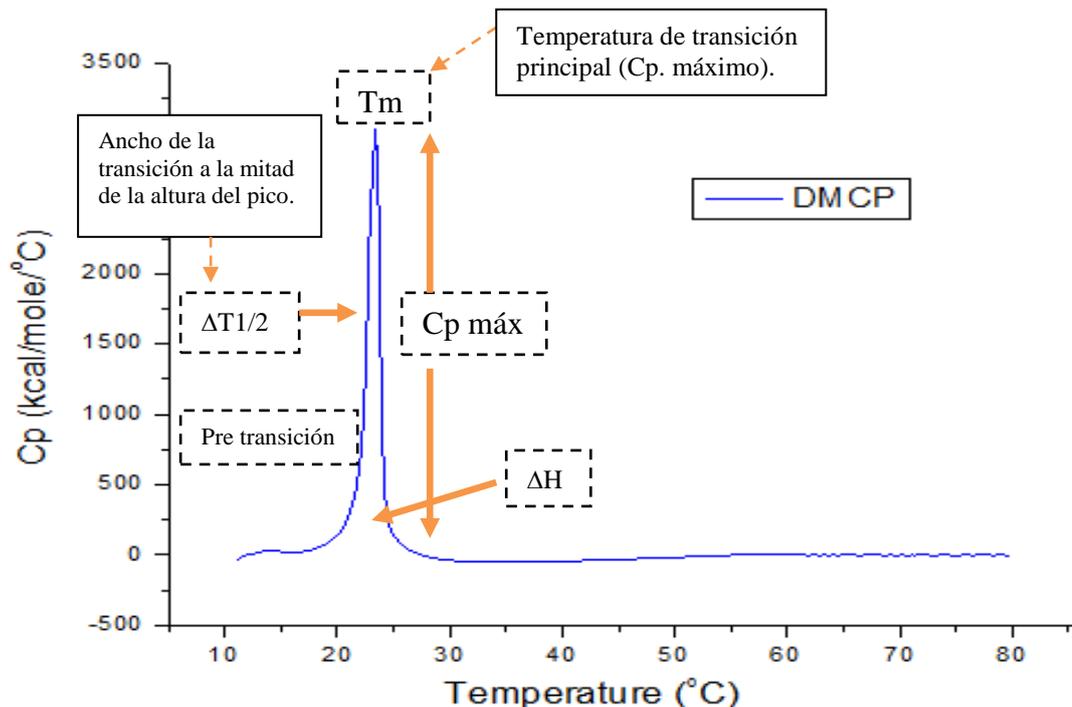


Figura 17: Perfil de transición de fase de liposomas de DMPC. (Facultad de química)

En las fosfatidilcolinas existen cuatro fases estables: fase sub-gel, fase gel, fase ondulada, fase líquido-cristalino desordena y fase fluida. Las correspondientes transiciones de fase son: sub-transición (T_s), que corresponde a la transición de la fase sub-gel a la tipo gel; la pre-transición (T_p), que corresponde a la transición de la fase gel a la fase



ondulada y la transición principal (T_m), que corresponde al cambio de la fase ondulada a la fase fluida.

Sub-transición (T_s): es una transición meta estable cuya aparición (pico endotérmico), depende de la historia térmica de la muestra. Esta transición está asociada con un incremento de desorden en la cadena alifática de los fosfolípidos.

Pre-transición (T_p): esta transición ha estado asociada con un cambio en el empaquetamiento de los fosfolípidos, aunque modelos recientes sugieren que se debe principalmente a un incremento en la hidratación de la bicapa. La ocurrencia de esta pre-transición depende de la naturaleza de la cabeza del fosfolípido, está presente en las fosfatidilcolinas y en los fosfatidilgliceroles, pero no en las fosfatidiletanolaminas y glucolípidos. Esta transición es muy sensible a perturbaciones en la membrana causadas por fármacos, péptidos o proteínas, aunque todavía existe un debate sobre si esto es debido realmente a la interrupción del orden estructural de la cadena alifática o más bien un cambio en la discordancia en el área de la sección transversal entre el grupo de la cabeza polar y colas alifáticas.

Transición principal (T_m): la transición principal es la de mayor entalpía y cooperatividad de las transiciones ya mencionadas. Un gran cambio en el desorden de la membrana y la pérdida de la inclinación de los fosfolípidos acompañan a esta transición.

Utilizando la DSC se pretende estudiar las transiciones de fase gel a líquido-cristalino de las bicapas de fosfolípidos para determinar el efecto que tiene la incorporación de las moléculas de interés para así poder utilizar el sistema como una forma farmacéutica.



Figura 18: Calorímetro diferencial de barrido (Facultad de química)

En este trabajo no se observó en ningún caso la pretransición, en los liposomas, a temperaturas más bajas donde coexisten en estado gel, los fosfolípidos están altamente empaquetados por fuerzas de Van der Waals, en el inicio de transición de fase, los fosfolípidos funden cooperativamente resultando en un estado líquido-cristalino en donde los fosfolípidos están más vagamente asociados, debido a que las fuerzas de Van der Waals están debilitadas entre las cadenas de acilo, como también el debilitamiento de las interacciones de las cabezas polares de los fosfolípidos, y una expansión lateral de las cadenas de acilo. Debido a que estas interacciones débiles de Van der Waals dictan la estructura de la membrana, las longitud de las cadenas de acilo y la identidad del grupo cabeza del fosfolípido son los mejores contribuyentes a los cambios en la naturaleza de la transición de fase de gel a líquido-cristalino.

4.5 Determinación de peso seco para el estudio de la eficiencia del tratamiento.

En este trabajo el método para determinar la eficiencia del tratamiento consiste en la inducción del desarrollo de la neurocisticercosis en ratones hembra BALB/c infectados con 30 cisticercos de *Taenia crassiceps* cepa ORF en el Instituto de Neurología con la colaboración de la Dra. Francisca

Palomares Alonso del Instituto de Neurología. Al grupo blanco solo se le administra carboximetilcelulosa (CMC) como placebo. En el segundo grupo se prueba el método con PZQ ya validado y por último, en un tercer grupo se prueba la suspensión de liposomas con PZQ para determinar si hay un cambio en la biodisponibilidad del fármaco en torrente sanguíneo. El análisis de los resultados se realiza después de pasar 20 días en tratamiento, esa muestra se analiza por medio del procesamiento para peso seco de los parásitos recuperados el cual consiste en homogenizar los parásitos en tubos de 50ml y centrifugar, se decanta el sobrenadante y el botón de membranas se transfiere a viales ámbar previamente pesados. Los viales con membrana se congelan a -70°C por 24h y se liofilizan por 24h más. El residuo se pesa para que se obtenga el peso seco de las membranas de los parásitos para así calcular la eficiencia en base al peso del grupo blanco.

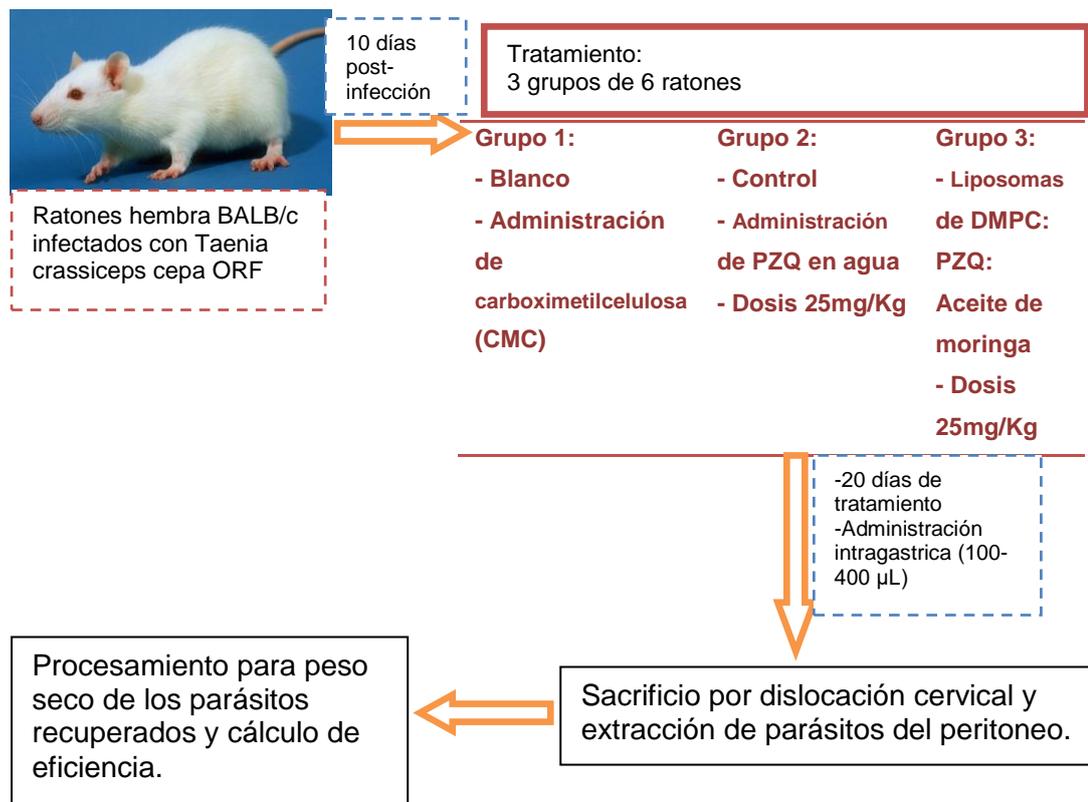


Figura 19: Representación esquemática del proceso de toma de muestra en ratón. (Instituto de Neurología)



CAPITULO 5 EQUIPOS Y REACTIVOS

Reactivos:

DMPC. Marca Sigma Chemical Company . Sólido. Formula condensada $C_{36} H_{72} NO_8P$. Masa molar 677.9 g mol^{-1} . Pureza 99%. Lote 88F-8377. No P-0888. Almacenar a 0°C .

Marca Sigma Chemical Company . Sólido. Fórmula condensada $C_{36} H_{72} NO_8P$. Masa molar 677.9 g mol^{-1} . Pureza 99%. Lote 70H8353. No P-0888. Almacenar a 0°C .

Aceite de moringa Extracto del aceite esencial de las semillas de moringa oleífera por medio de maceración y su posterior concentración en rota evaporador con uso de hexano.

Praziquantel Fórmula química $C_{19}H_{24}N_2O_2$ Masa Molar 312.413g/mol , derivado de pira isoquinolinas, Almacenar en refrigeración con protección a la luz para evitar degradación.

Diclorometano. Marca J.T. Baker. Líquido. Fórmula condensada CH_2Cl_2 . Masa molar 84.93 g mol^{-1} . Pureza 99.98%. Lote T34C64. Punto de ebullición $39-40^\circ\text{C}$. Almacenamiento en un lugar fresco, seco y bien ventilado.

Acetona. Líquido. Fórmula condensada C_3H_6O . Masa molar 58.08 g mol^{-1} . Punto de ebullición 56.5°C . Almacenar a temperatura ambiente.

Etanol. Líquido. Fórmula condensada C_2H_5OH . Masa molar 46.07 g mol^{-1} . Pureza 96 %. Punto de ebullición 78°C . Almacenar a temperatura ambiente.

Alcohol Etílico Absoluto Anhidro. Marca J.T. Baker. Líquido. Fórmula condensada CH_3CH_2OH . Masa molar 46.07 g mol^{-1} . Pureza 99.9%. Lote L46C59. Punto de inflamabilidad 13°C . Almacenar en recipientes bien cerrados, Temperatura ambiente.

Agente limpiador para DSC. Hidróxido de potasio. Contrad 70. Marca Decon Labs. Inc. Almacenar a temperatura ambiente.

Agua destilada y desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.



Equipos:

Balanza analítica. Marca OHAUS. Modelo Analytical Plus, Suiza.

No Serie 1118453077.

Sonicador. Marca Cole-Parmer 8892.

Calorímetro Diferencial de Barrido. Marca MicroCal®

Incorporated. Modelo VP_DSC Microcalorimeter. No serie 06.99.138.
USA.

Desgasificador. Marca MicroCal® Incorporated. Modelo
TermoVac2. No serie 08.00.191. USA.

Dispensador dinámico de luz. Marca Malvern Zetasizer 4V. No de
serie 02288807.

Espectrofotómetro UV-Visible. Marca Varian. Modelo CARY 50.
Australia.

Rotavapor. Marca buchi. Modelo r-3 buchi Suiza.

Desionizador. Marca Simplicity® Millipore. No de serie
F1CA58004 A. Francia.

Extrusor. Marca Lipex No de serie 02212501

CAPITULO 6 METODOLOGÍA

6.1 Preparación de película

Materiales y equipo

El material que se utilizó fue un matraz bola de 50 mL, espátula, vaso de precipitados de 250 mL, nave para pesar, piseta, gradilla de plástico, tubos falcón de 15 mL, pipetas beral, sanitas, pinzas de disección, filtro de 100 nm, jeringas.

El equipo que se utilizó fue un rotavapor® R-3 Buchi, una balanza analítica OHAUS ANALYTICAL Plus, sonicador Cole- Parmer 8892 y extrusor.



Metodología

La preparación del liposoma se realizó por el método de “hidratación de película delgada”. Se lavó todo el material perfectamente con agua, acetona y alcohol para asegurarse de que dentro del matraz no haya partículas pegadas a las paredes, se utiliza una mezcla etanol- agua en la matraz y se sónica por 30 minutos (no se debe utilizar ningún tipo de detergente).

Pesar la cantidad necesaria de DMPC, PZQ, DPPA, Aceite de moringa, en la proporción mol y concentración que se evalúa, en un matraz de bola de 50 ml (tarando), previamente seco y limpio.

- 1) Adicionar el CH_2Cl_2 mínimo necesario para disolver los componentes que se encuentran dentro del matraz (~3ml).
- 2) Agitar el matraz de bola, sin sumergir el matraz en el baño de agua. Esto es con el objetivo de que los componentes se disuelvan en el CH_2Cl_2 uniformemente.
- 3) Retirar el disolvente a una temperatura de 50 °C con ayuda del rotaevaporador y una bomba de vacío 15-20 minutos, cuidar que la manguera que alimenta con agua fría al refrigerante, para evitar que el CH_2Cl_2 se disperse al ambiente y cause un accidente.
- 4) Una vez concluida la evaporación del disolvente, se hidrata la película con H_2O desionizada, buffer de fosfatos o disolución de NaCl, se usa calor para desprender totalmente la película de las paredes del matraz.
- 5) Una vez concluido el paso anterior, sonicar durante 30 minutos posteriormente tapan el matraz con un tapón esmerilado sin ejercer mucha presión al cerrarlo.
- 6) El paso siguiente es llevar los liposomas (MLVs) a extrudir. Esto se hace en un extrusor que cuenta con un baño el cual se ajusta a 45°C, se hace pasar la suspensión de vesículas a través de la membrana de celulosa (0.1 μm o 100nm) la cual se encuentra dentro del extrusor, el proceso se repite al menos 30 veces cambiando el filtro después de pasarla 10 veces.

- 7) Una vez terminado el proceso de homogenización del tamaño de liposomas, el sistema está listo para ser analizado fisicoquímicamente, el cual se almacena a 4°C para el estudio de estabilidad.

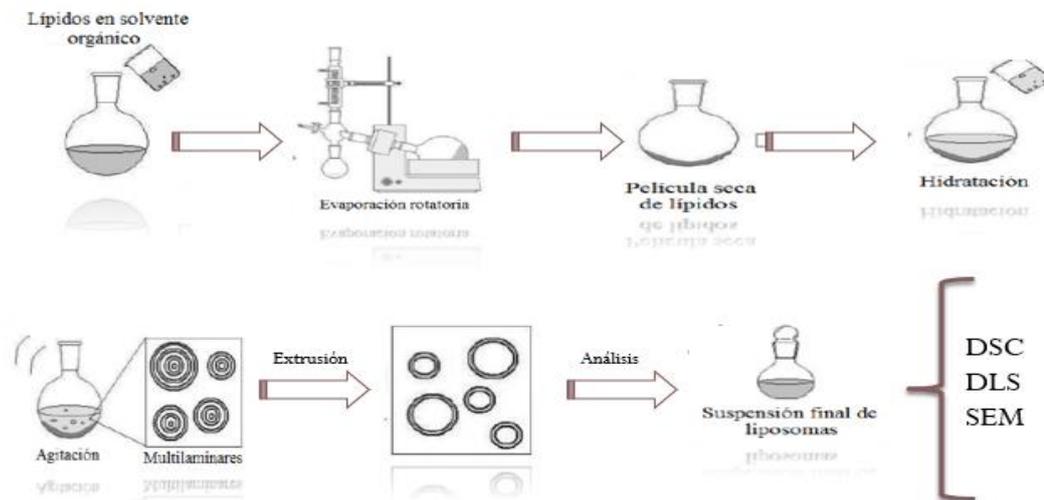


Figura 20: Preparación de liposomas por el método de hidratación de película delgada. (Figura tomada y traducida desde de Araújo Lopes et al. (2013).)

6.2 Determinación de incorporación (DSC)

Material y equipo.

El material necesario fue una jeringa para DSC, vaso de precipitados, toallas de papel, tubos Ependorf, tubos falcon. El equipo que se ocupó fue un Calorímetro Diferencial de Barrido. Marca MicroCal® Incorporated. Modelo VP_DSC Microcalorimeter. No serie 06.99.138. USA y un desgasificador. Marca MicroCal® Incorporated. Modelo TermoVac2. No serie 08.00.191. USA.

Metodología.

Primero se obtuvo la línea base, para esto se desgasificó el agua desionizada y con una jeringa se inyectó el agua en ambas celdas (la de referencia y la otra de muestra). Se llenaron las celdas a un mismo volumen 0.5ml. Fue importante asegurarse de que no hubiera presencia de burbujas en las celdas. Después se ajustaron los parámetros que se utilizaron durante los experimentos. Se dejó correr el programa en el

intervalo de temperaturas que se fijó. Luego de obtener la línea base, se inyectó la muestra y se midió con los mismos parámetros. Una vez que se terminó de usar el equipo se lavó abundantemente solamente con agua desionizada.

Se diseñó un programa en Origin 7 para realizar un experimento de DSC. Este es el software correspondiente a la obtención del termograma del sistema DMPC en agua desionizada. En este caso se hicieron 3 corridas de 5 a 65 °C. El análisis de los resultados permite obtener los parámetros termodinámicos $T_{1/2}$ y T_m .

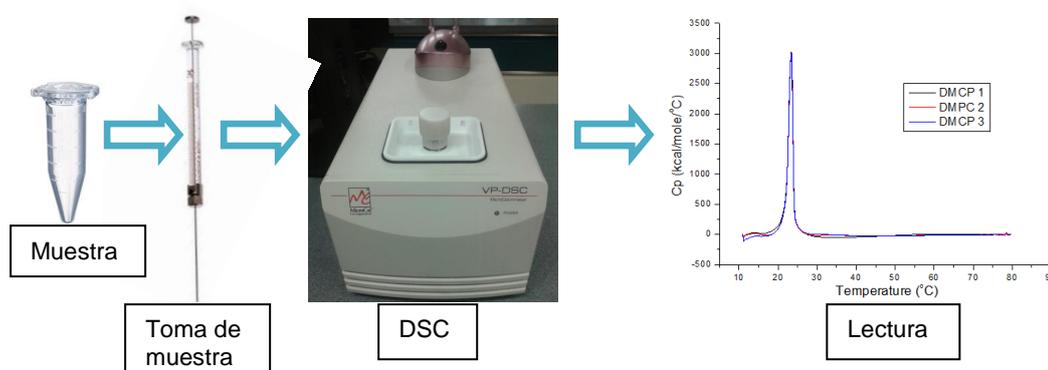


Figura 21: Representación gráfica del proceso para la técnica de DSC. (Facultad de química)

6.3 Determinación de tamaño de partícula (DLS)

Material y equipo.

Se utilizaron tubos ependorf, piseta, celda de plástico para medir tamaño de partícula, papel anti pelusa y vaso de precipitados. El equipo que se usó fue un Dispensor dinámico de luz Marca Malvern Zetasizer 4V. No de serie 02288807.

Metodología

El tamaño de partícula y su distribución se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS) a 25°C. Se colocó la suspensión en la celda hasta la marca que indica el equipo, en la posición adecuada y se ajustaron los parámetros en el software Zetasizer®. La muestra se iluminó con un láser, la intensidad de la luz dispersada se midió mediante el detector. Se

realizaron tres mediciones por muestra. Los tamaños de partícula fueron determinados el día que se hidrató la película o un día posterior.

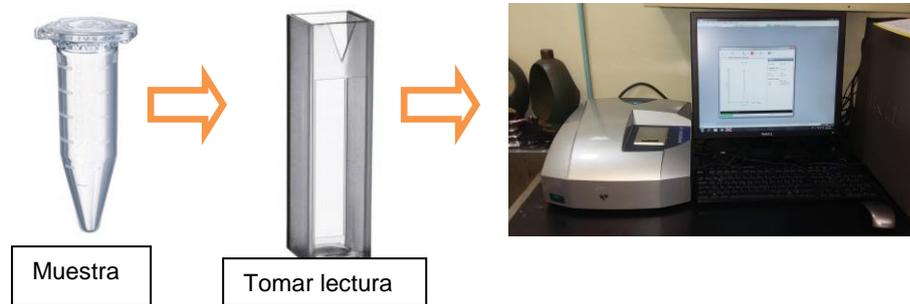


Figura 22: Representación gráfica del proceso para la técnica de DLS. (Facultad de medicina)

6.4 Determinación de morfología y tamaño (SEM)

Material y equipo

Se utilizaron tubos ependorf de 2 mL El equipo que se usó fue un Microscopio electrónico de barrido en el edificio H Mario Molina.

Metodología

Una vez que se obtuvo el sistema liposomal se diluyó la muestra agregando una gota de la pipeta beral y llevando a 2 mL, con agua destilada y desionizada, después se mandó al establecimiento Mario Molina para su análisis.

6.5 Determinación de estabilidad

Material y equipo

Se utilizaron tubos falcón de 15ml, refrigerador a 4°C.

Metodología

Las suspensiones de los diferentes sistemas después y durante su análisis fisicoquímico se procedió a almacenar a 4°C desde la hidratación de la película hasta el análisis de la estabilidad física del sistema.



CAPITULO 7 RESULTADOS

7.1 DMPC hidratado con agua

7.1.1 Termogramas

La calorimetría diferencial de barrido se empleó para determinar la temperatura de inicio de la fusión de las cadenas lipídicas, la transición de fase gel a la fase líquido cristalina y la entalpia representativa de la cooperatividad del proceso.

Dado que la temperatura de transición es sensible a la presencia de compuestos dentro de la bicapa, este estudio se realizó para probar la buena manufactura de los liposomas.

En este trabajo, no se observó la subtransición (T_s) en ninguno de los sistemas estudiados.

La pre transición (T_p) ocurre entre los 5 a los 10 °C por debajo de la temperatura de transición principal, y una pequeña entalpia. Ésta se ha explicado en términos de cambios estructurales en la red cristalina lamelar, con la reorganización de la bicapa de un estado lamelar unidimensional distorsionado a una red monocónica de dos dimensiones que constan de laminillas de lípidos distorsionados por las ondulaciones periódicas.

El cambio entre la fase gel y la fase liquido-cristalina se debe al aumento de la temperatura, que provoca como resultado la reorganización de las estructuras de los fosfolípidos.

La orientación de las uniones carbono-carbono cambia de una configuración trans en el estado gel a un estado desordenado que contiene varias conformaciones de Gauches dando como resultado una transición a un estado cristalino líquido.

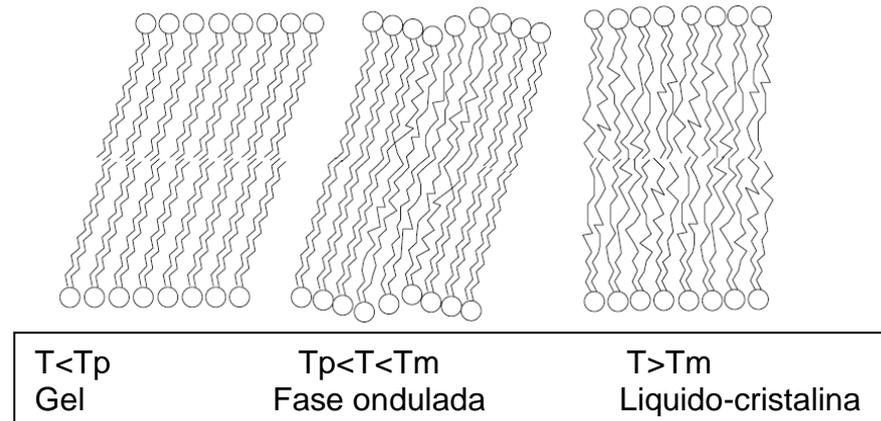
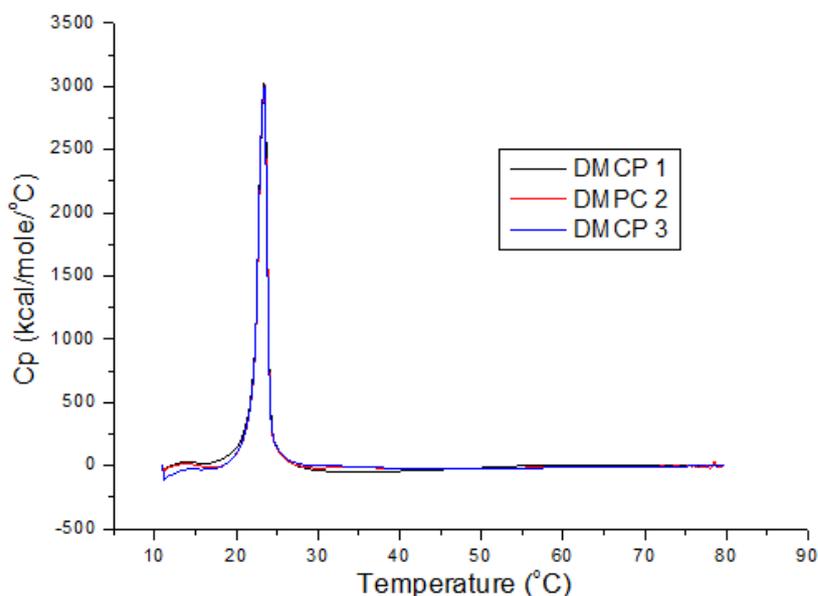


Figura 23: Representación esquemática de la alineación de las cadenas de acilo para formar una doble capa de moléculas. Gel en estado cuasi cristalino ($T < T_p$), fase ondulada ($T_p < T < T_m$) y en el estado líquido cristalino ($T > T_m$). (Costas Demetzos (2008) Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal Stability)

La temperatura de transición (T_m) de fase principal está determinada en gran medida por el grupo de la cabeza polar, junto con la longitud y grado de insaturación de las cadenas de hidrocarburos.

Los fosfolípidos que tienen el mismo grupo de cabeza con cadenas de hidrocarburos más largas tienen una mayor temperatura de transición, así como la entalpia asociada, a comparación de aquellos fosfolípidos con cadenas más cortas, además con cadenas insaturadas trans tienen una T_m más alta esto se puede atribuir a la alteración del empaquetamiento lipídico dentro de la bicapa en comparación con los que son insaturados cis.



Gráfica 1: Termograma para el sistema DMCP. Esta determinación se hizo por triplicado obteniéndose siempre la misma traza.

Tabla 4: Parámetros termodinámicos para el sistema DMPC 30mM en agua.

Liposomas DMPC	T Rango(°C)	$\Delta H(kcal/mol)$	$T_m(^{\circ}C)$	$T_{1/2}(^{\circ}C)$
30mM	16.6 --> 32.4	4879.4±109	23.4±0.1	1.25

En la gráfica 1 se muestra un termograma en el que se registra de forma continua la capacidad térmica (C_p) de la solución de liposomas de DMPC 30Mm en función de la temperatura, dicho termograma se caracteriza por un ligero pico de absorción de calor correspondientes a un proceso de pre transición que se realiza a una temperatura aproximada de 10-15°C y otro pico evidente de transición térmica inducida que se realiza a una temperatura $T_m=23.4^{\circ}C$, ambas corresponden a procesos endotérmicos. Empleando el software ORIGIN 7 se calculó el área bajo la curva, el valor obtenido es el promedio del cambio de entalpia para la transición principal de las tres corridas.

La tabla 4 reporta los parámetros termodinámicos obtenidos.

7.1.2 Estabilidad del sistema

Tabla 5: Estudio de estabilidad del sistema DMPC.

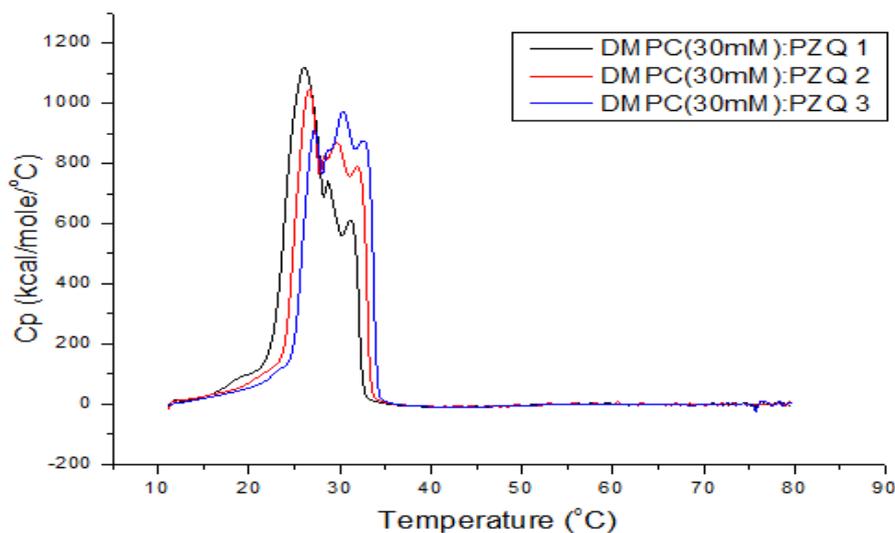


Día 1	Día 2	Día 3
Suspensión estable, lechosa.	Suspensión estable, lechosa.	Suspensión floculada.

Como se muestra en la tabla 5 se observa la estabilidad física del sistema. Para el sistema DMPC hidratado con agua fue estable por un periodo de dos días, debido a que el sistema tiene una alta concentración de fosfolípidos, a pesar de que este sistema presenta una población de liposomas.

7.2 DMPC: PZQ hidratado con agua

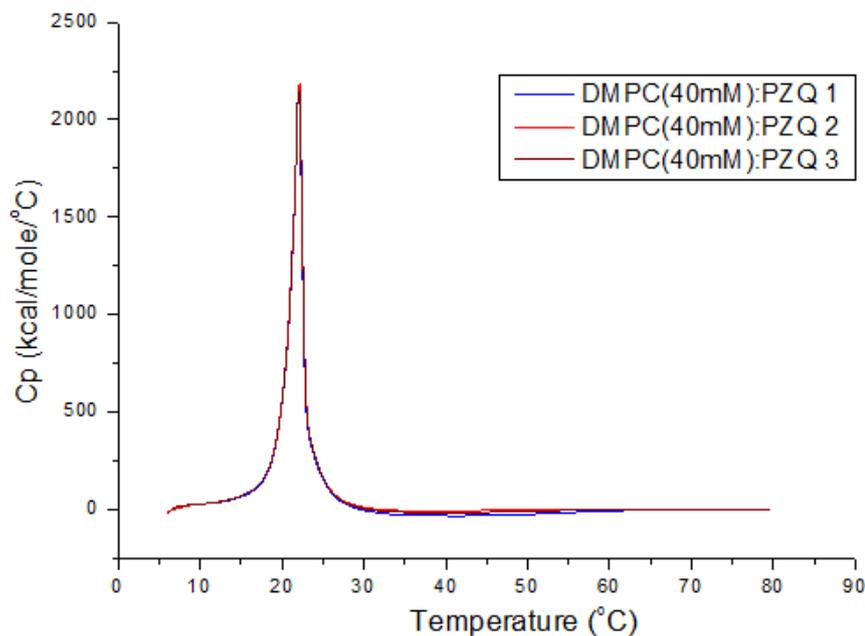
7.2.1 Termogramas



Gráfica 2: Termogramas para todos los sistemas DMCP: PZQ. Esta determinación se hizo por triplicado obteniéndose siempre la diferente traza.



En la gráfica 2 se muestra el termograma para la solución de liposomas de DMPC (30mM): PZQ . A partir de éste se puede observar que el praziquantel interacciona con las cadenas de acilo del DMPC, ya que todo el perfil se modifica con respecto al termograma correspondiente al fosfolípido puro, esta prueba se descartó ya que durante la manufactura de los liposomas se observó gran cantidad de fármaco que al momento de hidratar con agua destilada y desionizada y se dedujo que la cantidad de PZQ es superior a la que puede ser encapsulada, lo que derivó en aumentar la concentración de DMPC a 40mM.



Gráfica 3: Termograma para el sistema DMCP: PZQ. Esta determinación se hizo por triplicado obteniéndose siempre la misma traza.

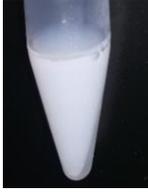
Tabla 6: Parámetros termodinámicos del sistema DMCP: PZQ

Liposomas DMPC (40mM): PZQ	T Rango(°C)	$\Delta H(Kcal/mol)$	$T_m(^{\circ}C)$	$T_{1/2}(^{\circ}C)$
	11.6 --> 35.2	5637.5 ± 163.9	22.1 ± 0.1	1.5

En la gráfica 3 se muestra el termograma para la solución de liposomas de DMPC:PZQ. A comparación con el termograma con DMPC, no se observa un cambio aparente en el ancho del pico de absorción de calor, el proceso de transición principal se presentó a $T_m=22.08^\circ\text{C}$ y un cambio de entalpia de 5637.5kcal/mol ; 758.1kcal/mol mayor que en el caso de la solución de liposomas de DMCP puro, es decir en este caso se necesita más energía para realizar la transición de un estado gel a liquido-cristalino.

7.2.2 Estabilidad del sistema

Tabla 7: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ.

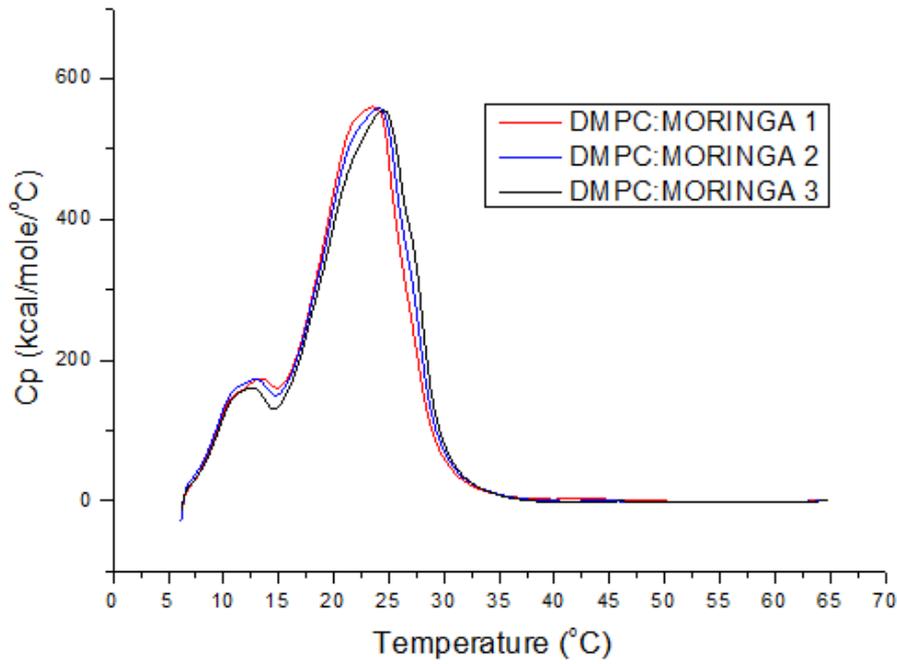
				
Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Suspensión estable, lechosa.	Suspensión estable, lechosa.	Suspensión estable, lechosa.	Suspensión estable, lechosa.	Suspensión floculada.

Como se puede ver en la tabla 7 se determinó la estabilidad física del sistema DMPC: PZQ hidratado con agua en condiciones de refrigeración a 4°C . El sistema es estable por un periodo de 4 días, es más estable a comparación del sistema con el fosfolípido puro, esto se deber a que en el sistema el PZQ una molécula hidrofílica por tanto se encapsula en el centro acuoso sin afectar la interacción fosfolípido-fosfolípido presentando una población de liposomas igualmente que el sistema con fosfolípido puro.

7.3 DMPC: ACEITE DE MORINGA hidratado con agua

7.3.1 Termogramas

Sistema DMPC(40mM): ACEITE DE MORINGA HIDRATADO CON AGUA



Gráfica 4: Termogramas de los sistemas de DMPC: MORINGA. Esta determinación se hizo por triplicado obteniéndose siempre la misma traza.

Tabla 8: Parámetros termodinámicos de los sistemas de DMPC: MORINGA.

Liposomas

DMPC(40mM): MORINGA

T Rango(°C)	$\Delta H(kcal/mol)$	$T_m(^{\circ}C)$	$T_{1/2}(^{\circ}C)$
6.2 --> 40	6278.4±77	23.9±0.5	9.5±0.4

En la gráfica 4 se muestra el termograma para la solución de liposomas de DMPC: ACEITE DE MORINGA. A partir de éste se puede concluir que el aceite de moringa se incorpora al liposoma de DMPC ya que el perfil obtenido aquí con respecto al del fosfolípido puro, que se muestra en la gráfica 1, se necesitan 1399kcal/mol más para la transición de fase en las transiciones obtenidas. Ambas son procesos endotérmicos es decir, necesita energía. Con respecto al $T_{1/2}$ se puede decir que las moléculas

no son cooperativas en la transición para pasar de una fase gel a líquido cristalina.

7.3.2 Estabilidad del sistema

Tabla 9: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: MORINGA.

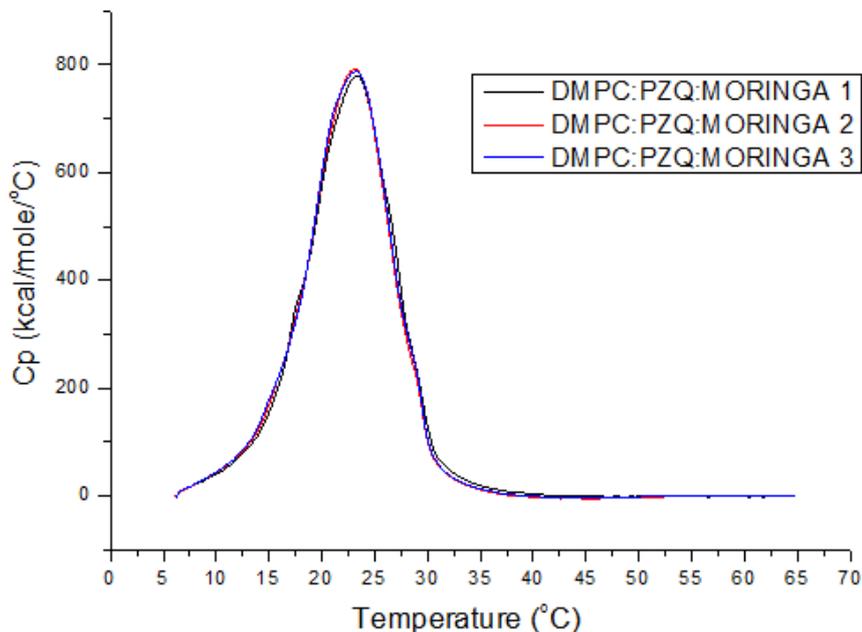
			
Día 1 Suspensión estable, translúcida.	Día 5 Suspensión estable, translúcida.	Día 10 Suspensión estable, translúcida.	Día 15 Suspensión estable, translúcida.
			
Día 20 Suspensión estable, translúcida.	Día 25 Suspensión estable, translúcida.	Día 29 Suspensión estable, translúcida.	Día 30 Suspensión floculada.

Como se puede ver en la tabla 9 se determinó la estabilidad física de la suspensión de liposomas DMPC: MORINGA. En comparación con la suspensión de DMPC puro este presenta una mayor estabilidad a pesar de que presenta más de una población, esto se pudo deber a una interacción del aceite con las cadenas de acilo que estabiliza el sistema obteniendo una duración de 29 días estable hasta su floculación.

7.4 DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con agua

7.4.1 Termogramas

Sistema DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA



Gráfica 5: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA. Esta determinación se hizo por triplicado obteniéndose siempre la misma traza.

Tabla 10: Parámetros termodinámicos del sistema DMPC: PZQ: MORINGA

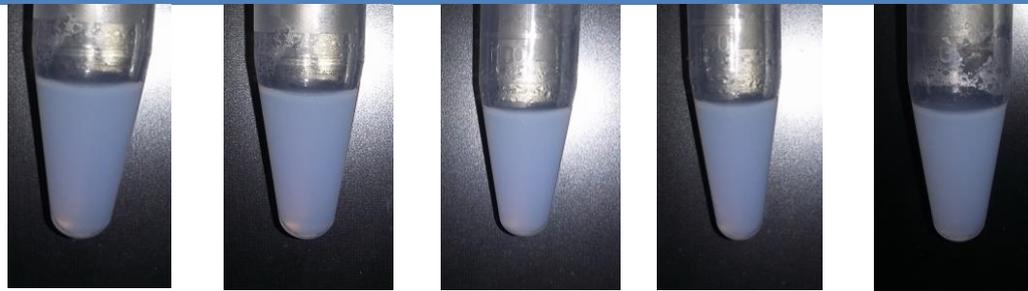
Liposomas	T Rango(°C)	$\Delta H(kcal/mol)$	$T_m(^{\circ}C)$	$T_{1/2}(^{\circ}C)$
DMPC(40mM): PZQ: MORINGA	6.3 --> 42.2	8028.2±63.5	23.2±0.1	8.9±0.3

La gráfica 5 nos muestra el termograma del sistema DMPC: PZQ: MORINGA por duplicado, así se comprueba la reproducibilidad del mismo. Comparando con los termogramas anteriores, éste se caracteriza por no presentar el pico del proceso de la pre transición, indicando que posiblemente la presencia del aceite tenga un efecto directo sobre la bicapa lipídica ya que anteriormente se demostró que el aceite de moringa se intercala en las cadenas de acilo debido a su hidrofobicidad dado a las características del liposoma. La temperatura de transición disminuye pero la entalpía es mayor en comparación al puro que se

muestra en la gráfica 1, es decir en este caso se necesita más energía para realizar la transición de un estado gel a líquido-cristalino. Con respecto a la $T_{1/2}$, que está relacionada con la cooperatividad de los liposomas para el cambio de transición, no es cooperativo porque las moléculas de interés interactúan con las cadenas de acilo del fosfolípido.

7.4.2 Estabilidad del sistema

Tabla 11: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ: MORINGA.



Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5
Suspensión estable, translúcida.				



Día 6	Día 7	Día 8	Día 9
Suspensión estable, translúcida.	Suspensión estable, translúcida.	Suspensión estable, translúcida.	Suspensión floculada.

Como se puede observar en la tabla 11 se determinó la estabilidad física del sistema DMPC: PZQ: MORINGA a 4°C. El sistema es estable por un



periodo de 8 días hasta presentar flóculo. En comparación con el sistema de fosfolípido puro este sistema presenta dos poblaciones desfavoreciendo al sistema pero es más estable, esto se puede deber a que el aceite de moringa actúa como un estabilizador del sistema.

7.5 Parámetros termodinámicos de los sistemas hidratados con agua

Tabla 12: Resultados termodinámicos de todos los sistemas de liposomas caracterizados por DSC.

Sistema liposomal	$\Delta H(\text{kcal mol}^{-1})$	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
DMPC	4879.4±109	23.4±0.1	1.25
DMPC(40mM) : PZQ	5637.5±163.9	22.1±0.1	1.5
DMPC(40mM) : Aceite de moringa	6278.4±77	23.9±0.5	9.5±0.4
DMPC(40mM) : PZQ : Aceite de moringa	7187.1±59	21.1±0.4	7.5±1.1

La tabla 12 presenta los parámetros termodinámicos de todos los sistemas de liposomas estudiados. Se observa que al adicionar una molécula, se requiere de más energía para llevar a cabo la transición de fase. Con respecto a T_m , se nota un mayor desplazamiento de ésta cuando está presente el praziquantel debido a que durante la manufactura se notaron cristales del fármaco que no se encapsularon. Por último, la $T_{1/2}$ del sistema que indicó una cooperatividad para el cambio de fase es el sistema DMPC (40mM): PZQ debido a que el PZQ está encapsulado en el centro acuoso sin intervenir con las interacciones de las cadenas de acilo.



7.6 Tamaño de partícula para los sistemas hidratados con agua

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) es una herramienta muy útil para la determinación de tamaños de partícula, los experimentos de dispersión dinámica de luz se realizaron mediante el equipo MALVERN ZETASIZER mediante el programa Zetasizer Software®. Se obtuvieron distribuciones de tamaño de liposomas de los diferentes sistemas como se muestra en la tabla 13.

Tabla 13: Tamaños de partícula de los sistemas liposomales hidratados con agua.

No. de extrusiones	Muestra	Población 1(nm)	Población 2(nm)	Población 3(nm)
20	DMPC 30mM	179.2 ± 13.6		
20	DMPC 40mM + PZQ	150.1±3		
30	DMPC 40mM + Aceite de moringa	133.9±28.1	134±210.6	6.1±10.6
20	DMPC 40mM + PZQ + Aceite de moringa	41.8±11.1	180.3±28.6	

Como se observa en la tabla 13, al extrudir la muestra de 20 veces se puede obtener 1 población en los sistemas DMPC 30mM y DMPC 40mM + PZQ, en el caso del sistema DMPC 40mM + PZQ + Aceite de moringa no ocurre esto a pesar de usar el mismo método haciendo que el sistema sea más inestable ya que con dos poblaciones y el movimiento browniano en la suspensión se flocula más rápido. Cuando se realizan 30 extrusiones se obtiene más de una población, como los mostrados en el sistema DMPC40mM + Aceite de moringa haciendo al sistema más inestable.

7.7 Morfología y tamaño de partícula para los sistemas hidratados con agua

En el sistema de liposomas DMPC 30mM hidratados con agua destilada y desionizada se obtuvo como resultado una población de liposomas tubulares. Para el caso del sistema DMPC (30mM): PZQ se obtuvo una población de liposomas ovalados, en este caso durante la manufactura se pudieron observar cristales del fármaco, por ello se tuvo que aumentar la concentración de DMPC a 40mM para así poder incorporar la concentración deseada del fármaco (1.25mg/ml). Para el sistema de DMPC: MORINGA los liposomas presentan morfología tanto tubular como ovalados. Para el sistema DMPC: PZQ: MORINGA se pudo determinar que los liposomas presentan una morfología ovalada con dos poblaciones de tamaño de partícula.

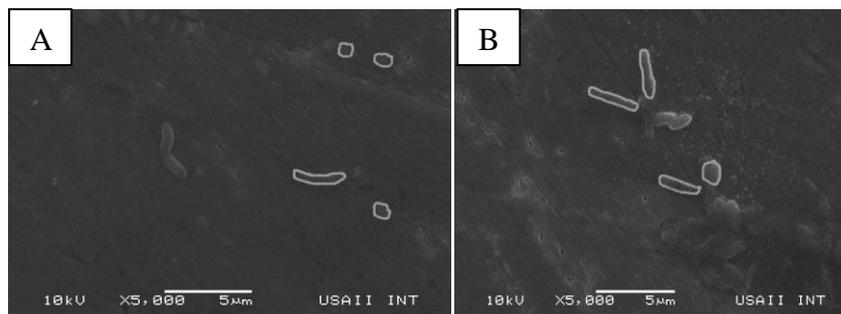


Figura 24: A y B Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (30mM). (Edificio H Mario Molina)

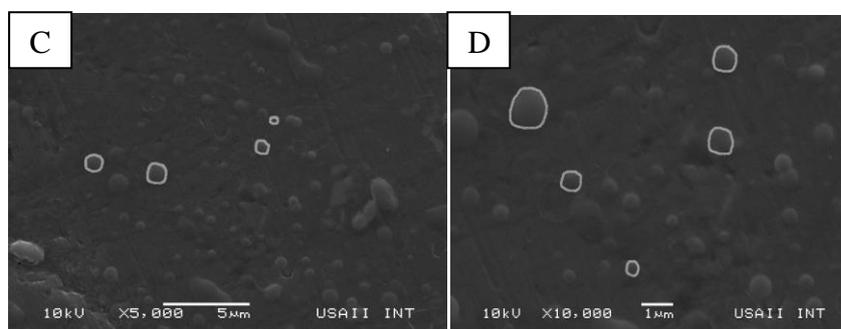


Figura 25: C y D Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (30mM): PZQ. (Edificio H Mario Molina)

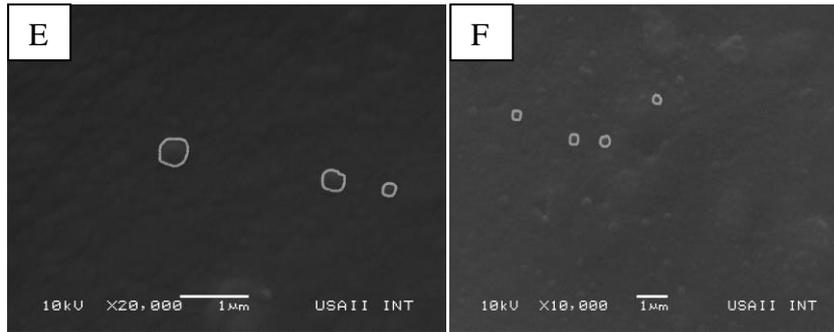


Figura 26: E y F Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (40mM): PZQ. (Edificio H Mario Molina)

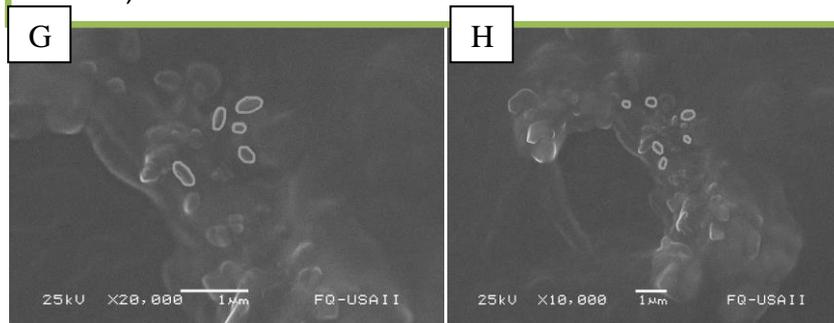


Figura 27: G y H Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (40mM): ACEITE DE MORINGA. (Edificio H Mario Molina)

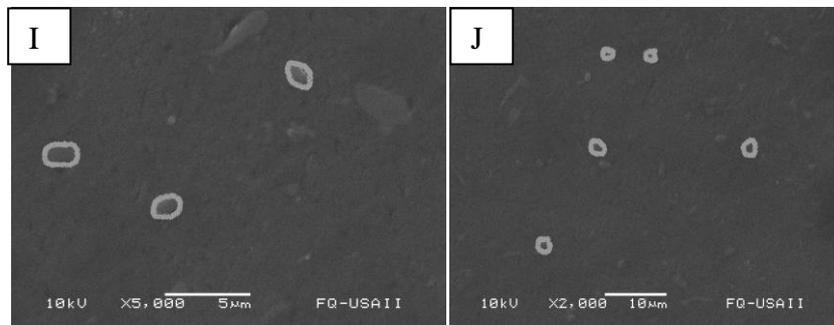


Figura 28: I y J Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC (40mM): PZQ: ACEITE DE MORINGA. (Edificio H Mario Molina)



7.8 Estabilidad física de los sistemas hidratados con agua

Tabla 14: Parámetros de estabilidad de los sistemas liposomales.

N de extrusiones	Sistemas de liposomas	Floculación del sistema(días)	Poblaciones
20	DMPC	3	1
20	DMPC: PZQ	5	1
30	DMPC: Aceite de moringa	30	3
20	DMPC : PZQ: Aceite de moringa	9	2

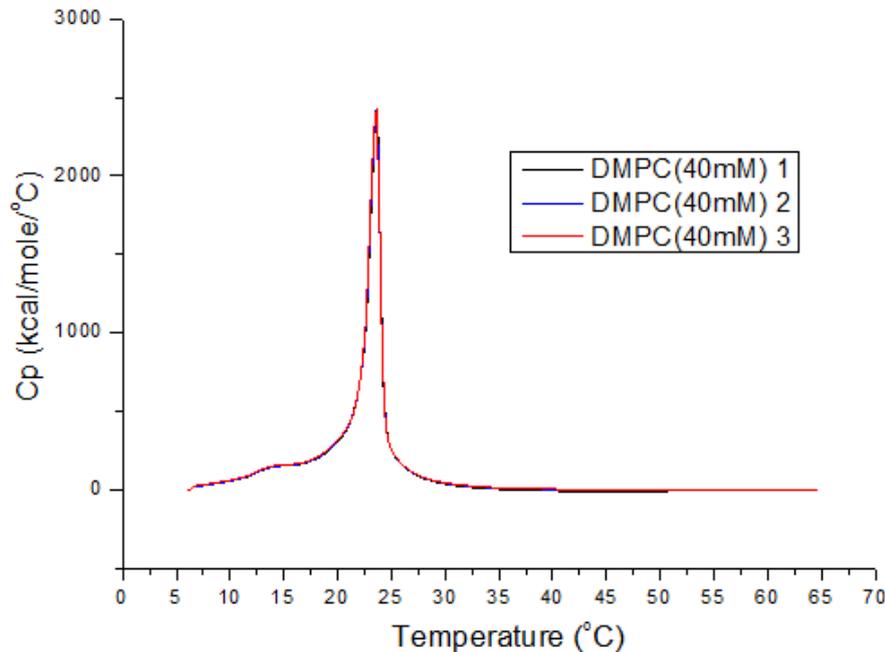
Con respecto a la estabilidad de los sistemas, se optó por extrudir la suspensión más veces para obtener el tamaño de partícula con menor dispersión, lo que hace más estable al sistema. Los resultados mostraron que no se consiguió el efecto deseado ya que tanto el aceite como el fármaco afectaron el tamaño como se puede ver en la tabla 14. El sistema DMPC: MORINGA fue el más estable a pesar de tener tres poblaciones mientras que el menos estable fue el sistema que contiene el fosfolípido puro. Un punto a notar es que el aceite de moringa estabiliza el sistema ya que cuando se le adiciona al sistema DMPC: PZQ este prácticamente duplica su estabilidad física.

7.9 DMPC hidratado con PBS

7.9.1 Termogramas

Sistemas de liposomas hidratados con un buffer de fosfatos

DMPC



Gráfica 6: Termogramas de los sistemas de DMPC. Esta determinación se hizo por triplicado obteniéndose siempre la misma traza.

Tabla 15: Parámetros termodinámicos de los sistemas liposomales hidratados con PBS.

Liposomas	T Rango(°C)	$\Delta H(kcal/mol)$	$T_m(^{\circ}C)$	$T_{1/2}(^{\circ}C)$
DMPC				
40mM	6.2--> 38.3	6891.4±132.7	23.5±0.1	1.2

En la gráfica 6 se muestran los termogramas en los que se registra de forma continua la capacidad térmica (C_p) de la suspensión de liposomas de DMPC 40mM en función de la temperatura. El termograma se caracteriza por dos picos de absorción de calor correspondientes a un proceso de pre transición que se realiza a una temperatura entre 10-15°C. El otro pico corresponde a la transición principal del sistema que se

realiza a una temperatura $T_m=23.5\pm 0.1^\circ\text{C}$ ambas corresponden a procesos endotérmicos. En comparación con el termograma del sistema de DMPC hidratado con agua, éste se desplaza a la derecha alrededor de 5°C y se infiere que esto se debe a la presencia del PBS.

7.9.2 Estabilidad del sistema

Tabla 16: Estudio de estabilidad del sistema DMPC.



Día 1

Suspensión estable.

Día 2

Suspensión estable.

Día 3

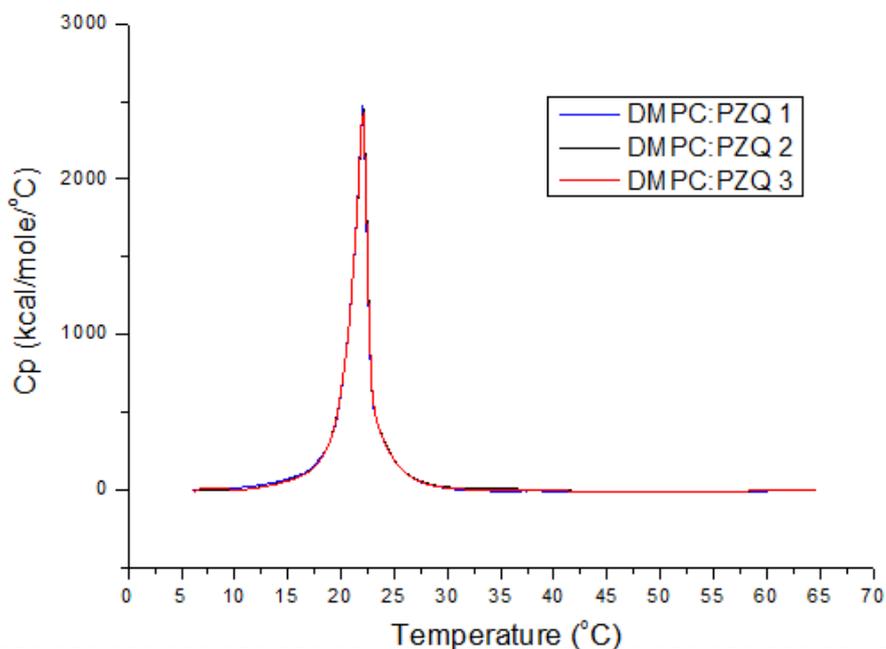
Suspensión floculada.

La determinación de la estabilidad física se puede observar en la tabla 16 del sistema DMPC hidratado con PBS a 4°C . El sistema tiene un periodo de estabilidad de 2 días, las mediciones muestran que presenta más de una población de liposomas lo que hace que estos choquen y se aglomeren culminando en flóculo.

7.10 DMPC: PZQ hidratado con PBS

7.10.1 Termogramas

En la gráfica 7 se presenta la traza calorimétrica del sistema DMPC: PZQ



Gráfica 7: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ hidratados con PBS. Esta determinación se hizo por triplicado obteniéndose siempre la misma traza.

Tabla 17: Parámetros termodinámicos del sistema DMPC: PZQ

Liposomas

DMPC(40mM): T Rango(°C) $\Delta H(kcal/mol)$ $T_m(^{\circ}C)$ $T_{1/2}(^{\circ}C)$
PZQ

6.2 --> 32.9	6473.6±40.6	22.1	1.5
--------------	-------------	------	-----

En la gráfica 7 se muestra el termograma para la suspensión de liposomas de DMPC: PZQ hidratado con buffer de fosfatos. Comparado con los termogramas de DMPC puro, se muestra un cambio en las temperaturas de transición. En cuanto a las magnitudes de los parámetros termodinámicos de este sistema, no hay un cambio aparente en el $T_{1/2}$ del pico, éste no presenta cooperatividad de las moléculas para la transición de fase. El proceso de transición principal se realiza a $T_m=22.09^{\circ}C$ y el cambio de entalpia es de $6473.6kcal/mol^{\circ}C$.

7.10.2 Estabilidad del sistema

Tabla 18: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ.

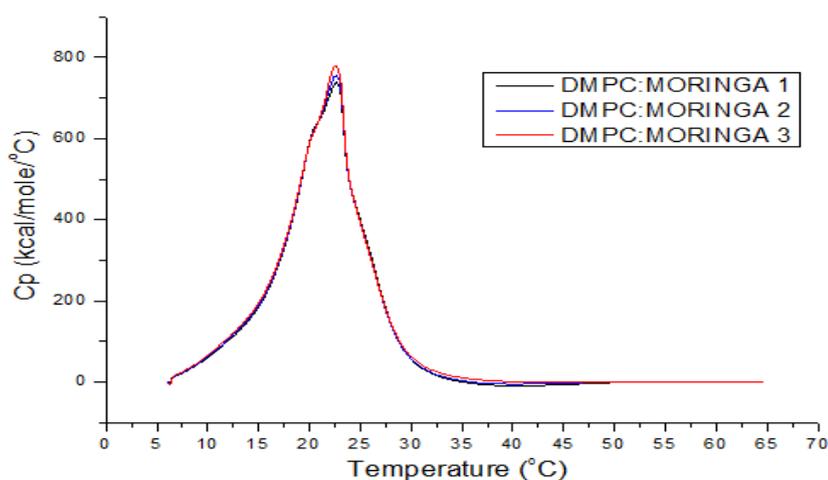
		
Día 1	Día 2	Día 3
Suspensión estable.	Suspensión estable.	Suspensión floculada.

La tabla 18 presenta la estabilidad física del sistema DMPC: PZQ a 4°C. La suspensión presenta flóculo a los tres días a pesar de que éste solo tiene una población. A comparación con en fosfolípido puro este presenta el mismo lapso de estabilidad a pesar de que éste sistema tiene PZQ. En comparación con el sistema DMPC: PZQ hidratado con agua éste sistema disminuye su estabilidad física a solo dos días.

7.11 DMPC: ACEITE DE MORINGA hidratado con PBS

7.11.1 Termogramas

DMPC: ACEITE DE MORINGA



Gráfica 8: Termogramas de los sistemas de DMPC: MORINGA hidratados con PBS. En la gráfica se presenta la traza calorimétrica por triplicado.

Tabla 19: Parámetros termodinámicos para los sistemas de DMPC: MORINGA hidratados con PBS.

Liposomas

DMPC(40mM): T Rango(°C) $\Delta H(kcal/mol)$ $T_m(^{\circ}C)$ $T_{1/2}(^{\circ}C)$

Aceite de moringa

6.3 --> 40.7 6681.3±129.3 22.6 7±0.2

En la gráfica 8 se muestra el termograma para la suspensión de liposomas de DMPC:MORINGA hidratado con buffer de fosfatos. Tomando como referencia el termograma de DMPC solo, se presentó un cambio de temperaturas a las cuales que caracterizan las transiciones. Para las magnitudes de $T_{1/2}$ hay un cambio aparente resultando en menor cooperatividad debido a que el aceite, por ser hidrofílico, se intercala en las cadenas de acilo del fosfolípido. El proceso de transición principal se realiza a $T_m=22.64^{\circ}C$ y el cambio de entalpía es de 6681.3kcal/mol.

7.11.2 Estabilidad del sistema

Tabla 20: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: MORINGA.



Día 1	Día 2	Día 3
Suspensión estable.	Suspensión estable.	Suspensión floculada.

La tabla 20 muestra los resultados de la determinación de estabilidad física del sistema DMPC: MORINGA a 4°C. Éste sistema flocula a los tres días a pesar de tener aceite de moringa el cual, en los sistemas hidratados con agua, actúa como estabilizador. A comparación con el

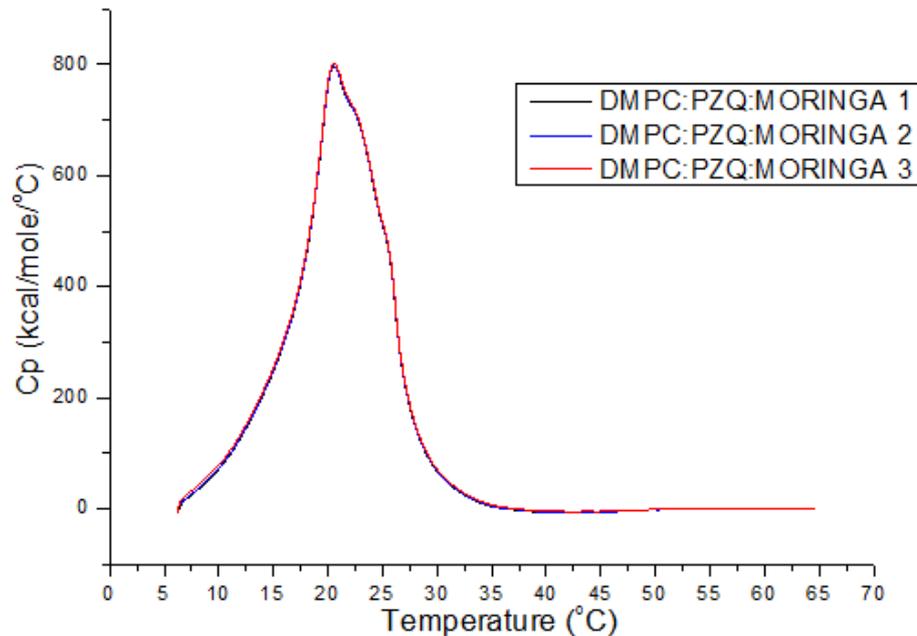


sistema de fosfolípido puro este presenta la misma estabilidad, no afectándole la presencia del aceite de moringa.

7.12 DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con PBS

7.12.1 Termogramas

DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA



Gráfica 9: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con PBS. En la gráfica se presenta la traza calorimétrica por triplicado.

Tabla 21: Parámetros termodinámicos obtenidos por DSC para los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con PBS.

liposomas

DMPC(40mM): T Rango(°C) ΔH(kcal/mol) Tm(°C) T1/2(°C)

PZQ:

MORINGA

6.2 --> 39.2	7896.8±87.2	20.5±0.1	8.6
--------------	-------------	----------	-----

En la gráfica 9 se muestra el termograma para la suspensión de liposomas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con buffer de fosfatos.

En éste se presenta un cambio aparente en el T1/2 presentando menor

cooperatividad de las moléculas para la transición de fase ya que el aceite por ser hidrofílico se intercala en las cadenas de acilo del fosfolípido. El proceso de transición principal se realizó a $T_m=22.64^\circ\text{C}$ para el cual se obtuvo un cambio de entalpia de 1005.4kcal/mol más que el sistema con el fosfolípido puro.

7.12.2 Estabilidad del sistema

Tabla 22: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ: MORINGA.



Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Suspensión estable.	Suspensión estable.	Suspensión estable.	Suspensión floculada.

Como se observa en la tabla 22 se presentan los resultados de estabilidad para el sistema DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con PBS a 4°C . Se determinó que el sistema tiene un lapso de estabilidad de 3 días. A comparación con el sistema de DMPC puro este es más estable un día, a pesar de que este sistema presenta más de una población.



7.13 Parámetros termodinámicos de los sistemas hidratados con PBS

Tabla 23: Parámetros termodinámicos de los sistemas liposomales.

Sistema liposomal	$\Delta H(\text{kcal mol}^{-1})$	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
DMPC(40mM)	6891.4±132.7	23.5±0.1	1.2
DMPC(40mM) : PZQ	6473.6±40.6	22.1	1.5
DMPC(40mM) : Aceite de moringa	6681.3±129.3	22.6	7±0.2
DMPC(40mM) : PZQ : Aceite de moringa	7896.8±87.2	20.5±0.1	8.6

La tabla 23 muestra los parámetros termodinámicos de los sistemas hidratados con PBS. Los sistemas DMPC: PZQ y DMPC: MORINGA necesitan menos energía que el sistema con el fosfolípido puro para poder llevar a cabo la transición de fase, obteniendo termogramas completamente diferentes para el sistema DMPC: PZQ presenta cooperatividad para la transición como el del DMPC puro. Para el sistema DMPC: MORINGA este disminuye su cooperatividad debido al aceite con respecto al del fosfolípido puro debido al aceite. Por último el sistema DMPC: PZQ: MORINGA este sistema requiere más energía, presentando menor cooperatividad y cambiando la temperatura a la cual se lleva a cabo la transición principal con respecto al sistema DMPC.

7.14 Tamaño de partícula para los sistemas hidratados con PBS

La técnica de dispersión dinámica de luz (DLS) es la herramienta utilizada para la determinación de tamaños de partícula. Los experimentos de



dispersión dinámica de luz se realizaron en el equipo MALVERN ZETASIZER programa Zetasizer Software, mediante DLS se han obtenido distribuciones de tamaño de liposomas de los diferentes sistemas como se muestra en la tabla 24.

Tabla 24: Tamaños de partícula de los sistemas hidratados con PBS.				
No de extrusiones	Muestra	Población 1(nm)	Población 2(nm)	Población 3(nm)
30	DMPC40mM	199.5±67	395.8±561.2	
50	DMPC 40mM + PZQ	145.9±14.2		
50	DMPC 40mM + Aceite de moringa	156.7±23	196.6±234.6	3441±2994
50	DMPC 40mM + PZQ + Aceite de moringa	155.7±59.2	780.6±1032	3064±2678

Como se puede observar en la tabla 24 al extrudir la muestra de 30 a 50 veces se obtiene más de una población, esto se puede deber a la concentración usada del fosfolípido así como a la adición del fármaco y el aceite de moringa (ocurriendo un reacomodo de las moléculas debido a la saturación de sistema) la presencia de partículas mayores a 100nm podría interpretarse por el cambio en la morfología de esferas a tubos de 100nm de radio pero longitud mayor, aunque no se descarta que después del tratamiento térmico los liposomas se deforman dando lugar a una forma más estable mayor a 100nm.

7.15 Morfología y tamaño de partícula para los sistemas hidratados con PBS

Con respecto a la morfología obtenida de los sistemas hidratados con buffer de fosfatos se puede deber a la extrusión de los sistemas. Dado que utiliza una alta concentración del fosfolípido en el caso del DMPC puro la morfología mostrada es de forma irregular y presenta otra

poblacion de liposomas esféricos como se confirma con los resultados del DLS. En el caso del sistema DMPC:PZQ se observa en la figura que presenta dos poblaciones de liposomas ambas esfericas pero de tamaños diferentes. En el sistema liposomal de DMPC:MORINGA se determinaron dos poblaciones de liposomas esféricos de diferentes tamaños y una poblacion de liposomas alargados(tubulares). Por último, en el sistema liposomal DMPC:PZQ:MORINGA, se presenta más de una poblacion de liposomas esféricos de diferentes tamaños.

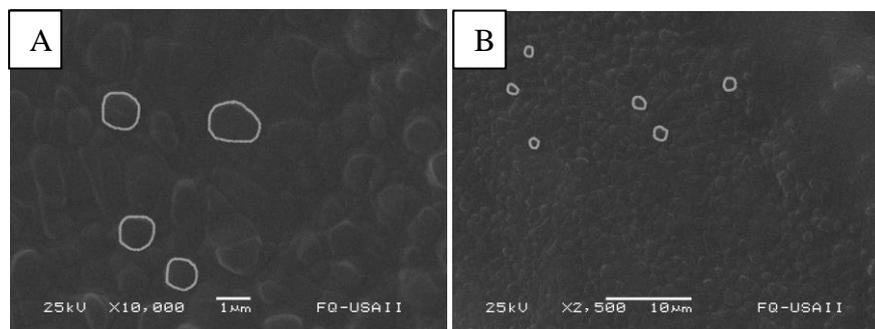


Figura 29: A y B Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC. (Edificio H Mario Molina)

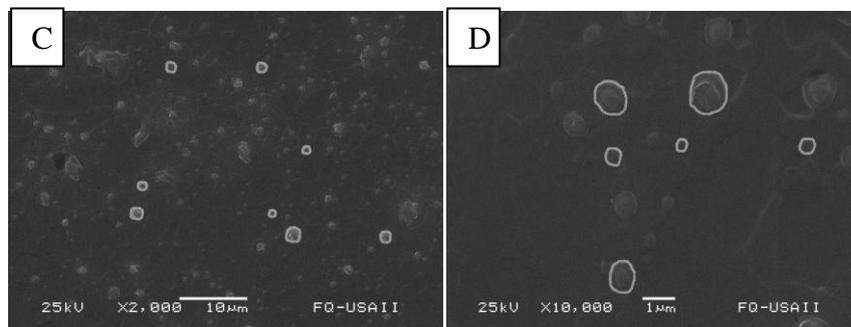


Figura 30: C y D Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: PZQ. (Edificio H Mario Molina)

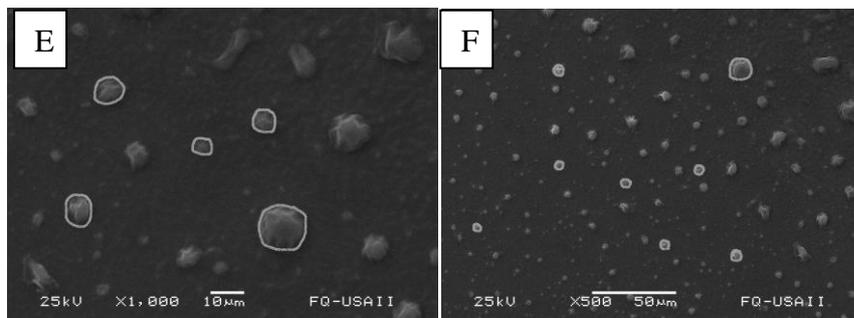


Figura 31: E y F Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: MORINGA. (Edificio H Mario Molina)

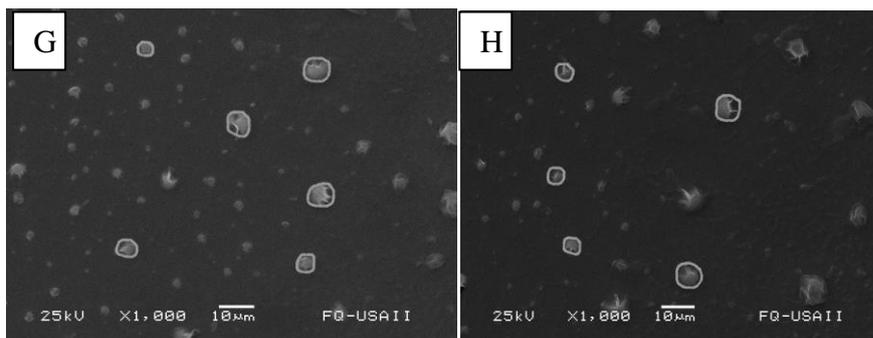


Figura 32: G y H Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: PZQ: MORINGA. (Edificio H Mario Molina)

7.16 Estabilidad física de los sistemas hidratados con PBS

Tabla 25: Estabilidad física para los sistemas de hidratados con PBS.

N de extrusiones	Sistemas de liposomas	Floculación del sistema(días)	Poblaciones
30	DMPC	3	2
50	DMPC: PZQ	3	2
50	DMPC: Aceite de moringa	3	3
50	DMPC : PZQ : Aceite de moringa	4	3

La tabla 25 MUESTRA que el sistema DMPC: PZQ es igual de estable que el DMPC puro a pesar de que su preparación varía con el número de extrusiones por los cuales pasaron los sistemas. En tanto para el sistema DMPC: MORINGA presenta la misma estabilidad física que la del fosfolípido puro independientemente de que este último se extruyó más veces presentando más poblaciones que el sistema con el fosfolípido puro. Por último el sistema más estable hidratado con PBS es el de DMPC: PZQ: MORINGA el cual dura cuatro días habiéndolo extruído 50 veces.

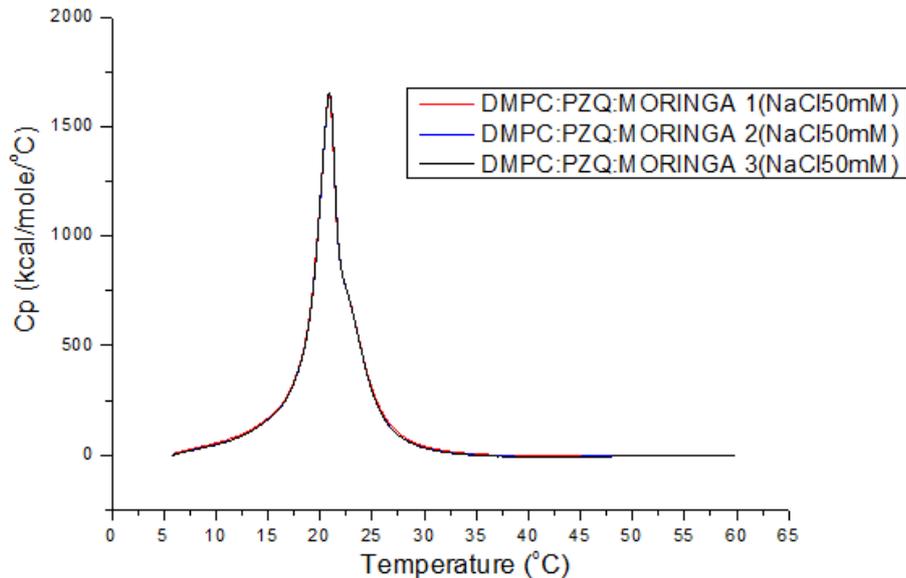


7.17 DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con NaCl 50mM

7.17.1 Termogramas

Sistemas de liposomas modificando fuerza iónica

DMPC: PZQ: Aceite de moringa en NaCl 50mM



Gráfica 10: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 50mM. Esta grafica presenta la traza calorimétrica por triplicado.

Tabla 26: Parámetros termodinámicos de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con NaCl 50mM.

Liposomas

DMPC(40mM): T Rango(°C) ΔH(kcal/mol) Tm(°C) T1/2(°C)

PZQ:

MORINGA

5.7 --> 37.3 7761.0±113.6 20.9 2.7

En la gráfica 10 se muestra el termograma para la suspensión de liposomas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con una disolución de NaCl 50mM. En él se observa que la presencia de NaCl tiene una repercusión en todos los parámetros termodinámicos haciendo que éste sea más cooperativo con respecto al sistema DMPC: PZQ: MORINGA

hidratado solamente con agua y más endotérmico, con un ΔH de 7760.97Kcal/mol.

7.17.2 Estabilidad del sistema

Tabla 27: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 50mM.



Día 1

Suspensión estable.

Día 2

Suspensión floculada.

La tabla 27 muestra los resultados para el sistema DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 50mM a 4°C. A comparación del sistema hidratado con agua mili-Q este sistema es más inestable debido a la carga iónica que generan los iones sobre el fosfolípido afectando las interacciones fosfolípido-fosfolípido haciendo que flocule más rápido ya que este sistema solo dura un día estable.

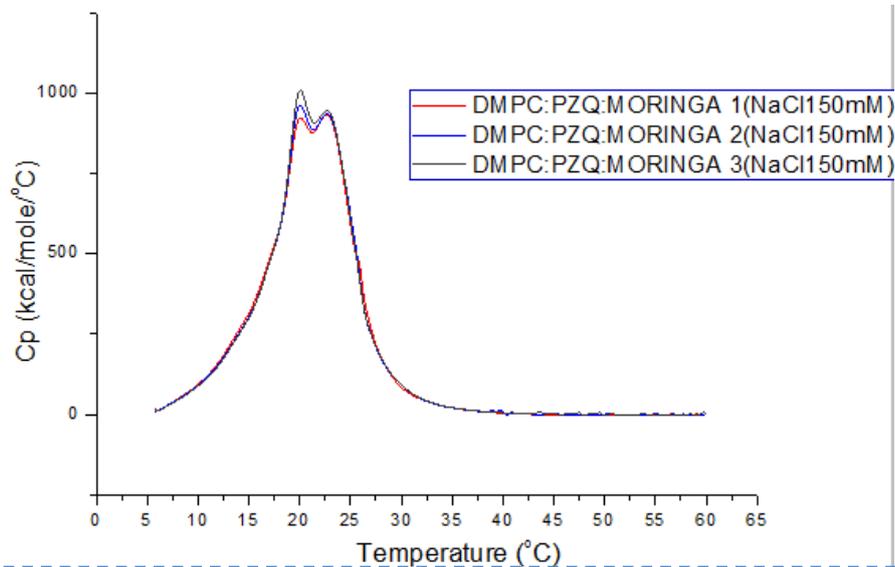


7.18 DMPC: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con NaCl 150mM

7.18.1 Termogramas

Sistemas de liposomas modificado con fuerza iónica

DMPC: PZQ: Aceite de moringa en NaCl 150mM



Gráfica 11: Termogramas de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con NaCl 150mM. Esta determinación se hizo por triplicado obteniéndose siempre la misma traza.

Tabla 28: Parámetros termodinámicos de los sistemas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratados con NaCl 150mM.

Liposomas

DMPC(40mM): T Rango(°C) $\Delta H(kcal/mol)$ $T_m(^{\circ}C)$ $T_{1/2}(^{\circ}C)$

PZQ:

MORINGA

5.8 --> 39.3	9913±52.4	20.9±1.5	8.6±0.5
--------------	-----------	----------	---------

En la gráfica 11 se muestra el termograma para la suspensión de liposomas de DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con una disolución de NaCl 150mM por triplicado. El sistema presenta una transición de fase reversible en la cual las tres trazas calorimétricas son prácticamente iguales. Con respecto a la T1/2 que se obtuvo se puede hablar de que el

sistema no es cooperativo para la transición ya que el inverso de este está muy cercano a cero.

7.18.2 Estabilidad del sistema

Tabla 29: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 150mM.



Día 1
Suspensión floculada.

Como se puede ver en la tabla 29 se determinó la estabilidad física del sistema DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 150mM a 4°C. A comparación con el sistema hidratado con NaCl 50mM, éste es más inestable ya que tiene una mayor cantidad de iones que afectan las interacciones entre los fosfolípidos.

7.19 Parámetros termodinámicos de los sistemas hidratados con NaCl

Tabla 30: Resultados termodinámicos de todos los sistemas de liposomas caracterizados por DSC.

Sistema liposomal	$\Delta H(\text{kcal mol}^{-1})$	T_m (°C)	$T_{1/2}$ (°C)
DMPC(40mM) : PZQ : Aceite de moringa NaCl 50mM	7761.0±113.6	20.9	2.7
DMPC(40mM) : PZQ : Aceite de moringa NaCl 150mM	9913±52.4	20.9±1.5	8.6±0.5



La tabla 30 presenta los resultados termodinámicos de los sistemas hidratados con NaCl por medio de la técnica de DSC. Como se puede ver el sistema hidratado con NaCl 150mM requiere de una mayor energía para la transición de fase así como menos cooperativo debido a su $T_{1/2}$ que es de 8.6 ± 0.5 , cabe resaltar que ambos sistemas realizan su transición a la misma T_m .

7.20 Tamaño de partícula para los sistemas hidratados con NaCl

Tabla 31: Tamaños de partícula obtenidos por DLS para los sistemas hidratados con disoluciones de NaCl.

No de extrusiones	Muestra	Población 1(nm)	Población 2(nm)	Población 3(nm)
30	DMPC 40mM + PZQ + Aceite de moringa (NaCl 50mM)	138.1 \pm 4.851		
30	DMPC 40mM + PZQ + Aceite de moringa (NaCl 150mM)	168.8 \pm 57.48	2809 \pm 2398	1756 \pm 3041

Como se puede ver en la tabla 31, utilizando la técnica de DLS se determinó el tamaño de partícula que para el sistema de DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 50mM presenta una población con un tamaño de 138.1nm lo cual favorecería la administración y ayudaría a evitar su degradación por parte de los macrófagos del cuerpo, esto es lo que se busca con los liposomas SUV por ser más estables y por lo tanto más útiles para los fines de este trabajo. Para el sistema de DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 150mM se obtuvieron tres poblaciones, dos de ellas demasiado grandes, esto se pudo deber al efecto de la fuerza iónica haciendo que el sistemas fuera más inestable dando como resultado la floculación del sistema después de un día.

7.21 Morfología y tamaño de partícula para los sistemas hidratados con NaCl

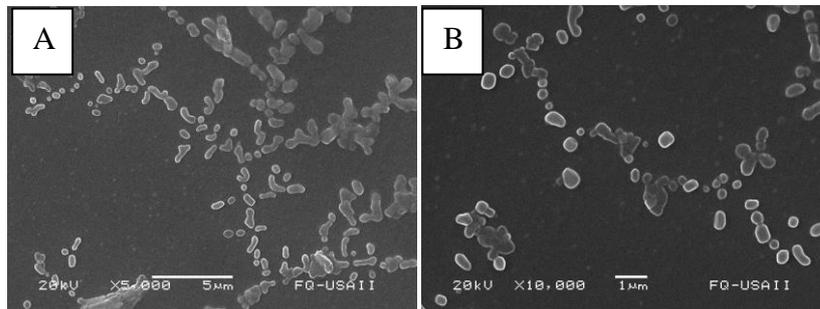


Figura 33: A y B Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: PZQ: MORINGA (NaCl 50Mm). (Edificio H Mario Molina)

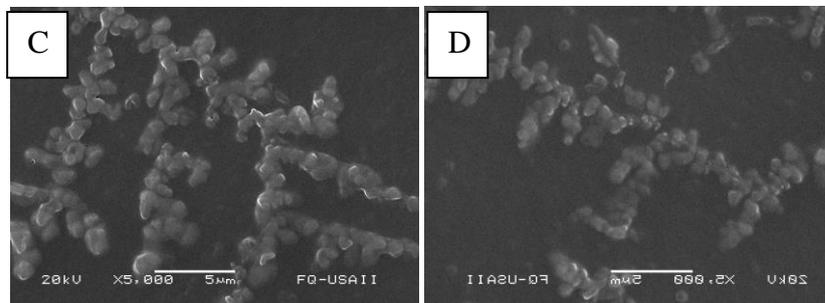


Figura 34: C y D Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC: PZQ: MORINGA (NaCl 150Mm). (Edificio H Mario Molina)

La determinación de la morfología y tamaño se realizó por medio de la técnica de SEM. Para el sistema de DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con NaCl 50mM se obtuvieron liposomas esféricos y tubulares como se muestra en la figura 33. En comparación, aquéllos hidratados con NaCl 150mM tienen una forma indefinida, éstos muestran aglomeración de los liposomas (figura 34).



7.22 Estabilidad física de los sistemas hidratados con NaCl

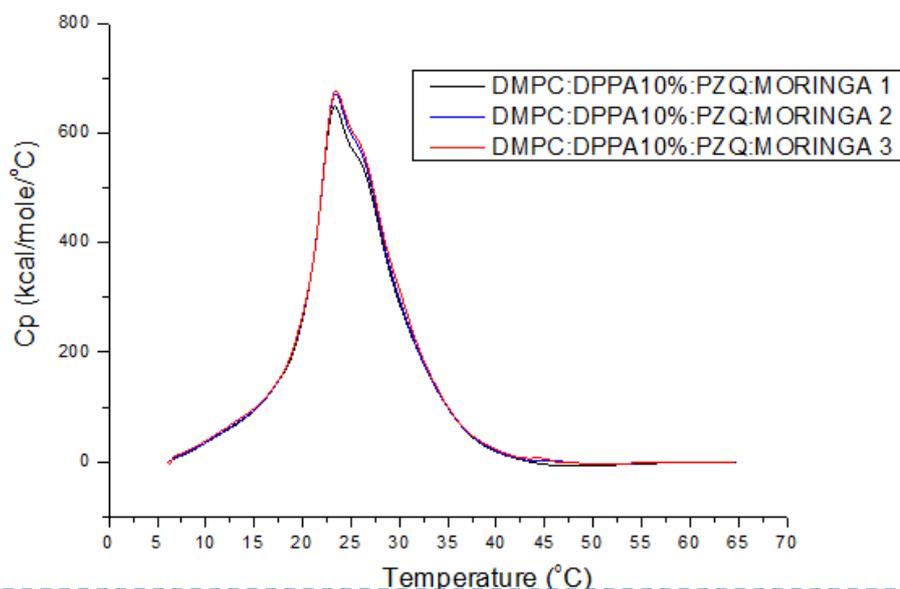
Tabla 32: Estabilidad física de los sistemas hidratados con las disoluciones de NaCl.

No de extrusiones	Sistemas de liposomas	Floculación del sistema(días)	Poblaciones
30(2 filtros)	DMPC : PZQ : Aceite de moringa (NaCl 50Mm)	2	1
30(2 filtros)	DMPC : PZQ : Aceite de moringa (NaCl 150Mm)	1	3

La estabilidad de los sistemas se determinó mediante la presencia de un flóculo en la suspensión de liposomas a temperatura controlada de 4°C. Los resultados obtenidos fueron para el sistema DMPC: PZQ: Aceite de moringa hidratado con NaCl 50mM, una duración de 2 días en una fase a pesar de que como se puede notar en la tabla 32 no presenta más que una población, esto se pudo deber a que la fuerza iónica ejercida por NaCl en los liposomas tiene un efecto en la floculación del sistema, y eso se puede comprobar comparándolo con el sistema hidratado con NaCl 150mM, el cual flocula en 1 día.

7.23 DMPC: DPPA 10%: PZQ: ACEITE DE MORINGA hidratado con agua

7.23.1 Termogramas



Gráfica 12: Termogramas de los sistemas liposomales de DMPC: DPPA10%: PZQ: MORINGA. Esta determinación se hizo por triplicado obteniéndose siempre la misma traza.

Tabla 33: Parámetros termodinámicos de los sistemas de DMPC: DPPA10%: PZQ: MORINGA.

Liposomas DMPC(40mM): PZQ: MORINGA	T Rango(°C)	ΔH (kcal/mol)	Tm(°C)	T1/2(°C)
	6.3 --> 46	7304.7±177.3	23.4±0.1	8.6±0.1

En la gráfica 12 y en la tabla 33 se muestran los resultados obtenidos por la técnica de DSC, que procesados con el programa Origin 7, dan como resultado un ΔH de 7304.72Kcal/mol. Otro punto a destacar con respecto a este proceso es que se puede decir que el sistema no es cooperativo con respecto al sistema de DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con agua el cual se puede corroborar por los resultados de T1/2.

7.23.2 Estabilidad del sistema

Tabla 34: Estudio de estabilidad del sistema DMPC: DPPA10%: PZQ: MORINGA.



Día 1	Día 2	Día 3	Día 4
Suspensión estable.	Suspensión estable.	Suspensión estable.	Suspensión floculada.

La tabla 34 presenta los resultados de la determinación de estabilidad física a 4°C del sistema DMPC: DPPA10%: PZQ: MORINGA hidratado con agua. El sistema es estable por un periodo de 3 días hasta la presencia de un flóculo. A comparación del sistema DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con agua el cual duró 8 días, éste sistema es más inestable y presenta más de una población, independientemente de la presencia del DPPA el cual se añadió por ser un repulsor de carga negativa para evitar que los liposomas choquen y se aglomeren, pero no se mostró ese efecto.

7.24 Tamaño de partícula para los sistemas con DPPA

Tabla 35: Tamaños de partícula por el método de DLS del sistema liposomal.

No de extrusiones	Muestra	Población 1(nm)	Población 2(nm)
30 (3 filtros)	DMPC +DPPA 10% + PZQ + Aceite de moringa	134.2±7	18.2±16

Los tamaños de partícula obtenidos fueron por la técnica de DLS de los cuales se determinó que el sistema DMPC: DPPA10%: PZQ: MORINGA presenta dos poblaciones de las cuales la mayor es de 187.6nm lo cual para fines de trabajo realizado entra en el rango de lo aceptable (100 a 200nm) para favorecer estabilidad.

7.25 Morfología y tamaño de partícula para los sistemas con DPPA

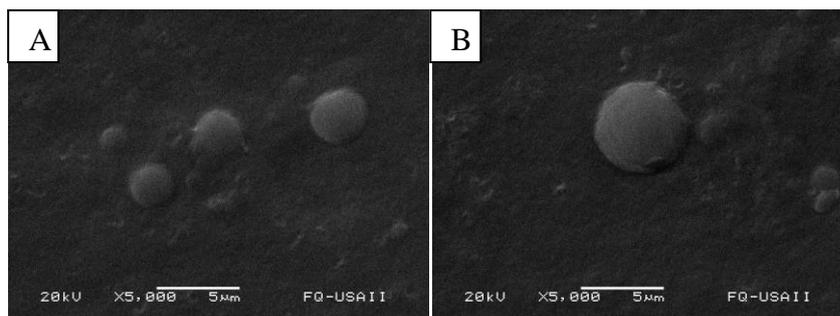


Figura 35: A y B Microscopia electrónica de barrido del sistema de DMPC:DPPA10%: PZQ: MORINGA (Edificio H Mario Molina)

Mediante la técnica de SEM muestra que para el sistema con DPPA10% presenta dos poblaciones de liposomas esféricos como se puede ver en la figura 35. Estas poblaciones se pueden confirmar con los resultados obtenidos por la técnica de DLS, en la cual también se obtienen esas dos poblaciones.

7.26 Estabilidad física del sistema con DPPA

Tabla 36: Parámetros de estabilidad física para el sistema liposomal.

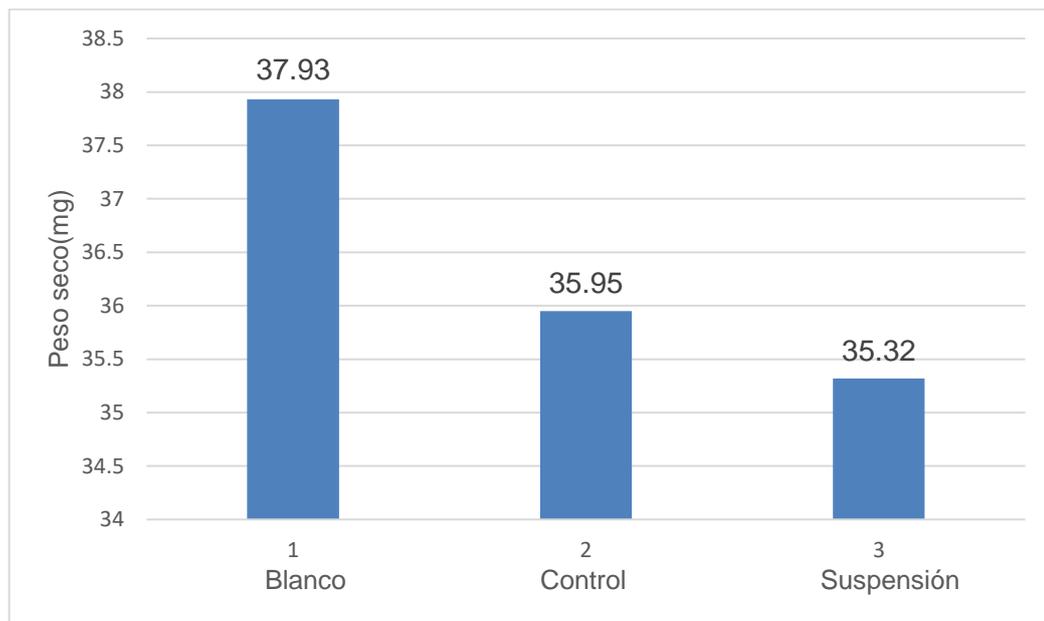
N de extrusiones	Sistemas de liposomas	Floculación del sistema(días)	Poblaciones
30(3 filtros)	DMPC : DPPA		
	10%:PZQ : Aceite de	4	2

Para la prueba de estabilidad se puede determinar que el sistema DPPA10% fue estable por un periodo de 3 días, debido a que este contiene un repulsor de carga para evitar aglomeraciones. Los resultados



muestran que es más inestable que el sistema DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con agua el cual presentó un periodo de estabilidad de 8 días.

7.27 Evaluación in vivo en ratones de liposomas de PZQ con Aceite de moringa



Gráfica 13: Determinación estadística del peso seco de los grupos de ratones con los tratamientos.

Mediante pruebas estadísticas se compararon los pesos secos de los grupos en los cuales se probó la suspensión de liposomas en comparación con el grupo control, demostrando que la formulación tiene la misma eficiencia que el grupo control, lo cual indica que ésta no se ve favorecida por el uso de liposomas. Sin embargo la suspensión de liposomas presentó un tiempo de estabilidad menor debido a que la suspensión durante el estudio no se conservó a 4°C a la cual se evaluó la estabilidad del sistema.



Tabla 37: Resultados estadísticos de la evaluación in vivo.

	Promedio de peso seco(mg)	Desviación estándar
Blanco	37.93	4.76
Control	35.95	5.19
Suspensión	35.32	3.51

Estadísticamente el tratamiento con liposomas muestra menor desviación estándar lo cual es un indicativo de una mejor consistencia de los datos como se ve en la tabla 37 comparando el grupo control y el del tratamiento con la suspensión de liposomas no muestran diferencia significativa demostrando que ambos tratamientos presentan la misma eficacia.



Capítulo 8 CONCLUSIONES

Se comprobó la incorporación de aceite de moringa en la bicapa lipídica de liposomas de DMPC como también la encapsulación PZQ en el centro acuoso del liposoma.

La incorporación de ambas moléculas se confirmó por medio de la técnica de DSC, mediante el análisis de la transición de fase principal y los parámetros termodinámicos obtenidos en los sistemas estudiados.

El aceite de moringa le confiere mayor estabilidad al sistema liposomal.

El sistema liposomal DMPC: PZQ: MORINGA hidratado con agua mili Q fue el sistema más estable y logra incorporar ambas moléculas. Los tamaños de partícula de todos los sistemas formados están en el rango de 100-200nm, lo cual se demostró por las técnicas de DLS y SEM.

Mediante pruebas in vivo de la suspensión se encontró que la biodisponibilidad de liposomas con PZQ y aceite de moringa es igual que la presentada con el tratamiento de PZQ, al mantener la misma biodisponibilidad. Es muy probable que no haya diferencia en niveles de PZQ los cuales dan el efecto terapéutico.



Capítulo 9 PERSPECTIVAS Y SUGERENCIAS

En este trabajo se prepararon varias formulaciones de los liposomas de DMPC incorporando PZQ con aceite de moringa. Se mejoró notablemente la solubilidad del fármaco. Se obtuvieron parámetros que indican la estabilidad, incorporación y encapsulación de moléculas, lo cual representa un campo diferente para la investigación de interés.

Los sistemas liposomales pueden optimizar su eficiencia mediante el uso de una mayor proporción del aceite ya que hay estudios que demuestran que el aceite de moringa favorece las condiciones para un mayor efecto por parte del PZQ.

Con la optimización del sistema liposomal, presentado en este trabajo se sugiere realizar nuevamente las pruebas in vivo correspondientes, contribuyendo así al mejoramiento los tratamientos empleados para neurocisticercosis.



Capítulo 10 INTERES COMERCIAL

La determinación de las características fisicoquímicas de los liposomas por DSC, SEM y DLS es fácil y rápido, con el cual se determina la encapsulación de las moléculas y ya que los liposomas son un modelo biológico por la similitud con las membranas celulares, se pueden utilizar para facilitar la llegada de diferentes fármacos tanto hidrofílicos como hidrofóbicos para aumentar la eficiencia del efecto de estos fármacos en su sitio de acción.

En este trabajo se expande el aprendizaje sobre su manipulación y estabilidad de liposomas de DMPC con aceite de moringa y PZQ, la importancia de esto es ofrecer mejores alternativas para el tratamiento de neurocisticercosis ya que los tratamientos existentes presentan muchas limitantes.

Las características del sistema liposomal probado en este trabajo son:

- El aceite de moringa estabiliza el sistema independientemente del número de poblaciones de liposomas en el sistema.
- Se presentó una mayor estabilidad con agua como hidratante.
- Se encontró que para el manejo de la muestra el proceso de congelamiento- descongelamiento acelera la inestabilidad del sistema.



Capítulo 11 BIBLIOGRAFIA

1. Vladimir P. Torchilin. (1 Febrero 2005). Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4, 145-160.
2. María Torellóa, Anna Viscasillasa, Alfonso del Pozoa. (9 octubre 2002). Liposomas (I). Conceptos generales y relación con las estructuras cutáneas. *El Sevier*, 21, 11-192.
3. Gregory Gregoriadis. (2007). *Liposome Technology Third Edition Volume I Liposome Preparation and Related Techniques*. New York London: Informa Healthcare USA, Inc.
4. David B Fenske & Pieter R Cullis (2008) *Liposomal nanomedicines*, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5:1, 25-44, DOI: 10.1517/17425247.5.1.25
5. Lin Zhang, Shuli Wang, Manhong Zhang & Jie Sun (2013) *Nanocarriers for oral drug delivery*, *Journal of Drug Targeting*, 21:6, 515-527, DOI: 10.3109/1061186X.2013.789033
6. A.R. Mohammeda, N. Westonb, A.G.A. Coombesa, M. Fitzgeraldc, Y. Perriea,* . (12 September 2004). Liposome formulation of poorly water soluble drugs: optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 285, 23-34.
7. Elisa Elizondo,* Evelyn Moreno,* Ingrid Cabrera,* Alba Córdoba,* Santiago Sala,* Jaime Veciana,* and Nora Ventosa* . (2011). *Liposomes and Other Vesicular Systems: Structural Characteristics, Methods of Preparation, and Use in Nanomedicine*. *El sevier*, 104, 1-52.
8. Theresa M. Allen a, Pieter R. Cullis b. (Enero del 2013). *Liposomal drug delivery systems: From concept to clinical applications*. *El sevier*, 65, 36-48.
9. S. Sood, *Characterization of liposome manufacturing using extrusion*, Master's Thesis, San Jose State University, 1999.



10. D.D. Lasic, F.J. Martin (Eds.), *Stealth Liposomes*, CRC Press, Boca Raton (1995)
11. Biju, Ss & Talegaonkar, Sushama & Mishra, Prabhat & Khar, Roop. (2006). Vesicular systems: An overview. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 5. 10.4103/0250-474X.25707.
12. Juan D. Sabín Fernández. (2007). Estabilidad coloidal de nanoestructuras liposómicas.
13. EJ. Carrión *, A. de la Maza" y J.L. Parra*". (1997). La influencia de la fuerza iónica y la carga de la bicapa lipídica en la estabilidad de liposoma F). *Boletín Intexter(UPC)*, 111, 21-31.
14. Fite, F.Javier & de la Maza y Ribera, Alfonso & Luis Parra, José. (2019). La influencia de la fuerza iónica y la carga de la bicapa lipídica en la estabilidad de liposomas.
15. B. Alberts, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter . (2010). *Biología Molecular de la célula*. Barcelona: Omega S. A.
16. B. Alberts, D. Bray, K. Hopkin, A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, P. Walter. (2004). *Essential Cell Biology*. New York: Garland Science.
17. McMurry, J., *Química Orgánica*, 5ª. Edición, México, Ed. International Thomson Editores, S.A. de C.V., 2001.
18. WOLFE, D.H. (1996). *Química General y Biológica*. México: McGraw Hill.
19. Xie, S., Pan, B., Shi, B., Zhang, Z., Zhang, X., Wang, M., & Zhou, W. (2011). Solid lipid nanoparticle suspension enhanced the therapeutic efficacy of praziquantel against tapeworm. *International journal of nanomedicine*, 6, 2367–2374. doi:10.2147/IJN.S24919
20. NOM-021-SSA2-1994, Para la prevención y control del binomio teniosis/cisticercosis en el primer nivel de atención médica.
21. López-de Guimaraes D, Mezarina-Valverde J, Flores-Plata J, Pajuelo-Vera M.. Múltiples lesiones en parénquima cerebral debido a neurocisticercosis en una nativa de altura: reporte de caso. *Acta Med Peru*. 2017;34(1):57-60 Alberto Fica C., Marcelo Castro S..



- (febrero del 2012). Neurocysticercosis - an neglected disease in Chile. *scielo*, vol. 29, 72-81.
22. Carlos Hugo Zapata¹ , Sergio Alberto Vargas² , Carlos Santiago Uribe¹. (2017). Neurocisticercosis racemosa (sic), diagnóstico orientado por neuroimágenes. *Biomedica*, 37, 26-32.
23. Luz Elena Botero ^{1,3} , Sonia Agudelo ^{1,2}. (Junio 2004). Evaluación de cisticerco de taenia crassiceps como antígeno sustituto para el diagnóstico de la neurocisticercosis. *IATREIA*, 17, No. 2, 167-168.
24. Doodipala Samba Reddy, Randy Volkmer, Neurocysticercosis as an infectious acquired epilepsy worldwide, *Seizure*, Volume 52, 2017, Pages 176-181, ISSN 1059-1311, <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2017.10.004>.
25. Sumit Sinha, B.S. Sharma, Neurocysticercosis: A review of current status and management, *Journal of Clinical Neuroscience*, Volume 16, Issue 7, 2009, Pages 867-876, ISSN 0967-5868, <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2008.10.030>.
26. Hector H Garcia, Theodore E Nash, Oscar H Del Brutto, Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis, *The Lancet Neurology*, Volume 13, Issue 12, 2014, Pages 1202-1215, ISSN 1474-4422, [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70094-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70094-8).
27. Matthaïou, D. K., Panos, G., Adamidi, E. S., & Falagas, M. E. (2008). Albendazole versus praziquantel in the treatment of neurocysticercosis: a meta-analysis of comparative trials. *PLoS neglected tropical diseases*, 2(3), e194. doi:10.1371/journal.pntd.0000194
28. Villa-García, M., San Martín-Martínez, E., & Pedroza-Islas, R. (2015). Liposomas como Nanotransportadores de Antioxidantes y Estudio de Tasa de Liberación. En Ramírez-Ortiz, M.E. (Ed.). *Tendencias de innovación en la ingeniería de alimentos*. Barcelona, España: OmniaScience. 215-254.
29. Jefferson V. Proaño & Jaime Torres-Corzo & Roberto Rodríguez-Della Vecchia & Gabriel Guizar-Sahagun & Leonardo Rangel-



- Castilla. (26 June 2009). Intraventricular and subarachnoid basal cisterns neurocysticercosis: a comparative study between traditional treatment versus neuroendoscopic surgery. Springer, 25, 1467–1475.
30. Siddhartha Mahanty, Hector H. Garcia, Cysticercosis and neurocysticercosis as pathogens affecting the nervous system, Progress in Neurobiology, Volume 91, Issue 2, 2010, Pages 172-184, ISSN 0301-0082, <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2009.12.008>.
31. Rodrigo Ramos-Zúñiga, H. Raúl Pérez-Gómez, Fernando Jáuregui-Huerta, María del Sol López-Hernández, Jazmín Elizabeth Valera-Lizárraga, Gabriela Paz-Vélez, Adán Becerra-Valdivia, Incidental Consequences of Antihelminthic Treatment in the Central Nervous System, World Neurosurgery, Volume 79, Issue 1, 2013, Pages 149-153, ISSN 1878-8750, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2012.01.060>.
32. Gerardo Guinto Balanzar, Yoshiaki Guinto, Neurocysticercosis: Is Medical Management Innocuous?, World Neurosurgery, Volume 79, Issue 1, 2013, Pages 71-72, ISSN 1878-8750, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2012.04.015>.
33. Mauro Loyo-Varela, Bruno Estañol, Salvador Manrique-Guzman, Development of Neurological Symptoms in Patients with Asymptomatic Cerebral Cysticercosis Undergoing Albendazole Therapy for Intestinal Parasites, World Neurosurgery, Volume 79, Issue 1, 2013, Pages 69-70, ISSN 1878-8750, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2012.04.017>.
34. Leonidas M. Quintana, Cysticercosis Treatment: A Complex Interaction Drug-Parasite-Host, World Neurosurgery, Volume 79, Issue 1, 2013, Pages 73-74, ISSN 1878-8750, <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2012.02.046>.
35. Costas Demetzos” Differential Scanning Calorimetry (DSC): A Tool to Study the Thermal Behavior of Lipid Bilayers and Liposomal



- Stability” *Journal of Liposome Research*, 18:3, 159-173, DOI: 10.1080/08982100802310261.
36. Shane M. Ohline” Differential Scanning Calorimetric Study of Bilayer Membrane Phase Transitions. A Biophysical Chemistry Experiment” *Journal of Chemical Education* Vol. 78 No. 9 September 2001.
37. Rodney L. Biltonen” The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations” *Chemistry and Physics of Lipids*, 64 (1993) 129-142. Elsevier Scientific Publishers Ireland Ltd.
38. WHO. (15 de febrero de 2018). Teniasis y cisticercosis. Recuperado de <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/taeniasis-cysticercosis>
39. Alberto Fica C., Marcelo Castro S. (febrero del 2012). Neurocysticercosis - an neglected disease in Chile. *scielo*, vol. 29, 72-81.
40. Carlos Hugo Zapata , Sergio Alberto Vargas , Carlos Santiago Uribe1. (2017). Neurocysticercosis racemosa (sic), diagnóstico orientado por neuroimágenes. *Biomedica*, 37, 26-32.
41. Bazan R, Hamamoto Filho PT, Luvizutto GJ, Nunes HR, Odashima NS, Dos Santos AC, Elias Júnior J, Zanini MA, Fleury A, Takayanagui OM. “Clinical Symptoms, Imaging Features and Cyst Distribution in the Cerebrospinal Fluid Compartments in Patients with Extraparenchymal Neurocysticercosis.” *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Nov 9;10(11):e0005115. doi: 10.1371/journal.pntd.0005115.
42. Ito A, Yanagida T, Nakao M. “Recent advances and perspectives in molecular epidemiology of *Taenia solium* cysticercosis”. *Infect Genet Evol*. 2016 Jun;40:357-67. doi: 10.1016/j.meegid.2015.06.022.
43. Flisser A. (2013). State of the art of *Taenia solium* as compared to *Taenia asiatica*. *The Korean journal of parasitology*, 51(1), 43–49. doi:10.3347/kjp.2013.51.1.43



44. Carpio A, Fleury A, Romo PharmD ML, Abraham R, Fandiño J, Durán JC, Cárdenas G, Moncayo J, Rodrigues CL, San-Juan D, Serrano-Dueñas M, Takayanagui O, Sander JW. “New diagnostic criteria for neurocysticercosis: Reliability and validity. *Ann Neurol*”. 2016 Jul 20. doi: 10.1002/ana.24732.
45. Gonzales I, Rivera JT, Garcia HH. Cysticercosis Working Group in Peru. “Pathogenesis of *Taenia solium* taeniasis and cysticercosis”. *Parasite Immunol*. 2016 Mar;38(3):136-46. doi: 10.1111/pim.12307.
46. Dra. Teresa Uribarren Berrueta. (6 febrero 2018). Cisticercosis. Recuperado de:
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/parasitologia/cisticercosis.html>
47. Fleury A, Cardenas G, Adalid-Peralta L, Fragoso G, Sciutto E. “Immunopathology in *Taenia solium* neurocysticercosis”. Review. *Parasite Immunol*. 2016 Mar;38(3):147-57. doi: 10.1111/pim.12299.
48. Garcia HH, Nash TE, Del Brutto OH. “Clinical symptoms, diagnosis, and treatment of neurocysticercosis”. Review. *The Lancet Neurology*. December 2014;13(12):1202–1215.
49. Oscar H. Del Brutto. “Neurocysticercosis”. *The Neurohospitalist*. 2014; 4(4):205-212.
50. Bobes RJ, Fragoso G, Fleury A, García-Varela M, Sciutto E, Larralde C, Lacleste JP. “Evolution, molecular epidemiology and perspectives on the research of taeniid parasites with special emphasis on *Taenia solium*”. *Infection, Genetics and Evolution*, April 2014;23:150-160.
51. Flisser A. “State of the art of *Taenia solium* as compared to *Taenia asiatica*”. *Korean J Parasitol*. 2013 Feb;51(1):43-9. doi: 10.3347/kjp.2013.51.1.43.
52. Cárdenas G, Valdez R, Sáenz B, Bottasso O, Fragoso G, Sciutto E, Romano MC, Fleury A. “Impact of *Taenia solium* neurocysticercosis upon endocrine status and its relation with immuno-inflammatory parameters”. *Int J Parasitol*, Feb 2012; 42(2):171–176.



-
53. Fernando Padilla Santamaría, Julia Cruz Balderrabano” Moringa oleifera leaf extracts for prevention and treatment of diabetes mellitus” Rev Cubana de Medicina Natural y Tradicional. 2016;1(2)
54. Peter Atkins and Julio de Paula. (2006). PHYSICAL CHEMISTRY. Great Britain by Oxford University Press: W. H. Freeman and Company New York.