



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LA CONVERSIÓN DE
VESÍCULAS DE L-ALFA-DIPALMITOIL-FOSFATIDILCOLINA (DPPC) A
MICELAS MIXTAS MEDIANTE LA ADICIÓN DE n-OCTIL-BETA-
D-GLUCOPIRANÓSIDO (OGP).

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

OLDAÍS SALINAS URBANO

MÉXICO, D.F.

2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS

VOCAL: JOSEFINA ADRIANA VERDEJO COSS Y LEÓN

SECRETARIO: ANA ELENA GARCÍA IÑÁRRITU

1er. SUPLENTE: TANIA CAMPOS GONZÁLEZ

2° SUPLENTE: MA. GUADALUPE LEMUS BARAJAS

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE BIOFISICOQUÍMICA, EDIFICIO F-301

DEPARTAMENTO DE FISICOQUÍMICA

FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ASESOR DEL TEMA:

SILVIA DEL SOCORRO PÉREZ CASAS

SUPERVISOR TÉCNICO:

MA. GUADALUPE LEMUS BARAJAS

SUSTENTANTE:

OLDAIS SALINAS URBANO

Índice

<i>Capítulo 1. Generalidades. Reactivos utilizados y técnicas</i>	1
1. Introducción.....	1
1.1 Liposomas.....	2
1.2 Tensoactivos	10
1.3 Fármacos Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	17
1.4 Técnicas y Fundamentos	19
<i>Capítulo 2. Objetivos e Hipótesis</i>	25
2.1 Objetivos	25
2.2 Hipótesis.....	26
<i>Capítulo 3. Metodología experimental</i>	27
3.1 Materiales y equipo	27
3.2 Reactivos.....	27
3.3 Metodología.....	28
<i>Capítulo 4. Modelo termodinámico</i>	30
<i>Capítulo 5. Resultados y Discusión</i>	33
5.1 Primera serie de experimentos: Determinación de la cantidad de Chol	33
5.2 Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	37
5.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	53
5.4 Tamaño de partícula	61
5.5 Microscopia electrónicas de barrido (SEM).....	66
<i>Capítulo 6. Conclusión</i>	69
<i>Referencias</i>	70

Capítulo 1. Generalidades. Reactivos utilizados y técnicas.

1. Introducción.

Las membranas biológicas son sistemas complejos formados de lípidos, proteínas y otras moléculas entre ellas tensoactivos. Las interacciones tensoactivo-membrana son estudiadas a detalle debido a que sirven como modelos para numerosos fenómenos biológicos tales como: eventos de fusión, acción de fármacos anestésicos o procesos de digestión de grasas en el intestino.

El esquema de solubilización de la bicapa lipídica mediante un tensoactivo es llamado modelo de tres fases. De acuerdo a dicho modelo la transferencia de tensoactivo de la fase acuosa a la bicapa lipídica es descrito por un equilibrio de partición, lo anterior denominado Fase 1. Sin embargo, sólo una parte del tensoactivo se puede incorporar entre los fosfolípidos; no obstante, una concentración mayor de tensoactivo hace que la membrana comience a desintegrarse. Lo anterior, es señal del inicio de la Fase 2, donde coexisten micelas formadas por tensoactivo-lípido con bicapas mixtas (el tensoactivo está incluido en la membrana).

Las vesículas comienzan a abrirse en hojas lamelares o micelas cilíndricas y una vez que esto ocurre las bicapas lipídicas se convierten en micelas mixtas, lo cual completa a la Fase 3(1,2).

Este trabajo estudiamos el proceso de partición en liposomas formados por DPPC mediante la técnica de ITC, DSC y tamaño de partícula.

Con la finalidad de encontrar las mejores condiciones del proceso mediante su caracterización fisicoquímica, a continuación se describen y definen conceptos, reactivos y las técnicas.

1.1 Liposomas

1.1.1. Definición

Los liposomas son vesículas esféricas de auto ensamblaje con un tamaño que oscila entre 20 nm a 10 μm , están compuestos de una bicapa lipídica que es formada con las cadenas hidrófobas de los lípidos, los grupos polares de los lípidos están orientados hacia el exterior, y hacia la cavidad interior, donde los lípidos están rodeados por un ambiente hidrófilo [3]. Su estructura es similar a la de las células, y por eso son empleados para el estudio de las interacciones entre los lípidos de la membrana y/o biomoléculas tales como ADN o proteínas, o como sistemas de liberación controlada de fármacos.

Los liposomas pueden existir como vesículas unilamelares o multilamelares. Las vesículas unilamelares consisten en una bicapa lipídica que separa el núcleo acuoso de un ambiente acuoso exterior, mientras que las vesículas multilamelares tienen múltiples bicapas de lípidos que separan los diferentes ambientes acuosos. Los liposomas normalmente consisten en diferentes tipos de fosfolípidos de origen natural, pero otros lípidos tales como el colesterol se pueden incluir para mejorar sus características. Con el fin de obtener liposomas de composición mixta (fosfolípidos de diferente longitud de cadena o lípidos como el colesterol) los lípidos se disuelven en un disolvente orgánico que posteriormente se evapora de la mezcla y se obtiene una película seca. Los liposomas se forman espontáneamente cuando esta película seca se dispersa en un medio acuoso. Como se ha mencionado, los liposomas tienen la capacidad de funcionar como portadores de fármacos hidrófilos, hidrófobos y anfifílicos. Los fármacos de carácter hidrófilo se pueden encapsular en el núcleo acuoso, mientras que los fármacos hidrófobos y anfifílicos se pueden incorporar dentro de la bicapa lipídica.

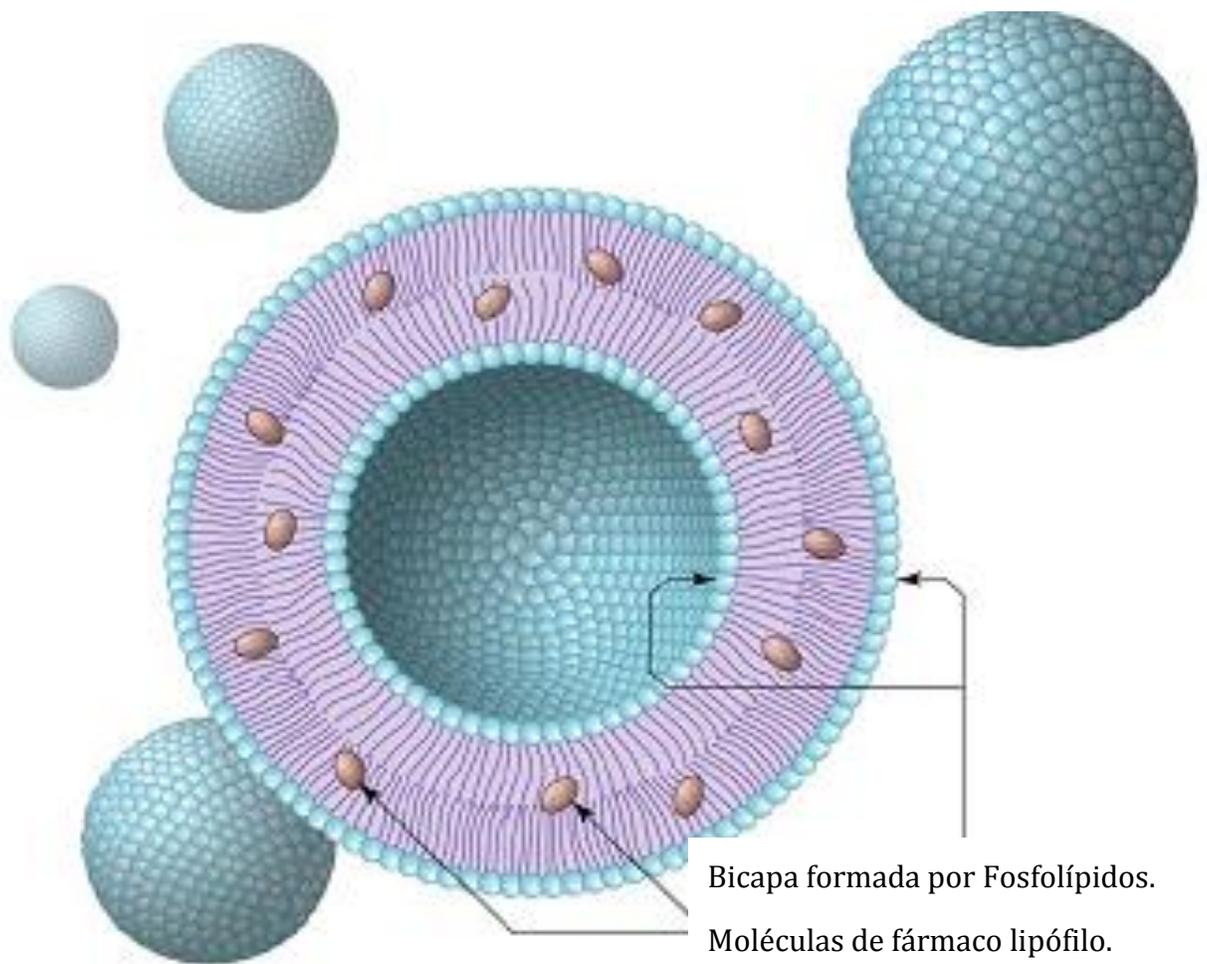


Fig. 1.1. Representación de Liposomas, en la bicapa lipídica, se pueden en capsular fármacos de carácter lipófilo.

1.1.2. Lípidos

Los fosfolípidos (PLs, por sus siglas en inglés, Phospholipids) que se encuentran típicamente en altas proporciones en las membranas celulares son un componente importante en las formulaciones de liposomas. Un PL consta de dos ácidos grasos unidos a un grupo de cabeza polar que puede ser glicerol o esfingomielina. Los PLs son moléculas anfipáticas y tienen ambos grupos: hidrófobos e hidrófilos. Las dos cadenas de hidrocarburos constituyen las colas hidrófobas, mientras que el grupo fosfato por su carácter polar constituye el grupo hidrófilo. Los PLs pueden constar de diferentes grupos de cabeza y cola que afectan a la carga superficial y la permeabilidad de la bicapa de los liposomas [4].

La estabilidad de la membrana del liposoma depende del grado de compactación de las cadenas hidrocarbonadas de las moléculas de lípidos. La longitud de la cadena de hidrocarburo y el grado de saturación de las cadenas de acilo determinan la temperatura a la cual la membrana se transforma de una "fase gel" totalmente extendido y estrechamente empaquetada a una desordenada "fase fluida" cristalina líquida, la cual es conocida como la temperatura de transición principal (T_m).

1.1.2.1 Fosfatidilcolinas.

Las fosfatidilcolinas (PC, por sus siglas en inglés, Phosphatidylcholine) son un grupo de fosfolípidos cuya principal característica es la incorporación de la colina (amina cuaternaria), que se encuentra unida al éster fosfórico, en la cabeza polar.

Este tipo de fosfolípidos son componentes principales de las membranas biológicas y se pueden obtener fácilmente a partir de fuentes naturales como la yema de huevo o de leguminosas como la soja.

Entre las fosfatidilcolinas que se emplean para la preparación de liposomas están:

- ☛ Dimiristoil fosfatidilcolina con una cadena saturada de 14 átomos de carbono.

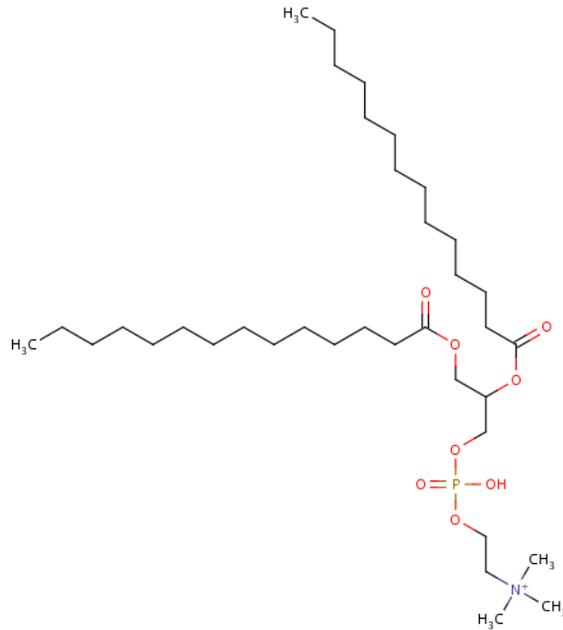


Fig. 1.2. Molécula Dimiristoil fosfatidilcolina.

- ☛ Dipalmitoil fosfatidilcolina con una cadena saturada de 16 átomos de carbono.

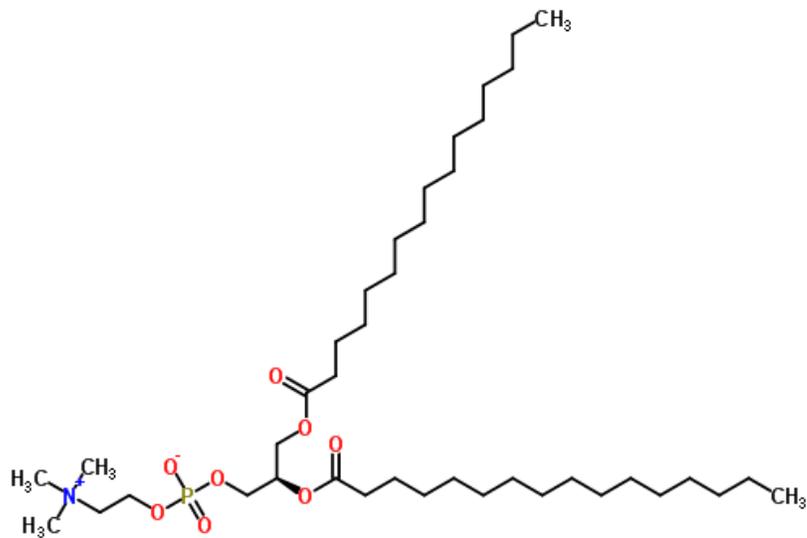


Fig. 1.3 Molécula Dipalmitoil fosfatidilcolina.

☞ Diestearoil fosfatidilcolina con una cadena saturada de 18 átomos de carbono.

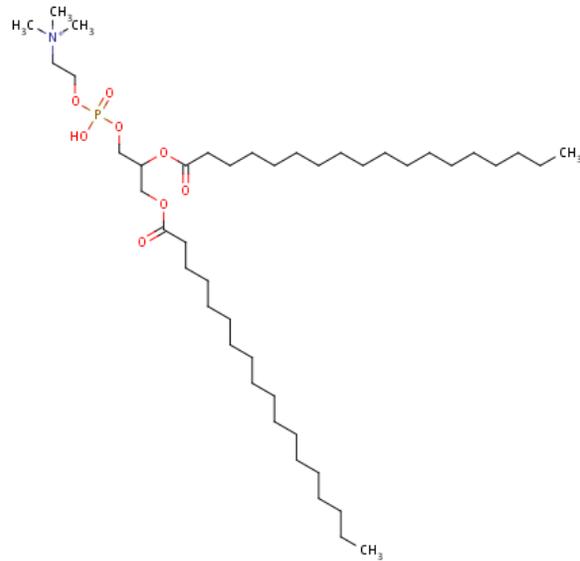


Fig. 1.4. Molécula Diestearoil fosfatidilcolina.

1.1.2.2. Colesterol.

Colesterol (Chol, por sus siglas en inglés, Cholesterol) es uno de los lípidos (esterol) utilizados en las formulaciones de liposomas y su incorporación en la bicapa lipídica tiene un efecto importante sobre las características del mismo. La presencia de Chol en la bicapa lipídica mejora la estabilidad así como la rigidez de la membrana, debido por la forma altamente ordenada.

La estructura molecular Chol, con los cuatro anillos de hidrocarburos, hace que sea fuertemente hidrófobo. La presencia del grupo hidroxilo (OH) unido al extremo de Chol hace que en parte sea débilmente hidrófilo.

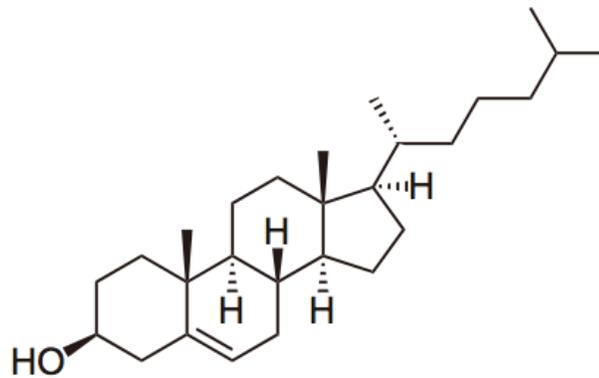


Fig. 1.5. Molécula de Colesterol

El Chol puede ser incorporado en las bicapas de lípidos en concentraciones de 1:1 molar, no forma una bicapa con el mismo, por lo tanto, se necesitan otros fosfolípidos para formar una bicapa. Debido a sus propiedades anfipáticas el Chol se inserta en la bicapa orientando el grupo OH hacia el núcleo acuoso y la cola rígida hidrófoba hacia las bicapas de fosfolípidos.

1.1.3 Clasificación de los liposomas

La clasificación de los liposomas se basa en su tamaño y lamelaridad, dichos factores dependen de su composición y del método de preparación. Los principales son tres:

- ✦ Las Vesículas multilamelares (MLV, por sus siglas en inglés, multilamellar vesicles). Son vesículas con un tamaño que va desde 100 nm a varios micrómetros de diámetro, dependiendo del método de preparación. Se componen de un gran número de bicapas lipídicas concéntricas y debido a su gran lamelaridad son empleados preferentemente para la incorporación de moléculas hidrófobas.

- ✦ Las Vesículas unilamelares pequeñas (SUV, por sus siglas en inglés, small unilamellar vesicles). Son vesículas que consisten de una sola bicapa y, teóricamente, puede ser tan pequeños como aproximadamente 20 nm de diámetro. Estos liposomas son más adecuados para la administración parenteral debido a su homogeneidad en tamaño.

- ✦ Las Vesículas unilamelares grandes (LUV, por sus siglas en inglés, large unilamellar vesicles). Son vesículas generalmente con un tamaño en el orden de 100 nm diámetro que consisten de igual manera en una bicapa lipídica. Estos liposomas pueden atrapar una mayor cantidad de fármacos hidrófilos debido a su núcleo acuoso más grande en comparación con los SUV.

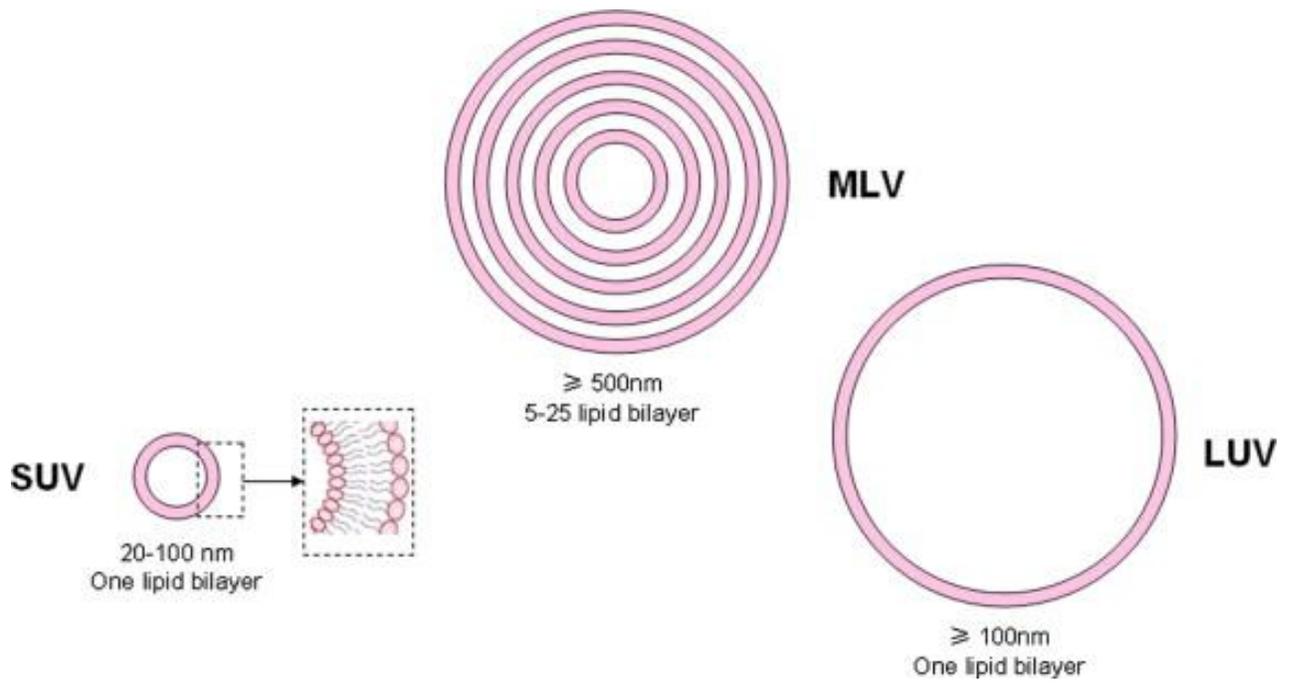


Fig. 1.6. Representación de la clasificación de liposomas en base a su tamaño y lamelalidad.

1.2 Tensoactivos.

Los tensoactivos son moléculas anfifílicas que contienen en su estructura una parte polar o hidrofílica (soluble en agua) y una parte no polar o hidrofóbica (liposoluble, soluble en aceite). Se denominan también agentes con actividad superficial (derivado de la palabra inglesa surfactants, surface active agents) debido a que tienen la tendencia de colocarse en las interfases líquido-líquido o líquido-vapor, formando una capa monomolecular. En solución acuosa una vez saturada la superficie con monómeros tienden a organizarse en agregados, disminuyendo la energía interfacial. Los grupos hidrofílicos pueden estar cargados eléctricamente por la presencia de un dipolo o por cargas residuales ya sean positivas o negativas. Algunos ejemplos se muestran en la tabla 1.1. La porción hidrofóbica está formada generalmente por cadenas largas de residuos de hidrocarburos, que pueden contener diferentes estructuras, tales como:

- ✎ Cadenas largas lineales alquílicas (C8-C20).
- ✎ Cadenas largas ramificadas alquílicas (C8-C20).
- ✎ Cadenas largas de alquilbencenos (C8-C15).
- ✎ Residuos de alquilnaftalenos (C3 y mayores).
- ✎ Polímeros de óxido de propileno de alta masa molar (derivados de polioxipropilén glicol).

Grupos Ácidos	Grupos Básicos	Grupos no iónicos
-COOH	-NH ₂	-COO-
-OSO ₂ OH	>NH	-CONH-
-SO ₃ H	>N-	-NH
-PO ₃ H ₂	Piridinio	-O-
		-CH(OH)-

Tabla 1.1: Clasificación de los grupos hidrofílicos de tensoactivos.

Cuanto más largo sea el grupo hidrófobo menor será la solubilidad en agua y mayor en solventes orgánicos. El crecimiento de este grupo causa empaquetamiento de moléculas de tensoactivo en la interfase e incrementa la tendencia del tensoactivo a adsorberse o a formar agregados llamados micelas. Con el número de carbonos también aumenta el punto de fusión de los tensoactivos, la adsorción en películas y la tendencia a formar fases de cristal líquido en solución.

1.2.1 Clasificación de los tensoactivos.

De acuerdo con las características de la cabeza polar los tensoactivos se clasifican en tres tipos.

- Iónicos.
- Anfóteros.
- No iónicos.

1.2.1.1. Iónicos

Los iónicos son aquellos que en solución se ionizan, a su vez se clasifican en aniónicos y catiónicos.

Los tensoactivos aniónicos tienen la carga eléctrica negativa en la parte polar. Contienen generalmente uno de los cuatro grupos polares solubles (carboxilato, sulfonato, sulfato o fosfato) combinado con un catión que puede ser orgánico (cadena hidrocarbonada hidrófoba) o inorgánico (Na^+ , K^+ , Ca^+ , Ba^+ , Mg^+ , NH_4^+ , etc.). Estos tensoactivos se emplean en la producción de barras de jabón donde se requieren soluciones alcalinas, en productos para el cuidado del cabello y piel, como agentes emulsificantes en jabones que limpian en seco, jabones líquidos, etc.

Los tensoactivos catiónicos tienen la carga de la porción polar positiva. Suelen ser derivados de ácidos grasos o de petroquímicos conteniendo un nitrógeno cargado positivamente. El anión es generalmente un ion Cl^- , Br^- , OH^- o SH_4 , son comúnmente utilizados en detergentes, agentes limpiadores, lavaplatos líquidos, cosméticos, en pigmentos y agentes dispersantes [3]. Dentro de los usos que se les da está el de agentes emulsificantes a pH menores de 7, inhibidores de corrosión para superficies metálicas (protección de agua, sales y ácidos), promotores adhesivos contra la humedad en pinturas o bien en contenedores de pigmentos.

1.2.1.2. Anfóteros

Los anfóteros son tensoactivos que tienen ambos grupos iónicos, el catiónico (positivo) y aniónico (negativo). Al alterar el pH de una solución acuosa el carácter aniónico o catiónico del anfótero puede cambiar. En algunos pH intermedios (no necesariamente 7), ambos grupos muestran igual ionización, a este pH se le llama punto isoeléctrico. El grupo carboxilato es el más común para la parte aniónica; así como el grupo amino lo es para la parte catiónica. En el punto isoeléctrico los tensoactivos presentan un mínimo en sus propiedades de espumación y detergencia. Muestran excelente compatibilidad con otros tensoactivos, frecuentemente forman micelas mixtas y las mezclas muchas veces tienen propiedades funcionales que no se encuentran en ninguno de los componentes puros, por ejemplo la irritación de la piel puede reducirse por debajo del nivel de aquella generada por cada uno de los componentes puros. El efecto de mezclar un anfótero con un aniónico es que reduce la irritación de la piel y ojos, aumenta la viscosidad en presencia de un electrolito, mejora la estabilidad de las espumas y mejora la detergencia. Muchos anfóteros actúan como hidrótrofos solubilizando tensoactivos no iónicos en electrolitos a altas temperaturas. Se usan mezclas anfótero/aniónico en shampoos, espumas de baño, geles de baño, jabones líquidos, limpiadores para manos, jabón de lavandería y trastes.

1.2.1.3. No iónicos

En los tensoactivos no iónicos la carga neta es cero. Se disuelven pero no se disocian en agua, mediante el efecto combinado de un cierto número de grupos solubilizantes tales como enlaces de tipo éter o grupos hidroxilos en sus moléculas. Las propiedades hidrofílicas son provistas por hidratación de grupos amido, amino, éter o hidroxilo.

Los tensoactivos no iónicos tienen la característica de ser estables en presencia de la mayoría de los productos químicos. Al no ionizarse en agua, no forman sales con los iones metálicos, esto para ser utilizados tanto en aguas blandas como en duras. Su naturaleza química origina que sean compatibles con otros tensoactivos catiónicos, aniónicos y coloides cargados positiva y negativamente.

En estos tensoactivos el grupo hidrofóbico está formado por una cadena larga que contiene una serie de grupos solubilizantes (hidrofílicos), tales como enlaces tipo éter o grupos hidróxilo en sus moléculas. La repetición de estas unidades tiene el mismo efecto que un hidrófilo fuerte, salvo que no hay ninguna ionización. Un caso similar es el de los azúcares que a pesar de su estructura hidrocarbonada, contienen un alto número de hidroxilos, haciendo soluble a la molécula en agua.

1.2.2. Glucopiranosidos (Tensoactivos No iónicos).

Los tensoactivos a base de azúcares provienen de fuentes renovables y presentan excelentes propiedades ecológicas [5]. Existen diferentes posibilidades de unión entre los grupos de la cabeza del azúcar hidrofílica y la cadena alquílica hidrofóbica, de las cuales los más frecuentes se muestran en la figura 1.7. Además de que la cabeza hidrofílica puede consistir de una o varias unidades de azúcar [6]. En el caso de que la parte hidrofóbica tenga dos o más cadenas alquílicas se llaman glucolípidos, figura 1.8.

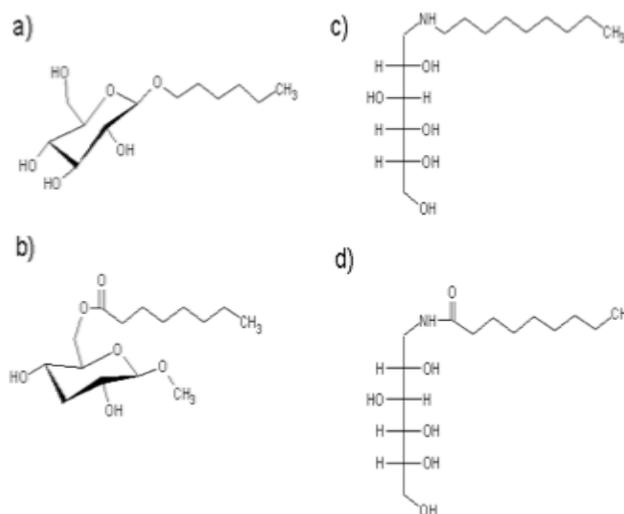


Fig. 1.7. Ejemplos del tipo de unión entre la especie del tipo hidrofóbica e hidrofílica: a) enlace éter, b) enlace éster, c) enlace amino, e) enlace amido.

En el caso de la figura (1.7 (a)) donde solo se tiene una unidad de glucosa en la parte hidrofílica (derivado de la D-glucosa que forma un anillo piranósido) el cual está unido a una sola cadena hidrocarbonada que forma la cola por un enlace éter, se llaman tensoactivos glucopiranósidos [6]. La cadena de estos tensoactivos puede ser de 1 a 18 átomos de carbon. La figura 1.8 muestra la estructura general de la familia de los glucopiranósidos donde n puede adquirir valores desde cero hasta 15.

Una importante característica de sus propiedades fisicoquímicas es su insensibilidad a la temperatura. Esta insensibilidad es causada por la fuerza de los puentes de hidrógeno entre los grupos -OH del azúcar y el agua, los cuales previenen cualquier deshidratación importante de las cabezas, a diferencia de otros tensoactivos no-iónicos como los alcoholes polietoxilados los cuales son muy sensibles a la temperatura. A pesar de que la sensibilidad a la temperatura podría ser una desventaja en ciertos campos de aplicación, este es un parámetro importante que puede ser modificado [7].

En el caso de la formación de micelas de este tipo de tensoactivos se ha demostrado que pequeños cambios en las cabezas de los tensoactivos (anómeros α y β) pueden tener un gran efecto en la forma y tamaño de las micelas. (8)

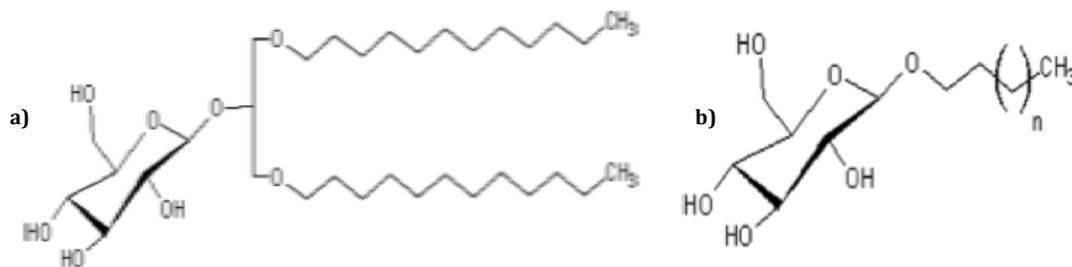


Fig. 1.8. a) Ejemplo de estructura de glucolípido. b) Ejemplo general de la estructura de glucopiranosido

Los glucopiranosidos son solubles en agua, tienen gran actividad superficial, propiedades emulsificantes y su valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de bajo a intermedio. Son poco tóxicos, biodegradables, biocompatibles e ino cuos para la piel. Se pueden obtener directamente de fuentes naturales como el ácido palmítico, el almidón y el aceite de coco. Son fácilmente sintetizables a partir de fuentes como los alcoholes grasos y oligosacáridos [7].

Los glucopiranosidos se emplean como detergentes para algodón. En el proceso de cristalización de proteínas de membrana (solubilizándolas haciendo que pierdan su función, para poder ser caracterizadas físicamente y determinar la estructura espacial) también se utilizan en la liberación de fármacos y se han utilizado en diversos procesos biológicos [9], [10].

Las propiedades de las mezclas de tensoactivos que contienen glucopiranosidos son interesantes desde el punto de vista técnico, en las formulaciones, ya que muchas veces los tensoactivos no-iónicos son mezclados con aniónicos mostrando efectos sinérgicos.

1.2.2.1. Octilglucopiranosido (Tensoactivo No iónico)

El n-octil-beta-d-glucopiranosido (OGP) está formado por una cadena alquílica con ocho átomos de carbono unido a una molécula de glucosa, tiene dos anómeros (α y β), figura 1.9.

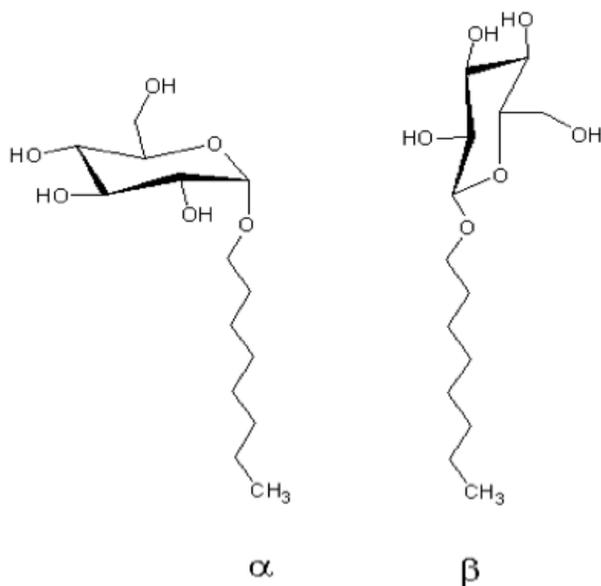


Fig. 1.9. Molécula de octilglucopiranosido, con sus anómeros α y β

De los tensoactivos glucopiranosidos es el más estudiado, tiene una CMC (Concentración micelar crítica) reportada de 18-25 mM con un número de agregación de 27-65 moléculas por micela cerca de la CMC. Se ha utilizado para solubilizar, reconstituir, purificar y cristalizar proteínas de membrana y proteínas asociadas con complejos de membrana sin ser desnaturalizadas, además de ser utilizado como emulsificante, como agente limpiador y acarreador de fármacos debido a que es no tóxico y biodegradable [8].

1.3. Fármacos Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

Es un grupo heterogéneo de fármacos con acciones antiinflamatoria, analgésica y antipirética, cuyos efectos están relacionados con la inhibición de la enzima araquidonato ciclooxygenasa (COX) y, por tanto, la inhibición de la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos (que intervienen en diferentes procesos inflamatorios).

Son útiles en dolores articulares, musculares, dentarios y cefaleas de diversa etiología, incluidas las formas moderadas de migraña. A dosis suficientemente elevadas son también eficaces en dolores postoperatorios y postraumáticos, ciertos cólicos y dolores de origen canceroso en sus primeras etapas. Los AINEs están indicados especialmente en ciertos dolores caracterizados por una participación destacada de las prostaglandinas (por ejemplo, dismenorreas o situaciones como metástasis óseas que cursan con intensa actividad osteoclástica).

1.3.1 Ibuprofeno.

El ibuprofeno es un antiinflamatorio no esteroideo (AINE) perteneciente al subgrupo de los derivados del ácido propiónico. Posee una eficaz actividad antiinflamatoria, antipirética y analgésica. Es probablemente la molécula más estudiada clínicamente entre todos los AINEs.

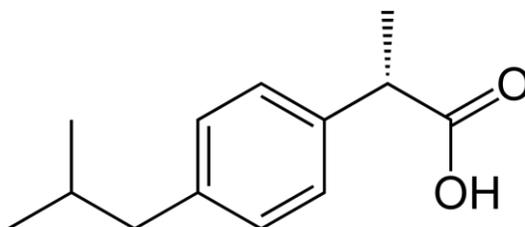


Fig. 1.10. Molécula de ibuprofeno

1.3.1.1. Mecanismo de acción.

Inhibe la acción de las enzimas COX-1 y COX-2. Los efectos antiinflamatorios del ibuprofeno son el resultado de la inhibición periférica de la síntesis de prostaglandinas subsiguiente a la inhibición de la ciclooxigenasa. El ibuprofeno inhibe la migración leucocitaria a las áreas inflamadas, impidiendo la liberación por los leucocitos de citoquinas y otras moléculas que actúan sobre los receptores nociceptivos.

Como otros AINEs no altera el umbral del dolor ni modifica los niveles de prostaglandinas cerebrales, concluyéndose que sus efectos son periféricos. La antipirexia es consecuencia de la vasodilatación periférica debido a una acción central sobre el centro regulador de la temperatura del hipotálamo.

1.3.1.2. Farmacocinética.

Se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal, presentándose picos de concentraciones plasmáticas 1-2 horas después de la administración. Su vida media de eliminación es de unas 2 horas aproximadamente. El ibuprofeno se une fuertemente a las proteínas plasmáticas.

Se metaboliza en el hígado, dando lugar a 2 metabolitos inactivos que, junto con el ibuprofeno, se excretan por vía renal bien como tales o como metabolitos conjugados. La excreción renal es rápida y completa.

1.3.1.3. Toxicidad

En los estudios de toxicidad los efectos observados coinciden con los de otros antiinflamatorios no esteroideos. El ibuprofeno no resultó teratogénico en diferentes especies animales. Asimismo, tanto los estudios de mutagénesis como los de cancerogénesis dieron resultados negativos.

1.4 Técnicas y Fundamentos

1.4.1 Calorimetría

Es la técnica que se basa en la medición del flujo de calor en una reacción química o en un cambio físico usando un equipo llamado calorímetro.

Los calorímetros suelen clasificarse en calorímetros adiabáticos y calorímetros isotérmicos. Los calorímetros adiabáticos constan esencialmente de un recinto de paredes adiabáticas, en cuyo interior se coloca la unidad calorimétrica en la cual se efectúan las mediciones. No existe un material cuya capacidad calorífica sea cero. Se han desarrollado sistemas que tratan de anular o minimizar las pérdidas caloríficas.

1.4.1.1 Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido o DSC es una técnica experimental dinámica que nos permite determinar la cantidad de calor que absorbe o libera una sustancia, mantenerla a temperatura constante durante un tiempo determinado o para calentarla o enfriarla a velocidad constante en un determinado intervalo de temperaturas. La calorimetría diferencial de barrido se ha revelado como una técnica importante en el campo de la ciencias biológicas debido a su elevado grado de sensibilidad y a su rápida velocidad de análisis, esta técnica, por ejemplo, está considerada hoy en día como la más adecuada para estudiar la energética de las transiciones plegamiento-desplegamiento de las proteínas. Por otra parte, la calorimetría diferencial de barrido (DSC) se emplea para determinar la temperatura de inicio de la fusión de las cadenas lipídicas y otras transiciones de fase y el área bajo la curva del termograma obtenido (es decir, el cambio de entalpía ΔH) representa la cooperatividad del proceso. Dado que la temperatura de transición es sensible a la presencia de aditivos en la bicapa, este es un parámetro recomendado para monitorear interacciones droga-lípidos y para detectar impurezas y/o productos de hidrólisis.

En la técnica experimental de Calorimetría Diferencial de Barrido se dispone de dos celdas. Una de ellas contiene la muestra a analizar y la otra corresponde a la referencia. Se usan calefactores individuales para cada celda y un sistema de control comprueba si se producen diferencias de temperatura entre la muestra y la referencia. Si se detecta cualquier diferencia entre los calefactores individuales, se corregirán de tal manera que la temperatura se mantendrá igual en ambas celdas. Es decir, cuando tiene lugar un proceso exotérmico o endotérmico el instrumento compensa la energía necesaria para mantener la misma temperatura en ambas celdas.

En este trabajo se utilizó un microcalorímetro modelo VP-DSC de Microcal Incorporated.



Fig. 1.11. Calorímetro Diferencial de Barrido, VP-DSC

1.4.1.2 Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).

La Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica analítica que nos permite estudiar el calor de interacción entre dos moléculas. La medición de este calor permite una muy precisa determinación de las constantes de equilibrio (K), la estequiometría y un perfil termodinámico de la reacción en el cual se incluyen la variación en la entalpía (ΔH) con los datos que se logran obtener se puede calcular la variación en la energía de Gibbs (ΔG) así como la entropía (ΔS).

La Calorimetría de titulación isotérmica ha demostrado ser extremadamente útil para el estudio de equilibrios tensoactivo-membrana y se pueden distinguir cuatro tipos de experimentos en líneas generales:

- ✎ La medición de la *concentración micelar crítica (CMC)*.

- ✎ *El equilibrio de reparto* entre el tensoactivo monomérico y la membrana lipídica.

- ✎ *Solubilización de membrana lipídica* a altas concentraciones de tensoactivo.

- ✎ *Formación de membrana* tras la dilución de micelas mixtas de lípido-tensoactivo.

El microcalorímetro TAM (Thermal Activity Monitor) es un sistema diseñado para la medición de procesos de carácter exotérmicos y endotérmicos, a una gran variedad de reacciones químicas y biológicas. El equipo cuenta con una alta sensibilidad, detecta diferencias de temperatura de 1×10^{-4} °C. Cuenta con un baño de 25L que actúa como termostato, manteniendo la temperatura constante en un intervalo de $\pm 2 \times 10^{-4}$ °C, dentro del baño están colocadas cuatro unidades calorimétricas independientes.

Una unidad calorimétrica cuenta con dos celdas, una que corresponde a la celda de referencia y otra a la celda de reacción, ambas celdas están fabricadas bajo las mismas dimensiones y hechas de acero inoxidable.

El calorímetro emplea la configuración diferencial en la cual los efectos térmicos que se producen en cada una de las celdas se detectan mediante termopilas, ambos sensores se conectan en oposición, de tal manera que los efectos comunes que se produzcan con la misma velocidad y amplitud se cancelan. Las termopilas del semiconductor son elementos Peltier que generan una fuerza electromotriz proporcional a la diferencia de las temperaturas de sus superficies opuestas que dan como resultado final una señal eléctrica proporcional al flujo de calor o potencia térmica neta.

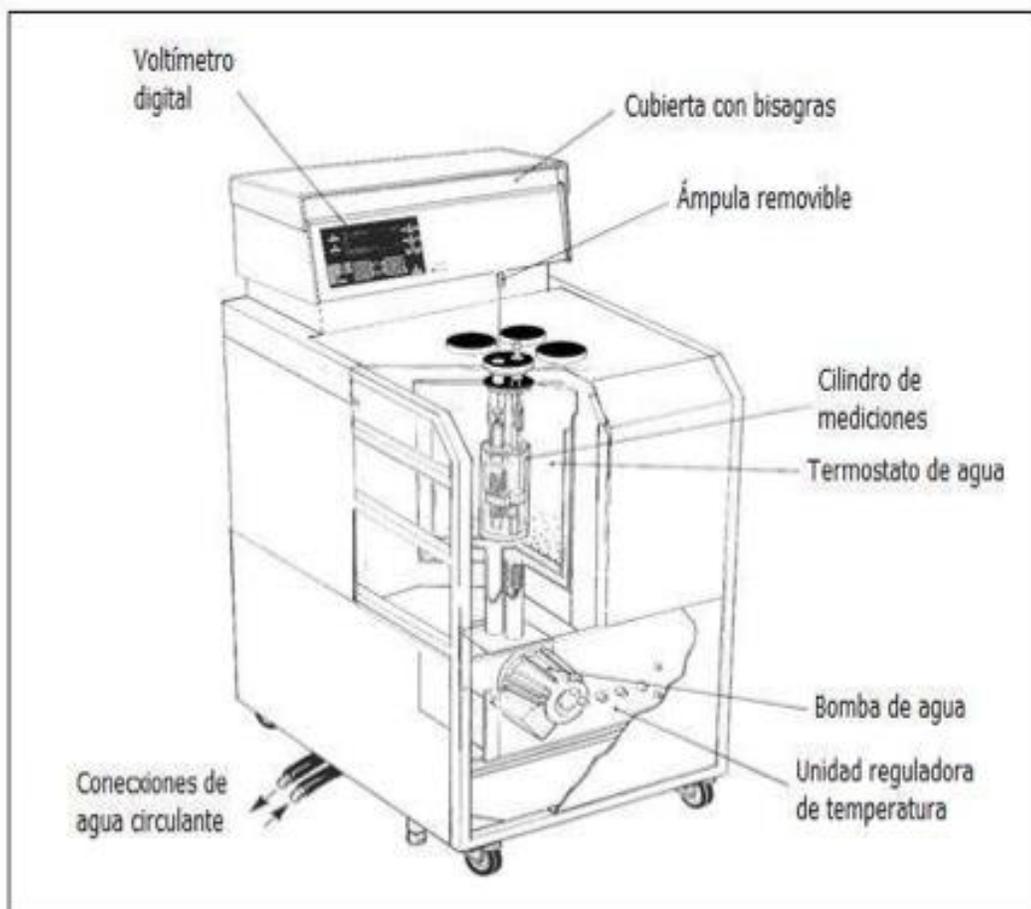


Fig.1.12. Microcalorímetro Termal Activity Monitor (TAM) de thermometric, Suecia.

Se cuenta con jeringas las cuales dispensan las disoluciones titulantes a través de cánulas de un diámetro muy pequeño, el volumen de la inyección así como la velocidad del volumen dispensando y el número de inyecciones se controla a través de un software con el cual también se monitorea el progreso del experimento.

Los experimentos se realizan bajo agitación constante que puede variar entre 80 a 100 revoluciones por minuto. El TAM cuenta con siete sensibilidades disponibles que son 3, 10, 30, 100, 300, 1000 y 3000 μW las cuales nos ayudan a abarcar un gran número de reacciones.

1.4.2. Dispersión de luz.

La dispersión de la luz se considera como el redireccionamiento de la luz que se produce cuando una onda electromagnética de onda (es decir, un rayo de luz incidente) se encuentra con un obstáculo o falta de homogeneidad, en nuestro caso la dispersión de partículas. A medida que la onda electromagnética interactúa con la partícula las órbitas de los electrones dentro de las moléculas constituyentes de la partícula son perturbadas periódicamente con la misma frecuencia así como el campo eléctrico de la onda incidente.

La oscilación o la perturbación de los resultados de la nube de electrones da una separación periódica de la carga dentro de la molécula, lo cual se denomina un momento dipolar inducido. El momento dipolar inducido oscilante se manifiesta como una fuente de radiación electromagnética, lo que resulta en la luz dispersada.

1.4.2.1 Dispersión de luz dinámica

Conocida como espectroscopía de correlación de fotones, esta técnica es uno de los métodos más utilizados para determinar el tamaño de partículas.

Un rayo de luz monocromática, tal como un láser, en una solución con partículas esféricas en movimiento browniano provoca un desplazamiento Doppler cuando la luz llega a la partícula en movimiento, cambiando la longitud de onda de la luz entrante, este cambio está relacionado con el tamaño de la partícula.

En este trabajo se utilizó el equipo de DLS, NANOSIZER ZS ZEN(3600) de Malvern instruments ltd, Malvern, UK.

1.4.3. Microscopia electrónica de barrido. (SEM)

El microscopio electrónico de barrido o SEM (por sus siglas en inglés) es el mejor método adaptado al estudio de la morfología de las superficies. A diferencia de un microscopio óptico que utiliza fotones del espectro visible, la imagen entregada por el SEM se genera por la interacción de un haz de electrones que "barre" un área determinada sobre la superficie de la muestra. La técnica esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones, este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que, captadas con detectores adecuados, nos proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra. La señal de electrones secundarios, que son los electrones arrancados a la propia muestra por la acción del haz incidente proporciona una imagen de la morfología superficial de la muestra.

En este trabajo se utilizó el equipo JEOL modelo JSM-35CF.

Capítulo 2. Objetivos e Hipótesis.

Objetivos:

- ✦ Establecer las mejores condiciones para la elaboración de liposomas utilizando dipalmitoil fosfatidilcolina (DPPC) como principal componente en la bicapa lipídica mediante la técnica de evaporación de fase inversa y la homogenización del tamaño de partícula mediante sonicación.
- ✦ Determinar el efecto de la adición de colesterol (Chol) en la elaboración de estos liposomas mediante estudio de tamaño de partícula y técnicas calorimétricas.
- ✦ Determinar el cambio de entalpía y el coeficiente de partición para la formación de micelas mixtas formadas por el tensoactivo octil glucopiranosido (OGP) y fosfolípidos de DPPC:Chol.
- ✦ Determinar el tamaño de partícula de los diferentes sistemas estudiados.
- ✦ Estudiar mediante tamaño de partícula y técnicas calorimétricas la microencapsulación de un fármaco modelo en los sistemas liposomales.
- ✦ Hacer el análisis termodinámico de sistemas de liposomas variando los componentes como se muestra en la siguiente tabla:

Muestra	Sistema
A	Solución de Liposomas de DPPC y OGP
B	Solución de Liposomas de DPPC:Chol relación 4:1 y OGP
C	Solución de Liposomas de DPPC-Ibuprofeno y OGP
D	Solución de Liposomas de DPPC:Chol relación 4:1 y OGP Ibuprofeno

Tabla 2.1. Sistemas de liposomas-OGP a estudiar.

Hipótesis:

- ✦ Las bicapas lipídicas pueden ser utilizadas para microencapsular moléculas lipófilicas. La adición de Colesterol y/o un tensoactivo a estos sistemas modifica su estabilidad. Mediante la determinación de los parámetros termodinámicos del proceso de partición del tensoactivo es posible observar la transición de liposomas hacia micelas y/o vesículas mixtas y caracterizar la estabilidad de los sistemas obtenidos.
- ✦ Mediante DSC y caracterización de tamaño de partícula, es posible evaluar la calidad de la técnica empleada para la formación de liposomas.

Capítulo 3. Metodología experimental.

3.1. Materiales y equipo.

- Monitor de Actividad Térmica (TAM) Termometric, Suecia, Modelo 2277
- Rotavapor BUCHI R-3
- Balanza analítica OHAUS modelo PM400
- Desionizador de agua
- Sonificador Cole Parmer Modelo 8890
- Matraz de bola de 50mL
- Vaso de precipitados de 100mL
- Matraz Aforado de 100mL
- Matraz Aforado de 10 mL
- Piseta
- Espátula cromo-níquel

3.2. Reactivos

- Agua desionizada y desgasificada
- Etanol
- Acetona
- OGP (Octil-glicosil-piranosido)
- Fosfatidilcolina
- Dipalmitoil Fosfatidilcolina (DPPC)
- Colesterol (Chol)
- Ibuprofeno

Fosfolípidos.	Masa Molar (g/mol)	Fórmula molecular	Pureza (%)
Fosfatidilcolina	*	*	40
Dipalmitoil Fosfatidilcolina	734	$C_{40}H_{80}NO_8P$	99
Colesterol	386.6	$C_{27}H_{46}O$	99

Tabla 3.1. Propiedades físicas de los fosfolípidos empleados. * La fosfatidilcolina al ser una mezcla de lípidos, no posee una masa molar ni un formula molecular definida.

3.3. Metodología

3.3.1. Técnica de formación de liposomas.

La primera parte del estudio consistió en la elaboración de liposomas mediante el método denominado evaporación en fase reversa. En dicho método, se parte de una solución de fosfolípidos en un solvente orgánico, este disolvente se elimina mediante el uso de un rotavapor, a baja presión, y calentando a una temperatura ligeramente superior al punto de ebullición del solvente orgánico empleado a una velocidad de rotación de 60 rpm. Tras la eliminación del solvente orgánico, los fosfolípidos quedan adheridos en la pared del matraz de bola, formando una película, que se hidrata con una solución acuosa y se somete a un proceso de agitación hasta que toda la película se incorpore a la fase acuosa, en este punto del proceso las monocapas lipídicas que constituyen las micelas se sitúan lo suficientemente cerca unas de otras para dar lugar a las bicapas lipídicas que constituyen la pared de los liposomas.

Esta solución de liposomas, se somete a un proceso de sonicación por 2 horas en un baño a una temperatura constante de 10 °C superior a su temperatura de transición, con el fin de que al aplicar energía, el reordenamiento de los fosfolípidos se realice fácilmente y se obtenga un tamaño de partícula bastante homogéneo.

3.3.2. Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC).

Se realizó el experimento de titulación de n-Octil- β -D-glucopiranosido (OGP) con una solución de liposomas. Tanto en la celda de referencia como en la de muestra se colocó aproximadamente 1.72 mL de la solución de OGP 15mM. En la jeringa de referencia se colocó agua desionizada, y en la jeringa de muestra se colocaron las siguientes soluciones de liposomas.

Muestra	Sistema [10mM]
A	Solución de Liposomas de DPPC
B	Solución de Liposomas de DPPC:Chol relación 4:1 molar
C	Solución de Liposomas de DPPC-Ibuprofeno
D	Solución de Liposomas de DPPC:Chol relación 4:1 molar, Ibuprofeno

Tabla 3.2. Sistemas de liposomas.

Se realizaron 40 inyecciones, cada una de 10 μ L, a una temperatura de 298.15K.

3.3.3. Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Se realizó el experimento de temperatura de transición de los liposomas de la siguiente manera: se colocó en la celda de referencia agua desionizada y desgasificada y en la celda de muestra la solución de liposomas 2mM, se realizan 10 barridos, en un rango de temperatura de 20 a 55 °C, y una velocidad de barrido de 60°C/hr.

3.3.4. Tamaño de Partícula

En un equipo NANOSIZER ZS ZEN (3600) se colocó en una celda de plástico una solución de liposomas de concentración 0.007g/L, considerando al látex de poliestireno como material estándar, cuyo índice de refracción es 1.59 y su índice de absorción de luz es 0.010; y como dispersante agua a una temperatura de 25°C, estos parámetros se establecen en el software del equipo. Se realizaron 3 corridas de 10 repeticiones cada una para un resultado confiable.

3.3.5. Microscopia electrónica de barrido.

Las muestras fueron secadas al vacío por una hora, al término fueron recubiertas de Carbono y Oro mediante la técnica de pulverización catódica a alto vacío, una vez recubiertas fueron observadas al microscopio a diferentes potencias del haz de electrones.

Capítulo 4. Modelo termodinámico.

Wenk et al. (1997) presentan un modelo para estudiar la asociación de un tensoactivo (en este caso el OGP) con la membrana lipídica considerando un simple equilibrio de partición a concentraciones por debajo de la concentración micelar crítica (CMC). Parten de la ecuación siguiente

$$X_b = Kc_{Df} \quad (1)$$

Donde c_{Df} es la concentración de tensoactivo libre en el seno de la solución, y X_b es el grado de unión y se define como la relación membrana-tensoactivo unido, c_{Db} , respecto a la concentración total de lípido, c_L° .

$$X_b = c_{Db}/c_L^\circ \quad (2)$$

X_b es también llamado relación tensoactivo-lípido, K es el coeficiente de partición. Tomando en consideración la conservación de masas del tensoactivo.

$$c_D^\circ = c_{Df} + c_{Db} \quad (3)$$

A partir de estas ecuaciones, se obtiene

$$c_{Db} = c_D^\circ \frac{Kc_L^\circ}{1 + Kc_L^\circ} \quad (4)$$

En el presente experimento, la concentración de detergente en la celda calorimétrica se fija (a excepción de un pequeño efecto de dilución) y la concentración de lípidos, c_L° , aumenta por inyecciones consecutivas de liposomas. La variación de la envolvente detergente está dada por la primera derivada de la ecuación 5

$$\delta c_{Db} = \delta c_D^\circ \frac{Kc_L^\circ}{(1 + Kc_L^\circ)^2} \quad (5)$$

Considerando que el calor molar de partición de OGP en la bicapa lipídica de DPPC es ΔH_D° , y el calor medido de la reacción está dado por la siguiente ecuación.

$$\delta H = n_{Db} \Delta H_D^\circ = c_{Db} V \Delta H_D^\circ \quad (6)$$

donde V es el volumen total de la solución en reacción, y $n_{Db} = c_{Db} V$ es el número de moles del tensoactivo que se encuentra unido a la membrana lipídica. En el experimento de titulación, la concentración de lípido en la celda calorimétrica no es constante sino que se incrementa en cada inyección por $\delta c_{L,i}$:

$$\delta c_{L,i} = V_i c_{L,i}^\circ / V \quad (7)$$

después de i inyecciones el calor acumulado está dado por

$$\delta H_i = c_D^\circ \Delta H_D^\circ V \frac{i K V_i c_{L,i}^\circ}{1 + i K V_i c_{L,i}^\circ} \quad (8)$$

El volumen de la reacción V , incrementa con cada inyección por V_{inj} . Los efectos resultantes de la dilución son tomados en cuenta haciendo las siguientes sustituciones:

$$\begin{aligned} V &\rightarrow V_o + i V_{inj} \\ c_L^\circ &\rightarrow c_L^\circ V_o / (V_o + i V_{inj}) \\ c_D^\circ &\rightarrow c_D^\circ V_o / (V_o + i V_{inj}) \end{aligned} \quad (9)$$

Que conducen a

$$\delta H_i = c_D^\circ \Delta H_D^\circ V_o V_{inj} \frac{i K c_L^\circ}{V_o + i V_{inj} (1 + K c_L^\circ)^2} \quad (10)$$

El calor entre dos inyecciones consecutivas δH_{i-1} y δH_i es

$$\delta h_i = \delta H_i - \delta H_{i-1} \quad (11).$$

Que es determinado directamente del experimento de ITC . Las ecuaciones 10 y 11 fueron aplicadas exitosamente por Wenk *et al* (**1997**). para describir la titulación lípido-tensoactivo, donde el lípido era 1-palmitoil-2-oleoil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (POPC) y el tensoactivo era OGP[1,2].

Capítulo 5. Resultados y Discusión

5.1 Primera serie de experimentos: Determinación de la cantidad de Chol.

Con el objetivo de encontrar las mejores condiciones para la elaboración de liposomas, tener un tamaño de partícula homogéneo y una solución de liposomas que no floculara en un periodo mínimo de 7 días, se trabajó con una mezcla de lecitina al 40% de pureza y Chol 99% de pureza. Se probaron mezclas lecitina: Chol, en las siguientes proporciones. La lecitina es una mezcla de fosfolípidos.

Solución	Concentración de Lípido [M]	Concentración de Chol [M]	Proporción Lípido:Chol.
1	0.01	0.01	1:1
2	0.01	0.005	2:1
3	0.01	0.0025	4:1

Tabla 5.1. Relación de fosfolípidos para la formación de liposomas.

En un Matraz de Bola de 50 mL, se pesó una cantidad de fosfolípidos para preparar una solución acuosa 10mM. Esta cantidad de fosfolípidos se disolvió en 10 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) aplicando calor hasta que todos los fosfolípidos se disolvieron en el solvente; posteriormente se evaporó el solvente orgánico utilizando un rotavapor, aplicando vacío, en un baño María a 50°C y a 60rpm, durante 30 minutos, hasta eliminar todo el solvente posible.

Al final de la evaporación de CH_2Cl_2 , se obtuvo una película de fosfolípidos alrededor del interior del matraz, que se hidrató con agua desionizada, y se sometió a un proceso de agitación, en un baño María a 50°C , hasta que todo el film se incorporó a la fase acuosa.

La solución de liposomas obtenida, se sonicó por 2 horas, y se tomaron alícuotas a los 0, 5, 15, 30, 60, 120 minutos de sonicación. Se determinó el tamaño de partícula de las soluciones 1, 2 y 3 de la tabla 5.1, obteniéndose los resultados que se muestran en la tabla 5.2.

Tiempo (min.)	Solución 1 Tam. de Part. (nm.)	Solución 2 Tam. de Part. (nm.)	Solución 3 Tam. de Part. (nm.)
0	783	647.1	425.8
5	384.4	328.8	248
15	87.4	105.6	74.35
30	90.66	89.13	65.54
60	74.64	91.9	50.51
75	75.85	85.9	50.96

Tabla 5.2. Dependencia del tamaño de partícula en función de la cantidad de Chol en la bicapa lipídica. La concentración de fosfatidilcolina para los tres sistemas es constante [0.01M] y la temperatura de sonicación varió de 24 y 50°C.

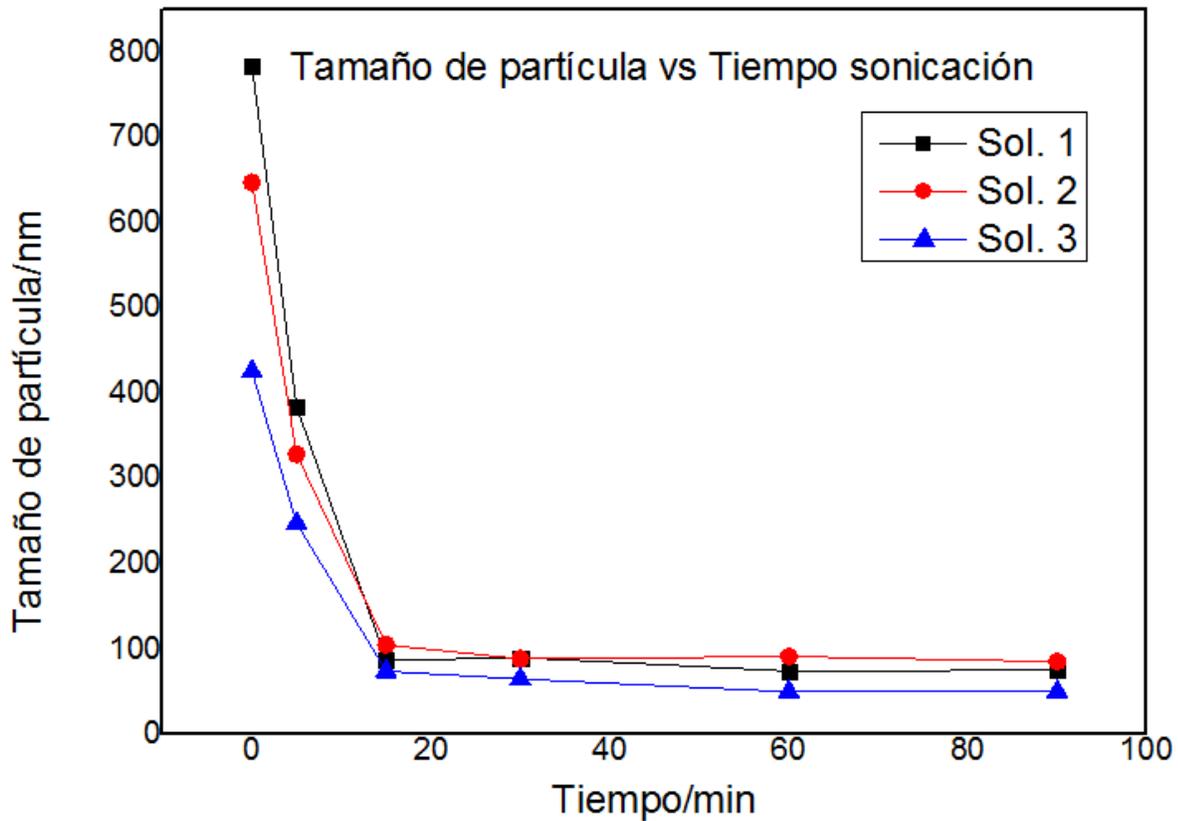


Fig 5.1. Dependencia del tamaño de partícula (diámetro medio) respecto a la cantidad de Chol , de las tres soluciones descritas en la tabla 5.2.

Del análisis de los resultados mostrados en la tabla 5.2. y en la gráfica de la figura 5.1 se concluye que se obtienen partículas de tamaño homogéneo en un tiempo menor cuando el Chol se encuentra a una concentración de 0.0025M; esto puede ser debido a que la doble capa lipídica no es muy rígida ni muy fluida. Por estas razones se decidió trabajar con la solución 3 de la tabla 5.1, es decir, aquella en la cual la relación fosfolípido: Chol es 4:1.

Con la relación establecida de lípido : Chol 4:1, se realizaron tres tipos de experimentos: en el primero se mantuvo la temperatura constante a 24°C, en el segundo se trabajó a 50°C y en el tercero se partió de una temperatura inicial de 24°C y se fue calentando lentamente hasta llegar a una temperatura de 50°C.

La tabla 5.3 y la figura 5.2 muestran los resultados obtenidos para estos tres experimentos. Se observa que al trabajar a 50°C el tamaño de partícula disminuye drásticamente (de 668.3 a 86.85 nm) en los primeros 15 minutos, y sigue disminuyendo de una forma gradual hasta los 43.3 nm a los 75 minutos. Esto puede ser atribuido a cambios estructurales en la bicapa lipídica donde se pasa de una fase rígida a una más flexible.

Por el contrario, cuando se trabajó a 24°C, se necesitó más tiempo para obtener un tamaño de partícula más pequeño (91 nm en 90 min). Cuando se calentó la solución desde 24°C hasta 50°C durante la sonicación, el tamaño de partícula disminuyó gradualmente desde 425.8 hasta 50.96 nm en 75 min.

Tiempo de Sonicación (min)	T = 24 °C Tam. de Part. (nm)	T = 50 °C Tam. de Part. (nm)	T = (24 a 50°C) Tam. de Part. (nm)
0	612.3	668.3	625.8
5	418	486.6	248
15	414	86.85	74.35
30	460.9	64.02	65.54
60	113	48.06	50.51
75	91	43.3	50.96

Tabla 5.3. Cambio en tamaño de partícula en función del tiempo de sonicación. La concentración de fosfatidilcolina es [0.01M] y la de Chol es [0.0025M].

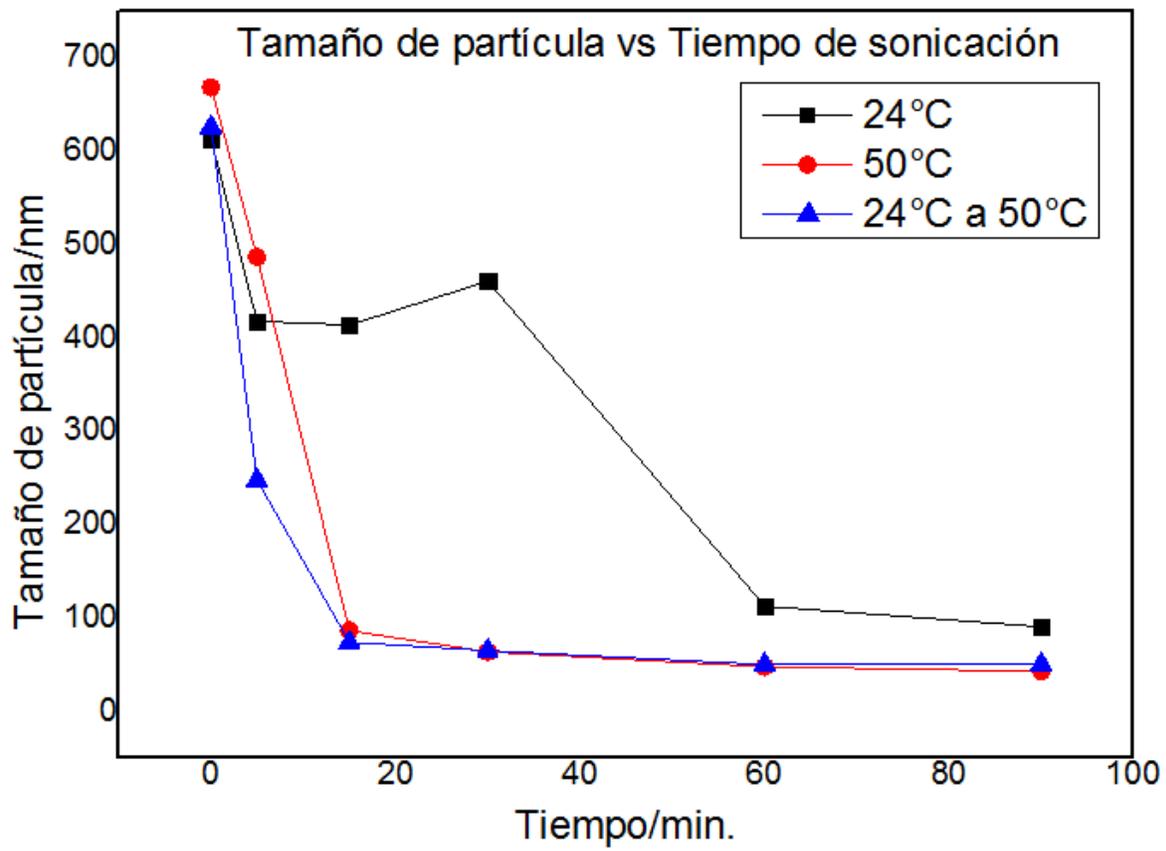


Fig. 5.2. Comparación de los tamaños de partícula, respecto a la temperatura de trabajo en el baño de sonicación.

5.2. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC).

Se empleó la calorimetría de titulación isotérmica (ITC) para determinar parámetros fisicoquímicos (entalpía, entropía, energía de Gibbs, y la constante de partición) de los cuatro sistemas de liposomas descritos en la tabla 5.1.

En el experimento se colocó en la celda de muestra la solución de OGP 15mM, que está por debajo de su CMC. En la jeringa se colocó la solución de liposomas a una concentración 10mM. Se inyectaron alícuotas de 10 μ L. Como referencia o control, se tituló la solución de OGP, con agua desionizada.

Con cada inyección de lípidos la concentración de OGP libre se reduce, por lo que hay menos tensoactivo disponible para la unión, y el calor experimental de reacción disminuye.

Las constantes de partición varían con la composición de la bicapa y del envejecimiento de la misma. La tabla 5.4 muestra los parámetros termodinámicos del proceso de partición del OGP en la bicapa y el tamaño de partícula para el sistema DPPC-OGP. Se observa que en este sistema prácticamente los parámetros no dependen del tiempo de envejecimiento. Los valores altos obtenidos para la constante de partición muestran que el OGP se encuentra preferentemente unido a la bicapa de fosfolípidos, los valores de cambio de entalpía y cambio de entropía, señalan que éste es un proceso espontáneo y guiado por la entropía, esto debido al efecto hidrofóbico, es decir, debido a que al incorporarse el OGP a la bicapa, las moléculas de agua que lo rodean pasan al seno de la solución y tienen más grados de libertad.

La figura 5.3 muestra el potenciograma para el sistema DPPC-OGP, al inicio de cada experimento se realiza una calibración eléctrica, de carácter exotérmico, que se observa en el monitor como un pico hacia arriba de tal manera que las señales hacia abajo representan procesos endotérmicos. En todos los potenciogramas presentados en este trabajo las señales correspondientes a las calibraciones no se muestran debido a que salen de la escala. El área de cada curva fue determinado por el software del DIGITAM 4.1 y representa el calor absorbido o

cedido en cada una de estas inyecciones (ΔH). Este calor es representado contra el número de inyecciones en la figura 5.4; a estos datos experimentales se ajusta el modelo termodinámico de partición de Seelig [1,2]. Cabe señalar que las discontinuidades señaladas en las curvas no pueden ser explicadas por este simple modelo de partición, por lo cual Wenk, et al.(1997), proponen realizar los experimentos a bajas concentraciones de tensoactivo, pero en nuestro caso, resulta complicado, porque las señales son muy pequeñas.

<i>Elaboración de Liposoma DPPC</i>	<i>Ejecución ITC</i>	ΔH_{OGP}° (kcal/mol)	<i>K</i>			
			10^6 (mL/mol)	ΔG_{OGP}° (kcal/mol)	$T\Delta S_{OGP}^{\circ}$ (kcal/mol)	<i>Tamaño</i> (nm)
01-Mzo-13	02-Mzo-13. F	0.0131	2.33	-8.68	8.69	48.61
01-Mzo-13	05-Mzo-13. V	0.0141	2.54	-8.73	8.75	48.61
18-Mzo-13	19-Mzo-13. F	0.0155	6.16	-9.26	9.27	48.61
18-Mzo-13	23-Mzo-13. V	0.018	6.31	-9.27	9.29	48.61

Tabla 5.4. Parámetros termodinámicos del sistema de liposomas DPPC 10mM, pH 7.4.

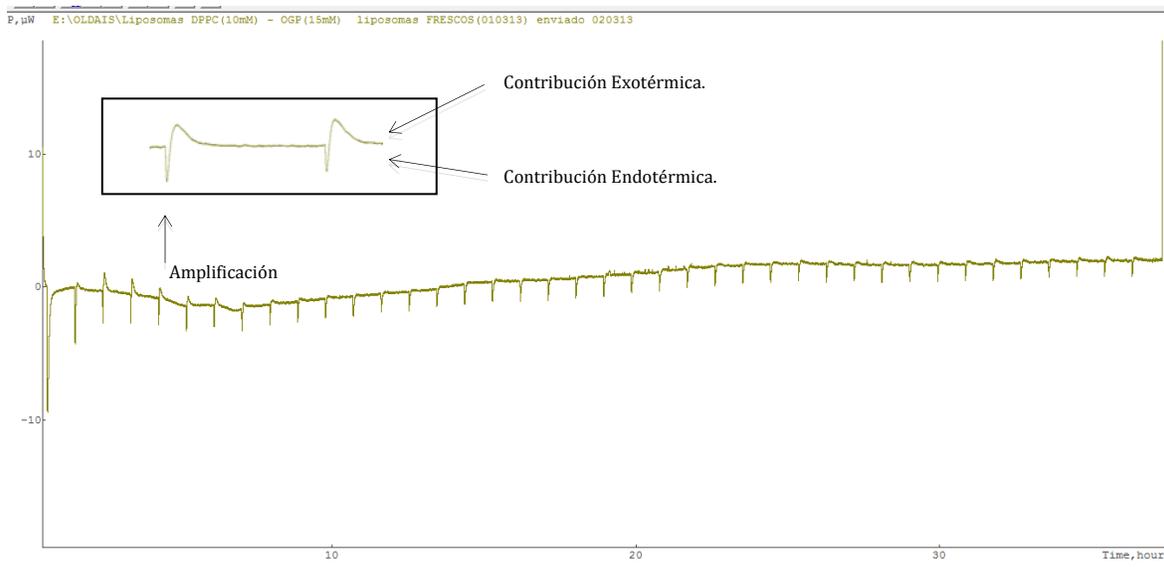


Fig. 5.3. Potenciograma del sistema de liposomas formados de DPPC con OGP.

El potenciograma de la figura 5.3, como ya se ha dicho, representa al sistema DPPC-OGP. En las primeras ocho inyecciones se observan dos contribuciones,

una endotérmica seguida por una exotérmica (véase fig 5.3). La contribución de carácter endotérmico se debe a la incorporación del OGP a la bicapa lipídica, mientras que la aportación exotérmica es causada por la desmicelización del OGP. Las señales de las inyecciones subsecuentes son de carácter totalmente endotérmico y decrecen conforme avanza el experimento. A partir de la novena inyección, conforme se adiciona más solución de liposomas, la señal de carácter endotérmico, comienza a decrecer, debido a que el OGP, comienza a disolver a la vesícula, porque la bicapa se encuentra ya saturada de OGP, dando lugar ahora a un nuevo arreglo que es el de la micela mixta, compuesta por fosfolípidos y OGP como se ilustra en la figura 5.4.

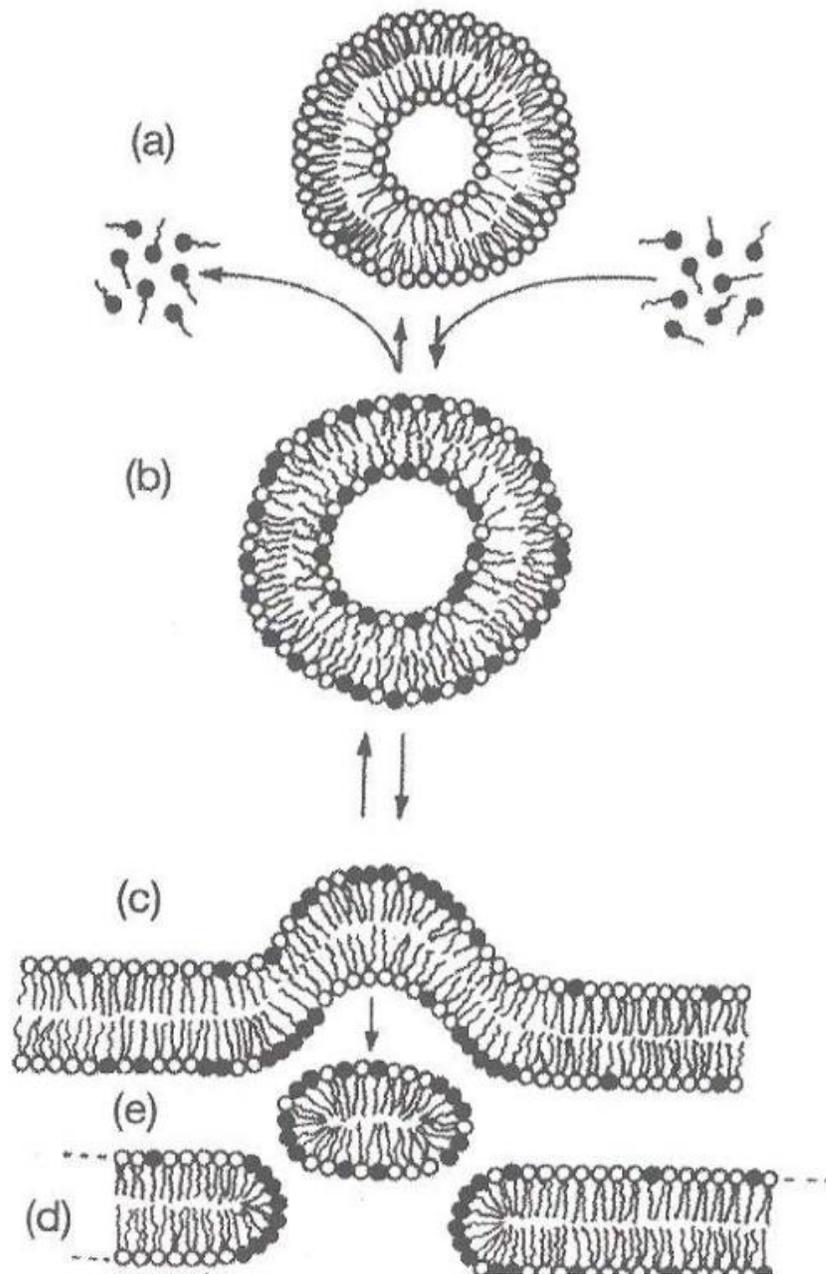
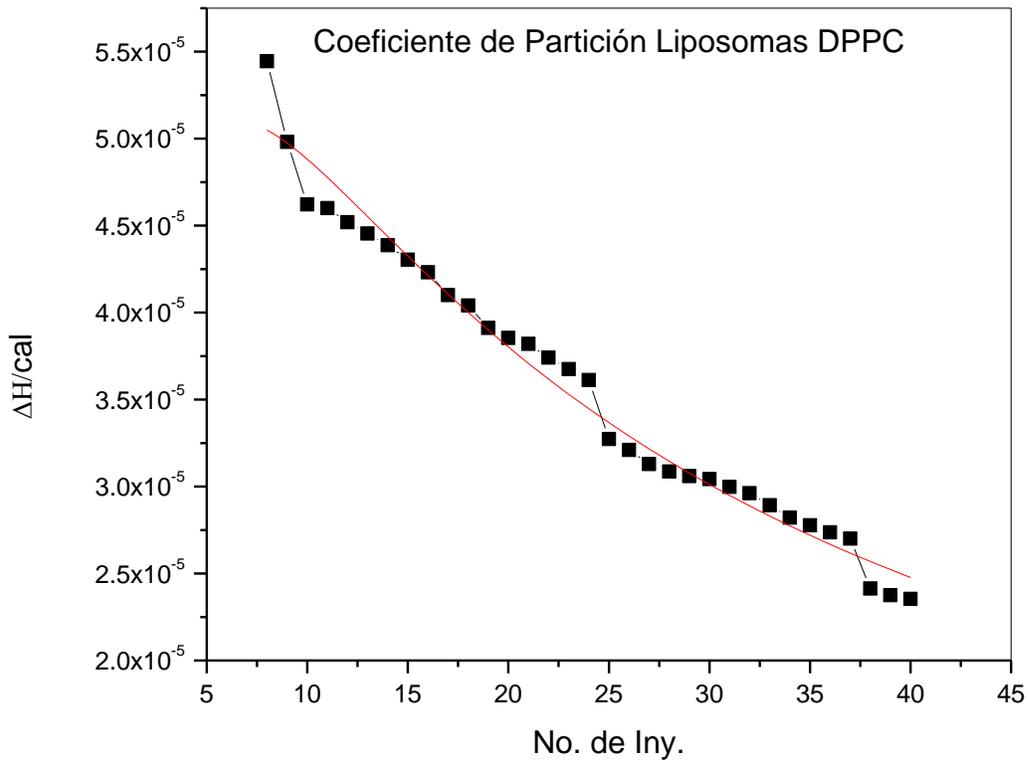


Fig. 5.4. a) Liposoma. b) Muestra la incorporación de tensoactivo a la bicapa lipídica. c) Conforme la cantidad de tensoactivo en la bicapa aumenta, este arreglo comienza a perder estabilidad. d) La bicapa es destruida. e) con la bicapa destruida, aparece un nuevo arreglo que es la micela mixta, compuesta por fosfolípidos y tensoactivo.



Model	Partition (User)		
Equation	((c*e*f*d*A*x)/(e+(x*f*(1+B*d))))^(2))		
Reduced Chi-Sqr	8.78183E-13		
Adj. R-Square	0.98271		
		Value	
B	A	3.15688E7	
	B	2.32761E6	

Fig. 5.5 Ajuste de Coeficiente de Partición de liposomas de DPPC y en la parte inferior se muestra la tabla de datos obtenidos tras realizar el ajuste, donde B es la constante del proceso de partición del OGP (**K**) y A es la entalpía del proceso de partición del OGP multiplicada por la constante de partición ($\Delta H_{OGP} \circ K$).

La tabla 5.5. muestra los parámetros termodinámicos para el sistema DPPC-OGP en presencia de Chol. El cambio de entalpía sigue siendo positivo, pero aumenta en comparación con el sistema DPPC-OGP en ausencia de Chol, debido a que la introducción del Chol en la bicapa implica un consumo de energía. La constante de partición aumenta un orden de magnitud y el proceso se hace más espontáneo. En ambos casos el proceso de partición está dirigido por la entropía debido al paso de las moléculas de agua que rodean al OGP hacia el seno de la solución.

Elaboración de		K					Tamaño
Liposoma	Ejecución	ΔH_{OGP}°	10^7	ΔG_{OGP}°	$T\Delta S_{OGP}^{\circ}$		
DPPC :Chol	ITC	(kcal/mol)	(mL/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(nm)	
01-Abril-13	02-Abril-13 F	0.034	7.52	-10.74	10.77	56.48	
01-Abril-13	06-Abril-13 V	0.021	6.75	-10.68	10.70	56.48	

Tabla 5.5. Parámetros termodinámicos del sistema de liposomas DPPC:Chol 5mM:1.25mM, pH

7.34.

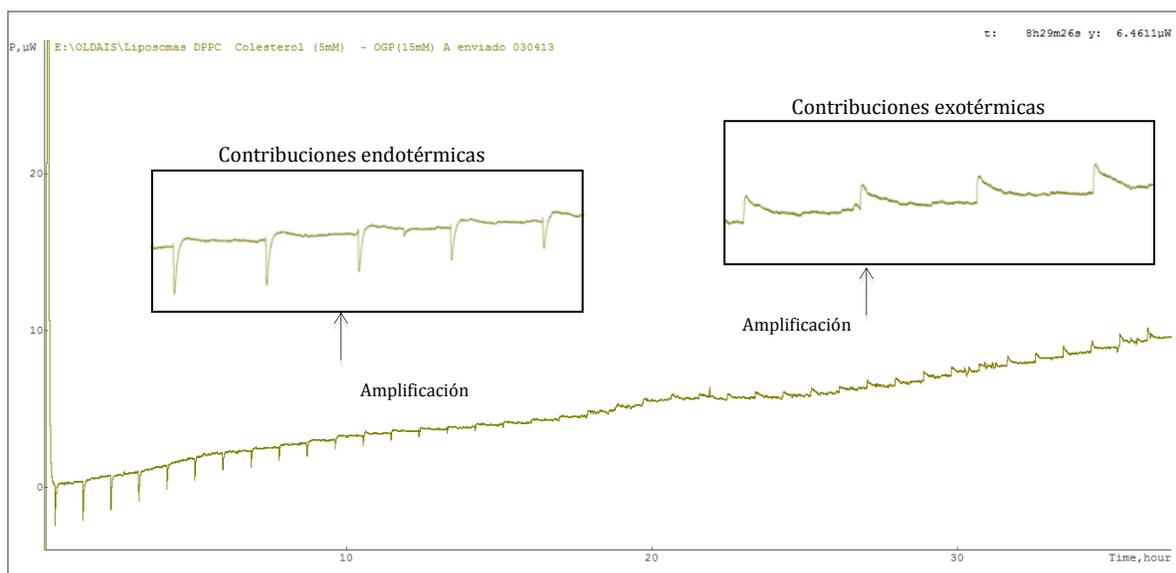
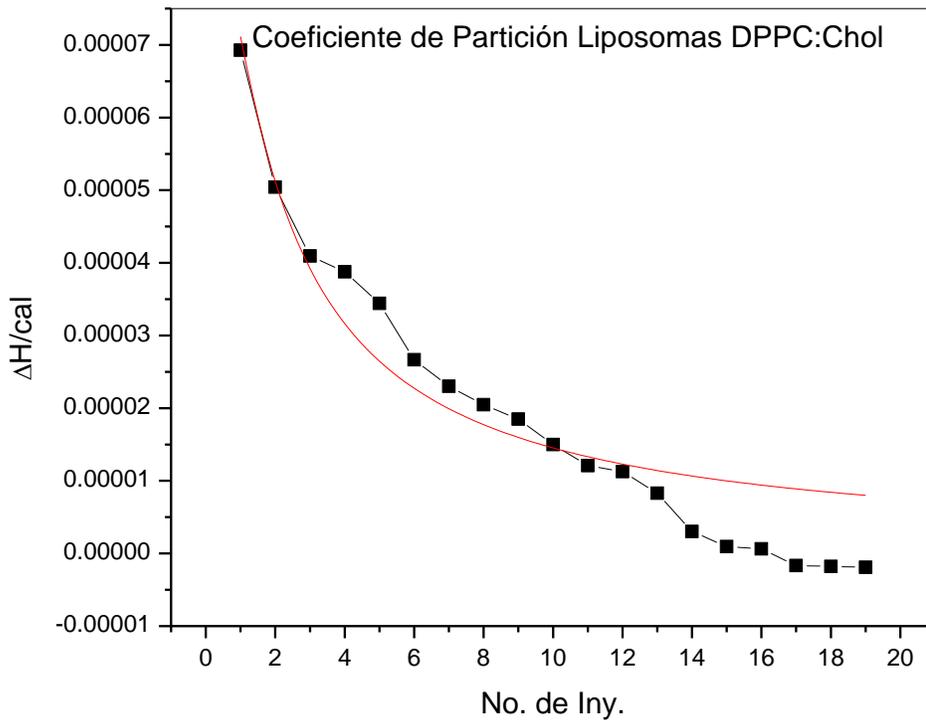


Fig. 5.6. Potenciograma del sistema de liposomas formados de DPPC:Chol. Relación 4a1 con OGP.

En la figura 5.6 se muestra el entalpograma del sistema DPPC-OGP en presencia de Chol. A diferencia del potenciograma DPPC-OGP sin Chol, las primeras inyecciones solamente muestran una contribución endotérmica (la contribución exotérmica está ausente), y decrecen conforme avanza el experimento. Como se ha explicado anteriormente, esto es debido a que la cantidad de OGP aumenta en la bicapa lipídica, hasta causar su desintegración y dar paso a la formación de micelas mixtas de lípidos-OGP, como se muestra en la figura 5.4. Se observa también que las señales endotérmicas decrecen y posteriormente aparecen señales exotérmicas que van aumentando conforme el experimento avanza.

Lo anterior es causado por la falta de OGP libre en el seno de la solución, en este momento del experimento, todo el OGP está ordenado en las micelas mixtas. Al momento de agregar más liposomas, dichas micelas mixtas comienzan a desintegrarse y se integran a bicapa del liposoma, dando paso a la formación de nuevos liposomas, en cuya bicapa lipídica contienen DPPC, Chol y OGP.



Model	Partition (User)	
Equation	((c*e*f*d*A*x)/(e+(x*f*(1+B*d)))^(2))	
Reduced Chi-Sqr	4.13899E-11	
Adj. R-Square	0.89585	
		Value
B	A	1.44546E9
	B	6.75372E7

Fig. 5.7. Ajuste de Coeficiente de Partición de liposomas de DPPC:Chol y en la parte inferior se muestra la tabla de datos obtenidos tras realizar el ajuste, donde B es la constante del proceso de partición del OGP (**K**) y A es la entalpía del proceso de partición del OGP multiplicada por la constante de partición ($\Delta H_{OGP}^{\circ} \cdot K$).

La tabla 5.6. muestra los parámetros termodinámicos para el sistema DPPC-OGP en presencia de Ibuprofeno. El cambio en la entalpía es positivo y es similar al del sistema DPPC-OGP. El efecto del envejecimiento en este sistema se ve reflejado en el valor de la constante de partición, cuando la solución es fresca el valor de K es un orden de magnitud mayor respecto a la solución después de tres días de su preparación.

Elaboración de Liposoma	Ejecución	K				Tamaño (nm)
		ΔH_{OGP}° (kcal/mol)	10^6 (mL/mol)	ΔG_{OGP}° (kcal/mol)	$T\Delta S_{OGP}^{\circ}$ (kcal/mol)	
DPPC -Iburpof	ITC					
13-Abril-13	14-Abril-13 V	0.15	2.44	-8.71	8.86	513
13-Abril-13	17-Abril-13 V	0.11	0.919	-8.13	8.244	513

Tabla 5.6. Parámetros termodinámicos del sistema de liposomas DPPC:Ibuprofeno 10mM:1.25mM, pH 7.42.

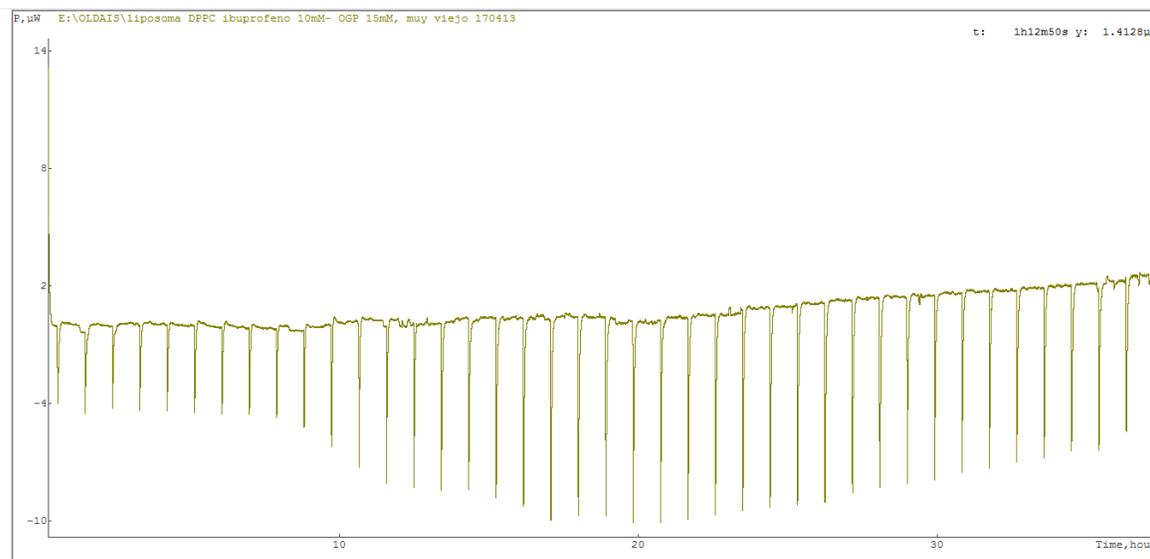
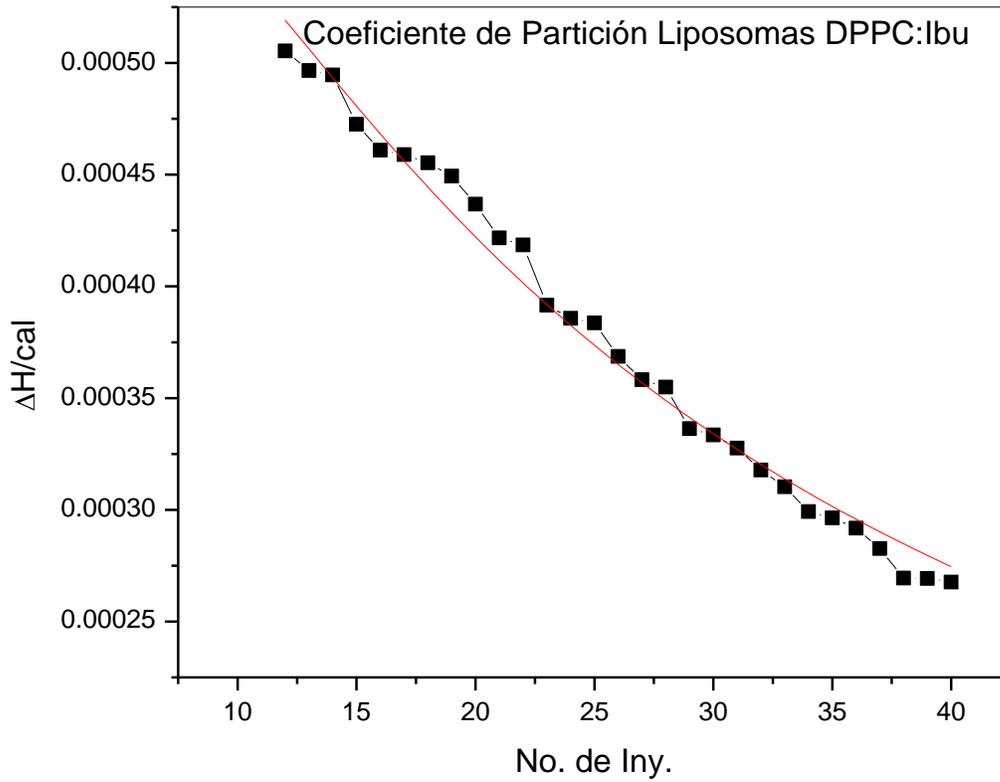


Fig. 5.8. Potenciograma del sistema de liposomas DPPC- Ibuprofeno con OGP.

El potenciograma de la figura 5.8, representa al sistema DPPC-OGP en presencia de Ibuprofeno. Las señales de las inyecciones para este sistema son de carácter totalmente endotérmico y muy grandes a comparación de los potenciogramas anteriores y van de un orden creciente y después decrecen conforme avanza el experimento. Las grandes señales de carácter endotérmico, deben su tamaño a la incorporación del Ibuprofeno, dichas señales comienzan a crecer, debido a la

incorporación del OGP en la bicapa formada por DPPC e ibuprofeno, después hay un decrecimiento debido a que el OGP comienza a disolver a la vesícula, ya que ésta se encuentra saturada de OGP, dando lugar ahora a un nuevo arreglo que es el de la micela mixta, compuesta por fosfolípidos, OGP y fármaco.



Model	Pariticion (User)	
Equation	((c*e*f*d*A*x)/(e+(x*f*(1+B*d))))^(2))	
Reduced Chi-Sqr	8.00388E-11	
Adj. R-Square	0.98643	
		Value
B	A	3.85863E8
	B	2.44719E6

Fig. 5.9. Ajuste de Coeficiente de Partición de liposomas de DPPC-Ibuprofeno y en la parte inferior se muestra la tabla de datos obtenidos tras realizar el ajuste, donde B es la constante del proceso de partición del OGP (**K**) y A es la entalpía del proceso de partición del OGP multiplicada por la constante de partición ($\Delta H_{OGP}^{o}K$).

La tabla 5.7. muestra los parámetros termodinámicos para el sistema DPPC-OGP en presencia de Chol e Ibuprofeno. El cambio en la entalpía es positivo y es similar al del sistema DPPC-OGP y al sistema DPPC-OGP en presencia de ibuprofeno. De igual forma que el sistema DPPC-OGP el efecto del envejecimiento en este sistema no se ve reflejado en el valor de la constante de partición ni en el valor de la entalpía.

Elaboración		K				
Liposomas	Ejecución	ΔH_{OGP}°	10^6	ΔG_{OGP}°	$T\Delta S_{OGP}^{\circ}$	Tamaño
DPPC :Chol-buprof	ITC	(kcal/mol)	(mL/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(nm)
30-Abril-13	01-Mayo-13 F	0.14	2.17	-8.64	8.78	165
13-Abril-13	08-Mayo-13 V	0.11	1.16	-8.27	8.38	165

Tabla 5.7. Parámetros termodinámicos del sistema de liposomas DPPC:Chol más Ibuprofeno 10mM:1.25mM:0.72mM, pH 7.41.

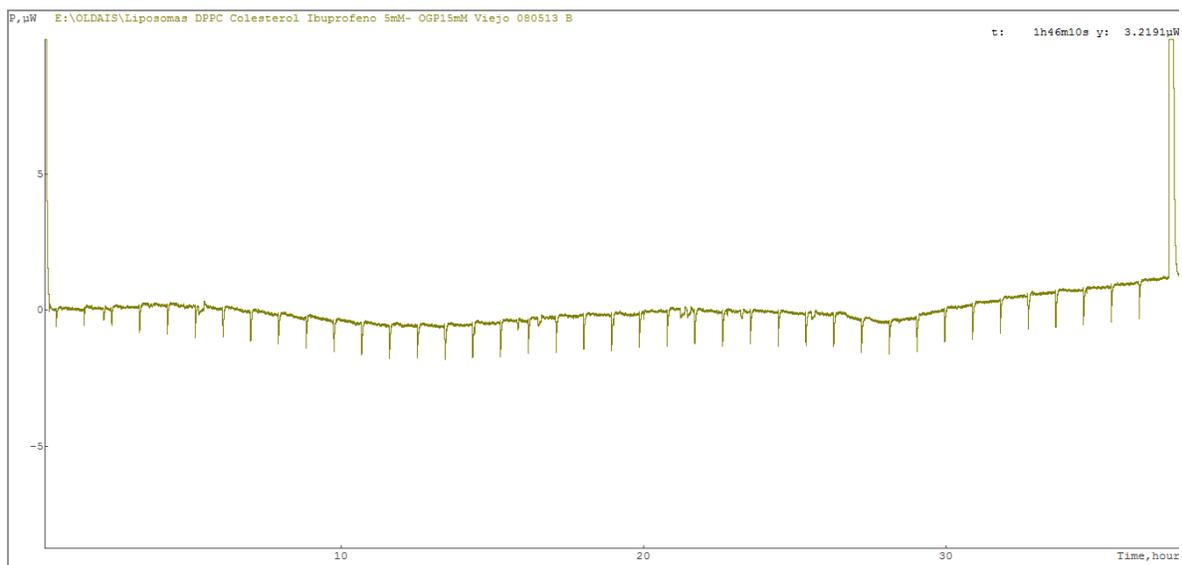
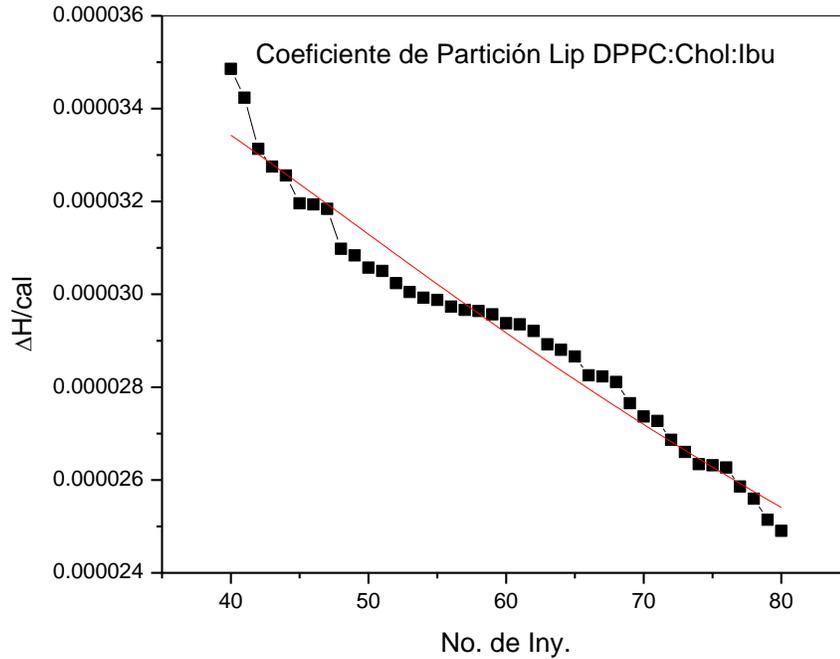


Fig. 5.10. Potenciograma del sistema de liposomas DPPC:Chol e Ibuprofeno con OGP.

El potenciograma de la figura 5.10., representa al sistema DPPC-OGP en presencia de Chol e Ibuprofeno. Las señales de las inyecciones al igual que el potenciograma 4.8 no muestran en las primeras señales el aporte endotérmico-exotérmico, sino que son de carácter totalmente endotérmico y decrecen suavemente. Como en los anteriores experimentos el OGP se integra a la

membrana y conforme aumenta la cantidad de éste, la bicapa se comienza a disolver, y da paso al arreglo de micela mixta, compuesta en este caso por fosfolípidos (DPPC y Chol), OGP y fármaco.



Model	Particion (User)		
Equation	$\left(\frac{c \cdot e^{f \cdot d \cdot A \cdot x}}{e + (x^f \cdot (1 + B \cdot d))^{(2)}} \right)$		
Reduced Chi-Sqr	2.21842E-13		
Adj. R-Square	0.96319		
		Value	
B	A	1.28448E7	
	B	1.16443E6	

Fig 5.11. Ajuste de Coeficiente de Partición de liposomas de DPPC:Chol: Ibuprofeno y en la parte inferior se muestra la tabla de datos obtenidos tras realizar el ajuste, donde B es la constante del proceso de partición del OGP (**K**) y A es la entalpía del proceso de partición del OGP multiplicada por la constante de partición ($\Delta H_{\text{OGP}}^{\circ} \cdot \mathbf{K}$).

La figura 5.12 compara la constante de partición para los sistemas A, B, C y D (Ver tabla 3.2) de soluciones frescas y de soluciones viejas aquí estudiadas. Se observa que en todos los sistemas el valor de K es alto, es decir que el OGP, se incorpora con gran afinidad a la bicapa. El coeficiente de partición para el sistema B (Liposomas formados por DPPC:Chol 4a1 y OGP) es el que tiene el valor más alto y también en él se observa el efecto del envejecimiento más drástico comparado con los demás sistemas estudiados, pudiéndose atribuir este comportamiento a la presencia de Chol. El efecto de la presencia del Chol en la K es contrarrestado al añadir Ibuprofeno en el sistema D (Liposomas formados por DPPC:Chol más Ibuprofeno y OGP), lo cual sugiere una pérdida de estabilidad de la bicapa.

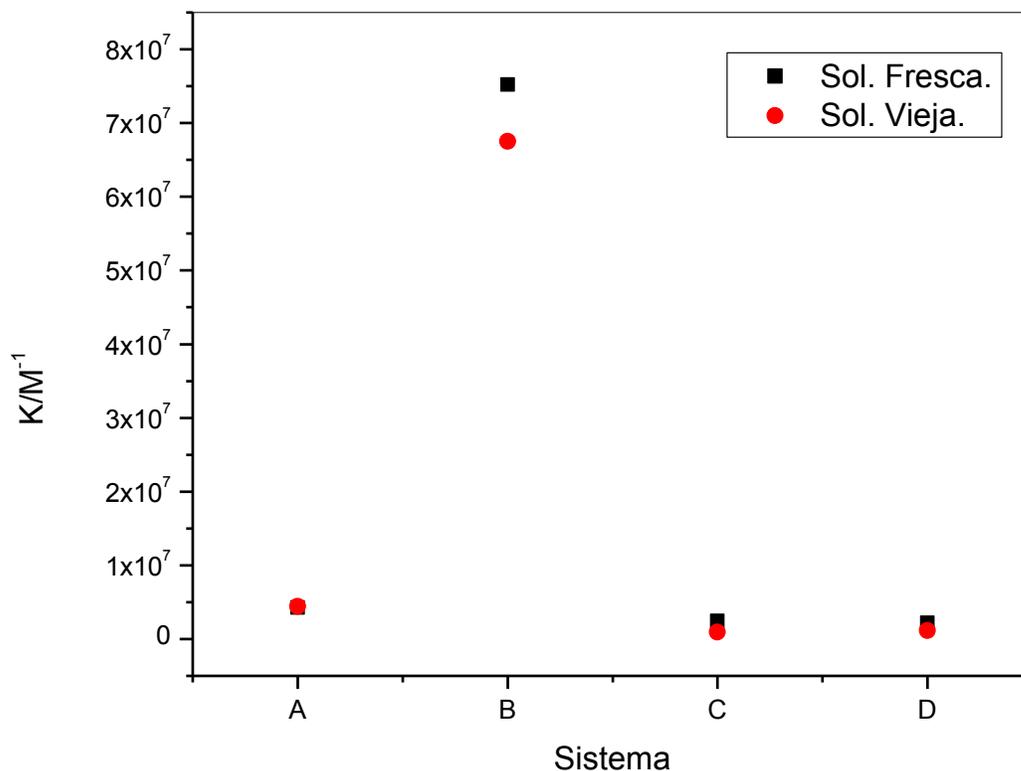


Fig. 5.12. Constante de Partición para los sistemas A (Solución de Liposomas de DPPC y OGP); B (Solución de Liposomas de DPPC:Chol relación 4:1 y OGP); C (Solución de Liposomas de DPPC-Ibuprofeno y OGP); D (Solución de Liposomas de DPPC:Chol relación 4:1, Ibuprofeno y OGP).

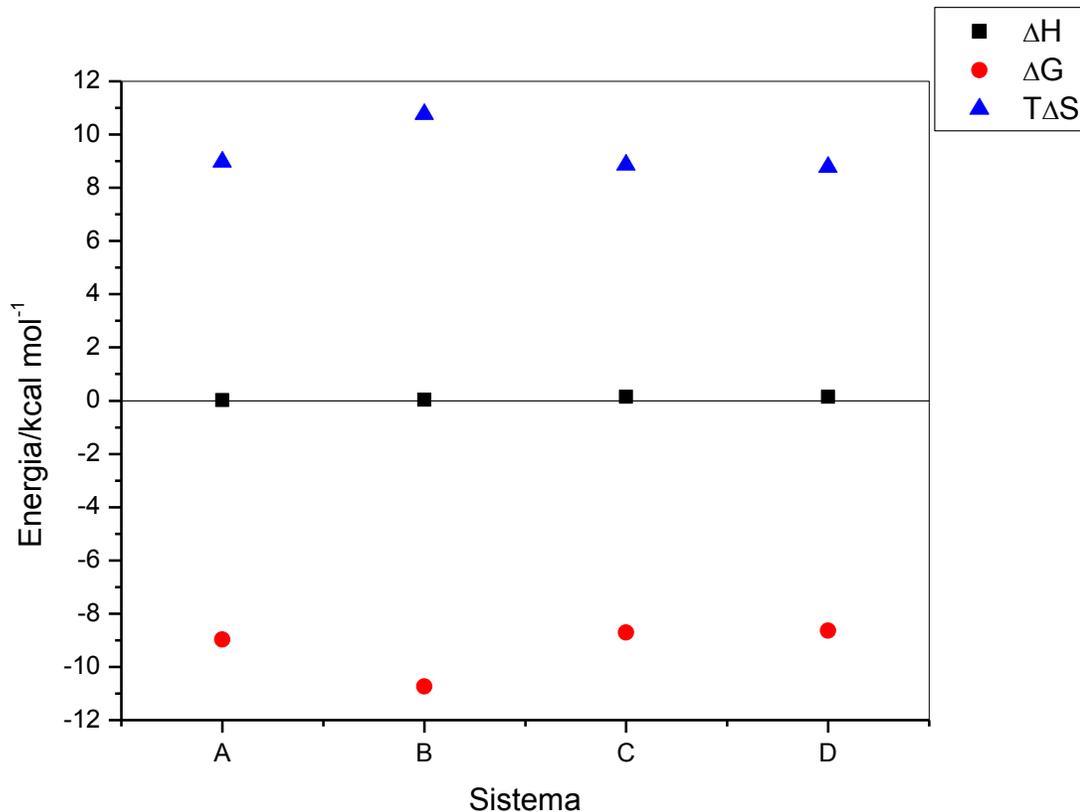


Fig. 5.13. Parámetros termodinámicos para los sistemas A (Solución de Liposomas de DPPC y OGP); B (Solución de Liposomas de DPPC:Chol relación 4:1 y OGP); C (Solución de Liposomas de DPPC-Ibuprofeno y OGP); D (Solución de Liposomas de DPPC:Chol relación 4:1, Ibuprofeno y OGP).

La figura 5.13 compara los valores de los parámetros termodinámicos (entalpía, entropía y energía de Gibbs) de partición para los sistemas A, B, C y D, de soluciones. Se observa que en todos los sistemas el valor de la entropía es alto en todos los casos, por lo que el proceso de partición de OGP es dirigido por la entropía en cualquiera de los diferentes sistemas. El valor de energía de Gibbs, es demasiado bajo para todos los sistemas, lo que nos indica que el procesos se da de una manera espontánea.

5.3 Calorimetría diferencial de barrido (DSC).

La calorimetría diferencial de barrido (DSC) se empleó para determinar la temperatura de inicio de la fusión de las cadenas lipídicas y otras transiciones de fase gel a la fase líquida-cristalina y la entalpía representativa de la cooperatividad del proceso. Dado que la temperatura de transición es sensible a la presencia de aditivos en la bicapa, este estudio se realizó para probar la buena manufactura de los liposomas[11].

[Liposomas DPPC]	T_p (°C)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
2mM	36.86	1.64	16.91	-15.27

Tabla 5.8 Valores termodinámicos de la temperatura de pre-transición de liposomas de DPPC.

[Liposomas DPPC]	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
2mM	40.87	5.34	36.18	-30.84

Tabla 5.9 Valores termodinámicos de la temperatura de transición de liposomas de DPPC.

La pre transición ocurre a 5 o 10 grados por debajo de la temperatura de la transición principal, con una menor entalpía, y puede ser debido a la rotación de los grupos de las cabezas polares o por el movimiento cooperativo de las cadenas de hidrocarburos, antes de la fusión.

La pre transición de DMPC y DPPC 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 monoclinica de dos dimensiones que consta de laminillas de lípidos distorsionado por las ondulaciones periódicas. Ver figura 5.14.

El cambio entre la fase de gel hacia la fase liquido-cristalino se debe al aumento de la temperatura en los fosfolípidos, dando como resultado la fusión cooperativa de las cadenas de hidrocarburos. La orientación de las uniones simple carbono-carbono cambia de una configuración trans a una configuración gauche, y la

distancia intermolecular entre moléculas es de aproximadamente 2 nm, por consiguiente, la rotación en una molécula y los impactos sobre las moléculas adyacentes, son factores para decir que la transición es un evento cooperativo.

La temperatura de la 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. Para fosfolípidos que tienen el mismo grupo de cabeza y el grado de hidratación, lo que aumenta la saturación de las cadenas de hidrocarburos por lo que aumenta la temperatura de transición, además con cadenas insaturadas trans tienen una T_m más alta que los que son insaturados cis. Los fosfolípidos con cadenas de hidrocarburos más largas tienen una mayor T_m , así como la entalpía asociada, a comparación de aquellos fosfolípidos con cadenas más cortas. El efecto del grupo de cabeza en la transición principal depende de la fuerza y la composición de la fase acuosa iónica, junto con el pH de lípidos cargados[12].

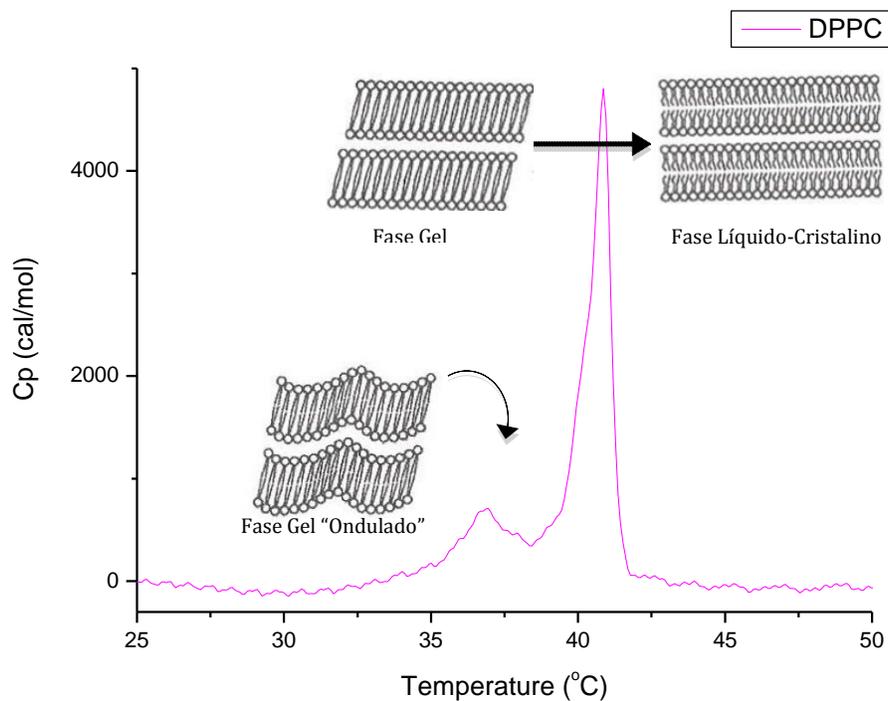


Fig 5.14 Termograma de liposomas DPPC

En la figura 5.14, se muestra un termograma en el que se registra de forma continua la capacidad térmica (C_p) de la disolución de liposomas de DPPC 2 mM, en función de la temperatura. Dicho termograma se caracteriza por dos picos de absorción de calor correspondientes a un proceso de pre-transición que se realiza a una temperatura $T_p=36.83$ °C; y otro de transición térmica inducida que se realiza a una temperatura $T_m=40.87$ °C; ambos corresponden a procesos endotérmicos. Empleando el Software ORIGIN 8.5, se calcula el área bajo la curva, el valor obtenido es el cambio de entalpía para cada uno de los procesos mencionados; las tablas 5.8 y 5.9, reportan los parámetros termodinámicos para ambos procesos, estos resultados concuerdan perfectamente con los reportados en la literatura [11], lo cual indica que el DPPC en este estudio es un reactivo de alta pureza y que la técnica utilizada para la elaboración de liposomas es confiable. Esto, aunado con las mediciones de tamaño de partícula garantizan la presencia de liposomas de un tamaño homogéneo y por lo tanto la calidad de los resultados obtenidos más adelante. Ambos procesos son espontáneos y están dirigidos por el cambio de entropía. Para el proceso global $\Delta G= -45.11$ kcal/mol.

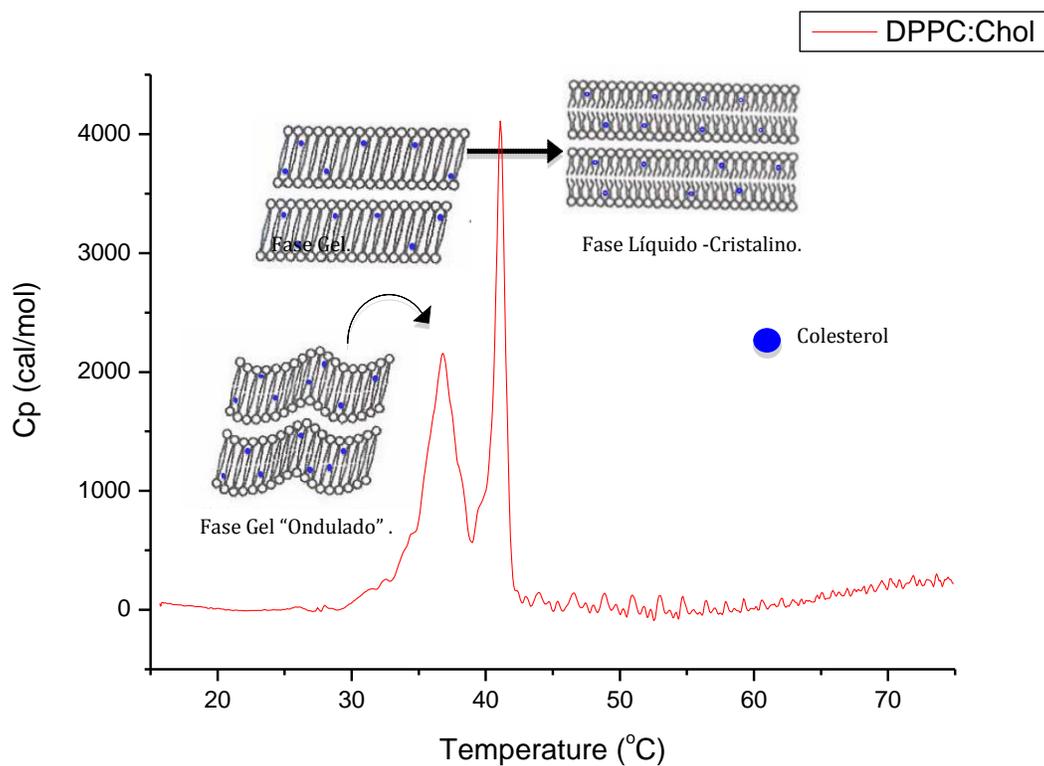


Fig 5.15. Termograma de liposomas DPPC:Chol relación 4:1

[Liposomas DPPC:Chol]	T_p (°C)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
2mM	36.85	6.92	48.51	-41.58

Tabla 5.10 Valores termodinámicos de la temperatura de pre-transición de liposomas de DPPC:Chol.

[Liposomas DPPC:Chol]	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
2mM	41.07	6.57	32.30	-25.74

Tabla 5.11 Valores termodinámicos de la temperatura de transición de liposomas de DPPC:Chol.

En la figura 5.15, se muestra el termograma para la disolución de liposomas de DPPC:Chol (4:1), 2 mM. A comparación con el termograma de la figura 5.14, éste se caracteriza por la diferencia entre el ancho de los dos picos de absorción de calor; el primero corresponde a un proceso de pre-transición realizado a T_p 36.85 °C para el cual el cambio de entalpía es de 6.92 kcal/mol; 5.28 kcal/mol mayor que en el caso de la disolución de liposomas de DPPC puro, es decir en este caso se necesita más energía para realizar la pre transición, pero esto se ve compensado con un cambio de entropía ($T\Delta S$) 31.60 kcal/mol mayor, dando como resultado un ΔG de -41.58 kcal/mol; 23.31 kcal/mol más negativo, lo cual indica que la presencia de colesterol hace más estable al sistema. Un efecto similar se observa en el proceso de transición principal a una T_m 41.07 °C. Para el sistema DPPC:Chol proceso global ΔG es igual -67.32 kcal/mol; es decir 22.21 kcal/mol más negativo, por lo tanto es más estable.

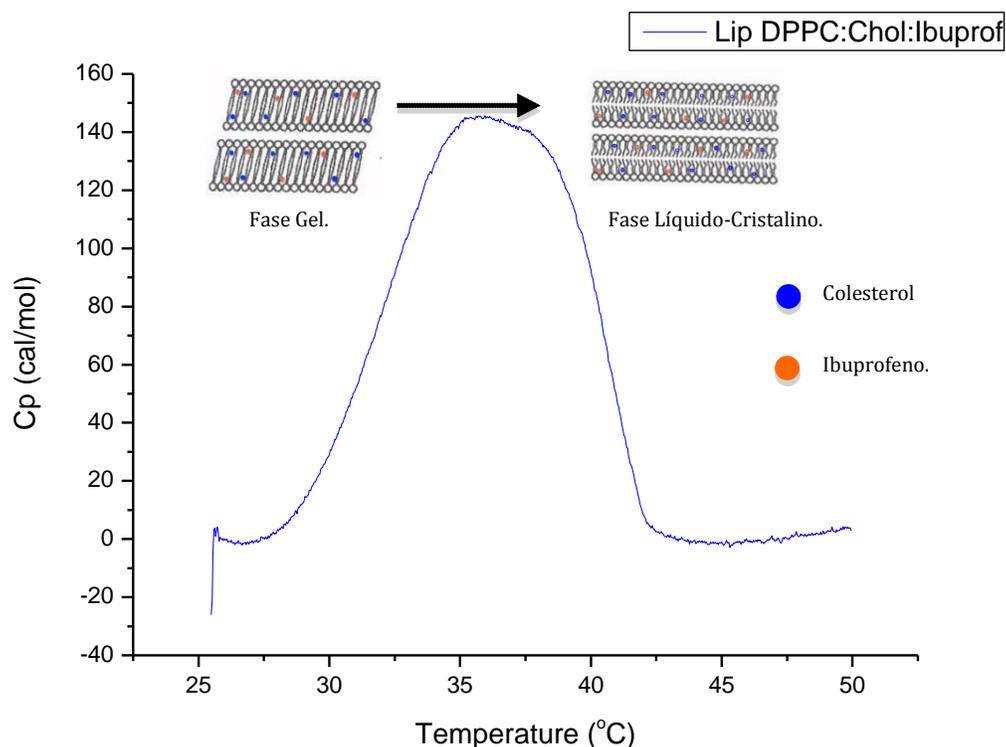


Fig 5.16. Termograma de liposomas DPPC:Chol e Ibuprofeno.

[Liposomas DPPC:Chol e Ibuprofeno]	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
10 mM	35.71	1.22	10	-8.78

Tabla 5.11 Valores termodinámicos de la temperatura de transición de liposomas de DPPC:Chol e Ibuprofeno.

La figura 5.16, nos muestra el termograma de los liposomas de DPPC:Chol más la inclusión de Ibuprofeno en la membrana a una concentración 2 mM. A comparación con los termogramas de la figura 5.14 y 5.15, éste se caracteriza por no presentar el pico de absorción de calor correspondiente a un proceso de pre-transición (T_p). La ausencia de la T_p es un indicio de que el Ibuprofeno se encuentra en la membrana y no en el centro acuoso de la vesícula. La temperatura de transición disminuye al igual que el valor de la entalpía y la

entropía. El proceso al igual que los anteriores es dirigido por la entropía y se da de una manera espontánea.

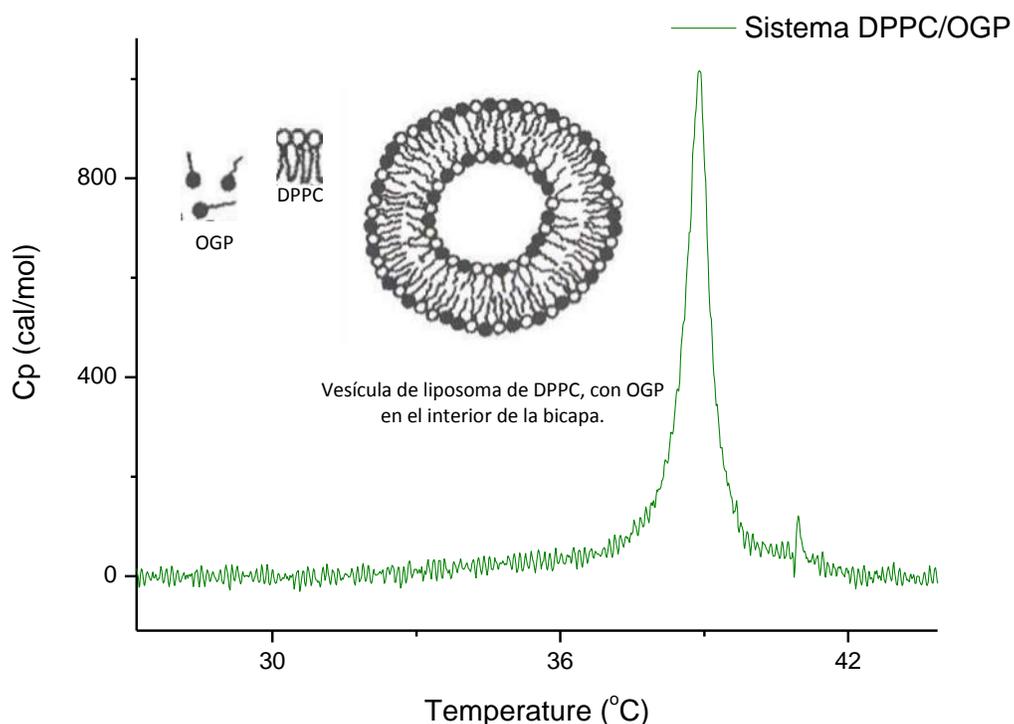


Fig 5.17 Termograma del sistema de DPPC/OGP

[Liposomas DPPC / OGP]	T_m (°C)	ΔH (kcal/mol)	$T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
2 mM	39	0.96	7.09	-6.13

Tabla 5.12 Valores termodinámicos de la temperatura de transición del sistema de liposomas de DPPC/OGP

La figura 5.17, es el termograma del sistema formado por liposomas de DPPC más la incorporación de OGP en la membrana. Al igual que el termograma anterior, el pico de absorción de calor correspondiente a un proceso de pre-transición (T_p) no se presenta. El pico obtenido es el correspondiente a la transición principal, en este sistema la membrana contiene moléculas de tensoactivo, lo cual hace que la membrana sea un poco más fluida, y esto se refleja en un cambio pequeño de la temperatura de transición.

5.4 Tamaño de Partícula.

Los experimentos de dispersión dinámica de luz (DLS por sus siglas en inglés), se realizaron para determinar el tamaño de partícula mediante el NANOSIZER ZS ZEN(3600) (Malvern instruments ltd, Malvern, UK) que nos arroja como información el diámetro de la partícula. Se realiza empleando una solución 0.07g/L del sistema a estudiar, considerando al látex de poliestireno como material estándar, cuyo índice de refracción es 1.59 y su índice de absorción de luz es 0.010; y como dispersante agua a una temperatura de 25°C.

En una formulación el tamaño de partícula es una de las características fisicoquímica más importantes. La razón es que las partículas grandes son clínicamente inaceptables debido a que pueden formar émbolos. El tamaño se puede controlar eligiendo adecuadamente el tipo de liposoma que se desee obtener y a su vez controlando el proceso de su formulación [12].

La tabla 5.14 muestra el tamaño de partícula y el índice de polidispersidad de los sistemas estudiados. Para el sistema de liposomas de DPPC el tamaño encontrado fue de 48.30nm (Fig. 5.18). Se observa que al añadir colesterol al liposoma de DPPC, éste aumenta solamente en un 3.34% (Fig. 5.19). La adición de colesterol se hace para controlar la permeabilidad y la fluidez de la membrana, haciéndola más rígida. En contraste, al agregar Ibuprofeno al sistema de liposomas de DPPC el tamaño de la partícula y el PDI aumentan en un orden de magnitud (Fig. 5.20), esto se debe a que la membrana de los liposomas formados por DPPC, es muy flexible, con la incorporación de un fármaco como el ibuprofeno (que contiene un ciclo), hace que aumente por mucho la permeabilidad del sistema y esto se refleja en el gran tamaño de la vesícula. Cuando se agrega Chol a los liposomas DPPC – Ibuprofeno, se observa una drástica disminución del tamaño de partícula(Fig. 5.21), en este caso la membrana del liposoma no aumenta demasiado el tamaño ya que el Chol controla la fluidez y permeabilidad de la membrana, por lo que la membrana es más rígida.

Sistema	Tamaño (nm)	PDI
Liposomas DPPC	48.30	0.234
Liposomas DPPC:Chol	50.33	0.313
Liposomas DPPC-Ibuprofeno	513.3	1.00
Liposomas DPPC:Chol-Ibuprofeno	117.6	0.434
Liposomas DPPC/OGP	392.1	0.432

Tabla 5.14 Tamaño de partícula y el índice de polidispersidad de los sistemas estudiados

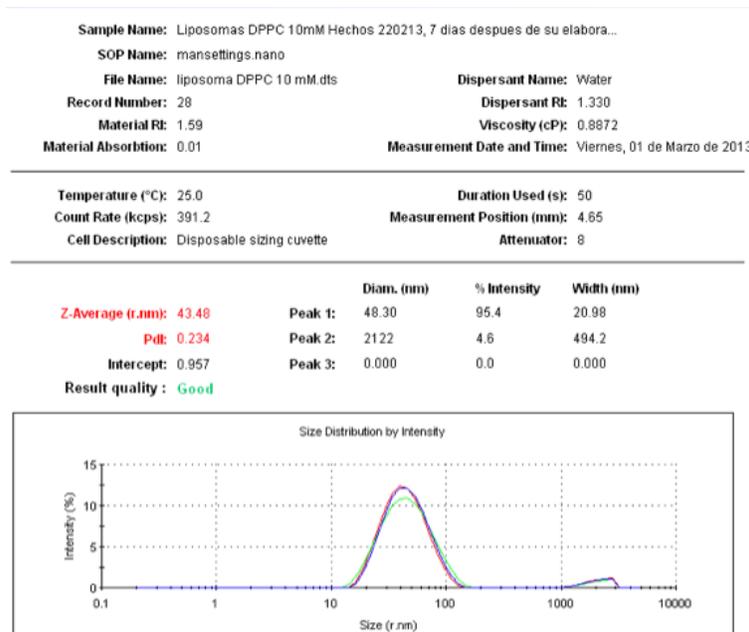


Fig. 5.18 Tamaño de partícula de liposomas de DPPC.

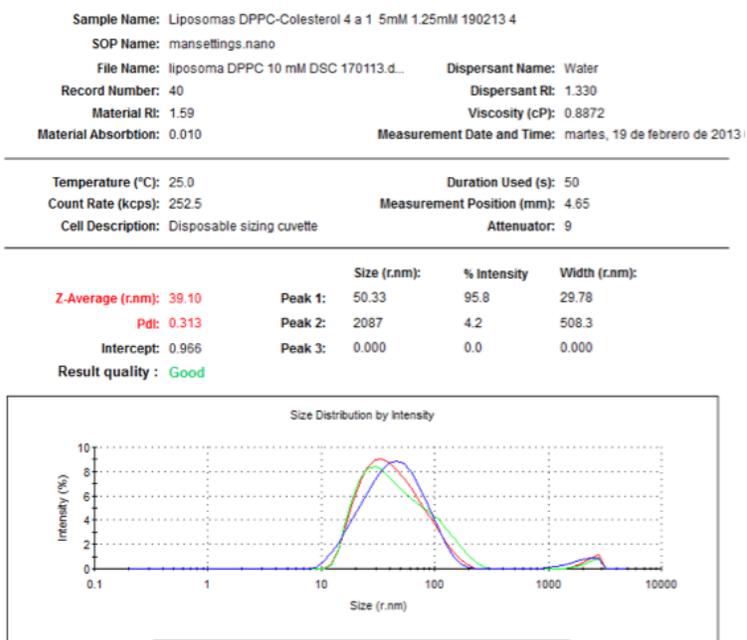


Fig. 5.19 Tamaño de partícula de liposomas de DPPC:Colesterol.

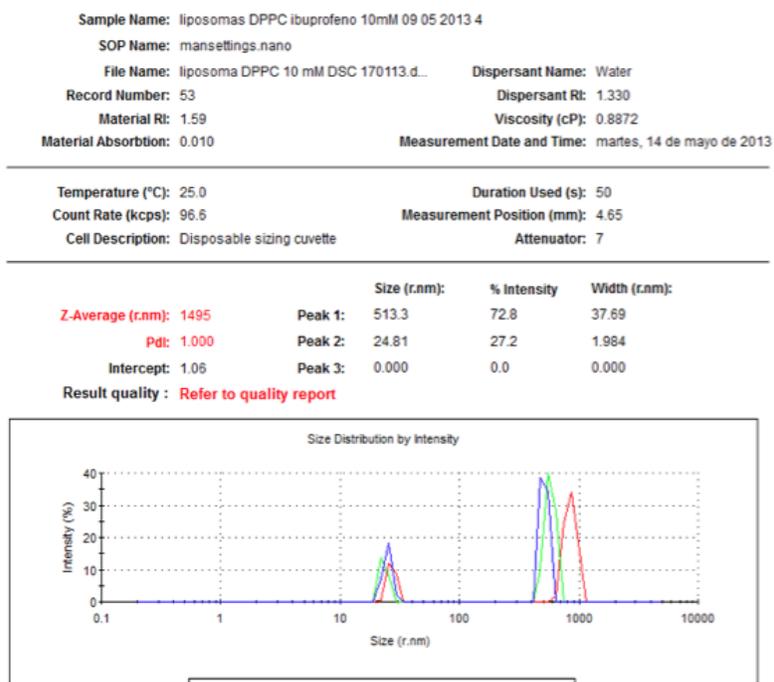


Fig. 5.20 Tamaño de partícula de liposomas de DPPC e Ibuprofeno.

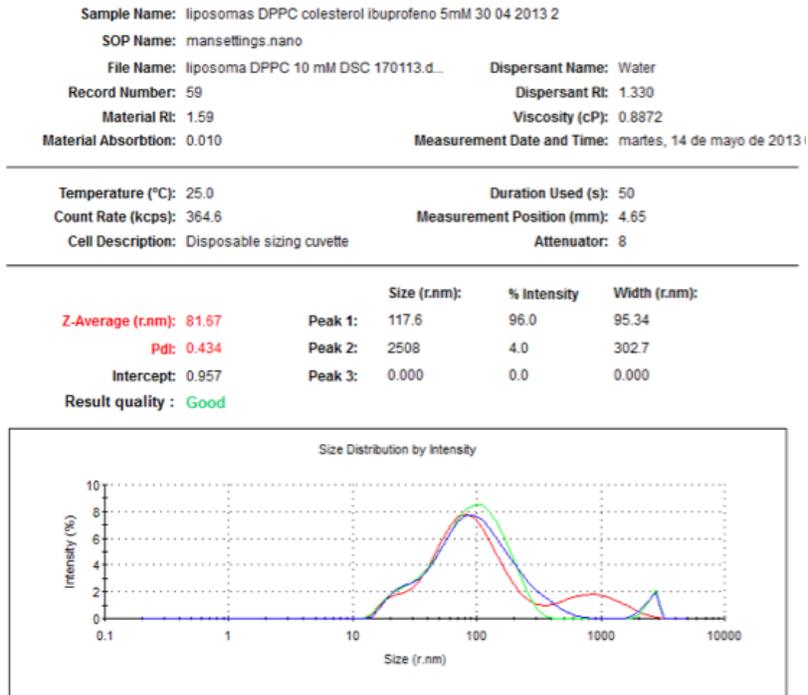


Fig. 5.21 Tamaño de partícula de liposomas de DPPC:Colesterol e Ibuprofeno.

Sample Name: Liposoma DPPC/OGP 2mM 5
SOP Name: mansettings.nano
File Name: liposoma DPPC 10 mM.dts
Dispersant Name: Water
Record Number: 44
Dispersant RI: 1.330
Material RI: 1.59
Viscosity (cP): 0.8872
Material Absorbion: 0.01
Measurement Date and Time: Miércoles, 02 de Octubre de 2013

Temperature (°C): 25.0
Duration Used (s): 50
Count Rate (kcps): 169.4
Measurement Position (mm): 4.65
Cell Description: Disposable sizing cuvette
Attenuator: 6

	Diam. (nm)	% Intensity	Width (nm)
Z-Average (d.nm): 165.4	Peak 1: 392.1	66.4	192.3
Pdl: 0.432	Peak 2: 89.07	33.6	28.05
Intercept: 0.977	Peak 3: 0.000	0.0	0.000

Result quality: Good

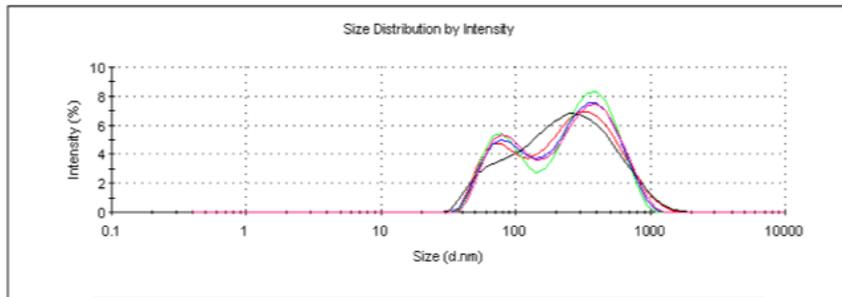


Fig. 5.22 Tamaño de partícula de sistema de liposomas de DPPC/OGP.

La figura 5.22 muestra el tamaño de partícula del sistema de liposoma de DPPC con OGP, en este sistema la vesícula de fosfolípidos, contiene en la membrana una pequeña cantidad del tensoactivo OGP, y como se observa en la figura se obtiene 2 tamaños de partícula, el valor grande de tamaño corresponde a la vesícula mixta, y el valor pequeño corresponde a una pequeña población de micelas mixtas.

5.5 Microscopia electrónica de barrido (SEM).

La microscopia electrónica de barrido, se empleó para confirmar la presencia de estructuras liposomales. Las muestras fueron secadas al vacío uno de los requisitos indispensables que deben cumplir la muestra es la ausencia de líquidos, es decir, la muestra tiene que estar seca y además debe ser conductora de la corriente eléctrica, por lo que una vez seca nuestra muestra fue recubierta de Carbono y Oro mediante la técnica de pulverización catódica a alto vacío, este recubrimiento tiene que ser suficientemente grueso como para que circule la corriente eléctrica que se deposita en la muestra y suficientemente delgado para que no enmascare o tape las características superficiales de interés. Una vez recubiertas, fueron observadas al microscopio a diferentes potencias del haz de electrones.

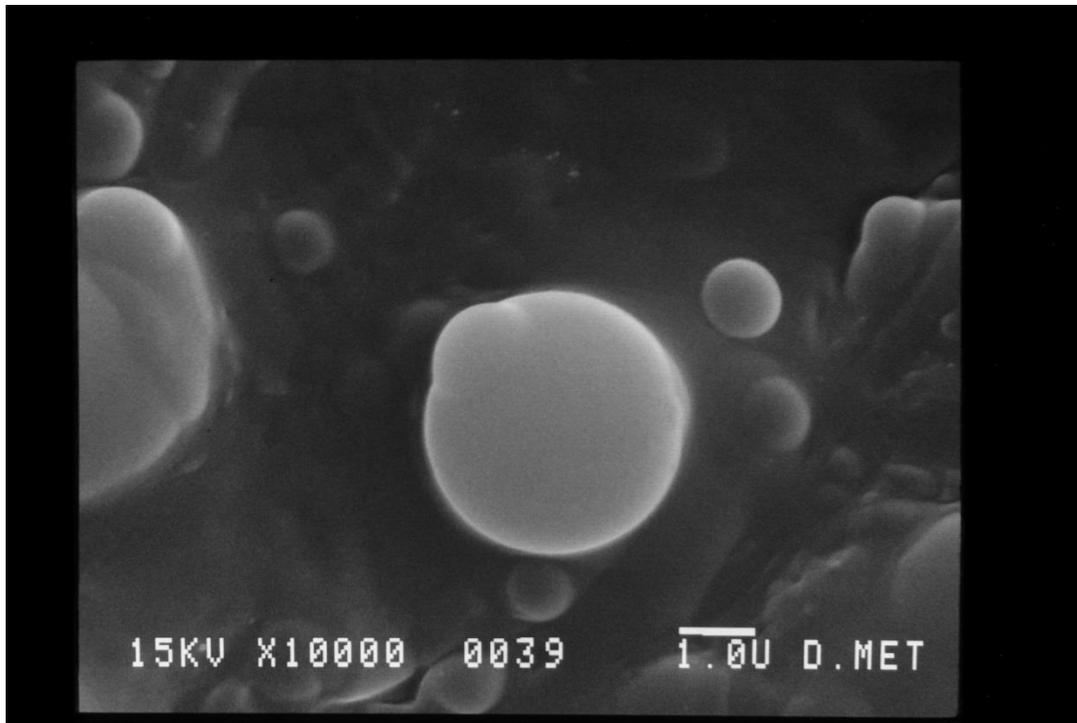


Fig. 5.23 Micrografía de liposoma fabricado de DPPC sin sonicar.

La figura 5.23 es la micrografía de una muestra de liposomas fabricados solo de DPPC sin sonicar, la imagen es muy definida ya que el tamaño de liposoma es muy grande, debido a que probablemente es un liposoma multilamelar.

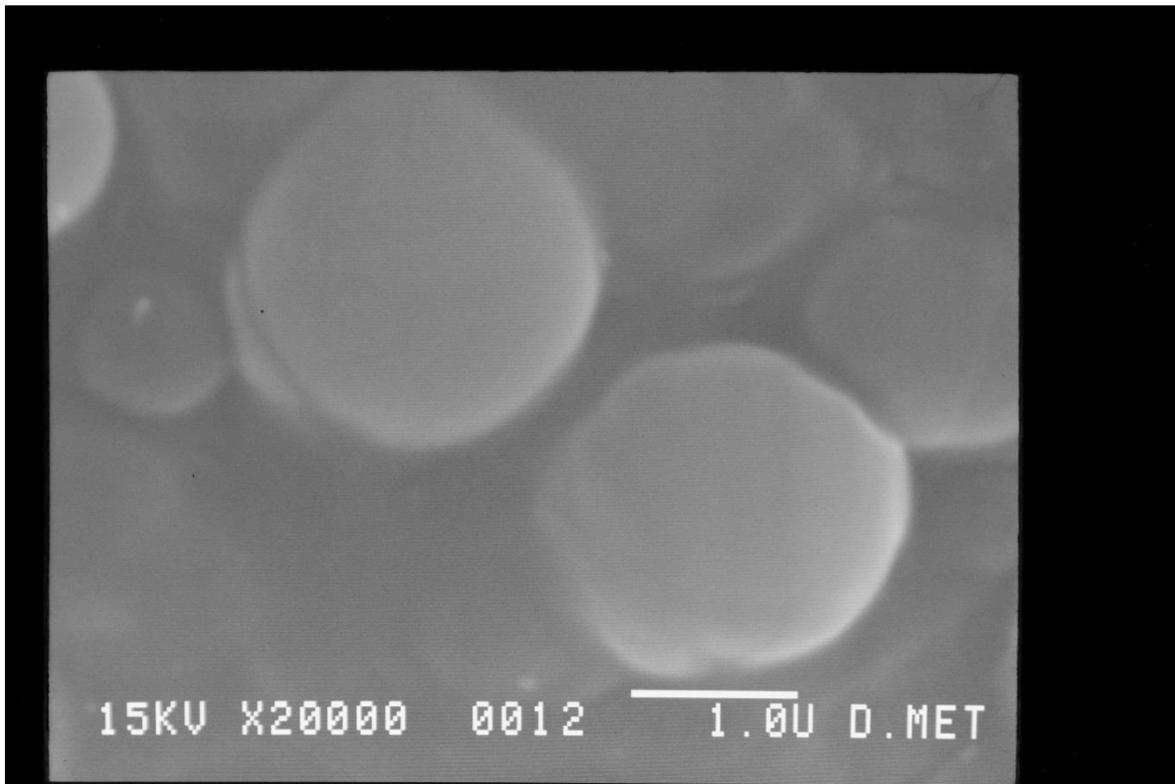


Fig. 5.24 Micrografía de liposoma fabricado de DPPC después de sonicar 2 horas.

La figura 5.24 es la micrografía de una muestra de liposomas fabricados solo de DPPC después de 2 horas de sonicación, la imagen es nítida, ya que el tamaño de liposoma es de 50 nm.

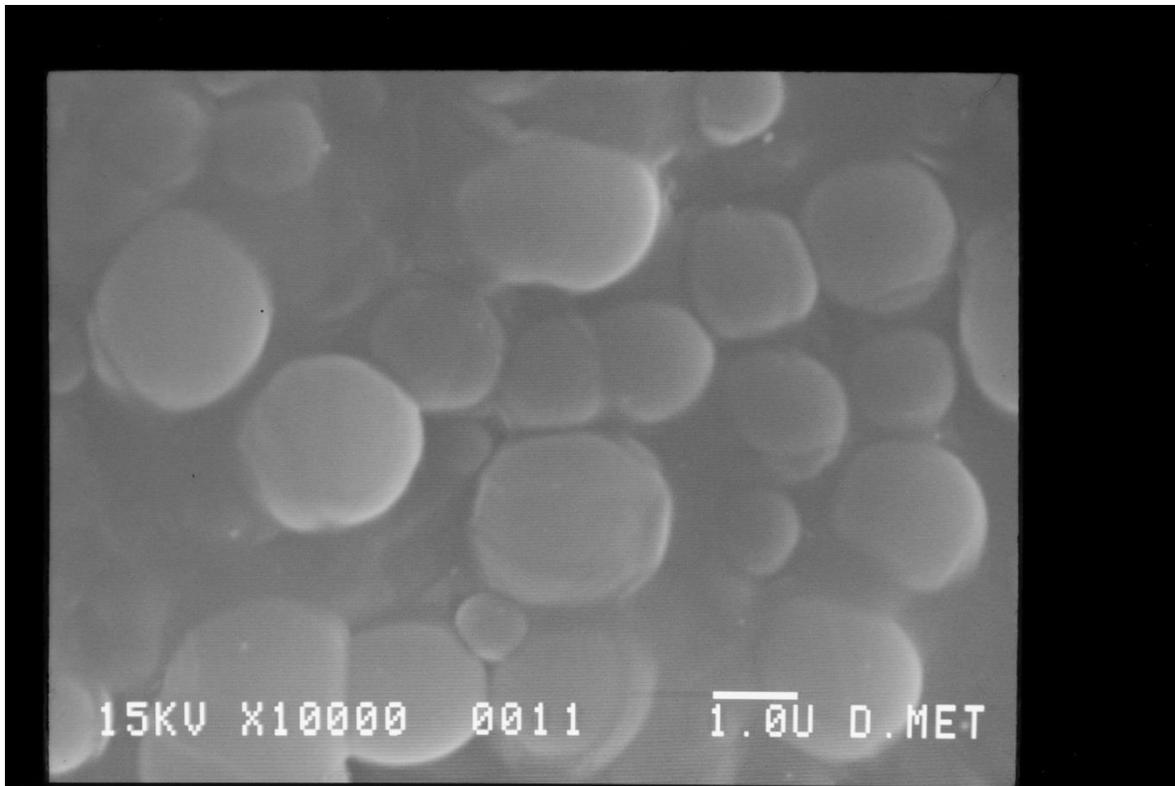


Fig. 5.25 Micrografía de liposoma fabricado de DPPC y tensoactivo.

La figura 5.25 es la micrografía de una muestra de liposomas fabricados de DPPC y tensoactivo, la proporción manejada es 90:10, después de 2 horas de sonicación, la imagen es al igual que la anterior es nítida, en esta foto se puede observar que los liposomas no son tan circulares como las anteriores fotos, y esto se debe a que la cantidad de tensoactivo en la membrana, hace que esta sea un más fluida.

Capítulo 6. Conclusión

Mediante los parámetros termodinámicos de los procesos de partición de OGP (n-octil-beta-d-glucopiranosido) obtenidos mediante los experimentos de ITC (Calorimetría de Titulación Isotérmica) fue posible observar la transición de liposomas hacia micelas y/o vesículas mixtas. Por los resultados obtenidos, se concluye que los sistemas que tienen una mayor estabilidad son aquellos que contiene colesterol en la membrana porque éste ayuda a mejorar la rigidez y la permeabilidad de la membrana. El proceso de partición en todos los casos es de naturaleza espontánea y está dirigido por la entropía.

Los resultados de DSC (Calorimetría Diferencial de Barrido) comprobaron la calidad de la técnica de manufactura de liposomas por el método de fase reversa, así como la calidad de los reactivos empleados. Esta técnica también permitió comprobar la inclusión de moléculas como el ibuprofeno y el OGP en la bicapa lipídica. El tamaño de partícula es una de las características fisicoquímicas más importantes para determinar las condiciones de la fabricación de liposomas como son la temperatura y el tiempo en el proceso de sonicación.

Los liposomas son modelos de membranas biológicas formadas básicamente por fosfolípidos. En los últimos treinta años, los liposomas han sido cada vez más importantes como sistema de administración de agentes terapéuticos, quimioterapéuticos, antígenos, inmunomoduladores y materiales genéticos. Un gran número de fármacos basados en este sistema de encapsulación se encuentran en investigación preclínica y clínica. La industria cosmética también ha mostrado gran interés en los liposomas y hoy en día existe una gama a base de ellos, por ejemplo algunos productos de cuidado de la piel disponibles en el mercado.

Referencias

- 1.- Wenk, M. R. and Seelig, J. “*Vesicle-Micelle transformation of phosphatidylcholine/Octyl- β - D-glucopyranoside mixtures as detected with titration calorimetry*”. *J. Phys. Chem. B*, 101, 5224-5231, **(1997)**.
- 2.- Heerklotz, H. and Seelig, J. “*Titration calorimetry of surfactant[^]membrane partitioning and membrane solubilization. (review)*.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1508 69-85, **(2000)**.
- 3.- Edwards K. A. and Baeumner, A. J. “*Analysis of liposomes (review)*.” *Talanta* 68 1432–1441, **(2006)**.
- 4.- Vemuri, S. and Rhodes, C.T. “*Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*.” *Pharmaceutics Acta Helvetiae* 70, 95-111, **(1995)**.
- 5.- Hoffmann, B. and Platz, G. “*Phase and aggregation behaviour of alkylglycosides*”. *Curr. Opin. Colloid Interfaced Sci.*, 6:171-177, **(2001)**.
- 6.- Strubenrauch, C. “*Sugar surfactans aggregation, interfacial and adsorption phenomena*”. *Curr. Opin. Colloid Interfaced Sci.*, 6(2):160-170, **(2001)**.
- 7.- Hato, M.; Minamikawa, H.; Tamda K.; and Baba, T. “*Self-assembly of synthetic glycolipid water system*”. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 80(3):233-270, **(1999)**.
- 8.- Fukuda, K.; Kawasaki, M.; Seimiya, T. and Fujiwara M. “*Stereochemical aspects of micellar propieties of esterified glucoside surfactants in water: apparent molar volumen adiabatic comprensibility, and aggregation number*”. *Colloid Polym. Sci.*, 278(6):576-580, **(2000)**.
- 9.- Chong, T. T.; Hashim, R. and Bryce Richard A. “*Molecular dinamics simulation of monoalkyl glycoside micelles in aqueous solution: influence of carbohydrate headgroup stereochemistry*”. *J. Phys. Chem. B*, 110(10):4978-4984, **(2006)**.
- 10.- Conlan, S. and Bayley, H. “*Folding of monomeric porin, OmpG, in detergent solution*”. *Biochemistry*, 42(31):9453-9465, **(2003)**.
- 11.- Biltonen, R. L. and Lichtenberg, D. “*The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations*”. *Chemistry and Physics of Lipids*, 64 129-142 **(1993)**.
- 12.- Torchilin ,V. P. and Weissig, V. Ed. “*Liposomes*” Oxford University Press, Oxford, U.K. **(2003)**
- 13.- Faustino-Vega, A.; Alvarez-Polo, M .A.; Gazca, B. and Bernad-Bernad, M.J. “*Influence of three different colloidal systems on the oxytetracycline-lecithin behavior*.” *Pharmazie* 64: 505-509 **(2006)**.