



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUIMICAS

ESTRUCTURAS TIPO EMULSIONES LIPIDICAS Y LIPOSOMAS.
DIPALMITOILFOSFATIDIL COLINA, COLESTEROL, TWEEN 20-SPAN 20 O TWEEN
80-SPAN 80 EN MEDIO ACUOSO

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
CARLOS JUÁREZ OSORNIO

Director de tesis:
Dr. Jesús Gracia Fadrique
Facultad de Química

Ciudad Universitaria, Ciudad de México Agosto de 2016.



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.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por alojarme durante tanto tiempo, Licenciatura, Maestría y por fin Doctorado.

Al Dr. Jesús Gracia Fadrique (Lab. 310 FQ-UNAM) por compartirme un espacio en su grupo de trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada (Num. 211349).

Al posgrado en Ciencias Químicas de la UNAM.

A la Dra. Silvia Pérez Casas (Lab. 301 FQ-UNAM) por su invaluable ayuda en los momentos más difíciles, por la donación de reactivos, por haberme dado la oportunidad del desarrollo docente y por haberme demostrado lo que significa ser universitario.

Al Dr. Abel Moreno Cárcamo (IQ-UNAM) por su apoyo y préstamo de equipos, además de sus sugerencias.

A la Dra. María Josefa Bernad Bernad (FQ-UNAM) por sus donaciones de reactivos, por confiar en mí y por las grandes oportunidades que me brinda.

Al Dr. Luis Alberto Medina Velázquez (IF-UNAM) por sus donaciones, sugerencias y por la oportunidad que me ofrece.

Al Dr. Ernesto Carrillo Nava (FQ-UNQM) por su apoyo en los estudios de Calorimetría.

A la Dra. Guillermina González Mancera (FQ-UNAM) por los estudios de microscopía electrónica.

A la Dra. Elena Arechaga Ocampo (UAM Cuajimalpa) por las porras.

A los compañeros del Laboratorio 301 de Biofisiología: Xelhua Marcos, Cristian Martínez, Alejandro Felipe y Carolina.

A Esteban Olvera y Miriam Novelo (Lab. 310 FQ-UNAM) por su compañerismo y charlas.

El sello de casa

*El "sello de casa" es una segunda identidad que nos caracteriza
llevo el Osornio materno y el Juárez paterno
pero llevo también recuerdos en la mente y sabores en los labios
También hice de mi eso que oía como piel dorada
¿Piel dorada? El significado; no se lee, se vive
no se aprende, se siente y no se compra, se gana*

*La adolescencia revelde se me escapó de las manos en las aulas universitarias
bueno, por lo menos la adolescencia y no el complemento
tomé muy en serio aquella idea de Salvador Allende sobre la juventud universitaria*

*Entre exámenes y clases, entre debates y desvelos
entre el amor de juvenud y los amigos de tropa sinceros
entre ecuaciones y esos inolvidables tacos de canasta
entre "goyas" o también entre duras consignas
me vi envuelto en una hermosa piel dorada
sin pelo en pecho, pero sí puma en pecho
y eso sí; de sangre azul: el sello de casa*

*¿Quién soy? Simplemente Carlos, el puma, el amigo
el hecho en CU o el "profe" como me dicen mis alumnos
Hoy sé con orgullo que doquiera que vaya, me reconocerán por el sello de casa.*

Carlos Juárez Osornio

Con dedicatoria especial a mi madre Esperanza Osornio y a la Dra. Silvia Pérez

Dedicatorias

A mi madre Esperanza Osornio Morales. Lo logramos una vez más, consta en ti el precio que pagué por este logro y tu apoyo fue mi principal impulso.

A mi hermana y a mi padre. Un motivo más para celebrar y para disfrutar con ustedes.

Amigas de siempre. Minerva y Ruth, ya tenemos más de qué hablar y por qué celebrar.

A la Facultad de Química de la UNAM. Me formaste como alumno y ahora como docente, valió la pena todo.

A ti, sí a ti, también te lo dedico, no creas que te había olvidado

Jurado asignado

Presidente	Dr. Abel Moreno Cárcamo
Vocal	Dr. David Quintanar Guerrero
Vocal	Dra. María Josefa Bernad Bernad
Vocal	Dr. Luis Alberto Medina Velázquez
Secretario	Dra. Alejandra Hernández Santoyo

Lugar donde se realizó el trabajo

Laboratorio 301 de Fisicoquímica de Superficies, edificio F, Facultad de Química
UNAM

Una parte del trabajo se presentó en cartel en el Congreso QuimiUNAM 2013, Ciudad Universitaria, Ciudad de México.

Los resultados fueron publicados en el *Journal of Liposome Research*:

Autores: Juárez-Osornio C. & Jesús-Gracia F.

Año: 2016

Título: Structures similar to lipid emulsions and liposomes. Dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80 in aqueous media.

doi: 10.1080/08982104.2016.1174944

Índice

<i>Introducción</i>	2
<i>Resumen/Abstract</i>	4
<i>Objetivo</i>	6
<i>Hipótesis</i>	8
<i>Capítulo 1: Potenciales termodinámicos en las fases volumétricas</i>	
1.1 Termodinámica: Generalidades	10
1.2 Potenciales termodinámicos esenciales	
1.2.1 Energía interna, Entalpía, Entropía y Energía libre	10
<i>Capítulo 2: Termodinámica de la interfase líquido-vapor</i>	
2.1 Potencial termodinámicos de la interfase líquido-vapor	14
2.1.1 Energía interna de superficie y ecuaciones de adsorción de Gibbs	14
2.1.2 Potencial químico y actividad	16
2.1.3 Coeficiente de actividad	18
2.1.4 Actividad superficial y concentración micelar crítica	19
2.1.5 Isoterma de Langmuir	22
2.2 Curvatura	24
<i>Capítulo 3: Tensoactivos y diagramas de equilibrio</i>	
3.1 Moléculas con actividad superficial	28
3.1.1 Comportamiento en un sistema acuoso.....	25
3.1.2 Ésteres de Sorbitán	29
3.2 Equilibrio de fases	31
3.2.1 Diagrama binario de equilibrio de fases para tensoactivos del tipo estoxilados	31
3.2.2 Diagramas ternarios	33
<i>Capítulo 4: Sistemas coloidales de entrega de fármacos</i>	
4.1 Sistemas coloidales de entrega de fármacos	36
4.1.1 Emulsiones	36
4.1.2 Liposomas	39
4.1.3. Micelas mixtas	42
<i>Capítulo 5: Materiales y Métodos</i>	
5.1 Método general	46
5.2 Determinación de <i>cmc</i> de Tween 20 y Tween 80	47
5.3 Diagramas binarios de equilibrio de Temperatura vs Composición	48
5.4 Diagramas pseudoternarios de equilibrio de agua/Tween-Span/DPPC-Col y tiempos de estabilidad coloidal.....	48
5.5 Estudios de calorimetría diferencial de barrido y microscopía confocal de fluorescencia	49
5.6 Microscopías MEB y MFA	49
<i>Capítulo 6: Resultados y discusión</i>	
6.1 Concentración micelar crítica	51

6.2 Diagramas binarios de equilibrio	53
6.3 Diagramas pseudo ternarios de Agua/Tween-Span/DPPC-Col y tiempos de estabilidad coloidal	53
6.3.1 Diagramas pseudo ternarios para la mezcla Tween 20-Span 20 y Curva de estabilidad	54
6.3.2 Diagramas pseudo ternarios para la mezcla Tween 80-Span 80 y Curva de estabilidad	55
6.3.3 Determinaciones instrumentales de los sistemas más estables.....	57
6.3.3.1 Planteamiento de las trayectorias termodinámicas de obtención	57
6.4 Estudios calorimétricos	58
6.5 Estudios de microscopía de fluorescencia	64
6.6 Estudios de Microscopía electrónica y de fuerza atómica	71
6.7 Resumen de análisis de resultados	74
<i>Capítulo 7: Conclusiones</i>	76
<i>Índice de Figuras</i>	78
<i>Índice de Abreviaturas</i>	82
<i>Índice de Tablas</i>	84
<i>Bibliografía</i>	86
<i>Artículo de publicación</i>	93

Introducción

Desde los inicios de la práctica médica ha existido el deseo de administrar una sustancia con la capacidad de “curar” la enfermedad de cualquier paciente, Paul Ehrlich denominó como “bala mágica” a ese fármaco idóneo con capacidad de actuar exclusivamente en el sitio biológico de la enfermedad [Gabizón, 2001], esta meta pudiera ser alcanzada mediante el uso de transportadores de fármacos. En la vida cotidiana encontramos diversas sustancias que por su identidad estructural pueden ser vehículos de fármacos; al respecto las estructuras micelares pueden ser uno de esos transportadores [Birdi 2010]; otras estructuras conocidas como liposomas, producto del autoensamblaje de sustancias conocidas como fosfolípidos, muestran esa capacidad de transporte [Rupp *et al.*, 2010; Szinitowska *et al.*, 2007; Tadros, 2005], incluso existe una partícula compuesta de tensoactivos y fosfolípidos conocida como micela mixta y se obtiene a partir de incrementar la proporción del tensoactivo con respecto al fosfolípidos [Rupp *et al.*, 2010; Szinitowska *et al.*, 2007]. En este trabajo se planteó el objetivo de generar estructuras para el transporte de fármacos a través de un procedimiento diferente a los reportados hasta la fecha.

En la literatura científica abundan los trabajos sobre el desarrollo de sistemas de transporte de fármacos, sin embargo, es necesario evaluar la influencia de factores como temperatura y composición sobre el tipo de transportador que se obtiene. En el presente trabajo, mediante el empleo de fosfolípidos, colesterol, compuestos pertenecientes al grupo de moléculas tensoactivas y con el uso de diagramas de equilibrio de fases, se evaluó la influencia de la temperatura y la composición en la formación de novedosas estructuras nanométricas con posible uso como transportadores de fármacos.

El trabajo presenta un Resumen, el Objetivo y la Hipótesis, en los capítulos 1-4 se ubica el Marco teórico, el capítulo 5 corresponde a la sección de Materiales y métodos y el capítulo 6 presenta los Resultados y su discusión, en el capítulo 7 se presenta la Conclusión del trabajo; al final del trabajo se presenta también los índices de Figuras, Abreviaturas, Tablas, Bibliografía y el artículo científico resultado de esta investigación.

Resumen / Abstract

Resumen

En este trabajo se reporta una nueva generación de estructuras nanométricas con posible uso en el campo farmacéutico. Mediante el respaldo de diagramas de equilibrio de fases, una mezcla de 1,2-Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DPPC), Colesterol (Col), ésteres de sorbitán etoxilados y no etoxilados (Tween 20-Span 20 o Tween 80-Span 80) y agua, fue llevada a las cercanías de la temperatura de enturbiamiento (cp) del tensoactivo, con lo que se direccionó la formación de ocho sistemas homogéneos con tiempos de estabilidad coloidal variables y de al menos 23 días. La influencia de los componentes en el tamaño de partícula se determinó mediante el diagrama pseudo ternario de equilibrio de fases de agua/Tween-Span/DPPC-Col. La identidad estructural de la partícula de los ocho sistemas, se determinó mediante Calorimetría diferencial de barrido (CDB), Microscopía confocal de fluorescencia (MCF), Microscopía electrónica de barrido (MEB) y Microscopía de fuerza atómica (MFA); los resultados instrumentales mostraron que siete suspensiones presentaron una partícula coloidal formada por un núcleo micelar mixto rodeado por al menos una bicapa de DPPC; una octava suspensión, presentó el mismo tipo de agregado nanométrico y además estructuras liposomales.

Abstract

This work reports a new kind of nanometric structures with potential use in the pharmaceutical field. Using phase diagram equilibrium, a mixture of 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), Cholesterol (Chol), fatty acid esters of sorbitan, ethoxylated and non ethoxylated (Tween 20-Span 20 or Tween 80-Span 80) and water were mixed in the proximity of cloud point (cp) of ethoxylated surfactant, to obtain homogeneous systems with different colloid stability times. The influence of components on size particle was determined by pseudo ternary phase diagram of water/Tween-Span/DPPC-Chol. The kind of arrangement of components in the suspension particles was evaluated by Differential scanning calorimetry (DSC), Confocal fluorescence microscopy (CFM), Scanning electron microscopy (SEM) and Atomic force microscopy (AFM); only seven suspensions were stable more than 23 days, whose suspension particle is structurally new, is a mixed micelle surrounded by at least one bilayer of DPPC; an eighth suspension, showed the same kind of nanometric structure and liposomes.

Objetivo

Diseñar trayectorias termodinámicas en la obtención de estructuras nanométricas con posible uso en el campo farmacéutico, sustentadas en estudios de equilibrio de fases, empleando como plataforma las estructuras micelares que presenta un tensoactivo del tipo etoxilado en las cercanías del punto de enturbiamiento como medida de control y reproducibilidad experimental.

Hipótesis

La adición de fosfolípidos y colesterol al sistema agua-tensoactivo etoxilado en las cercanías del punto de enturbiamiento, favorecerá la construcción de sistemas nanométricos con posible uso en el campo farmacéutico, a partir de estados termodinámicos de baja aleatoriedad correspondientes a sistemas micelares de los tensioactivos empleados.

1

*Potenciales Termodinámicos en
las fases volumétricas*

1.1 Termodinámica: Generalidades

La termodinámica se encarga del estudio del flujo, transición y transformación de energía en un sistema de interés [Baehr, 1965; Müller, 2006; Smith, 2004]. A través del tiempo, un sistema presenta ciertos valores de todas aquellas propiedades medibles las cuales pueden variar; para cada una de las combinaciones numéricas del sistema se corresponde un estado de equilibrio, la relación algebraica entre variables como temperatura (T) y presión, (P) recibe el nombre de función de estado o potencial termodinámico [Baehr, 1965; Connors, 2002; Kim, 2004; Laughlin, 1994].

1.2 Potenciales termodinámicos esenciales

1.2.1 Energía interna, Entalpía, Entropía y Energía libre.

Las ecuaciones (1-17) fueron tomadas de las siguientes referencias: Baehr, 1965; Beard, 2008; Birdi, 2010; Butt & Graft, 2010; Connors, 2002; Hiemenz, 1997; Hillert, 2007; Howell & Buckius, 1990; Kim, 2004; Laughlin, 1994; Martin, 1993; Moroi, 1992; Olvera, 2008; Prigogine & Defay, 1954; Smith & Van Ness, 2004. El cambio en la energía interna de un sistema, dU , está dado por la siguiente ecuación:

$$dU = dq - PdV \quad (1)$$

En la ecuación anterior, dq corresponde al cambio en el calor en el sistema y dV al de volumen. El calor a presión constante es llamado Entalpía, ecuación (2):

$$H = U + PV \quad (2)$$

La diferencial de la ecuación (2):

$$dH = dU + PdV + VdP \quad (3)$$

A partir de la ecuación (1):

$$dq = dU + PdV \quad (4)$$

Sustituyendo (4) en (3), se obtiene:

$$dH = dq + VdP \quad (5)$$

Definiendo la función Entropía de la siguiente manera:

$$dS = \frac{dq}{T} \quad (6)$$

A partir de las ecuaciones (1) y (6), se obtiene una de las ecuaciones fundamentales para la energía interna:

$$dU = TdS - PdV \quad (7)$$

La ecuación (7) corresponde al primer potencial termodinámico básico. La cantidad máxima de energía que un sistema posee, no necesariamente se manifestará como trabajo, aunque el proceso sea reversible, el cual precisamente aporta el máximo de energía disponible; Helmholtz y Gibbs, introdujeron dos expresiones al respecto:

$$dF = dU - TdS \quad (8)$$

$$dG = dH - TdS \quad (9)$$

Las variables F y G reciben el nombre de energía libre de Helmholtz y energía libre de Gibbs respectivamente; la sustitución de la ecuación (3), considerada a P constante, en la (9), da como resultado:

$$dG = dU + PdV - TdS \quad (10)$$

Integrando la ecuación (10) anterior, G absoluta es:

$$G = U + PV - TS \quad (11)$$

La diferencial de la ecuación (11) es:

$$dG = dU + PdV + VdP - TdS - SdT \quad (12)$$

La combinación de las ecuaciones (7) y (12), permiten obtener la siguiente expresión:

$$dG = VdP - SdT \quad (13)$$

La ecuación (13) representa otro de los potenciales termodinámicos básicos. De las ecuaciones (8) y (9), se obtiene:

$$dG = dF - dU + dH \quad (14)$$

Sustituyendo la definición de PdV de la ecuación (3) con P constante, en la ecuación anterior, se obtiene la siguiente definición adicional del cambio en la energía libre de Gibbs.

$$dG = dF + PdV \quad (15)$$

Combinando las ecuaciones (3) y (7), se obtiene lo siguiente:

$$dH = TdS + VdP \quad (16)$$

La ecuación (16) representa otro potencial termodinámico básico, junto con la energía libre de Helmholtz, se completan los cuatro potenciales termodinámicos básicos de la Tabla 1.

$$dF = -PdV - SdT \quad (17)$$

Tabla 1. Potenciales termodinámicos básicos

<i>Potencial</i>	<i>Ecuación</i>	<i>Número de ecuación</i>
Energía Interna	$dU = TdS - PdV$	7
Entalpía	$dH = TdS + VdP$	16
Energía libre de Gibbs	$dG = -SdT + VdP$	13
Energía libre de Helmholtz	$dF = -SdT - PdV$	17

2

*Termodinámica de la interfase
líquido-vapor*

2.1 Potenciales termodinámicos de la interfase líquido-vapor.

La interfase¹, es aquella región que separa las fases líquido-vapor, líquido-líquido, líquido-sólido, sólido-sólido y sólido-vapor; suele designarse el nombre de superficie para la región que separa las fases líquido-gas y sólido-gas [Birdi, 2010; Connors, 2002]. La Figura 2.1.1 muestra la interfase entre las fases volumétricas α y β , la cual presenta propiedades fisicoquímicas diferentes a las que muestran las fases volumétricas implicadas, por ello es necesario ajustar los potenciales termodinámicos descritos en el Capítulo 1 [Butt & Graf, 2003; Connors, 2002; Olvera, 2008; Tadros, 2005].

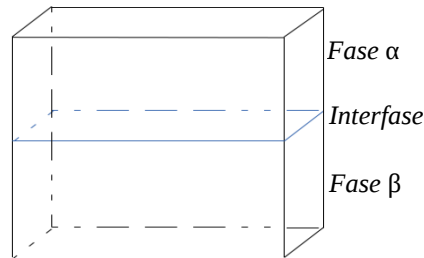


Figura 2.1.1 Esquema que muestra la zona interfasial ubicada entre las fases volumétricas α y β .

2.1.1 Energía interna de superficie y ecuación de adsorción de Gibbs.

Las ecuaciones que se muestran en este apartado 2.1.1 (18-32), fueron extraídas de las siguientes referencias: Birdi, 2010; Butt & Graf, 2003; Connors, 2002; Florence & Atwood, 2006; Hiemenz, 1997; Kim, 2004; Levine, 2004; Moroi, 1992; Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2003; Olvera, 2008; Prigogine & Defay, 1954; Rusanov & Prokhorov, 1996; Schik, 1987; Tadros, 2005. La evidencia física de que la región superficial no se comporta igual que las fases que separa es la migración de algunas moléculas del líquido hacia la fase vapor que sucede justo en esa zona; esto muestra que existe un exceso de energía en la interfase, la energía interna para la interfase está dada por la siguiente expresión (donde el asterisco denota que la magnitud es inherente a la interfase):

$$dU^* = TdS^* - PdV^* + dE^* \quad (18)$$

En la ecuación anterior, V^* corresponde al volumen de la interfase, dE^* se refiere al parámetro de energía superficial de exceso que permite la distinción y separación entre la fase líquida y la gaseosa, definido de la siguiente manera:

$$dE^* = \sigma dA \quad (19)$$

El valor de tensión interfasial es σ , que para el caso de la interfase líquido-gas, es la tensión superficial y A es el área. Sustituyendo (19) en (18), obtenemos:

$$dU^* = TdS^* - PdV^* + \sigma dA \quad (20)$$

1. El diccionario en línea de la Real academia de la lengua Española (www.rae.es/recursos/diccionarios, revisado en Junio de 2016), reconoce y define interfase e interfaz y no a la palabra interface, ésta es usada en algunos escritos seguramente como una derivación de la palabra facial o cara, lo que le vendría dando un significado de "intercara".

La presencia de algún soluto en la interfase, contribuye en el valor de dU^* mediante su potencial químico (μ_i) y el número de mol (n_i^*), la energía interna es ahora:

$$dU^* = TdS^* - PdV^* + \sigma dA + \sum_i \mu_i dn_i^* \quad (21)$$

La energía interna "absoluta" es:

$$U^* = TS^* - PV^* + \sigma A + \sum_i \mu_i n_i^* \quad (22)$$

La diferencial de (22) es:

$$dU^* = TdS^* + S^*dT - PdV^* - V^*dP + \sigma dA + Ad\sigma + \sum_i \mu_i dn_i^* + \sum_i n_i^* d\mu_i \quad (23)$$

Igualando ambas diferenciales se obtiene:

$$S^*dT - V^*dP + Ad\sigma + \sum_i n_i^* d\mu_i = 0 \quad (24)$$

Con T constante y bajo la primera consideración de Gibbs ($V^* \rightarrow 0$), la ecuación (24) se reduce a lo siguiente:

$$Ad\sigma + \sum_i n_i^* d\mu_i = 0 \quad (25)$$

El despeje de la variación de la tensión superficial de la ecuación (25) es:

$$-d\sigma = \sum_i \frac{n_i^*}{A} d\mu_i \quad (26)$$

Considerando la concentración de la especie i por unidad de área $n_i^*/A = \Gamma_i$ se obtiene:

$$-d\sigma = \sum_i \Gamma_i d\mu_i \quad (27)$$

La ecuación (27) corresponde a la Isoterma de Adsorción de Gibbs. Considerando que la presión superficial se define como la diferencia entre la tensión superficial del disolvente puro y la del medio:

$$\pi = \sigma_0 - \sigma \quad (28)$$

En la ecuación anterior σ_0 se refiere a la tensión superficial del disolvente puro, el parámetro σ se refiere al valor de tensión superficial del sistema; de este modo, la diferencial de la presión superficial es:

$$d\pi = -d\sigma \quad (29)$$

Al sustituir en la ecuación (27), la isoterma de Gibbs es la siguiente:

$$d\pi = \sum_i \Gamma_i d\mu_i \quad (30)$$

En una interfase saturada con moléculas de tensoactivo, la cantidad de moléculas del solvente en la misma zona tiende a cero, esto se conoce como la segunda consideración de Gibbs; es por ello que la variación de la presión superficial de la ecuación (30) es función sólo de la concentración superficial y del potencial químico del soluto, es decir:

$$d\pi = \Gamma d\mu \quad (31)$$

Los potenciales químicos de un tensoactivo en la interfase y el seno del líquido (μ^b) son iguales, la ecuación (31) puede ser escrita de la siguiente manera:

$$d\pi = \Gamma d\mu^b = \Gamma d\mu \quad (32)$$

2.1.2 Potencial químico y actividad

Las ecuaciones (33-46) de esta sección, fueron obtenidas de las siguientes referencias: Ben-Naim, 1980; Ben-Naim, 2006; Connors, 2002; Howell & Buckius, 1990; Kim, 2004; Prausnitz & Gomez de Acevedo, 2000; Prigogine & Defay, 1954; Schik, 1987. El potencial químico es un parámetro de importancia en la química de soluciones; para un sistema binario formado por un solvente y un soluto i , el potencial químico está definido de la siguiente manera:

$$\mu_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_T \quad (33)$$

A partir de la energía libre de Gibbs (13), a T constante, el volumen queda definido de la siguiente manera:

$$V = \left(\frac{\partial G}{\partial P} \right)_T \quad (34)$$

Empleando la ecuación de los gases ideales, la expresión (34) es:

$$\left(\frac{\partial G}{\partial P} \right)_T = \frac{RT}{P} \sum n_i = V \quad (35)$$

El volumen molar parcial de i con respecto al volumen del sistema (\bar{v}_i) es:

$$\left(\frac{\partial \mu_i}{\partial P}\right)_T = \bar{V}_i \quad (36)$$

A partir de la ecuación (35), el cambio de V con respecto a n es:

$$\left(\frac{\partial V}{\partial n_i}\right)_{T,P,n_j \neq n_i} = \bar{V}_i = \frac{RT}{P} \quad (37)$$

Sustituyendo (37) en la ecuación (36) obtenemos una diferencial para el potencial químico:

$$d\mu_i = RT \frac{dP}{P} = RT \ln P \quad (38)$$

Según el concepto de las presiones parciales, P está dada según la siguiente ecuación:

$$P_i = x_i P \quad (39)$$

Donde P_i es la presión parcial del componente i y x_i su fracción mol, a x_i constante se puede deducir lo siguiente:

$$d \ln P_i \approx d \ln P \quad (40)$$

Sustituyendo obtenemos:

$$d\mu_i = RT \ln P_i \quad (41)$$

La integración de la ecuación (41), desde un estado de potencial químico de referencia, μ_i^0 , obtenemos lo siguiente:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln P_i \quad (42)$$

Observando la ecuación, μ_i^0 corresponde al límite inferior de integración y puede ser conocido si $P = 1$ atm, de este modo el segundo sumando de la ecuación será cero y el potencial químico es:

$$\mu_i = \mu_i^0 \quad (43)$$

En procesos llevados a cabo en compartimentos especializados, como es el caso de los procesos biológicos, es necesario el desarrollo de una expresión análoga a la ecuación (43), en la que se trabaje con alguna magnitud diferente a P y que sea función de la composición en la fase líquida, esta nueva magnitud fue llamada actividad, a , de este modo la ecuación (43) es:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln a_i \quad (44)$$

En la ecuación (44), se puede inferir lo siguiente:

$$\begin{aligned} \mu_i &\rightarrow \mu_i^0 \\ a_i &\rightarrow 1 \end{aligned}$$

Análogo a la ecuación (42), la relación de a con la fracción mol de la especie i en solución, x_i , es:

$$a_i = \gamma_i x_i \quad (45)$$

La constante de proporcionalidad γ_i es llamada coeficiente de actividad. La ecuación (44), si el coeficiente de actividad tiende a uno, es simplemente:

$$\mu_i = \mu_i^0 + RT \ln x_i \quad (46)$$

Los sistemas para los cuales es aplicable la ecuación (46), son conocidos como soluciones simétricas ideales, entre más similares sean químicamente las moléculas de soluto y solvente, el sistema puede ser considerado como ideal; otro criterio de idealidad, considera que si el soluto se encuentra diluido en el sistema, las interacciones soluto-solvente prevalecen sobre las soluto-soluto, prácticamente inexistentes y el sistema se dice ideal bajo estas condiciones [Ben-Naim, 2006].

2.1.3 Coeficiente de actividad

La variación del coeficiente de actividad se aprecia en la Figura 2.1.3.1, al existir dos criterios de idealidad diferentes, los coeficientes tienden a uno a valores límite de x_i diferentes [Ben-Naim, 2006; Prausnitz & Gomez de Acevedo, 2000; Viades-Trejo *et al*, 2006]:

$$\text{i) } \gamma_i \rightarrow 1, \text{ si } x_i \rightarrow 1$$

El sistema Metanol en agua de la Figura 2.1.3.1, se rige bajo este criterio y es aplicable esta variación tanto para el disolvente como para el soluto, es por ello que el criterio es conocido como simétrico o de Henry.

$$\text{ii) } \gamma_i \rightarrow 1, \text{ si } x_i \rightarrow 0$$

El sistema NaCl en agua, apreciado también en la Figura 2.1.3.1, se rige bajo este criterio y, a diferencia del sistema Metanol-agua, esta variación no se cumple para el solvente, sólo para el soluto, por ello el criterio es conocido como asimétrico o de Raoult.

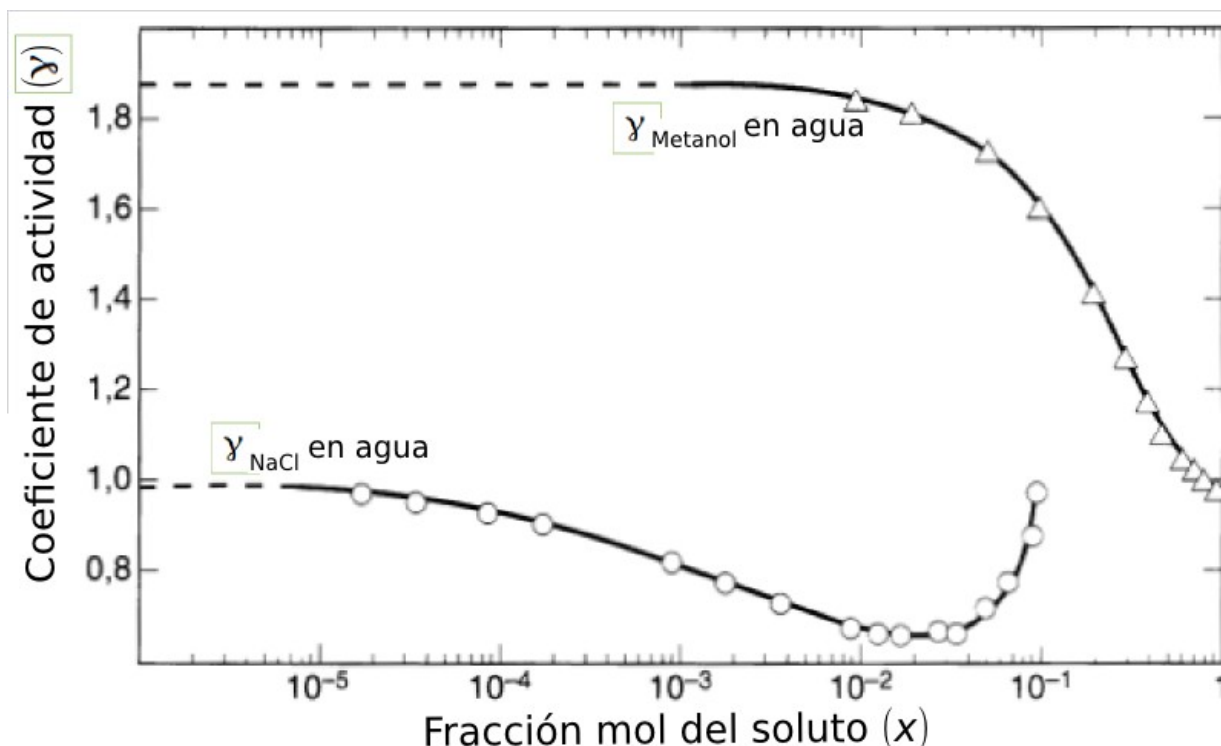


Figura 2.1.3.1. Coeficientes de actividad experimentales a 25°C para metanol y NaCl en agua. Prausnitz & Gomez de Acevedo, 2000; página 178.

2.1.4 Actividad superficial y concentración micelar crítica.

Una molécula con actividad superficial migra a la interfase líquido-vapor conforme se adicionen más moléculas al sistema, bajo esta situación, la interfase se satura por completo dando como resultado una organización supramolecular de los monómeros de tensoactivo denominada micela [Kim, 2004; Tadros, 2005], esta concentración de tensoactivo donde se forman se conoce como concentración micelar crítica, *cmc* [Florence & Atwood, 2006; Kim, 2004; Schik, 1987; Tadros, 2005], este valor puede ser estimado mediante la isoterma de adsorción de Gibbs. La curva típica de presión superficial vs $x_{\text{tensoactivo}}$, se aprecia en la Figura 2.1.4.1, el cambio abrupto de comportamiento gráfico se da en la *cmc* o x_{cmc} [Bermúdez-Salguero & Gracia-Fadrique, 2011; Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2003].

El complemento al criterio simétrico sobre la variación del coeficiente de actividad respecto a la concentración, implica lo siguiente: si $x \rightarrow 0$, entonces $\gamma \rightarrow \gamma^\infty$. Las condiciones anteriores son aplicables en las cercanías de la *cmc* (Fig. 2.1.4.1); γ^∞ corresponde al coeficiente de actividad a dilución infinita; de este modo, el límite del potencial químico de un tensoactivo al seno del líquido a dilución infinita es [Bermúdez-Salguero & Gracia-Fadrique, 2011; Gracia-Fadrique *et al.*, 2002; Pardo-Cervantes *et al.*, 2011]:

$$\lim_{x \rightarrow 0} \mu = \mu^0 + RT \ln x + RT \ln \gamma^\infty \tag{47}$$

La diferencial de la expresión anterior, teniendo en cuenta que γ^∞ es una constante, es:

$$d\mu = RT d\ln x \quad (48)$$

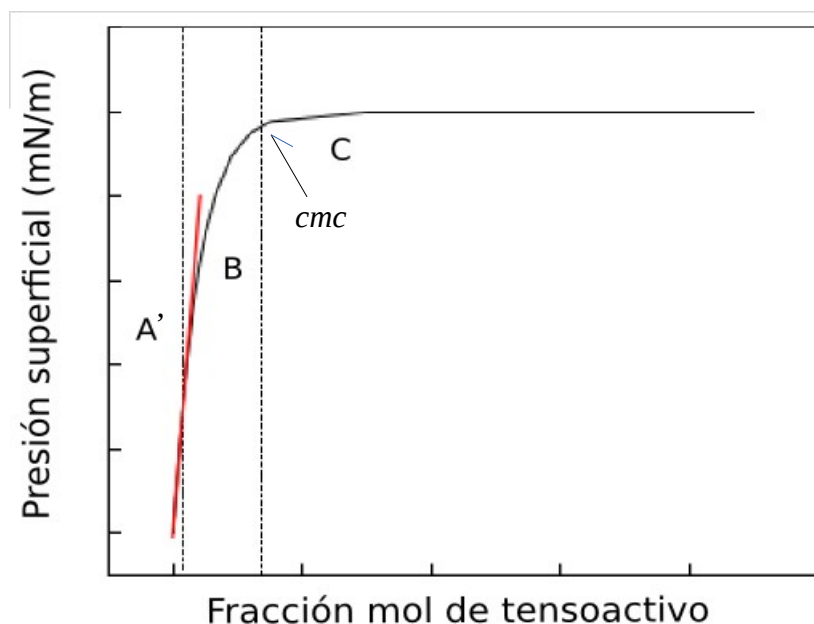


Figura 2.1.4.1. Curva típica de π vs x . La región A' corresponde a una zona diluida ($x \rightarrow 0$), la región B corresponde a la zona previa de presión superficial prácticamente constante, señalada como C, la cmc se ubica justo entre la zona B y C. **Bermúdez-Salguero & Gracia-Fadrique, 2011.**

$$d\mu = RT d\ln x \quad (48)$$

Recordando que $d\pi = \Gamma d\mu$ (ecuación 32), la ecuación anterior es:

$$d\pi = \Gamma RT d\ln x \quad (49)$$

Considerando T constante, obtenemos [Hillert, 2007; Olvera, 2008; Schik, 1987]:

$$\Gamma = \frac{1}{RT} \left(\frac{d\pi}{d\ln x} \right)_T \quad (50)$$

El parámetro Γ corresponde a la concentración de superficie y es igual al número de mol de tensoactivo por unidad de área interfasial. El valor de la fracción mol correspondiente a la cmc (x_{cmc}), puede ser determinado bajo las siguientes consideraciones [Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2005]: a) La curva de π vs $\ln x$, apreciada en la Figura 2.1.4.2, presenta un valor máximo de $d\pi/d\ln x$ justo en la cmc , así mismo, se llega a un valor máximo de presión superficial, π_{\max} , b) la concentración de superficie es máxima, Γ_{\max} , en la x_{cmc} , ya que la interfase se encuentra totalmente saturada, bajo este criterio:

$$\Gamma_{max} = \frac{1}{RT} \left(\frac{d\pi}{d \ln x} \right)_T^{max} \quad (51)$$

Reordenando e integrando en la periferia de la *cmc* [Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2005]:

$$\int_{\pi}^{\pi_{max}} d\pi = \Gamma_{max} RT \int_x^{x_{cmc}} d \ln x = \pi_{max} - \pi = \Gamma_{max} RT \ln x_{cmc} - \Gamma_{max} RT \ln x \quad (52)$$

La integral anterior, corresponde a la expresión de la ecuación lineal que representa los datos de π vs $\ln x$ hasta la *cmc*; el despeje de π de la expresión (52), muestra que el valor de x_{cmc} , se obtiene de la ordenada al origen [Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2005]:

$$\pi = \pi_{max} - \Gamma_{max} RT \ln x_{cmc} + \Gamma_{max} RT \ln x \quad (53)$$

El valor de π_{max} corresponde al promedio de los valores de π en la saturación de la interfase (Fig. 2.1.4.2) cuando $x \geq x_{cmc}$; Γ_{max} se calcula a partir de la pendiente (ecuación 53).

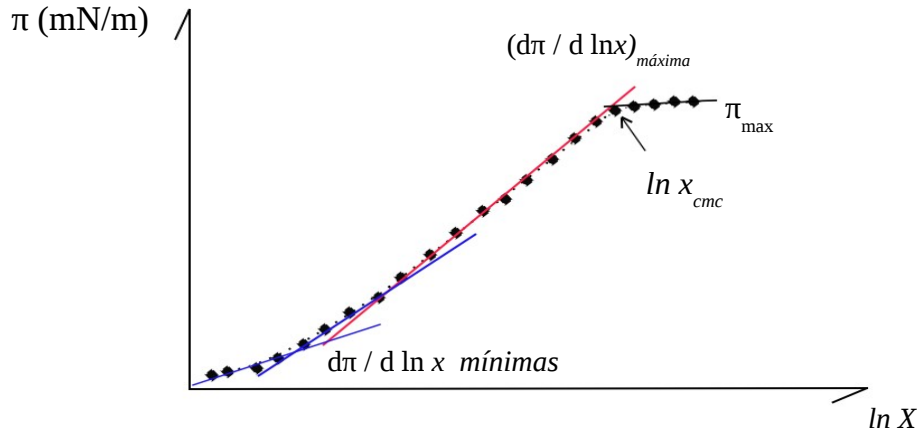


Figura 2.1.4.2. Comportamiento típico de la curva de π vs $\ln x$, la *cmc* se presenta justo antes de los valores máximos y constantes de π cuando $d\pi/d \ln x$ es máxima, línea roja.

La zona a dilución infinita es importante debido a que en esa región es posible estudiar la naturaleza de las interacciones tensoactivo-solvente sin interferencia de las interacciones soluto-soluto prácticamente inexistentes [Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2003]. La Figura 2.1.4.1, muestra cómo en la región A o a dilución infinita, existe un amplio efecto sobre la presión superficial y desde luego sobre la tensión superficial, con el mínimo de tensoactivo, x , y la relación entre π y x es prácticamente lineal [Gracia-Fadrique et al, 2002]:

$$\pi = m x \quad (54)$$

Con m como la pendiente que rige el comportamiento de la zona a dilución infinita, siendo única a un valor de P y T , está definida según la siguiente expresión [Gracia-Fadrique *et al.*, 2002]:

$$m = \left(\frac{d\pi}{dx} \right)_{T, x \rightarrow 0} \quad (55)$$

La ecuación (50), puede ser remplazada por la siguiente ecuación, sólo en la región A de la Figura 2.1.4.1 [Butt & Graf, 2003; Connors, 2002; Gracia-Fadrique *et al.*, 2002; Laughlin, 1994; Olvera, 2008]:

$$\Gamma = \frac{x}{RT} \left(\frac{d\pi}{dx} \right)_T \quad (56)$$

De este modo, la pendiente que rige el comportamiento a dilución infinita se obtiene por igualación de las ecuaciones (54) y (55):

$$\left(\frac{d\pi}{dx} \right) = m \quad (57)$$

Igualando las ecuaciones (54) y (57), se obtiene la siguiente expresión que es la ecuación de estado ideal bidimensional para la interfase líquido-vapor [Butt & Graf, 2003; Gracia-Fadrique *et al.*, 2002; Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2003; Tadros, 2005]:

$$\pi = \Gamma RT = m x \quad (58)$$

El área superficial que ocupa una molécula de soluto en la interfase, A , es inversa a la concentración de superficie, la ecuación (58) representa una ecuación de gas ideal bidimensional:

$$\pi A = RT \quad (59)$$

Definiendo el parámetro de cobertura, θ , como la fracción del área superficial cubierta por tensoactivo [Olvera, 2008; Sandoval-Vallarta *et al.*, 2015]:

$$\theta = \frac{\Gamma(x)}{\Gamma_{max}} \quad (60)$$

La sustitución de la definición de Γ (ecuación 60) en la expresión (58), permite obtener la siguiente ecuación:

$$\pi = \Gamma_{max} RT \theta \quad (61)$$

2.1.5 Isoterma de adsorción de Langmuir

Langmuir estableció tres postulados para describir la adsorción de una molécula con actividad superficial en la interfase líquido-vapor [Sandoval-Vallarta *et al.*, 2015]:

- i. Formación de una monocapa de moléculas adsorbidas.
- ii. Los sitios de adsorción interfásial tienen la misma probabilidad de ser ocupados por un tensoactivo.
- iii. No existe interacción alguna entre las moléculas adsorbidas.

Las ecuaciones de este apartado 2.1.5 (62-71), fueron obtenidas a partir de las siguientes referencias: Butt & Graf, 2003; Kim, 2004; Kotheke *et al.*, 2007; Olvera, 2008; Sandoval-Vallarta *et al.*, 2015; Tadros, 2005 La ecuación de adsorción de Langmuir, parte de las siguientes ecuaciones referentes a la velocidad de adsorción (V_{ads}) y la de desorción (V_{des}) de un tensoactivo en la interfase líquido-vapor:

$$V_{ads} = k_{ads}(1-\theta)x \tag{62}$$

$$V_{des} = k_{des}\theta \tag{63}$$

Las velocidades de adsorción y desorción son afectadas por una constante de adsorción (k_{ads}) y de desorción (k_{des}); en el equilibrio, la velocidad de adsorción y de desorción son idénticas, igualando las ecuaciones (44) y (45) y, planteando que $k_{ads}/k_{des} = \beta$, se obtiene lo siguiente:

$$\beta x = \frac{\theta}{1-\theta} \tag{64}$$

A partir de la ecuación (64):

$$\theta = \frac{\beta x}{1+\beta x} \tag{65}$$

A partir de la definición de Γ (ecuación 60) y usando la definición de θ anterior, obtenemos:

$$\Gamma = \Gamma_{max} \frac{\beta x}{1+\beta x} \tag{66}$$

Igualando las ecuaciones (56) y (66), se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{\beta}{1+\beta x} = \frac{1}{\Gamma_{max} RT} \left(\frac{d\pi}{dx} \right)_T \tag{67}$$

Integrando para determinar la presión superficial:

$$\int_0^{\pi} d\pi = \Gamma_{max} RT \int_0^x \frac{\beta}{1+\beta x} dx \quad (68)$$

$$\pi = \Gamma_{max} RT \ln(1 + \beta x) \quad (69)$$

Sustituyendo: $1 + \beta x = \beta x / \theta$ (65), obtenemos la siguiente expresión:

$$\pi = \Gamma_{max} RT (\ln \beta x - \ln \theta) \quad (70)$$

En la periferia de la *cmc*, $x \rightarrow x_{cmc}$, la superficie se encuentra saturada de tensoactivo, así que no hay más lugares disponibles para que lleguen más moléculas, es decir:

$$\begin{aligned} \theta &\rightarrow 1 \\ \pi &\rightarrow \pi_{max} \end{aligned}$$

Por lo tanto, la presión superficial máxima:

$$\pi_{max} = \Gamma_{max} RT (\ln \beta + \ln x_{cmc}) \quad (71)$$

El modelo de Langmuir para la adsorción de tensoactivo en la interfase líquido-vapor, expresada por las ecuaciones (69) y (71), considera la formación de una monocapa de moléculas tensoactivas, esto sucede para un valor máximo y único de π_{max} ; de la curva de π vs $\ln x$, se determina la zona de Langmuir, ubicada hasta los valores de π_{max} ; una regresión no lineal de los puntos experimentales (ecuación 69), permite calcular los parámetros de Γ_{max} y β , y x_{cmc} a partir de la ecuación (71).

2.2 Curvatura

Las interfases, fuera de efectos de paredes son curvas [Hernández-Baltazar & Gracia-Fadrique, 2005; Hiemenz, 1997; Viades-Trejo & Gracia-Fadrique, 2006], En la Figura 2.2.1, la interfase curva esférica de radio R, separa a las fases α y β quienes presentan un valor de presión, P^α y P^β respectivamente y cuya diferencia es responsable de la expansión de la interfase; la energía libre de Helmholtz que contiene los trabajos de superficie (dA) y de volumen (PdV) es la siguiente:

$$dF = -SdT - P^\alpha dV^\alpha - P^\beta dV^\beta + \sigma dA \quad (72)$$

De donde dV^α y dV^β son los cambios de volumen, σ la tensión interfacial y dA la variación del área superficial. En el equilibrio, $dF = 0$ y en condiciones isotérmicas $dT = 0$:

$$\sigma dA - P^\alpha dV^\alpha - P^\beta dV^\beta = 0 \quad (73)$$

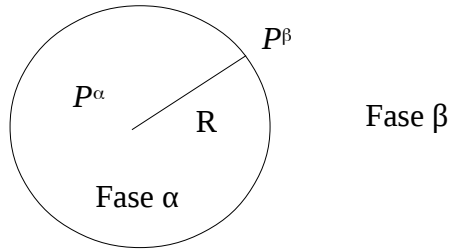


Figura 2.2.1. Interfase curva que separa las fases α y β , la expansión interfásica implica que $P^\alpha > P^\beta$.

La expansión de una fase implica que la otra experimenta una disminución de volumen:

$$-dV^\alpha = dV^\beta \tag{74}$$

Sustituyendo (74) en (73), obtenemos lo siguiente:

$$\sigma dA = (P^\alpha - P^\beta)dV = \Delta P dV \tag{75}$$

La diferencia de presiones entre las fases α y β (ecuación 75) es:

$$\Delta P = \sigma \frac{dA}{dV} \tag{76}$$

El incremento de volumen debido a la expansión ocurre simultáneamente con el aumento de área, en el equilibrio y para la interfase esférica de radio R , los cambios de volumen y de área están dados por $dV = 4\pi R^2 dR$ y $dA = 8\pi R dR$, sustituyendo ambas expresiones en la ecuación (76), obtenemos la siguiente expresión que corresponde a la ecuación de Young-Laplace para una interfase esférica:

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R} \tag{77}$$

La expresión anterior puede extenderse a interfases curvas no esféricas, Figura 2.2.2. De acuerdo a la ecuación (77), la diferencia de presión en cada plano es:

$$\Delta P_1 = \frac{2\sigma}{R_1} \tag{78}$$

$$\Delta P_2 = \frac{2\sigma}{R_2} \tag{79}$$

La diferencia de presión es igual en toda la interfase, de modo que:

$$\Delta P = \Delta P_1 + \Delta P_2 = 2\Delta P \quad (80)$$

Sustituyendo las expresiones (78) y (79) en la (80):

$$2\Delta P = \frac{2\sigma}{R_1} + \frac{2\sigma}{R_2} \quad (81)$$

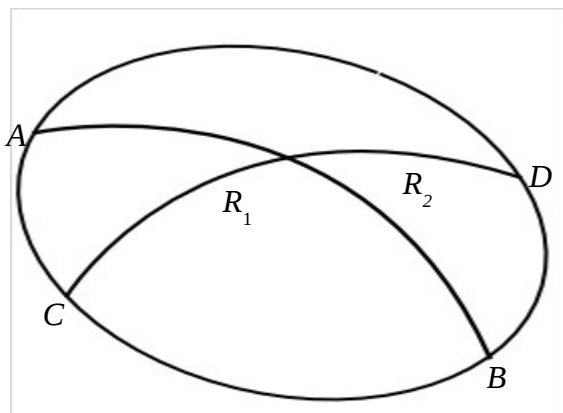


Figura 2.2.2. Superficie curva no esférica con los radios de curvatura en planos ortogonales AB y CD donde R_1 corresponde a la curvatura en AB y R_2 a la curvatura en CD.

Simplificando la ecuación (82), se obtiene la ecuación de Young-Laplace para interfases no esféricas:

$$\Delta P = \sigma \left(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right) \quad (82)$$

3

*Tensoactivos y diagramas de
equilibrio*

3.1 Moléculas con actividad superficial.

La estructura general de una molécula con actividad superficial muestra dos zonas de comportamiento antagónico, una de ellas, la de mayor tamaño y correspondiente a un hidrocarburo, es hidrófoba y la otra región es hidrofílica; por esta dualidad se emplea el término anfífilo como sinónimo de tensoactivo [Kim, 2004]. La Figura 3.1.1, muestra la estructura de una molécula con actividad superficial [Florence & Atwood; 2006; Hillert, 2007; Kim, 2004; Salager, 2002; Tadros, 2005].

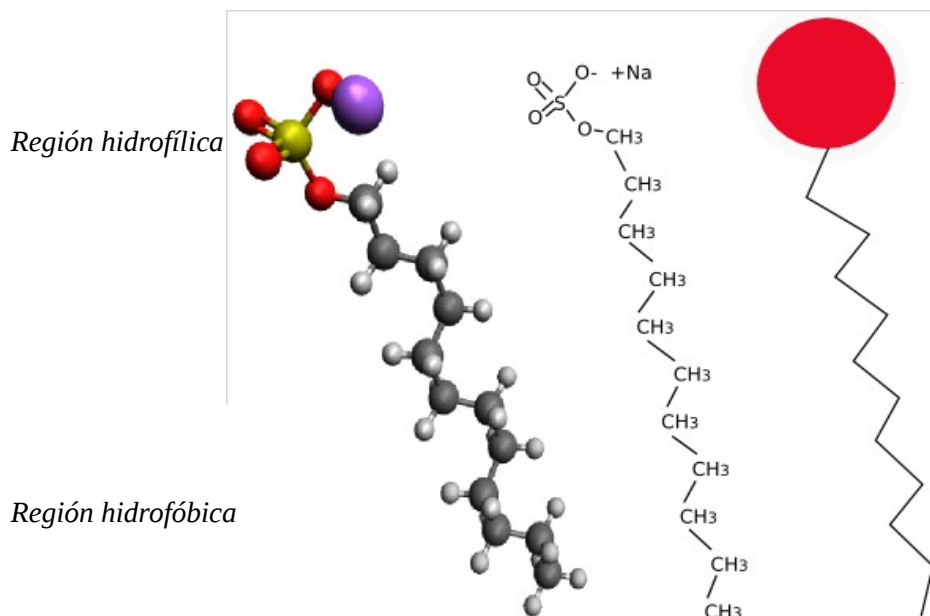


Figura 3.1.1 Estructura del tensoactivo Dodecil (éster) sulfato de Sodio, SDS. La figura de la izquierda corresponde a la conformación espacial de la molécula, la del centro representa la configuración lineal, la figura derecha corresponde al esquema general clásico de un tensoactivo, aplicable al SDS.

Cualquier tensoactivo en un sistema acuoso eventualmente migrará a la interfase líquido-vapor, conforme se adicionen más moléculas de tensoactivo, la interfase se satura por completo y la única alternativa restante a los monómeros de tensoactivo es una organización supramolecular denominada micela [Kim, 2004; Salager, 2002; Tadros, 2005]

3.1.1 Comportamiento en un sistema acuoso

Toda molécula con actividad superficial, migra a la interfase líquido-vapor, Figura 3.1.1.1 [Kim, 2004; Tadros, 2005; Florence & Atwood, 2006], conforme la interfase se satura, al seno de la fase acuosa los monómeros se organizan para formar estructuras micelares, esto sucede cuando se alcanza la *cmc*, la cual es función del tipo de tensoactivo, temperatura y presión del sistema [Florence & Atwood, 2006; Kim, 2004; Rangel *et al.*, 2005; Tadros, 2005]. En función de la naturaleza química de la región polar y de su comportamiento en agua, el tensoactivo puede ser aniónico como el SDS de la Figura 3.1.1, catiónico, zwitterionico y no iónico como los ésteres de sorbitán, que a diferencia de los demás, deben su interacción con el agua a los alcoholes, éteres y/o ésteres que están presentes en la estructura [Butt & Graf, 2003; Florence & Atwood, 2006; Hillert, 2013; Kim, 2004; Lechuga, 2005; Rangel *et al.*, 2005; Salager, 2002; Tadros, 2005; Wang & Zhou, 2009].

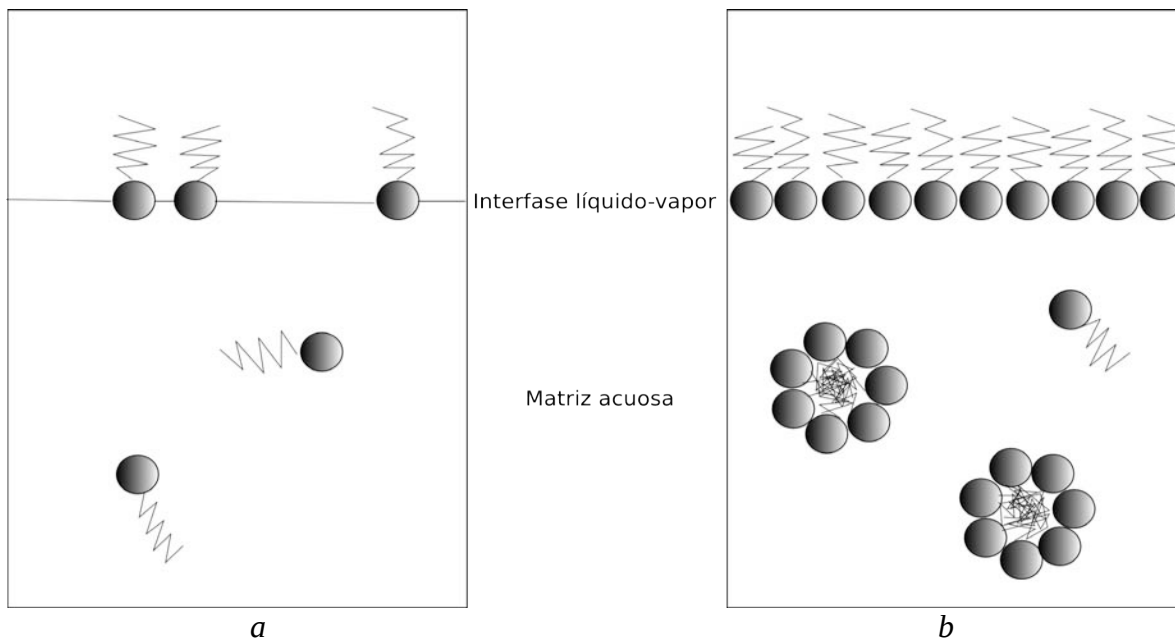


Figura 3.1.1.1 Esquema general del sistema vapor-agua-tensoactivo a) muestra la llegada de monómeros de tensoactivo hacia la interfase líquido-vapor, b) la saturación de la interfase, provoca la formación de estructuras micelares al seno del líquido.

3.1.2 Ésteres de Sorbitán.

Los ésteres de sorbitán son tensoactivos que se obtienen por adición de un ácido graso al sorbitán (Sorbitol cíclico) [Florence & Atwood, 2006; Kim, 2004; Kotheekar, 2007, Lechuga, 2005; Tadros, 2005]; las moléculas obtenidas pertenecen a una familia de moléculas de baja toxicidad por derivarse de compuestos biológicos, Figura 3.1.2.1 [Folmer, 2003; Tadros, 2005], de manera genérica se les conoce como ésteres de Sorbitán, véase la Tabla 2 [Florence & Atwood, 2006; Salager, 2002; Tadros, 2005], que sólo son dispersables en agua, favoreciendo emulsiones agua en aceite (W/O) [Kim, 2004].

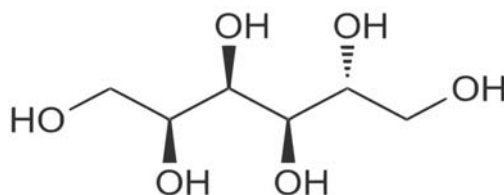


Figura 3.1.2.1. Estructura molecular del sorbitol.

La adición de óxido de etileno a los ésteres de Sorbitán genera la obtención de una serie de compuestos conocidos como ésteres de Sorbitán polietoxilados [Kotheekar et al, 2007; Tadros, 2005; Zhang et al, 2008]; la Tabla 3 muestra los nombres de los compuestos que se obtienen por la adición de 20 moléculas, en promedio, de óxido de etileno a los Span de la Tabla 2 [Tadros, 2005]. Los Tween son menos hidrófobos que sus antecesores Span, favorecen emulsiones del tipo aceite en agua (O/W) y son los compuestos más empleados en el campo farmacéutico [Folmer, 2003; Kotheekar et al., 2007; Liang et al., 2011; Tadros, 2005], tal es el caso de los Tween 20 y 80 cuyas estructuras se muestran en la Figura 3.1.2.2 [Folmer, 2003; Jumaa et al., 1999; Kotheekar, 2007; Lechuga, 2005; Tadros, 2005; Thomas & Dirk, 2007; Zhang et al., 2008].

Tabla 2. Ésteres de Sorbitán y su valor de balance hidrofílico-lipofílico (HLB)

Ácido graso esterificado en el Sorbitan	Nombre comercial	HLB
Ácido Láurico (C ₁₂ H ₂₄ O ₂)	Span 20	8.6
Ácido Palmítico (C ₁₆ H ₃₂ O ₂)	Span 40	6.7
Ácido Estéarico (C ₁₈ H ₃₆ O ₂)	Span60	4.7
Ácido Oléico (C ₁₈ H ₃₄ O ₂)	Span 80	2.1
Ácido Estéarico (tri esterificado)	Span 65	4.3

Tabla 3. Ésteres de Sorbitán polietoxilados y su valor de HLB

Span de base	Nombre comercial	HLB
20	Tween 20	16.7
40	Tween 40	15.6
60	Tween 60	14.9
80	Tween 80	15
65	Tween 65	10.5

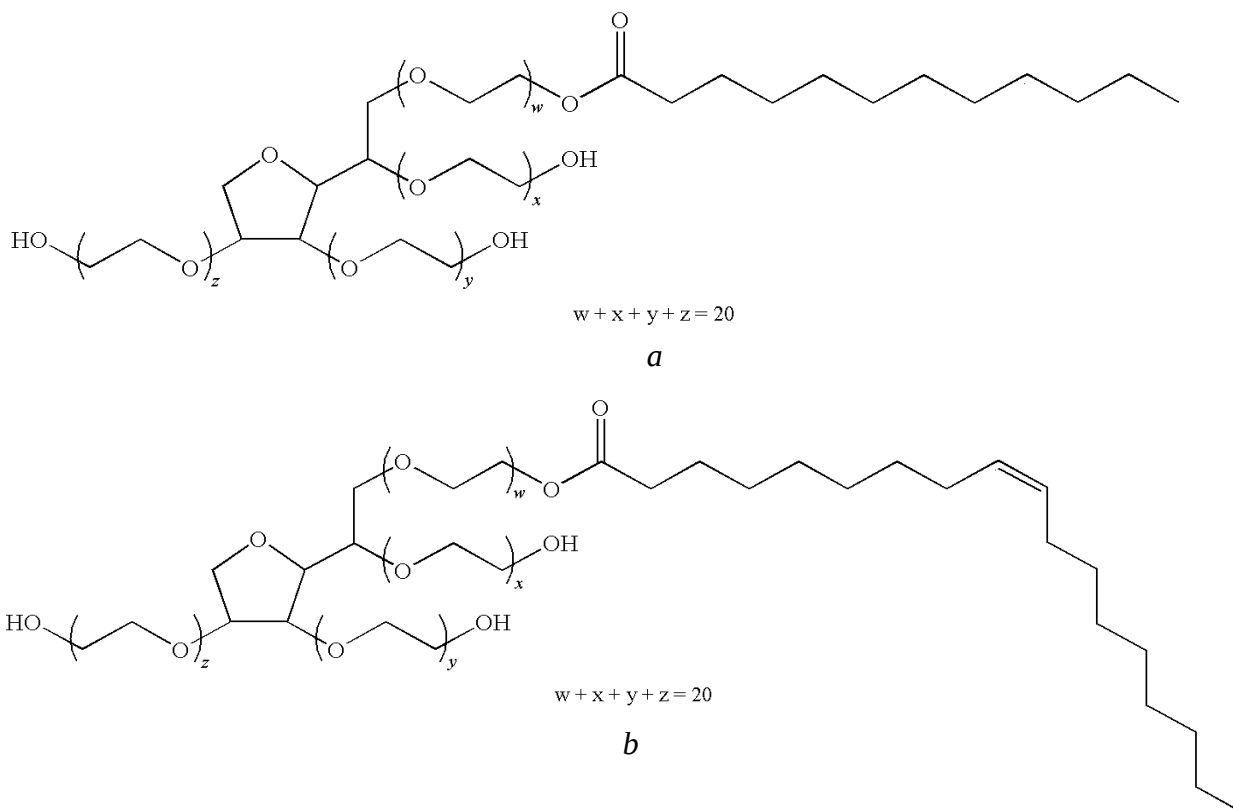


Figura 3.1.2.2. Estructuras de los ésteres de sorbitán (20) polietoxilados, *a*) corresponde al monolaurato de sorbitán (20) polioxiethylado (Tween 20) y *b*) al monooleato de sorbitán (20) polioxiethylado (Tween 80), en ambas se aprecia cierta cantidad de óxido de etileno, w, x, y, z, la cual es en promedio 20 mol para cada tensoactivo.

La obtención de los ésteres de sorbitán contempla en una primera etapa la pérdida de hasta dos moléculas de agua, como resultado se producen moléculas de sorbitol mono o bideshidratadas (Figura 3.1.2.3) posteriormente sobreviene la esterificación, con lo que se pueden obtener tres tipos de ésteres de sorbitán (Figura 3.1.2.4). Las estructuras de la Figura 3.1.2.2 son una posibilidad de producto, la prevalencia de alguna de ellas depende de las condiciones de reacción [Atwood, 2008].

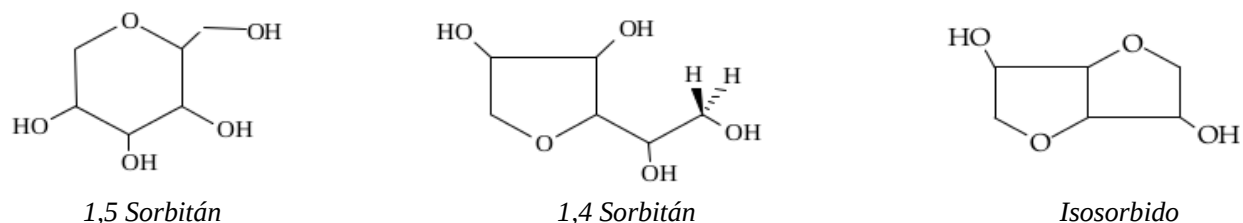


Figura 3.1.2.3. Moléculas de Sorbitán.

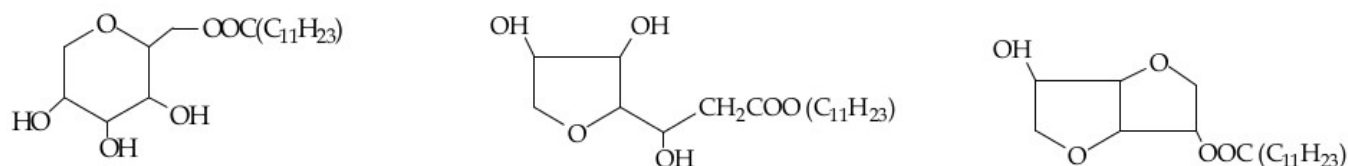


Figura 3.1.2.4. Ésteres de Sorbitán derivados del ácido láurico, las tres estructuras derivan de las apreciadas en la Figura 3.1.2.3.

3.2 Equilibrio de fases

Un sistema puede presentar varios estados de equilibrio en función de variables como T , P y cantidad de los componentes en el sistema; recordemos que fase está definido como aquella región espacial del sistema que presenta las mismas propiedades intensivas y/o extensivas; se le denomina homogéneo al sistema que presenta una sola fase y heterogéneo al que presenta más de una [Baehr, 1965; Connors, 2002; Howell & Buckius, 1990; Laughlin, 1994; Proggine, 1954].

3.2.1 Diagrama binario de equilibrio de fases para tensoactivos del tipo etoxilado.

Los diagramas binarios de equilibrio de tensoactivos del tipo etoxilado, son como el apreciado en la Figura 3.2.1.1, acotando éste a la zona donde la cantidad de tensoactivo sea a lo más del 20-25% en masa; los sistemas presentes corresponden a soluciones micelares que se muestran en el diagrama de la Figura 3.2.1.2, en éste la línea mostrada es conocida como de segregación de fases o de turbiedad y marca el límite entre un sistema monofásico, ubicado por debajo de la línea y correspondiente a una solución micelar y un sistema bifásico donde el tensoactivo ha segregado en microgotas. Físicamente la llegada del sistema a la línea de turbiedad o “cloud point”, (cp) está determinada por un enturbiamiento del medio que inicialmente es translúcido, este valor de cp es único para cada concentración de tensoactivo [Atwood, 2008; Tadros, 2005; Thomas & Dirk, 2007]. Existe un valor de cp mínimo que es conocido como temperatura crítica de solubilidad inferior, ($TCSI$) [Kieu, 2002]. El fenómeno de enturbiamiento, ha sido explicado en función del incremento del efecto hidrofóbico entorno al tensoactivo a causa del incremento de la temperatura; de este modo las micelas se van nutriendo de

monómeros, es decir, aumenta el número de agregación y eventualmente su tamaño, segregando el sistema en dos fases por encima del cloud point [Tadros, 2001; Kieu, 2002]. Las estructuras correspondientes a las fases hexagonal, cúbica y lamelar mencionadas en la Figura 3.2.1.1, se presentan en la Figura 3.2.1.3, la complejidad estructural es notoria en ellas.

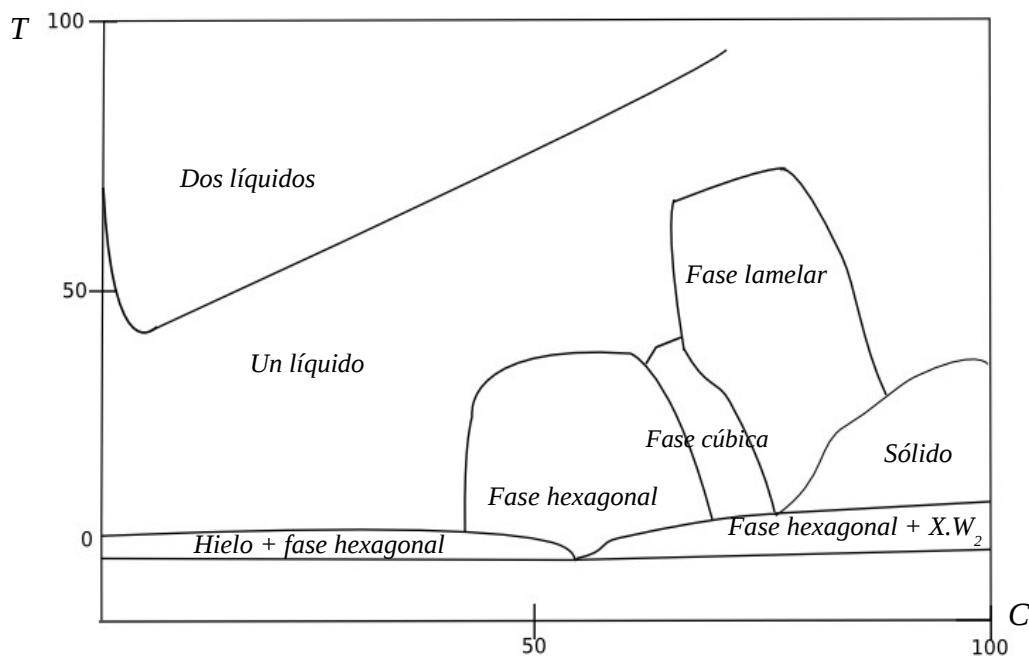


Figura 3.2.1.1. Diagrama binario de equilibrio de fases del compuesto alcohol láurico etoxilado con 6 mol en promedio de óxido de etileno; se observan las diferentes fases presentes en el sistema a una T y porcentaje determinados; $X.W_2$ se refiere a un complejo formado por una molécula de tensoactivo y dos de agua.

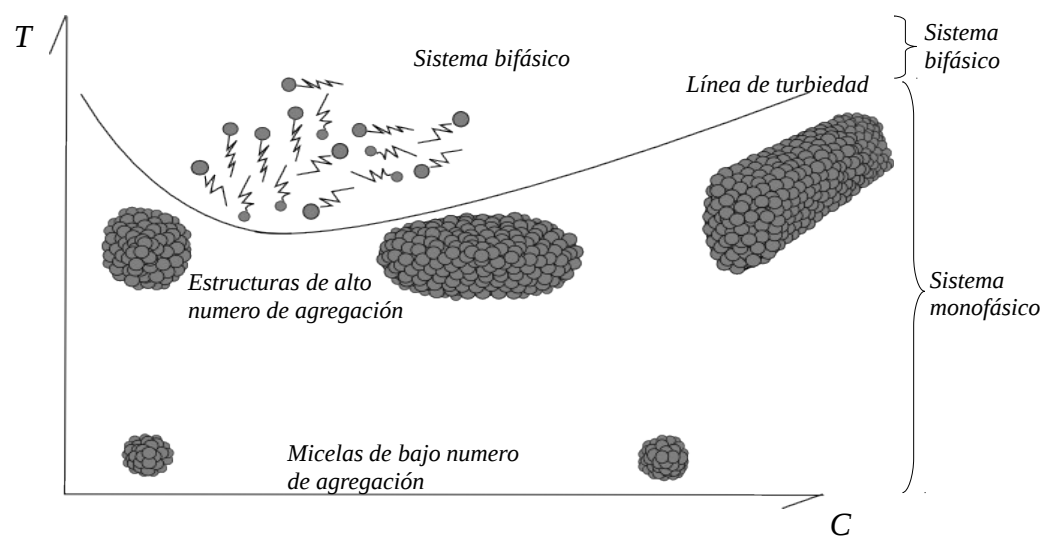


Figura 3.2.1.2. Diagrama binario ilustrativo, se aprecian las posibles estructuras de asociación del tensoactivo favorecidas por concentración y por temperatura; por encima de la línea de turbiedad, se pierden todas las estructuras y el tensoactivo segrega en dos fases.

La presencia de moléculas como Fosfolípidos y/o Colesterol o en general cualquier especie hidrófoba, podría ser insertada dentro de las macro micelas o estructuras de alto número de agregación

presentes por debajo de la línea de turbiedad, la consecuencia de la inserción podría ser la obtención de estructuras liposomales y/o partículas de emulsificación y/o micelas mixtas, por ello es de gran importancia el conocimiento del diagrama binario de equilibrio de fases del tensoactivo etoxilado que podría servir como plataforma en la formación de estructuras nanométricas.

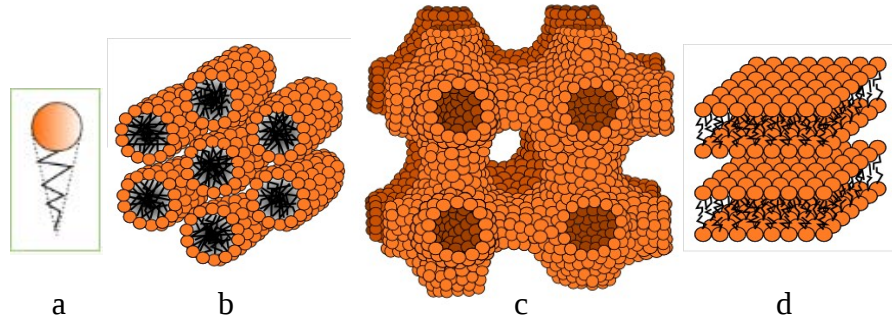


Figura 3.2.1.3 Organización supramolecular de los monómeros de un tensoactivo; a) monómero de tensoactivo, b) fase hexagonal, c) fase cúbica y d) fase lamelar. Tadros, 2001.

3.2.2 Diagramas ternarios

Las estructuras o sistemas destinados a la administración de fármacos generalmente se componen de muchas sustancias que no en cualquier proporción o bajo cualquier condición forman sistemas homogéneos, al respecto, un diagrama ternario permite saber sobre el comportamiento macroscópico del sistema respecto a alguna propiedad de interés en función de los componentes en el sistema. Un diagrama ternario de equilibrio de fases es como el apreciado en la Figura 3.2.2.1. Cada eje o lado del diagrama ternario corresponde a un sistema binario en el sistema y se ubica en un intervalo de 0-100% de proporción; se puede utilizar también % en masa, fracción en masa, % en mol y fracción mol como unidades, la T y P debe ser constante en todo momento, cualquier cambio en las variables implica un sistema ternario diferente [Prigogine, 1954].

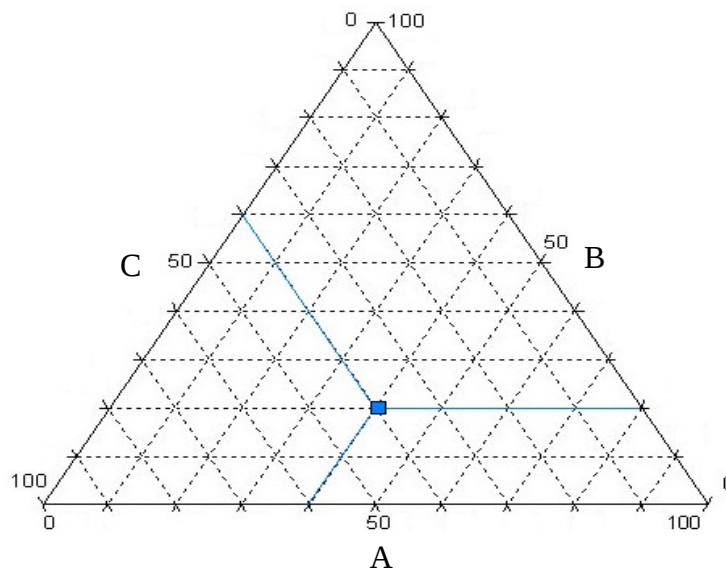


Figura 3.2.2.1 Diagrama ternario de equilibrio, los componentes del sistema son A, B y C, en azul se muestra un punto al interior del ternario cuya composición se determina por intersección de las líneas azules con los ejes del diagrama.

El punto azul apreciado en la Figura 3.2.2.1, corresponde a un sistema formado por cierta cantidad de A, B y C (x_A , x_B y x_C), en ese punto o en cualquier otro ubicado también al interior del ternario, se cumple lo siguiente [Progogine, 1954]:

$$x_A + x_B + x_C = 100\% \quad (83)$$

Una diagonal desde el punto azul, paralela a C, hasta la línea A, corresponde a x_A en el sistema; análogamente, una línea paralela a A desde el punto hasta la línea B, corresponde a x_B ; finalmente, una diagonal paralela a B, hasta la línea C, corresponde a x_C ; es posible delimitar zonas dentro del diagrama correspondientes a una propiedad particular del sistema, de este modo, es posible conocer bajo que T , P , x_A , x_B y x_C , el sistema presenta ciertas propiedades [Progogine, 1954].

4

Sistemas coloidales de entrega de fármacos.

4.1 Sistemas coloidales de entrega de Fármacos

Un sistema coloidal está formado por una fase dispersa cuyo tamaño de partícula oscila entre los 1-1000nm, ésta fase está suspendida en otra de mayor proporción o dispersora [Butt & Graft, 2003; Florence & Atwood, 2006]. En el campo farmacéutico, los sistemas coloidales son de gran importancia debido a la naturaleza hidrófoba de la mayoría de los principios activos o fármacos, de este modo es posible su inclusión al interior de una partícula coloidal con la consecuente mejoría de diversos parámetros farmacológicos [Birdi, 2010; De Smeet & Deriemeaker, 1999; Jumaa *et al.*, 1999; Taylor, 1998; Weiss, 2000]. La obtención de una emulsión de fosfolípidos y/o de una suspensión liposomal y/o de micelas mixtas mediante el método que se propone en el trabajo, no ha sido planteado hasta el momento. En la literatura existen numerosos trabajos donde estos sistemas se obtienen por otros métodos [Chi-Feng *et al.*, 2007; De Smeet & Deriemeaker, 1999; Ishii & Nagasaka, 2004; Ishii & Nii, 2005; Peterson & Siekmann, 2005; Rupp *et al.*, 2010; Šturcová *et al.*, 2010; Taylor, 1998; Yang *et al.*, 2013; Weiss, 2000]. A continuación, se presentan algunos puntos importantes referentes a los tres sistemas.

4.1.1 Emulsiones

El sistema formado por una fase oleosa, agua y tensoactivo, donde éste último se encuentra en mayor proporción en la interfase aceite-agua, recibe el nombre de emulsión, la cual se denomina O/W si la fase oleosa se encuentra suspendida en agua y W/O si es la fase acuosa la dispersa [Florence & Atwood, 2006; Kim, 2004; Tadros, 2005]. La Figura 4.1.1.1 muestra estos tipos de emulsión, donde el tamaño de partícula varía desde los 100nm hasta varias micras, por eso el sistema no es translúcido por la dispersión de la luz; la presencia del tensoactivo induce el abatimiento de la tensión interfacial aceite-agua, $\sigma_{o/w}$ y la coexistencia de las fases, aunque el sistema se estabiliza por adición de tensoactivo, con el transcurso del tiempo deja de serlo y coalesce debido al “efecto Young-Laplace” o al “efecto Ostwald” [Basu & Basu, 2010; Butt & Graft, 2003; Florence & Atwood, 2006; Juárez, 2006; Jespersen *et al.*, 2012; Kim, 2004; Puskás & Csempe, 2007; Stillwell, 2013].

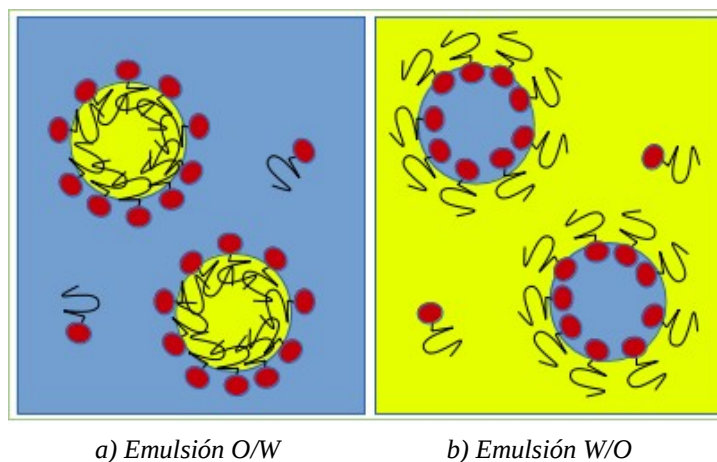


Figura 4.1.1.1. Emulsiones O/W y W/O, se aprecia en azul la fase acuosa, en amarillo la fase oleosa y en rojo las moléculas de tensoactivo, a) representa el tipo O/W y b) representa el W/O, en ambos casos se aprecia la presencia mayoritaria del tensoactivo en la región interfacial.

En el efecto Young-Laplace, una diferencia de tamaños entre partículas coloidales, estimula la fusión entre partículas (Figura 4.1.1.2) de este modo la diferencia de presiones al interior y exterior de las partículas, ΔP , cae conforme el radio, r , de la partícula de fusión es mayor que el de las partículas de origen, según lo mostró la ecuación (77) [Hernández-Baltazar & Gracia-Fadrique, 2005; Viades-Trejo & Gracia-Fadrique, 2006], de este modo, el sistema tiende al estado de ΔP menor que es posible sólo para radios cada vez mayores.

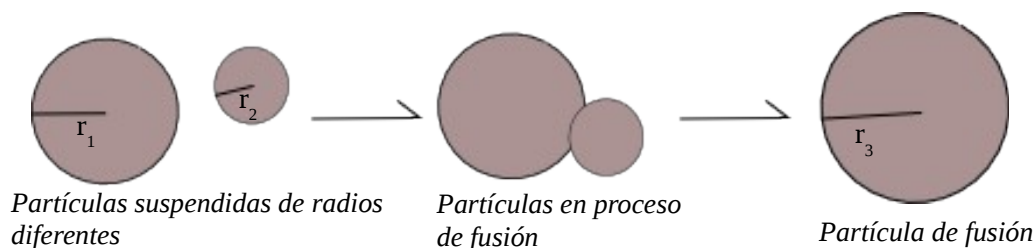


Figura 4.1.1.2. Efecto Young-Laplace, dos partículas de radios diferentes, r_1 y r_2 , se fusionan en una partícula mayor de radio r_3 , aplicando la ecuación de Young-Laplace a cada r , resulta ser el ΔP_3 (ecuación 77 para r_3) menor que para r_1 y r_2 , de este modo, el sistema se inclinará hacia un ΔP menor.

Un proceso de fusión desencadenado por la diferencia de tamaños entre las partículas suspendidas, provoca una segregación de fases, pues se formarán partículas cada vez más grandes (Figura 4.1.1.2) para las cuales la velocidad de sedimentación, dada por la ecuación de Stokes siguiente, es mayor [Atwood, 2008; Kim, 2004]:

$$V_{sed} = \frac{2r^2(\rho_2 - \rho_1)g}{9\eta} \quad (84)$$

En la ecuación (84), r es el radio de la partícula, ρ_1 y ρ_2 son las densidades de la fase continua y de la partícula suspendida respectivamente, g es la constante gravitacional y η la viscosidad del sistema. La velocidad de sedimentación de una partícula coloidal, V_{sed} , es directamente proporcional al tamaño de partícula suspendida y entre más pequeña sea, mayor tiempo estará en suspendida en el medio [Kim, 2004].

El efecto Ostwald o envejecimiento de Ostwald, contempla el crecimiento de las partículas emulsificadas más grandes a expensas de las de menor tamaño, sobre todo por efecto de curvatura, aunque sucede también a causa del potencial químico [De Smet & Deriemaeker, 1999; Kieu *et al.*, 2002; Weiss, 2000]. Entre menor sea la curvatura en las partículas de menor tamaño (curvatura negativa, véase la Figura 4.1.3.3), mayor es la probabilidad de que el material oleoso migre hacia las partículas grandes sin la necesidad de contacto físico [Taylor, 1998].

Las emulsiones de interés farmacéutico son variadas y existen casos donde se emplean fosfolípidos como agentes estabilizantes del sistema, tal cual lo hace un tensoactivo [Ishii & Nii, 2005; Li *et al.*, 2013; Liang *et al.*, 2011; Rupp *et al.*, 2010], se obtienen vía agitación mecánica y posterior homogenización de tamaño a altas presiones [Chi-Feng *et al.*, 2007; Ishii & Nagasaka, 2004; Peterson & Siekmann, 2001; Yang *et al.*, 2013]. Una emulsión elaborada a base de aceite de soya (20%v/v) y 1,2-Dioleoil-sn-glycero-3-fosfocolina (DOPC al 1.2%w/v) [Ishii & Nii, 2005], muestra el tipo de

partícula que se obtiene mediante estudios de Microscopía confocal de fluorescencia (MCF). La Figura 4.1.1.3 A, muestra la morfología de las estructuras de emulsificación fluoromarcadas con Rojo nilo; el sistema presenta cambios morfológicos por la simple adición de 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, DOPE (DOPC + DOPE 1:1 w/w) y Pluronic P123 (DOPC + DOPE + P123 6:5:1 w/w/w). Las imágenes en B) y C) dan constancia de la homogeneidad y disminución del tamaño de partícula para la mezcla de tres componentes. Respecto a estudios de lipólisis de los tres tipos de emulsión de fosfolípidos, ésta fue importante para la emulsión estabilizada por DOPC, seguida de DOPC/DOPE y siendo mucho menor para la estabilizada por la mezcla DOPC/DOPE/P123; esto puso de manifiesto el papel del P123 en cuanto a la capa de hidratación que genera mediante los óxidos de etileno que muestra en su estructura [Šturcová, 2010; Yang *et al.*, 2013].

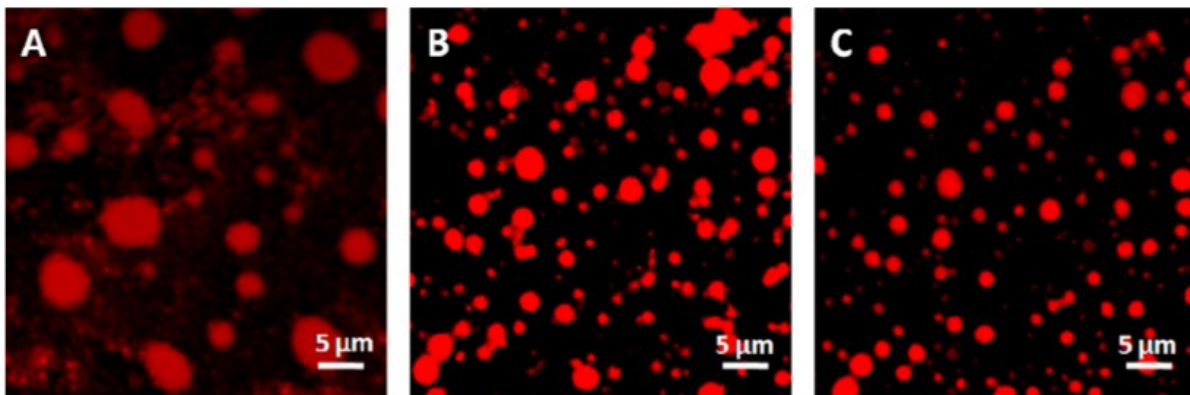


Figura 4.1.1.3. Micrografías de Fluorescencia de tres emulsiones a base de Fosfolípidos. a) corresponde al sistema obtenido con el empleo de DOPC como estabilizante, b) fue estabilizada con DOPC/DOPE y c) fue obtenida con la mezcla DOPC/DOPE/P123. Yang *et al.*, 2013.

La ubicación de los fosfolípidos en una emulsión es la región interfásica aceite-agua; esto puede confirmarse mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (CDB), estudios de esta naturaleza realizados a una suspensión de Fosfolípidos hecha a base de Dimiristoil fosfatidil colina (DMPC), Dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC al 4:1w/w), aceite de coco (5%w/v) y encapsulando Clometiazol (0-5%w/w) [Peterson & Siekmann, 2001], muestran un termograma obtenido sólo para la pareja de fosfolípidos emulsificando al aceite de coco, Figura 4.1.1.4 a), donde la temperatura de fusión de la pareja de fosfolípidos permite inferir que éstos están en la interfase aceite-agua; la presencia del Clometiazol, provoca un ensanchamiento y corrimiento del pico calorimétrico, Figura 4.1.1.4 b), lo cual indica que el fármaco se aloja en la interfase aceite-agua, provocando cambios estructurales en esa interfase y modificando el punto de fusión de la pareja de fosfolípidos; análogo al efecto que produce en el punto de fusión, la presencia de más de un tipo de fosfolípidos en las membranas lipídicas [Peterson & Siekmann, 2001; Stillwell, 2013].

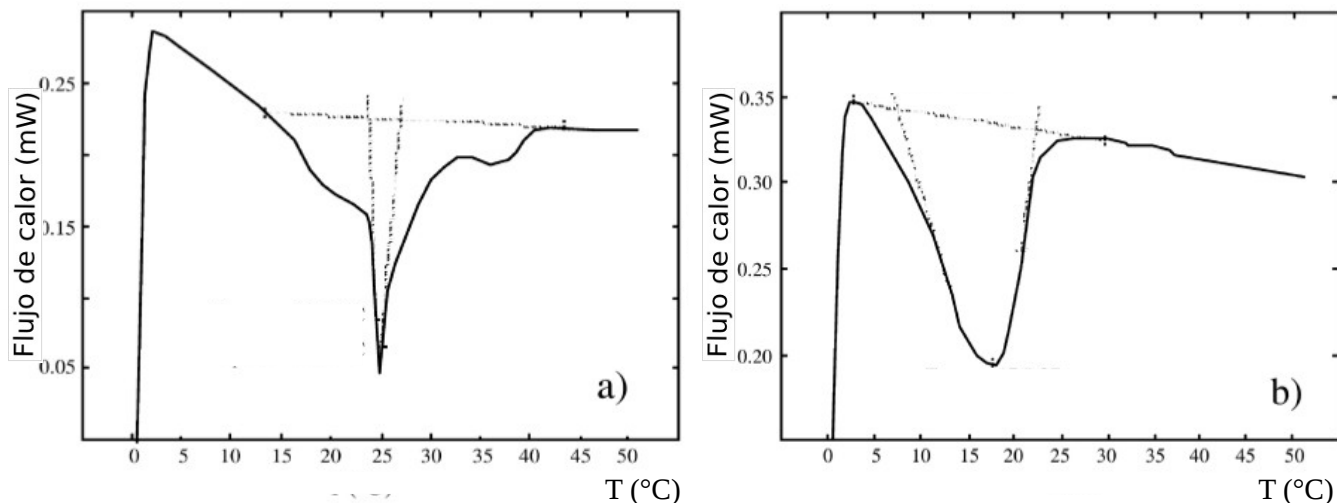


Figura 4.1.1.4. Termogramas por CDB de dos emulsiones a base de fosfolípidos, a) corresponde a DMPC/DPPC como estabilizante, b) al sistema con DMPC/DPPC y el Fármaco Clometiazol. El cambio de b) con respecto de a), es debido a la presencia del fármaco en la interfase aceite agua, sitio donde también se presenta DMPC/DPPC. Peterson & Siekmann 2001.

4.1.2 Liposomas

Los liposomas son estructuras esféricas constituidas de fosfolípidos dispuestos en una bicapa, análogo a una membrana celular (Figura 4.1.2.1), suelen clasificarse en función del tipo de estructura fosfolipídica que presentan, son conocidos como vesículas multilaminales (MLV) si presentan más de una bicapa, como vesículas unilaminales pequeñas (SUV) o como vesículas unilaminales de gran tamaño (LUV) [Basu & Basu, 2010; Juárez, 2006], a diferencia de un tensoactivo, los fosfolípidos presentan dos cadenas hidrocarbonadas (Figura 4.1.2.2). Debido a la presencia de un compartimento acuoso en su interior, pueden transportar fármacos hidrofílicos y gracias a la región hidrófoba de la membrana, también para fármacos hidrófobos [Basu & Basu, 2010; Belsito *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2013; Jespersen *et al.*, 2012; Pentak, 2014; Puskás & Csempez, 2007; Serro *et al.*, 2014; Tadros, 2005].

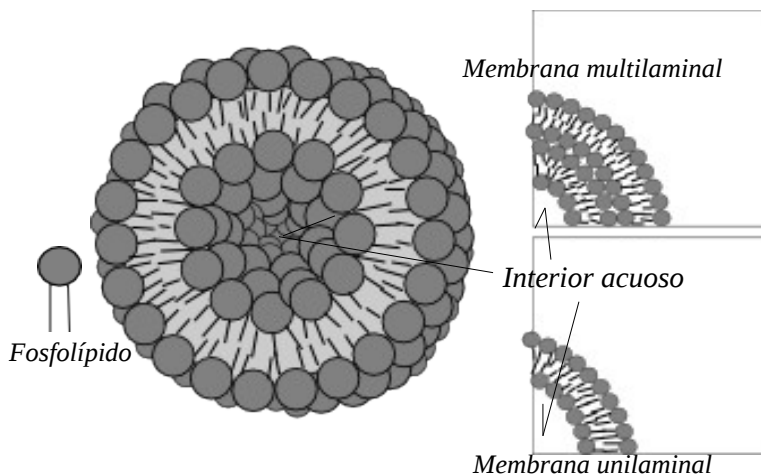


Figura 4.1.2.1. Estructura liposomal; se observa la organización de los fosfolípidos en multilaminas y unilaminas.

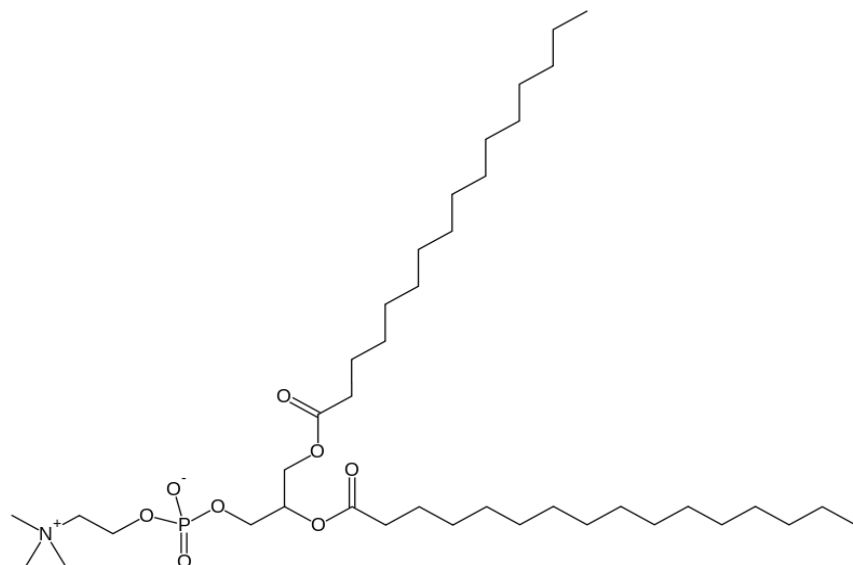


Figura 4.1.2.2. Estructura química del Dipalmitoil fosfatidil colina (DPPC)

El ordenamiento de los fosfolípidos en una bicapa obedece a la conformación espacial cilíndrica, el parámetro crítico de empaquetamiento (critical packing parameter), c_{pp} , dado por la siguiente ecuación, debe ser al menos de 0.5 para obtener estructuras liposomales [Otten *et al.*, 1995].

$$c_{pp} = \frac{V_T}{l\alpha} \tag{85}$$

En la ecuación anterior, V_T corresponde al volumen de la cadena hidrocarbonada del tensoactivo, si éste es espacialmente un cono, como sucede para un tensoactivo como el de la Figura 4.1.2.3 A, V_T sería calculado según la fórmula para ese cono; l corresponde a la longitud de la cadena hidrocarbonada y α corresponde al área de proyección de la cabeza polar del tensoactivo; los fosfolípidos son del tipo de las estructuras B-D.



Figura 4.1.2.3. Esquema que muestra la conformación espacial de un tensoactivo, la figura geométrica que mejor los modela, sirve para determinar el c_{pp} .

La Figura 4.1.2.4 muestra la influencia de la conformación espacial en el tipo de estructura de autoensamble [Kim, 2004; Rupp *et al.*, 2010; Schik, 1987; Tadros, 2005]. En la elaboración de liposomas, usualmente se emplean Colesterol (Col) y uno o varios fosfolípidos, como los insaturados FosfatidilColina de huevo o soya (PC), Ácido Fosfatídico (PA) o los fosfolípidos saturados DMPC, DPPC, Dipalmitoil ácido fosfatídico (DPPA) y Dimiristoil Fosfatidilglicerol (DMPG), además de antioxidantes como el α -tocoferol o β -hidroxitoluidina [Basu & Basu, 2010; Belsito *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2013; Panicker, 2007; Serro *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2007].

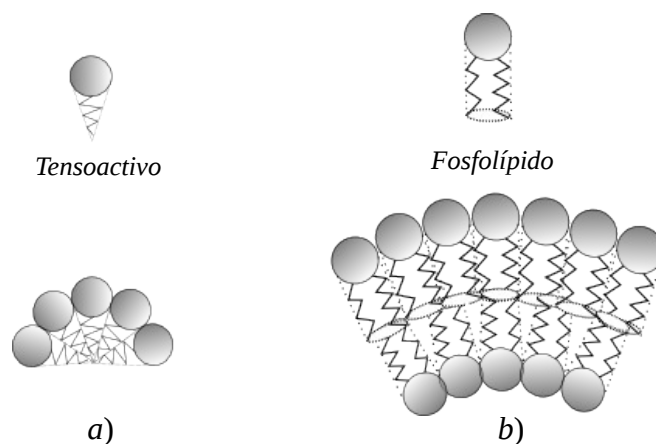


Figura 4.1.2.4. Esquema comparativo de un tensoactivo y un fosfolípido, *a)* corresponde a la conformación espacial cónica de un tensoactivo y a la organización de los monómeros en una micela, *b)* muestra la conformación cilíndrica para un fosfolípido de doble cadena y la organización de los monómeros en una bicapa liposomal.

Imágenes de microscopía electrónica o de Fuerza atómica y/o de Fluorescencia (MCF), además de estudios por Calorimetría diferencia de barrido (CDB), se utilizan para la caracterización adecuada de liposomas [Belsito *et al.*, 2005; Panicker, 2007; Socaciu, 2000; Weissig, 2010; Zhao *et al.*, 2007]. La Figura 4.1.2.5, muestra dos micrografías liposomales típicas obtenidas mediante microscopía electrónica ambiental de barrido (MEAB), en estas es posible observar la morfología esférica e incluso estimar el tamaño promedio de los liposomas [63].

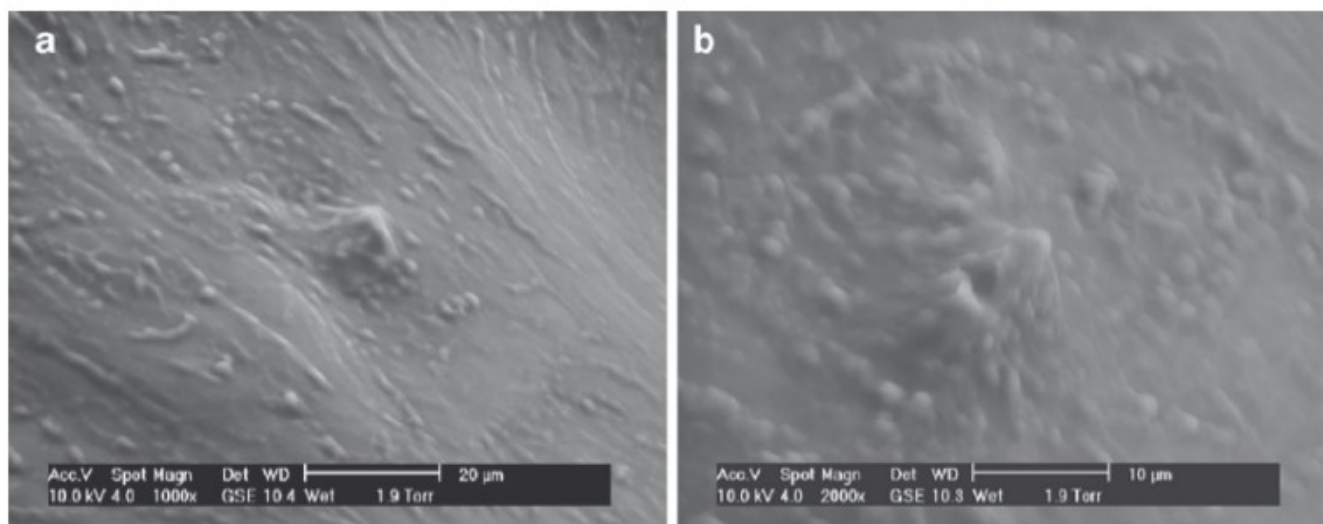


Figura 4.1.2.5. Micrografías electrónicas por MEAB de una formulación liposomal a base de PC/Col 4:1, ambas fotografías son de la misma muestra. Weissig, 2010, página 325.

La Figura 4.1.2.6 muestra imágenes de Microscopía de fuerza atómica (MFA) y MCF; se observa la morfología esférica en ambos estudios pero la MCF muestra la bicapa que organizan los fosfolípidos, mediante la adición de un Fluoróforo unido a un fosfolípido en el sistema. La bicapa de fosfolípidos se verá similar a un anillo del color correspondiente a la longitud de onda de emisión del fluoróforo [Ruozzi *et al.*, 2005; Schik, 1987].

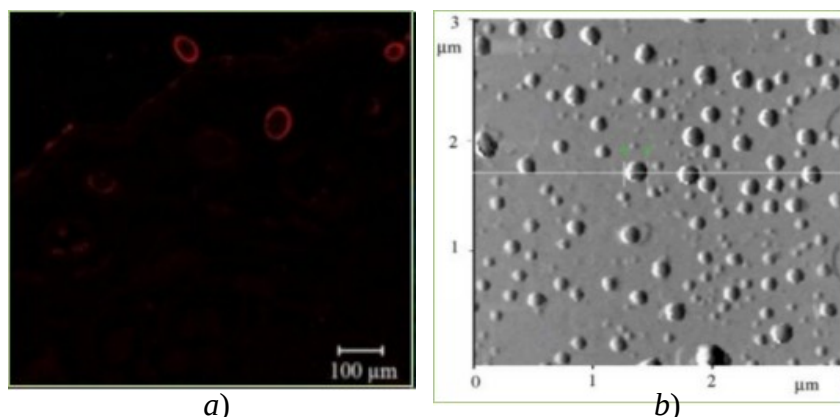


Figura 4.1.2.6. Micrografías MCF y AFM; a) corresponde a la MCF de un sistema liposomal a base de PC y Rodamina B 1,2-dihexadecanoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina, sal de trietilamonio (Rh-PE), b) corresponde a un sistema a base de PC/Col. Ruozi *et al.*, 2005; Schik, 1997 respectivamente.

Mediante CDB es posible determinar e identificar la presencia de fosfolípidos, Colesterol (Col) e incluso un fármaco hidrófobo en la membrana liposomal, así como de la estructuración de MLV o ULV. La Figura 4.1.2.7 presenta una serie de termogramas obtenidos para el sistema formado por DPPC, el derivado etoxilado de Dipalmitoil fosfatidiletanolamina (2000-PEG-DPPE), Dipalmitoil fosfatidilglicerol (DPPG) a diferentes proporciones y paclitaxel [Weissig, 2010]. Los termogramas muestran el pico calorimétrico típico para liposomas MLV de DPPC, cuya temperatura de transición (T_T) es 40-41°C y cómo disminuye ésta ante la presencia de fármacos hidrófobos, los cuales afectan la temperatura de fusión a causa de la disminución de la cristalinidad de los fosfolípidos. Los termogramas cambian para liposomas ULV que presentan un pico ancho respecto a las MLV, las interacciones hidrófobas entre los fosfolípidos en una bicapa unilaminar son menores que para una multilaminar, por ello se observan picos más anchos en las ULV [Kresheck & Mihelich, 2003; Panicker, 2007; Socaciu, 2000; Zhao, 2007].

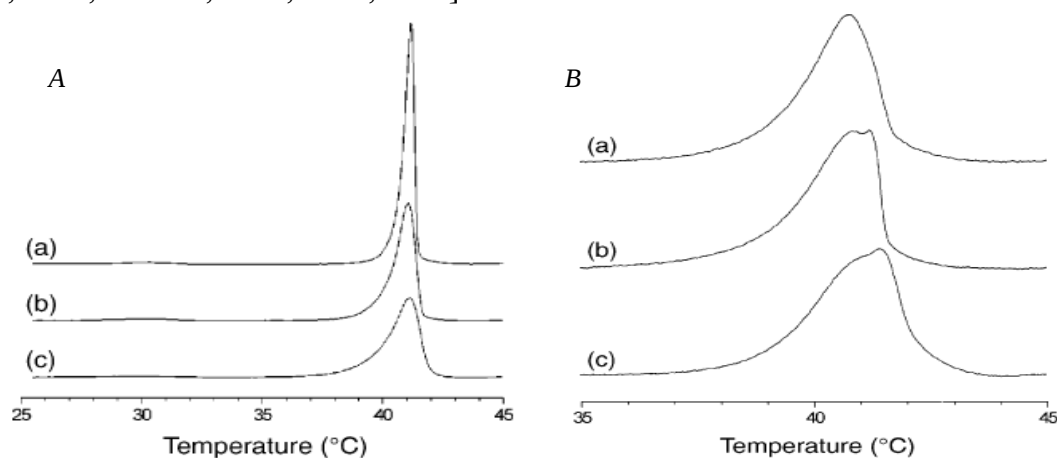


Figura 4.1.2.7. Termogramas del sistema DPPC/2000PEG-DPPE/DPPG/Paclitaxel, A) corresponde a liposomas MLV en las proporciones molares 100:0:0, 97:3:0:0 y 9:0:10:3 para a, b y c respectivamente; B) corresponde a liposomas ULV en las proporciones 100:0:0, 97:3:0:0 y 9:0:10:5 para a, b y c respectivamente. Zhao, 2007.

4.1.3 Micelas mixtas

Las micelas mixtas son estructuras con un interior hidrófobo, de diámetros de hasta 60 nm en promedio y esferoides, están formadas por la mezcla fosfolípido-tensoactivo (Figura 4.1.3.1) [Funari *et*

al., 2001; Kresheck & Mihelich, 2003; Liang, et al., 2011; Otten et al., 1995; Rupp et al., 2010; Sznitowska et al., 2007; Vamparys et al., 2013]. El ordenamiento estructural lípidos-tensoactivos en las micelas mixtas puede ser inferido mediante estudios de CDB como lo muestra la Figura 4.1.3.2.

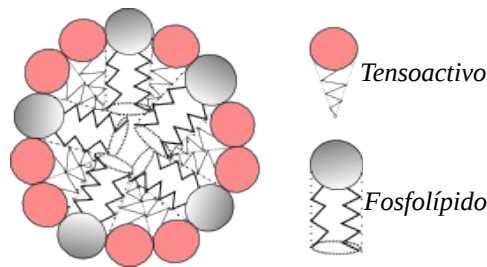


Figura 4.1.3.1. Esquema de la organización de los Fosfolípidos y tensoactivos en una micela mixta.

El termograma que se obtuvo para el sistema óxido de dodecildimetilfosfina (APO12) y DMPC con una fracción mol de APO12 (X_{APO12}) de entre 0-0.95, muestra cómo se modifica el pico característico del DMPC organizado en una bicapa liposomal ($X_{APO12} = 0$), cuya T_T es de entre 23.5-24.5°C [Kresheck & Mihelich; 2003; Otten, 1995; Vamparys, 2013], conforme X_{APO12} tiende a 1.0, el pico desaparece [Kresheck & Mihelich], también los termogramas muestran, para cantidades bajas de APO12, un corrimiento del pico hacia la izquierda lo cual implica la pérdida de “cristalinidad” del DMPC por intercalamiento del tensoactivo, por ello el pico se ensancha y la T_T disminuye. Al ser en el sistema $X_{DMPC} \approx X_{APO12}$, aparecen dos picos que indican la presencia de dos tipos de organización estructural en la que se encuentran los fosfolípidos: una donde sólo existe la posibilidad de que una sea un liposoma rico en tensoactivo y la otra una estructura micelar mixta. La proporción correspondiente al termograma marca el inicio del desvanecimiento de las estructuras liposomales porque se vuelven termodinámicamente inestables por efectos de curvatura, pues ésta se vuelve positiva, Figura 4.1.3.3, las estructuras micelares corresponden a este tipo de curvatura [Kooijman et al, 2003; Kooijman et al., 2005; Lähdesmäki et al., 2010; Vamparys, 2013].

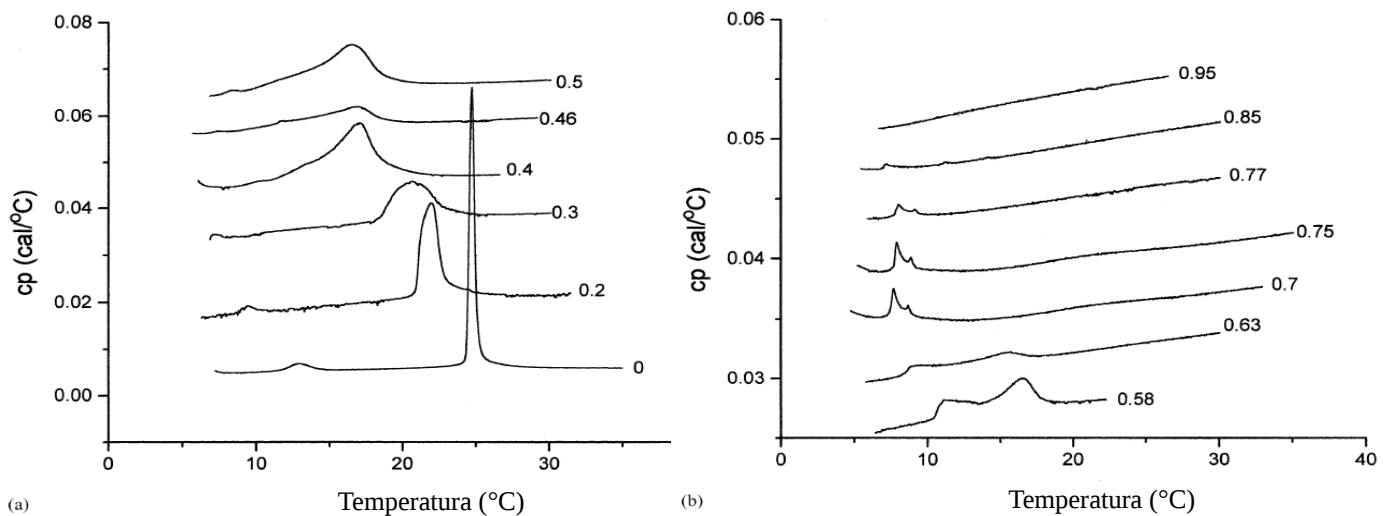


Figura 4.1.3.2. Termogramas por CDB del sistema DMPC/APO12, a) corresponde a X_{APO12} de entre 0-0.5 y b) a X_{APO12} de entre 0.58-0.95. Todas las proporciones de APO12 se aprecian junto al termograma correspondiente. Kresheck & Mihelich, 2003.

Los sistemas con $X_{\text{APO12}} = 1.0$, muestran picos interesantes; en particular los termogramas de $X_{\text{APO12}} = 0.58$, $X_{\text{APO12}} = 0.7$ y $X_{\text{APO12}} = 0.75$, muestran un pico cercano al punto de enturbiamiento del tensoactivo a esas concentraciones, los cuales son alrededor de 9, 6 y 6.5°C, respectivamente. Esto sugiere que la CDB en efecto registra los cambios estructurales de micelas que, por tener tensoactivo insertado, corresponden a micelas mixtas; lo anterior ha mostrado la utilidad de los estudios de CDB en la determinación de la presencia de micelas mixtas en un sistema [Kresheck y Mihelich, 2003].

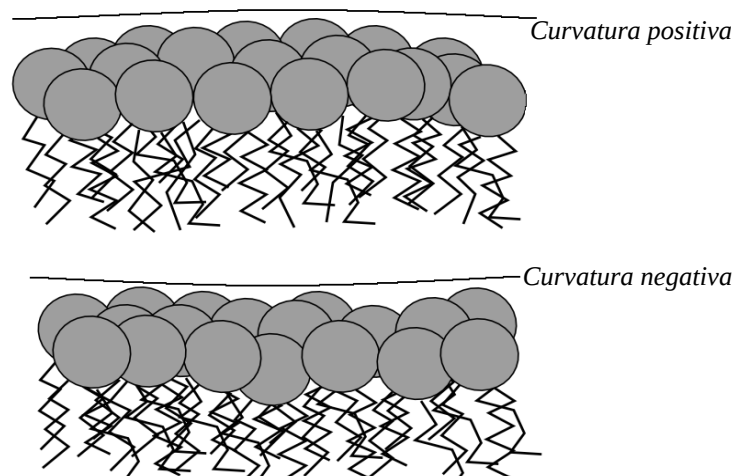


Figura 4.1.3.3. Tipos de curvatura de una estructura de asociación según el arreglo espacial de los monómeros de fosfolípidos o tensoactivos constitutivos.

5
 Materiales y Métodos

5.1 Método general.

Fue preparada una mezcla de DPPC-Col y Tween 20-Span 20 o Tween 80-Span 80 en agua mediante agitación en rotavapor (Buchi r-3, Suecia) a la temperatura correspondiente a la turbidez (cp) de la cantidad de Tween 20 o Tween 80 empleada sin considerar la cantidad de Span (Figura 5.1.1). La mezcla fue agitada a 120 rpm por 35 minutos a presión atmosférica normal; el sistema fue enfriado a temperatura ambiente y una muestra fue tomada para la determinación de tamaño de partícula y tiempo de estabilidad coloidal (tiempo máximo de la suspensión sin presentar floculación). Un diagrama pseudoternario del sistema de trabajo, puede mostrar diferentes zonas correspondientes al tamaño de partícula obtenida y una gráfica de la cantidad de DPPC-Col y Tween-Span vs tiempo de estabilidad coloidal, puede mostrar el sistema más estable. Todas aquellas suspensiones que mostraron al menos 23 días de estabilidad coloidal, fueron sometidas a estudios instrumentales para la elucidación de su naturaleza estructural.

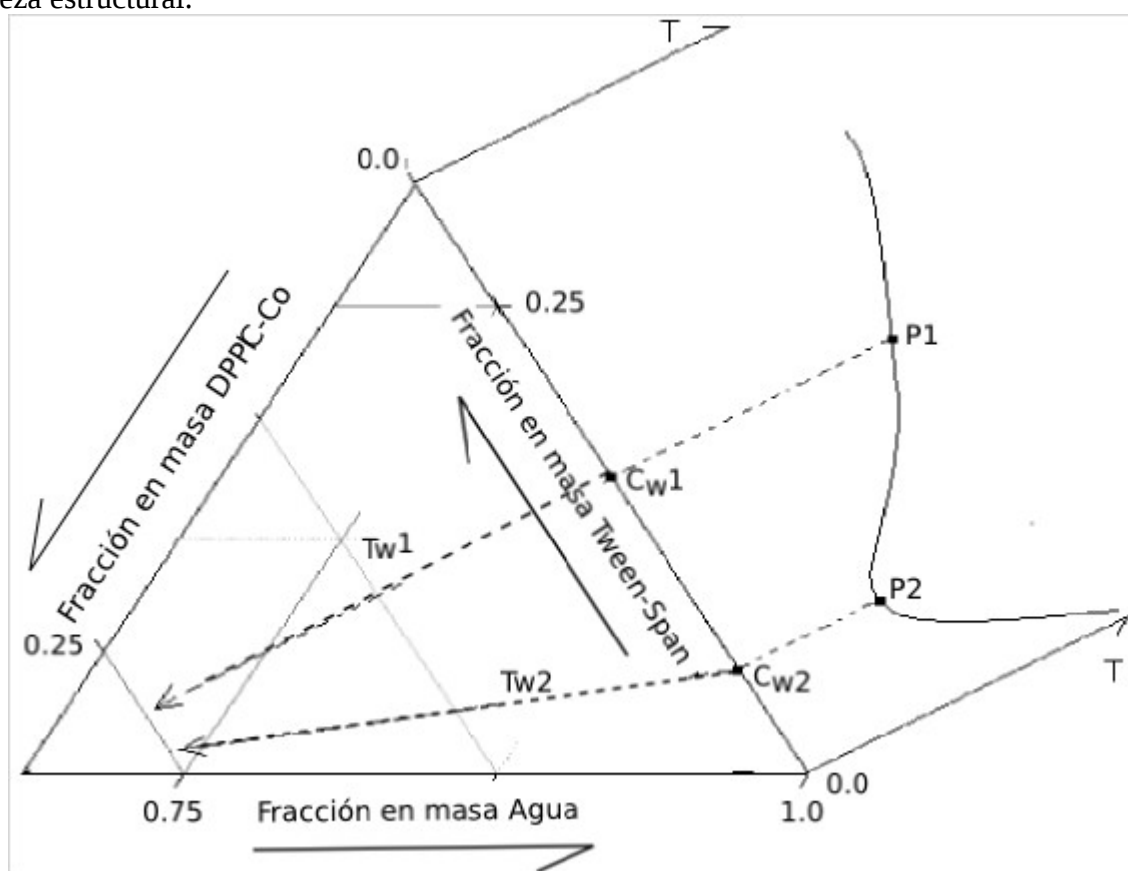


Figura 5.1.1. Digrama ternario de equilibrio de Agua/Tween-Span/DPPC-Col acoplado al binario de equilibrio de temperatura contra composición.

La Figura anterior muestra la ubicación de dos cantidades diferentes de Tween-Span en agua (C_{w1} y C_{w2}) en el eje agua/Tween/Span y al mismo tiempo en el eje de las abscisas del binario. Cualquier adición de DPPC-Col nos lleva en trayectoria al interior del diagrama ternario (T_{w1} y T_{w2} , denotados con flecha), no obstante, el sistema es primeramente llevado hasta una temperatura cercana al cp de C_{w1} y C_{w2} ($P1$ y $P2$) para el caso de Tween 80 y a una temperatura correspondiente al cp para el caso de Tween 20. Las flechas paralelas a cada lado o eje del ternario, indican la dirección creciente de la fracción en masa para los componentes del sistema.

5.2 Determinación de cmc de Tween 20 y Tween 80.

La concentración micelar crítica de Tween 20 (SIGMA, Taufkirchen Alemania) y Tween 80 (compatible con cultivos celulares, SIGMA-ALDRICH, Deisenhofen Alemania), se determinó mediante las ecuaciones (53) y (71); para esto se prepararon diversas soluciones de los tensoactivos en agua desionizada (Simplicity Millipore, Darmstadt Alemania), en el intervalo de concentraciones en fracción mol de 0 - 1.15×10^{-4} para Tween 20 y de 0 - 2.55×10^{-5} para Tween 80. El valor de tensión superficial se determinó mediante el método del anillo [Pardo-Cervantes et al, 2011], a través de una balanza analítica (OHAUS, +/- 0.3mg) con un gancho metálico pendiente de ella (véase Figura 5.2.1), complementan un elevador manual y una chaqueta de vidrio, la cual mediante el elevador se acerca o aleja la chaqueta conectada a un baño a 25°C (PolyScience, +/- 0.01K), este recipiente contuvo cada solución de tensoactivos; mediante las lecturas de masa provenientes de la balanza al alejar un anillo de Pt-Ir sumergido en la solución de interés, el valor de la tensión superficial, σ , se obtuvo mediante la ecuación de Du Noüy siguiente [Harkins & Jordan, 1930; Pardo-Cervantes *et al.*, 2011]:

$$\sigma = \frac{Mg}{4\pi R_r} f_i \quad (86)$$

El valor de, f_i de la ecuación (86), corresponde a un factor de corrección propuesto por Harkins-Jordan, M es el valor de la masa máxima que registra la balanza al “jalar” el anillo hacia afuera de la solución, g es la constante de gravedad y R_r el diámetro mayor del anillo [Harkins & Jordan, 1930; Pardo-Cervantes *et al.*, 2011]. Con los datos se elaboraron las curvas de σ vs x , π vs x y π vs $\ln x$, a partir de las cuales se aplicaron las ecuaciones (38) y (54) y se determinó la concentración micelar crítica de los tensoactivos, así como del valor de concentración superficial máxima o de saturación.

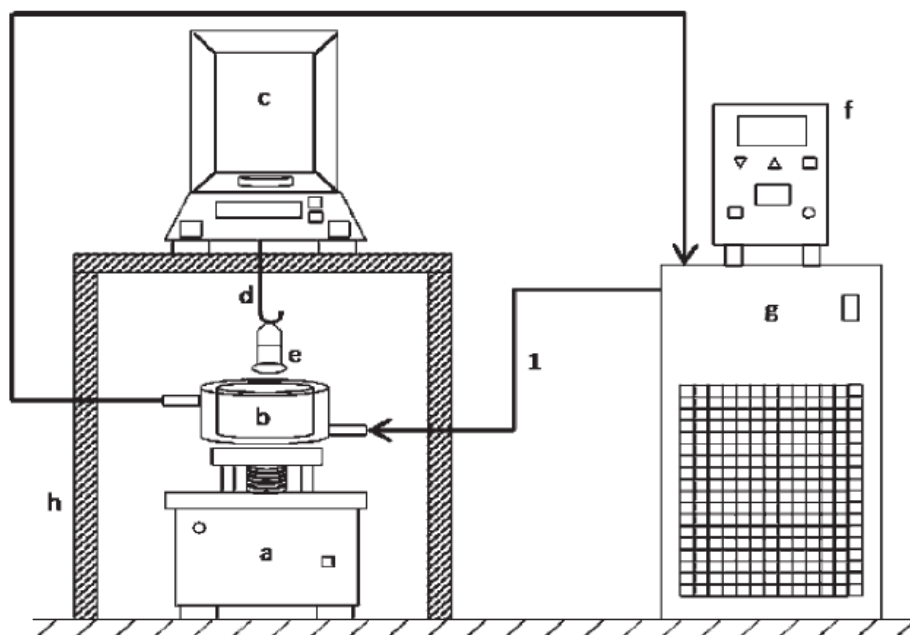


Figura 5.2.1. Esquema del equipo de tensiometría, a = elevador, b = chaqueta de vidrio, c = Balanza, d = gancho, e = anillo, f = pantalla del baño, g = baño, h = soporte de la balanza, l = circuito del baño. Pardo-Cervantes *et al.*, 2011.

5.3 Diagramas binarios de equilibrio de Temperatura vs Composición.

Los diagramas de equilibrio de Tween 20 y Tween 80, se obtuvieron mediante inspección visual [Neves et al, 2015]; las soluciones de cada tensoactivo se elaboraron en agua desionizada y filtrada (PVDF membranas de $0.2\mu\text{m}$ de diámetro de poro, Pall Gelman, Nueva York EUA), en el intervalo de concentraciones en porcentaje en masa de 0-9.5% para Tween 20 y de 0-18% para Tween 80; cada solución fue calentada en un baño María y se registró la temperatura en la cual el sistema presentó opalescencia, con los datos, fue elaborada la curva de concentración de tensoactivo vs cp .

5.4 Diagramas pseudoternarios de equilibrio de agua/tween-Span/DPPC-colesterol y tiempos de estabilidad coloidal.

A partir del diagrama de concentración (C) vs T , para Tween 20 y 80 en agua (Figura 5.3.1) se trazaron diversas trayectorias para el mezclado de los tensoactivos a una composición elegida (C_w), con DPPC, Col y Span, a una T cercana al cp correspondiente a la cantidad de Tween (T_w).

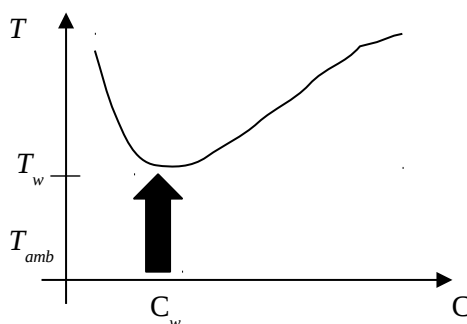


Figura 5.4.1. Diagrama binario de equilibrio del tensoactivo etoxilado de elección, Tween 20 o Tween 80, se observa un valor de T_w ubicado $1-2^\circ\text{C}$ por debajo del cp correspondiente a la C_w elegida.

La mezcla de inicio fue Tween 20/Span 20 o Tween 80/Span 80 en agua a las que se adicionó DPPC-Col a T ambiente (T_{amb}), posteriormente el sistema se llevó, en agitación mediante rotavapor, hasta $1-2^\circ\text{C}$ por debajo del cp (T_w), mostrado éste por el diagrama binario de Tween 80 (sin considerar la cantidad presente de Span) o justo en el cp para el caso de Tween 20, también sin considerar al Span; el sistema permaneció en ese estado de equilibrio por 35 minutos a 120rpm. La suspensión obtenida se dejó enfriar y mediante estudios de tamaño de las estructuras presentes mediante Dispersión dinámica de luz (DDL, NICOMP 380 ZLS, California EUA) a 25°C , 0.8902 cp de viscosidad dinámica y 1.333 de índice de refracción, se trazaron en un diagrama pseudoternario de Agua/Tween-Span/DPPC-Col, las zonas con cierto tamaño de partícula [Weissberger, 1987], además, fue tomada una muestra a la que se le determinó su estabilidad coloidal a temperatura ambiente, evaluada como el tiempo en el que sedimentó la muestra, con el dato obtenido, se realizó una gráfica de tiempo de estabilidad en función de las cantidades de Tween-Span y DPPC-Col. Los diagramas pseudoternarios de equilibrio y las gráficas de estabilidad que presentaron al menos un sistema estable hasta por 23 días (sin flóculo), son los únicos que se muestran en el capítulo de Resultados.

5.5 Estudios de Calorimetría Diferencial de Barrido y Microscopía Confocal de Fluorescencia.

Los sistemas con al menos 23 días de estabilidad coloidal fueron sometidos a estudios de CDB (Microcal VP-DSC, EUA) a una rapidez de calentamiento de 1K/min, se obtuvo la gráfica de C_p (Cal/°C por tratarse de una mezcla) vs T con la que se infirió sobre el ordenamiento del DPPC en la estructura obtenida bajo esta nueva propuesta experimental. Para cada muestra fueron realizados tres barridos, éstos se aprecian en tres colores diferentes en el termograma (negro para el primero, rojo para el segundo y verde para el tercero), el valor de T_m obtenido según el barrido, se aprecia en la misma gráfica en el color correspondiente.

Los sistemas analizados mediante Calorimetría diferencial de barrido, fueron fluoromarcados, con 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(sulfonil de lisamina rodamina B) (sal de amonio) (RhB) (pureza > 99%, Avanti lipids Inc, EUA), en relación en masa DPPC/RhB 99:1 o con fluoresceína de Sodio (NaFi) (SIGMA-ALDRICH, EUA) en agua desionizada. En el caso de RhB, ésta se adicionó a la mezcla Agua/Tween-Span/DPPC-Col y se procedió a agitar y calentar como se mencionó en el apartado 5.1, NaFi fue preparada en agua desionizada a una concentración de 0.2%w/v y fue adicionada a Tween-Span/DPPC-Col, obtenida la suspensión, fue purificada de NaFi no encapsulada mediante Equilibrio Donnan de membrana contra una solución de Dextrosa 3mM (SIGMA-ALDRICH, EUA) y NaCl 3%w/w (ACS reagent J.T. Baker, Deventer Holanda) en relación en volumen Suspensión/Solución de Dextrosa-NaCl 1:20, con cambios de solución de Dextrosa-NaCl cada 12 horas por tres días. La suspensión fluoromarcada, fue observada en un Microscopio de Fluorescencia Zeiss LSM Pascal (Jena Alemania) en las longitudes de onda de emisión de Rodamina y NaFi (560nm y 460nm respectivamente); mediante este estudio, se pondría de manifiesto la presencia o ausencia de interior acuoso en las estructuras obtenidas.

5.6 Microscopías MEB y MFA

Las muestras analizadas mediante CDB y MCF, también fueron estudiadas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y Microscopía de fuerza atómica (MFA). Las muestras analizadas por MEB, fueron secadas al vacío y recubiertas con Carbono y posteriormente con Oro (Sputter deposition), las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico JEOL 35CF (Tokio Japón).

En el análisis mediante MFA, las muestras fueron secadas por 8 días en una campana de secado sin vacío y fueron leídas en un microscopio multimodo TMSPM (Digital Instruments, EUA) en la modalidad “tapping” y con un cantilever RTESP (0.01-0.025 Ohm-cm, Veeco, EUA).

6

Resultados y discusión

6.1 Concentración micelar crítica.

La formación de estructuras nanométricas a partir de estructuras micelares, requiere del conocimiento de la *cmc* de Tween 20 y Tween 80. Las Figuras 6.1.1 y 6.1.2 muestran la relación de π vs $\ln x_{\text{tween}}$ de los tensoactivos a partir de las cuales se determinó la *cmc* mediante la isoterma de adsorción de Gibbs integrada en la periferia de la *cmc*. Las Figuras 6.1.3 y 6.1.4, muestran la relación de π vs x_{tween} a partir de las que se determinó el valor mediante la ecuación de estado superficial de Langmuir. Los datos obtenidos se aprecian en la Tabla 4.

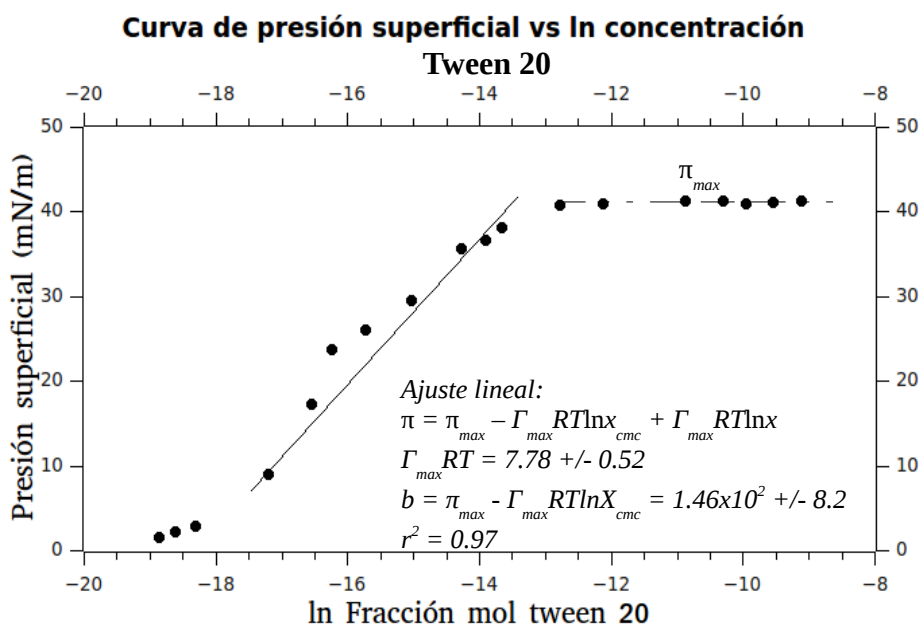


Figura 6.1.1 Curva de π vs $\ln x_{\text{tween}}$ para Tween 20, se aprecia el ajuste de los datos de la zona lineal.

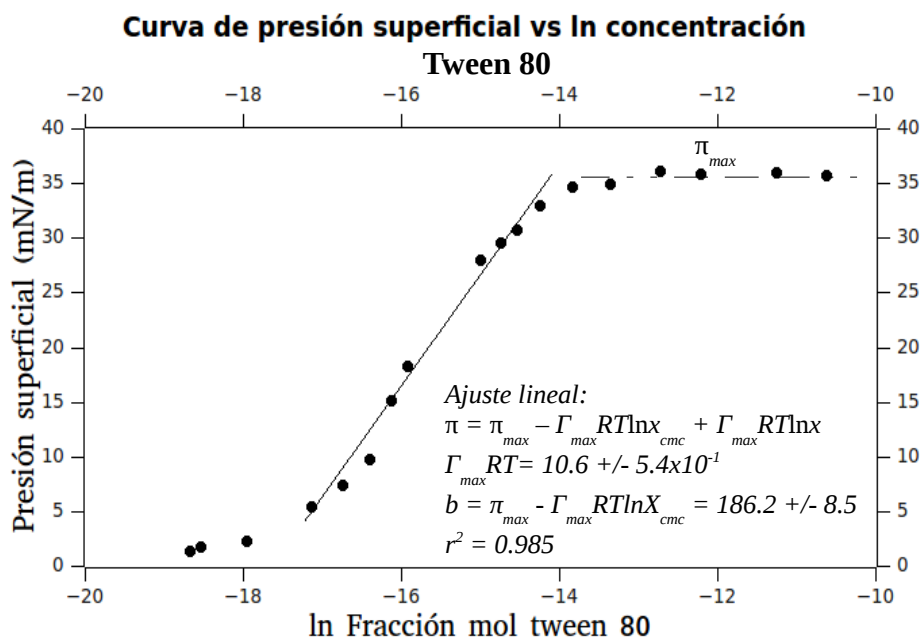


Figura 6.1.2 Curva de π vs $\ln x_{\text{tween}}$ para Tween 80, se aprecia el ajuste de los datos de la zona lineal.

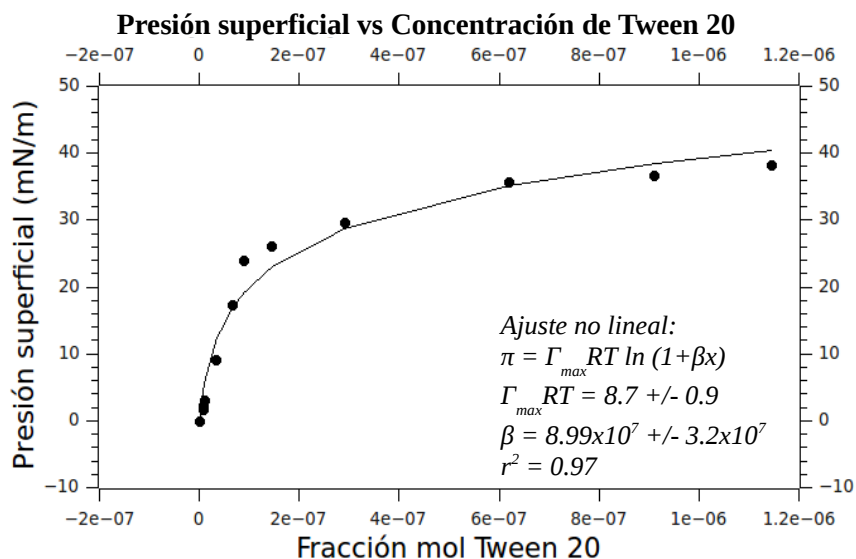


Figura 6.1.3. Curva de π vs x_{tween20} ($x_{\text{tween20}} \leq 1.2 \times 10^{-6}$), se aprecia el ajuste no lineal

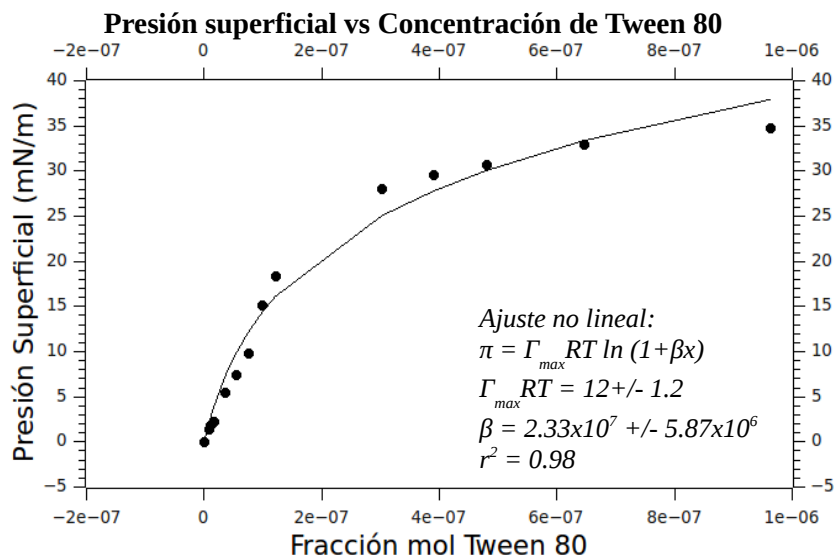


Figura 6.1.4. Curva de π vs x_{tween80} ($x_{\text{tween80}} \leq 1 \times 10^{-6}$), se aprecia el ajuste no lineal.

Tabla 4. Parámetros Superficiales para Tween 20 y Tween 80

	Γ_{max} Gibbs (mol/m ²)	cmc_{Gibbs} (mM)	cmc_{Gibbs} (%w/w)	Γ_{max} Langmuir (mol/m ²)	$cmc_{Langmuir}$ (mM)	$cmc_{Langmuir}$ (%w/w)
Tween 20	3.14×10^{-6}	7.95	9.7×10^{-3}	3.51×10^{-6}	6.16	7.53×10^{-3}
Tween 80	4.3×10^{-6}	3.84	6.014×10^{-3}	4.8×10^{-6}	4.4	6.88×10^{-3}

La Tabla 4 muestra los valores de cmc ; el valor de cmc para Tween 80 resultó ser menor que el de Tween 20, esto se debe a que el primero es un derivado etoxilado del ácido oléico de 18 carbonos, el cual presenta una insaturación, mientras el Tween 20 es derivado del ácido Láurico de 12C (Figura 3.1.2.2), la cmc será menor conforme el tensoactivo sea más hidrófobo [Mukherjee & Padhan, 2011], esto lo confirma el valor de HLB (balance hidrofílico-lipofílico), para Tween 20 es 16.7 y 15 para Tween 80 [Kothekar *et al.*, 2007].

6.2 Diagramas binarios de equilibrio.

La temperatura de enturbiamiento, condición en la que se presentan las micelas más grandes en tamaño y número de agregación, se muestra en la Figura 6.2.1 para Tween 20 y Tween 80.

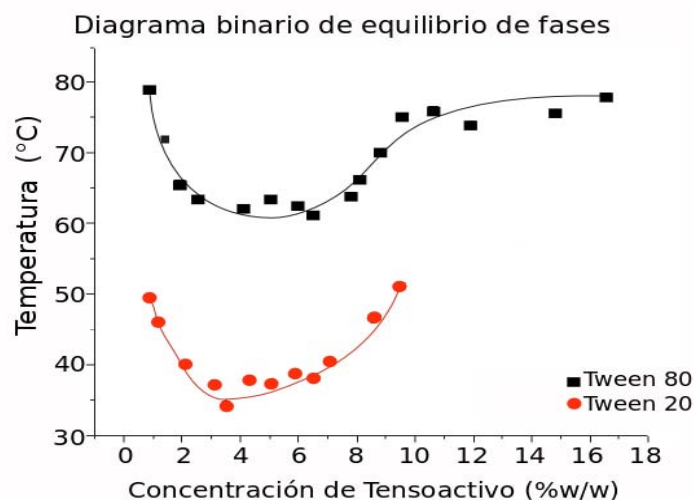


Figura 6.2.1. Diagrama binario de equilibrio de Tween 20 y Tween 80, se observan los puntos experimentales y una línea de tendencia.

La Figura 6.2.1 muestran una línea de turbiedad a temperaturas más bajas para Tween 20; las moléculas de agua de solvatación que rodean a cada monómero de Tween 80, se organizan de cierta manera derivado del efecto hidrofóbico entorno a la cadena hidrocarbónica, de este modo las moléculas de agua periféricas, disminuyen tanto su movilidad que semejan una estructura tipo hielo, por ello fueron llamadas “icebergs” [Shinoda, 1977], éstos son más en cantidad que para Tween 20, quien presenta una cadena de 12C y no promueve la formación de tantos “icebergs” como lo hace el otro tensoactivo, por ello se requiere una mayor temperatura en el caso de Tween 80 para romper esas estructuras circundantes a cada monómero y puedan éstos insertarse en las macromicelas presentes en las cercanías del punto de enturbiamiento. La temperatura crítica de solubilidad inferior (TCSI) determinada para cada tensoactivo se muestra en la Tabla 5.

Tabla 5. Temperaturas críticas de solubilidad inferior experimentales.

	TCSI (% en masa, °C)
Tween 20	3.2, 35
Tween 80	5, 61.5

6.3 Diagramas pseudo ternarios de Agua/Tween-Span/DPPC-Col y tiempos de estabilidad coloidal.

La obtención de estructuras con posible uso en el campo farmacéutico a partir de estructuras micelares, fue planeada con diferentes proporciones de componentes, con auxilio de un diagrama pseudo ternario de equilibrio, elaborado a partir del tamaño de partícula de las estructuras que se presentaban en algún sistema, fue establecida la relación entre el tamaño de partícula y las proporciones de componentes. Los diagramas pseudoternarios fueron elaborados probando las parejas etoxiladas Tween 20-Span 20 o Tween 80-Span 80 en relación porcentual entre ellos 100:0, 90:10 y 80:20 y para

la pareja DPPC-Col con relación porcentual 100:0, 95:5 y 90:10, tal cual se mencionó en el apartado 5.3; alternadamente, se analizó el tiempo en el que se presentaba floculación de los sistemas obtenidos y con los datos, se realizó la curva de tiempo de floculación en función de Tween-Span y DPPC-Col; la estabilidad coloidal correspondió al tiempo en el que la suspensión presentó una fase; sólo se muestran los diagramas pseudoternarios y las gráficas de estabilidad de aquellos sistemas que muestran al menos una suspensión estable por 23 días.

6.3.1 Diagramas pseudo ternarios para la mezcla Tween 20-Span 20 y Curva de estabilidad.

La Figura 6.3.1.1 muestra los sistemas de Tween 20-Span 20 80:20 y DPPC-Col 100:0. Todos los diagramas pseudoternarios, incluyendo los de Tween 80, están acompañado de la curva de estabilidad respectiva, los códigos de colores indican el tamaño de partícula presente o indican el intervalo de tiempo de estabilidad.

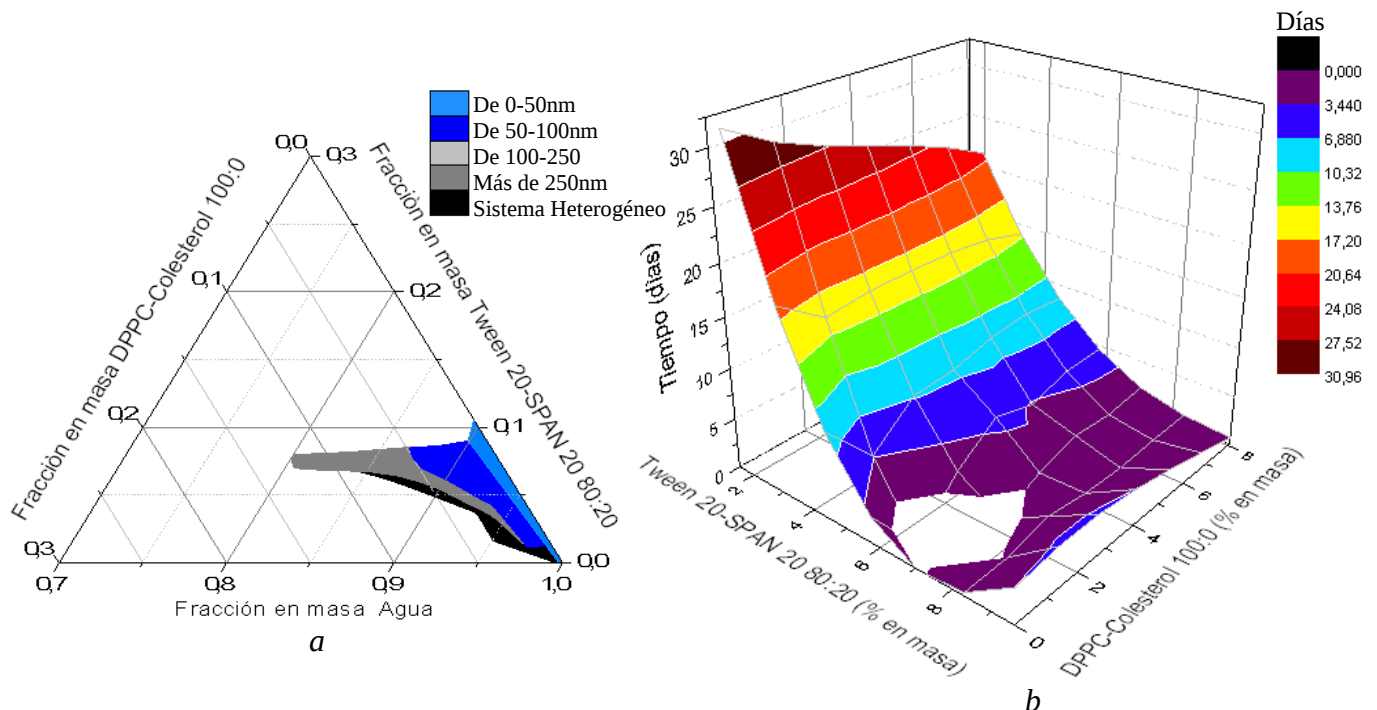


Figura 6.3.1.1. Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 20-Span 20 80:20 y DPPC-Col 100:0 y curva de estabilidad correspondiente, a) Diagrama pseudo ternario, el código de colores, indica el tamaño de partícula presente en algún sistema de los obtenidos, b) Curva de estabilidad de las suspensiones plasmados en el diagrama pseudo ternario, el código de colores que la acompaña indica un intervalo de tiempo.

En la Figura anterior se presenta la única mezcla de Tween 20-Span 20 y DPPC-Col que presentó un sistema estable por al menos 23 días, sólo fue posible obtener sistemas con estabilidad coloidal de hasta 30 días para proporciones de Tween 20-Span 20 80:20 de entre 2-4%w/w y menores al 2% de DPPC-Col 100:0 (Figura 6.3.1.1 b), además para estas proporciones se observa una prevalencia de partículas de hasta 100nm de diámetro (Figura 6.3.1.1 a), el tamaño recomendable para un sistema de liberación de fármaco debe ser de a lo más 100nm, debido a que su inmunogenicidad se eleva considerablemente para tamaños superiores al mencionado [Chandant et al, 2010]; posiblemente las estructuras estables obtenidas no son de naturaleza liposomal, pudieran ser emulsiones de fosfolípidos y/o micelas mixtas [Ishii & Nagasaka, 2004; Jin et al, 2014; Kresheck & Mihelich, 2003].

6.3.2 Diagramas pseudo ternarios para la mezcla Tween 80-Span 80 y curva de estabilidad.

Las Figuras 6.3.2.1-6.3.2.4 corresponden a los sistemas para Tween 80-Span 80; análogo a los sistemas con Tween 20-Span 20, con diferentes proporciones de DPPC-Col.

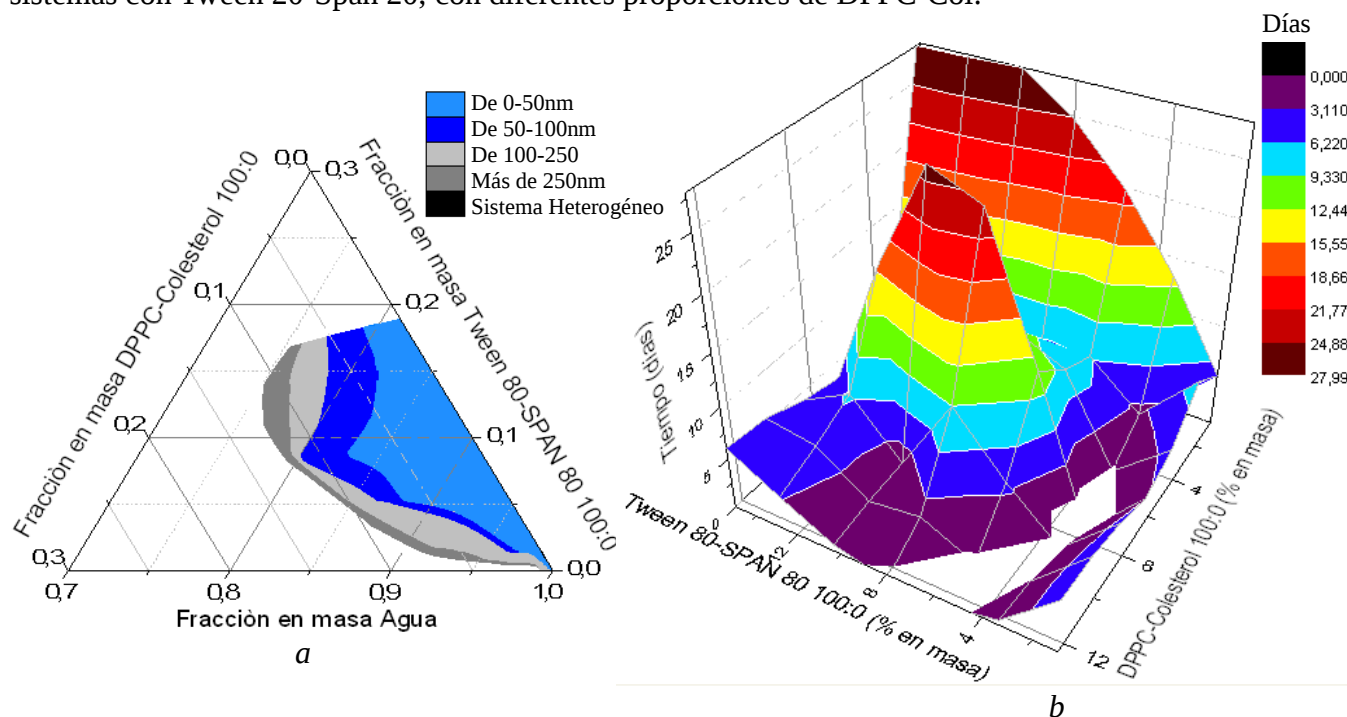


Figura 6.3.2.1. Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 80-Span 80 100:0 y DPPC-Col 100:0 y la curva de Estabilidad correspondiente, a) Diagrama pseudo ternario, b) Curva de Estabilidad.

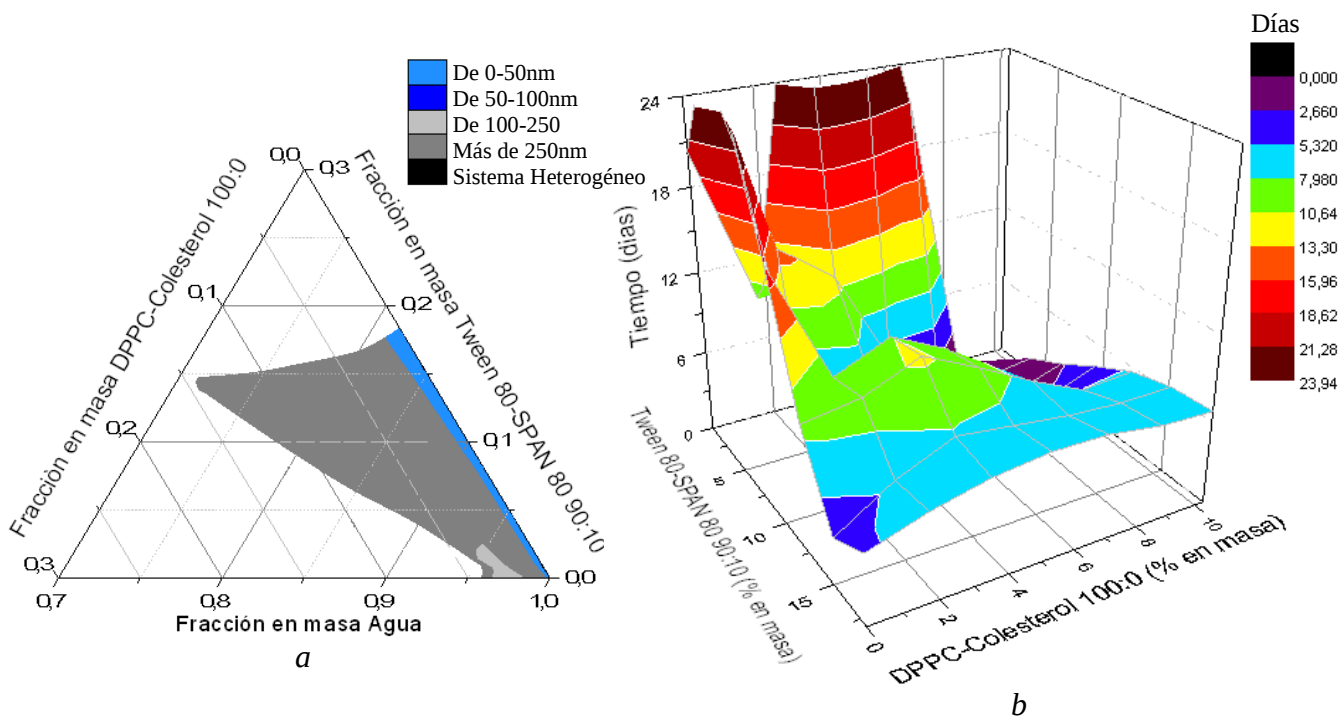


Figura 6.3.2.2. Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 80-Span 80 90:10 y DPPC-Col 100:0 y la curva de Estabilidad correspondiente, a) Diagrama pseudo ternario, b) Curva de Estabilidad.

La Figura 6.3.2.1 b, muestra un tiempo de estabilidad de hasta 28 días, al parecer la discrepancia estructural entre Tween 20 y Tween 80 está induciendo la diferencia en la estabilidad coloidal, el Tween 80 presenta un doble enlace que provoca que la cadena hidrocarbonada cambie de dirección, haciendo esto que la región hidrofóbica del tensoactivo sea más voluminosa, Figura 3.1.2.2 Las proporciones de Tween 80 y DPPC que presentaron los tiempos de estabilidad mayores, fueron cercanas a 9%w/w y 6.2%w/w respectivamente para el tiempo más alto de 28 días con partículas de entre 50-100nm (Figura 6.3.2.1 a); para el segundo tiempo más largo de alrededor de 21 días, las proporciones fueron de 15 y 1.5%w/w respectivamente, en donde se presentan partículas de hasta 50nm; respecto a la Figura 6.3.2.2, se observa una ligera disminución en el tiempo de estabilidad hasta ser de 24 días, este sistema contiene un 10% de Span 80 y 0% de Colesterol.

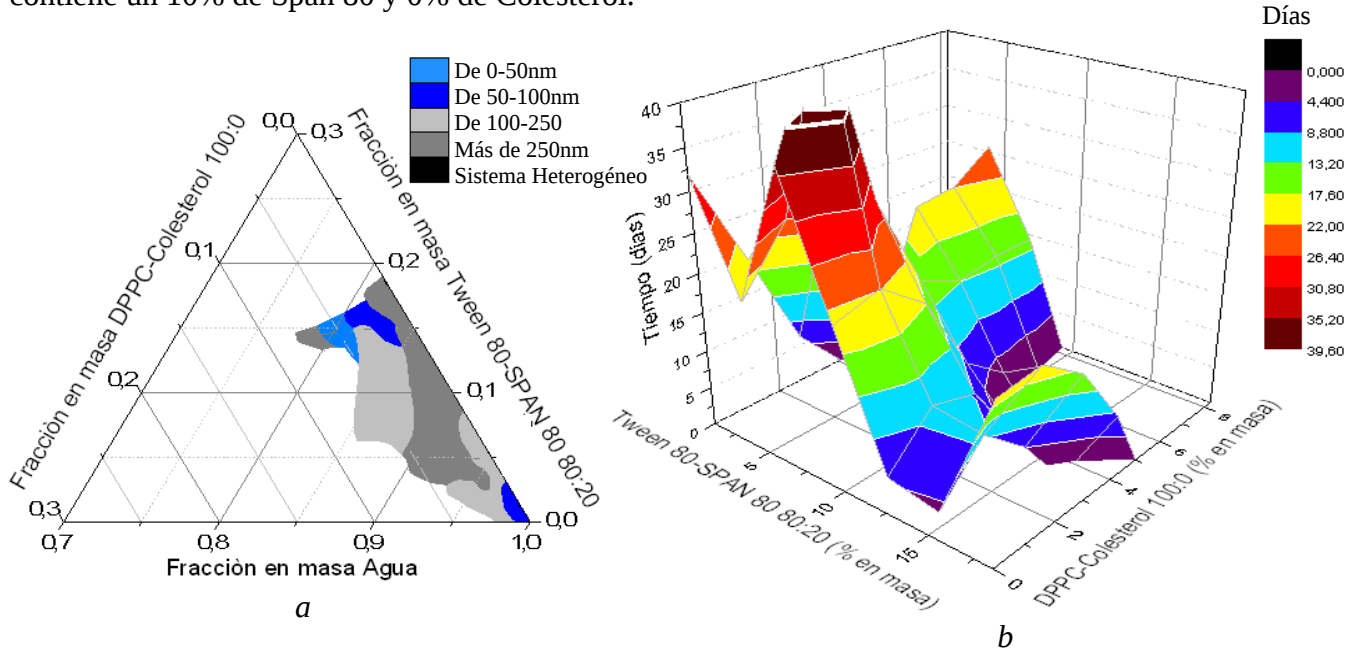


Figura 6.3.2.3. Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 100:0 y curva de estabilidad, a) Diagrama pseudo ternario, b) Curva de Estabilidad.

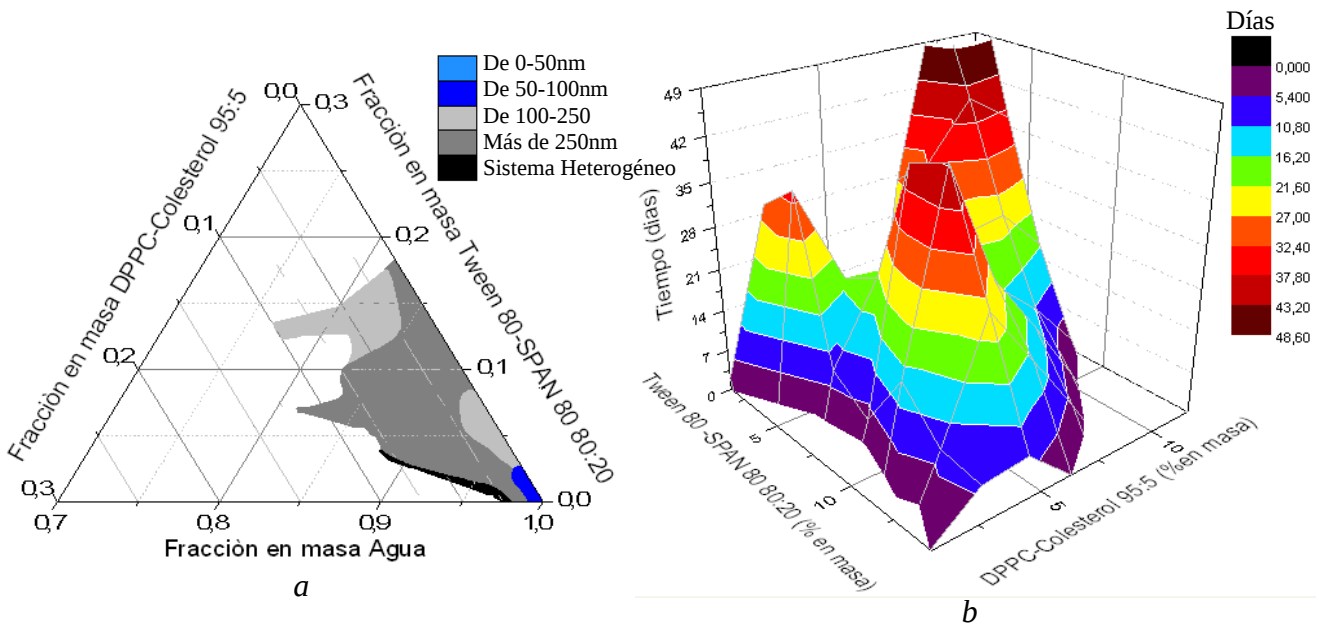


Figura 6.3.2.4. Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 95:5 y curva de estabilidad, a) Diagrama pseudo ternario, b) Curva de estabilidad coloidal.

La Figura 6.3.2.3 muestra un incremento considerable en el tiempos de estabilidad para Tween-Span de entre 2-4%w/w y DPPC-Col de entre 1.8-2.1%w/w, la presencia de una cantidad mayor de Span 80 y sin Col favoreció la obtención de sistemas con 40 días en donde existen partículas de tamaños entre los 50-250nm (Figura 6.3.2.3 a), de cualquier manera, esta Figura y la 6.3.2.4, han revelado información importante respecto al tiempo de estabilidad, el cual llegó a ser el máximo para alrededor de un 3% de Tween 80-Span 80 y de 10% de DPPC-Col, cuyas partículas son mayores de 250nm (Fig. 6.3.2.4 b).

6.3.3 Determinaciones instrumentales

Para el estudio instrumental de los sistemas obtenidos, se eligió un tiempo de 23 días como límite, todos los sistemas que presentaron una sola fase en este tiempo, fueron sometidos a estudios de CDB, MCF, MFA y MEB con el fin de elucidar su naturaleza estructural. Los sistemas seleccionados se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Sistemas sometidos a estudios instrumentales.

Sistema	Proporción de Tensoactivos (% w/w)	Proporción de DPPC-Col (% w/w)	Relación molar de DPPC/Col/Tween/Span	Simbolo	Figura	Tiempo de estabilidad	Tamaño promedio (nm)	Error (desviación estándar en %)
Tween 20-Span 20 80:20 DPPC-Col 100:0	1.9	0.97	1:0:1:1	<i>i</i>	6.3.1.1	29	57.1	75.3
Tween 20-Span 20 80:20 DPPC-Col 100:0	1.95	0.5	2:0:4:3	<i>ii</i>	6.3.1.1	30	37.9	83.7
Tween 80-Span 80 100:0 DPPC-Col 100:0	9.1	6.1	5:0:4:0	<i>iii</i>	6.3.2.1	25	79.7	69.4
Tween 80-Span 80 90:10 DPPC-Col 100:0	0.61	2.1	20:0:3:1	<i>iv</i>	6.3.2.2	23	101	51.5
Tween 80-Span 80 80:20 DPPC-Col 100:0	4.5	2.3	9:0:8:6	<i>v</i>	6.3.2.3	38	266	43.3
Tween 80-Span 80 80:20 DPPC-Col 95:5	3.25	3.2	100:10:48:37	<i>vi</i>	6.3.2.4	48	987.7	54.4
Tween 80-Span 80 80:20 DPPC-Col 95:5	7.9	4.3	20:2:19:15	<i>vii</i>	6.3.2.4	36	201.6	47.8
Tween 80-Span 80 80:20 DPPC-Col 95:5	4.15	7.8	20:2:5:4	<i>viii</i>	6.3.2.4	26	378.1	57

6.3.3.1 Trayectorias termodinámicas de obtención.

En la obtención de sistemas nanométricos mediante la propuesta novedosa del trabajo, es importante mencionar la concentración inicial de Tween-Span en agua, ésta para cada sistema, corresponde a los valores de la segunda columna de la tabla 6, por ejemplo para el sistema (*iii*), la trayectoria de obtención parte del punto de 9.1%w/w de Tween 80-Span 80 100:0 en agua, valor encontrado en el

diagrama binario de equilibrio de Tween 80 de la Figura 6.2.1 y que se ubica también en el eje Tween 80-Span 80 100:0 del pseudoternario de la Figura 6.3.2.1 a); de este modo para obtener el sistema (iii), es necesario adicionar DPPC-Col 100:0 hasta una proporción 6.2%w/w (tercera columna de la Tabla 6) y mezclar el sistema a 120rpm por 35 minutos a 69-70°C, temperatura cercana al cp de 9.1% de Tween en agua (apartado 5.3). Para el caso de los sistemas con Span como el sistema i , el procedimiento es análogo al del ejemplo, la diferencia corresponde a la determinación del cp , pues al estar los diagramas binarios de equilibrio de la Figura 6.2.1 en función de la cantidad de Tween 20 o Tween 80, es necesario determinar la cantidad sólo de Tween en el medio.

6.4 Calorimetría diferencial de barrido

La calorimetría diferencial de barrido (CDB), registra la respuesta de un sistema a un flujo de calor mediante una gráfica de capacidad térmica a presión constante (C_p) en función de la temperatura conocida como termograma. Un perfil gráfico como el de la Figura 6.4.1, muestra un pico endotérmico (hacia arriba) [Martínez, 2016]. El termograma obtenido para la muestra (i) (Tabla 6), muestra los picos calorimétricos obtenidos en el primero y segundo barrido (negro y rojo respectivamente); el subíndice 1 indica el valor de T_m para el primer pico y el 2 para el segundo pico, en el caso del tercer barrido, sólo se muestra el valor de T_m cuando el valor difiere de las otras dos T_m que se hayan obtenido. En el termograma se aprecian dos picos muy cercanos y por ello superpuestos cuyos máximos son de 36.3 y 38°C, temperaturas cercanas a la de 40-42.3°C que muestra el termograma típico del DPPC organizado en bicapas [Ambrosini *et al.*, 1998; Biltonen & Lichtenberg, 1993; Salinas, 2014; Socaciu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2014], aunque el pico de lo que se conoce como pretransición y que se ubica en 34.5-35.4°C [Ambrosini *et al.*, 1998; Salina, 2014; Zhao *et al.*, 2007] no se presentó en el termograma. La gráfica obtenida en el primer barrido es diferente de las otras dos correspondientes a los barridos subsiguientes, esto es indicio de que la muestra (i) presentó cierto grado de termosensibilidad y dos tipos de estructuras que difieren en el arreglo que el DPPC presentó, por ello los picos de 36.3 y 38°C. El sistema (i) presenta partículas de hasta 50nm (Figura 6.3.1.1), tamaño corroborado mediante estudios de MCF y MFA, el que no se haya presentado un ensanchamiento importante en el o los picos, indica que el DPPC está estructurando bicapas con cantidades bajas de Tween 20/Span 20, por ello el pico no se ensancha ni se corre demasiado hacia la izquierda [Kresheck & Mihelich, 2003; Biltonen & Lichtenberg, 1993], el sistema (i) fue ligeramente turbio, evidencia del tamaño de partícula.

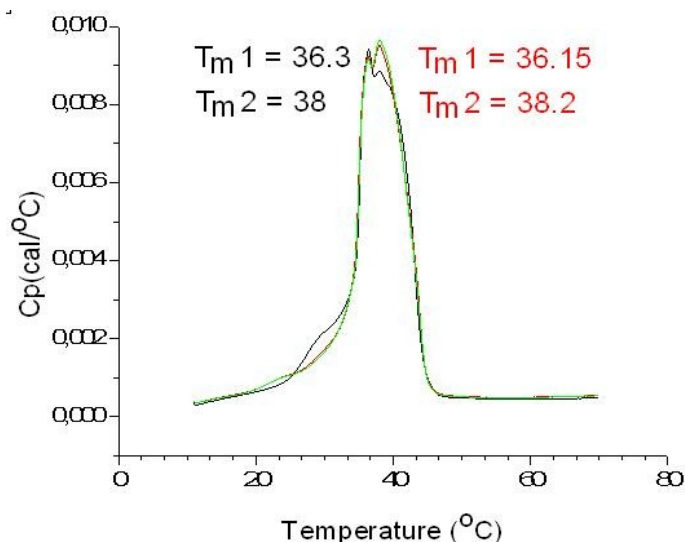


Figura 6.4.1. Termograma obtenido para el sistema Tween 20-Span 20 80:20 y DPPC-Col 100:0; se observan los valores de T_m .

La Figura 6.4.2 muestra un pico cercano a los 39.8°C y otro mayor a los 40.4°C, esto es indicio de que existen al menos dos tipos de estructuras ligeramente diferentes en cuanto a la disposición del DPPC, por eso la cercanía de los picos, además de que presentan termosensibilidad por ser el termograma del primer barrido diferente a los de las otras dos (gráficas roja y verde). En el termograma se aprecia el patrón típico observado para liposomas MLV a base de DPPC con cantidades crecientes de algún componente hidrófobo en la bicapa sin ser éste mayor que el DPPC [Biltonen & Lichtenberg, 1993; Kresheck & Mihelich, 2003]. La relación molar en números enteros del Tween 20/Span 20/DPPC es 4:3:2, esto implica que la cantidad de DPPC es la menor de todas, sugiriendo que la partícula del sistema (ii) es similar a la del sistema (i). Es importante mencionar que la apariencia del sistema fue ligeramente opalescente.

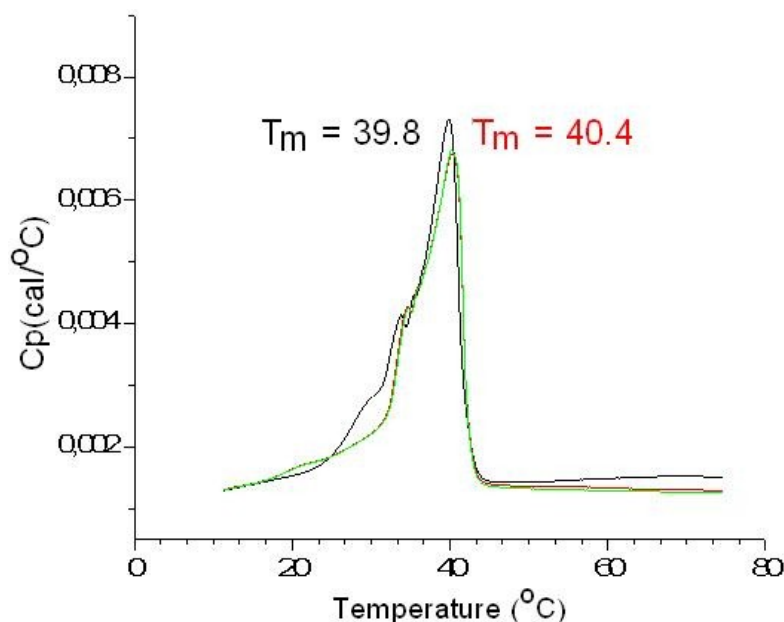


Figura 6.4.2. Termograma del sistema (ii) a base de Tween 20-Span 20 80:20 y DPPC-Col 100:0, se observan las T_m obtenidas en el primer y segundo barrido.

La Figura 6.4.3, muestra el termograma obtenido para la muestra (iii), éste muestra un pico de T_m de 42.1°C, así mismo, el pico se ensancha hacia la izquierda y, a diferencia de los dos termogramas anteriores, la gráfica no se modifica entre los barridos realizados. La proporción molar de Tween 80/DPPC en el sistema es 4:5, el tamaño de partícula presente en el sistema fue de hasta 50nm (Figura 6.3.2.1); el patrón gráfico observado es similar a uno obtenido para una emulsión a base de DMPC/DPPC y aceite de coco o donde se emplea oleato y palmitato de glicerilo emulsificando un aceite, de hecho el responsable del engrosamiento asimétrico hacia la izquierda en estos sistemas, es la cantidad de fase oleosa encapsulada [Carbone *et al.*, 2014; Peterson & Siekmann, 2001]; al parecer, tenemos en el sistema (iii) una estructura en la que hay un núcleo hidrófobo rodeado por DPPC en bicapas. Es importante mencionar que la apariencia del sistema fue transparente, por ello la estructura obtenida debe ser similar a la de la Figura 6.4.2.

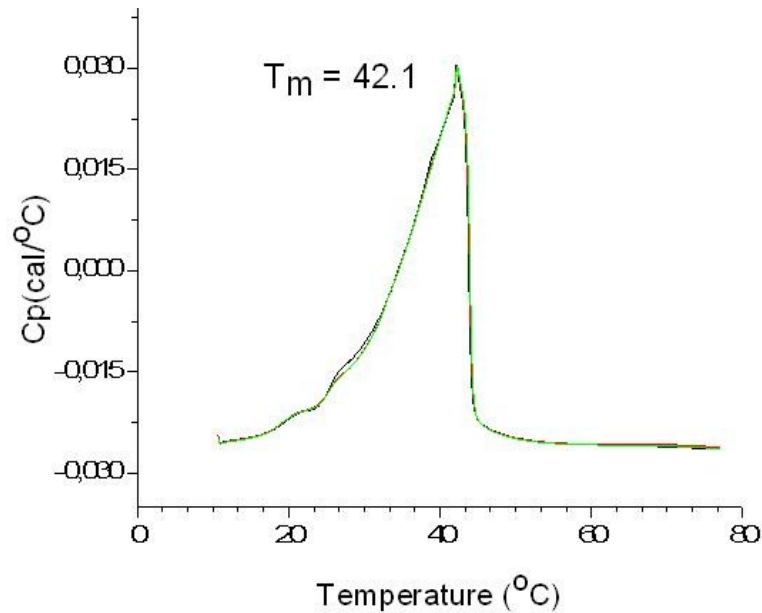


Figura 6.4.3. Termograma del sistema (iii) a base de Tween 80-Span 80 100:0 y DPPC-Col 100:0.

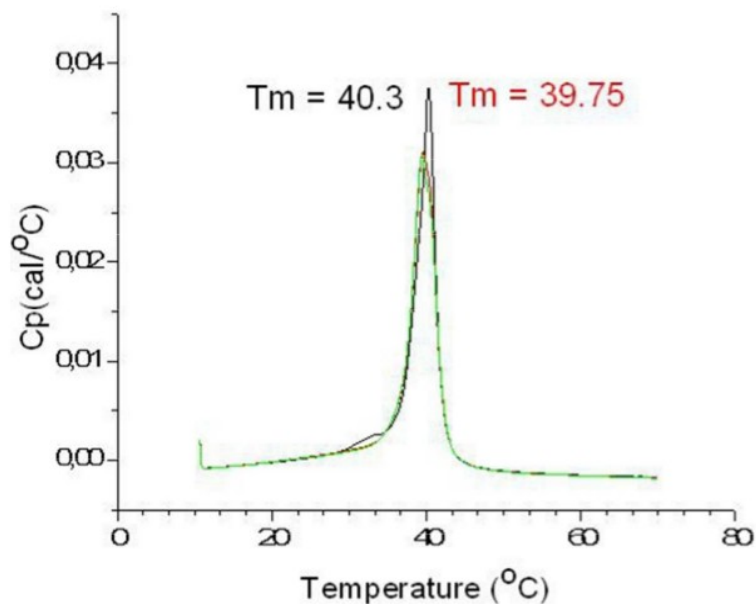


Figura 6.4.4. Termograma obtenido para el sistema (iv) a base de Tween 80-Span 80 90:10 y DPPC-Col 100:0.

El termograma de la muestra (iv), muestra un valor de T_m de 40.3°C, el cual disminuye a 39.75°C para las siguientes corridas, además de la disminución del valor de Cp, esto indica un re-arreglo estructural en la muestra inducido por el primer calentamiento que reduce la estabilidad de la muestra; el tamaño de las estructuras presentes fue de entre 50-250nm (Figura 6.3.2.2), la relación en mol de Tween 80/Span 80/DPPC fue 3:1:20, esto implica una elevada cantidad de DPPC, el cual está estructurando bicapas posiblemente multilaminales, análogas a un liposoma MLV con cantidades de Tween 80-Span 80 intercalado prácticamente de cero, la simetría del pico observado y la T_m obtenida lo indican,

además de un tamaño de partícula superior al de los sistemas (i)-(iii); además de que la apariencia del sistema fue opalescente. Es importante indicar que las estructuras obtenidas con Tween 80-Span 80 han sido termodinámicamente más estables que las de Tween 20-Span 20, el valor de C_p y desde luego el ΔH , lo indican. Los sistemas (i) y (ii) no sobrepasaron los $0.01 \text{ Cal/}^\circ\text{C}$, mientras los sistemas (iii) y (iv) sí, seguramente la presencia de una insaturación en la estructura del Tween 80 y Span 80 provoca que las estructuras favorezcan que el DPPC presente un mejor empaquetamiento en la bicapa y por ello se requiere mayor energía para promover la transición de fases [Biltonen & Lichtenberg, 1993; Heerklotz & Epand, 2001], quizá esto es consecuencia de un entrecruzamiento de las regiones hidrófobas del Tween 80 y Span 80 en el núcleo de la partícula.

La Figura 6.4.5 corresponde al termograma de un punto de la misma trayectoria de la muestra (iv) con una proporción de DPPC-Col de 1%w/w, es decir, un punto anterior al sistema (iv), el cual llamaremos iv_a y cuyo tiempo de estabilidad es de alrededor de 8 días. El termograma muestra dos picos superpuestos, ambos cercanos a la T_T del DPPC cuando forma bicapas, los picos de la muestra (iv_a) están ligeramente corridos hacia la derecha además de ser anchos; esto sugiere que hay dos tipos de ordenamientos del DPPC en las partículas, es decir, dos tipos de estructuras cuyas diferencias deben ser en la cantidad de bicapas que el DPPC presenta y/o en la presencia de Tween 80 en esas capas. La proporción de Tween 80/Span 80/DPPC en el sistema fue 6:2:21, una cantidad elevada de DPPC, por esto quizá no haya Tween intercalado en la bicapa, sin embargo y a diferencia del sistema (iv), el tiempo de estabilidad disminuyó al igual que el del C_p y ΔH ; este sistema (iv_a), que no aparece en la Tabla 6, muestra la relación que hay entre un tiempo de estabilidad bajo con valores de C_p y/o ΔH igualmente bajos (se omitieron los valores de T_m), por ello el sistema no fue estable por mucho tiempo.

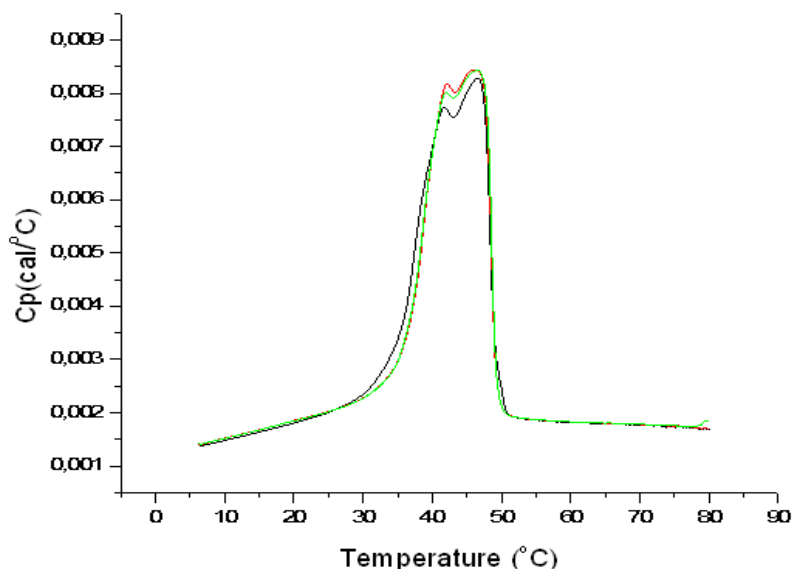


Figura 6.4.5. Termograma obtenido para el sistema (iv_a) a base de Tween 80-Span 80 90:10 y DPPC-Col 100:0, las proporciones respectivas fueron 0.56%w/w y 1%w/w.

Respecto a la muestra v (Fig. 6.4.6), se aprecia un sólo pico que prácticamente fue del mismo valor para las tres corridas, sin embargo el valor de C_p disminuyó visiblemente de la primera a la tercera corrida, indicando la termosensibilidad, vista ya para algunos sistemas previos, las proporciones en mol de Tween 80/Span 80/DPPC en el sistema fueron 8:6:9 y el tamaño de partícula de 100-250nm (Figura 6.3.2.3). El desplazamiento del pico calorimétrico sugiere que en el sistema el DPPC también está estructurando bicapas que circundan un núcleo hidrófobo, aunque la bicapa de DPPC llega a presentar en muy baja proporción tensoactivos, por ello la T_m se aleja de los $40-42^\circ\text{C}$ correspondientes a una bicapa de DPPC.

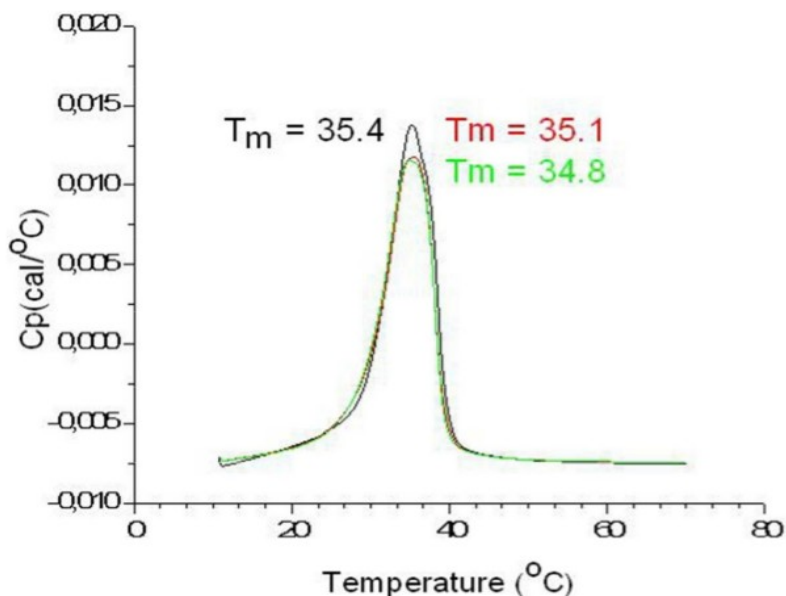


Figura 6.4.6. Termograma del sistema (v) a base de Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 100:0.

La Figura 6.4.7, muestra el termograma obtenido para la muestra (vi).

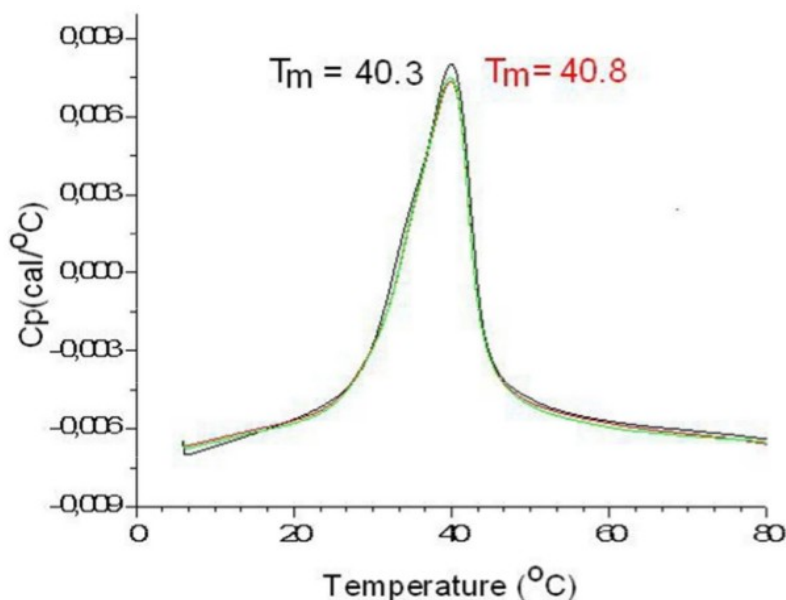


Figura 6.4.7. Termograma obtenido para el sistema vi a base de Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 95:5.

El termograma anterior correspondiente al sistema (vi), muestra claramente el pico de transición calorimétrica típico para un sistema a base de DPPC que estructura bicapas unilaminales [Chen et al, 2013; Chi-Feng *et al.*, 2007], la T_m obtenida fue de 40.4°C, la adición al sistema de Col por ejemplo, provoca un corrimiento del pico hacia la izquierda [Chen et al, 2013; Chi-Feng *et al.*, 2007; Ishii & Nagasaka, 2004; Ishii & Nii, 2005], el sistema (vi) presentó una relación en mol de Tween 80/Span 80/DPPC/Col de 48:37:100:10 y un tamaño de partícula de al menos 250nm, al parecer el sistema consta de DPPC estructurando bicapas con Col intercalado.

La Figura 6.4.8, correspondiente al sistema (vii), muestra una T_m de 35 °C en el primer barrido que disminuye a los 33.9 °C en los siguientes, fenómeno presentado por todos los sistemas excepto el (iii), la proporción en mol de Tween 80/Span 80/DPPC/Col fue de 19:15:20:2 y el tamaño de partícula fue de al menos 250 nm; en comparación con el sistema (vi), se observó que un incremento en la cantidad de Tween-Span, provocó que el sistema sea menos estable, determinado por tiempo de estabilidad y/o $C_p/\Delta H$; una vez más el termograma muestra que el DPPC está estructurando una bicapa con Col intercalado, tal cual lo han mostrado todas las estructuras anteriores.

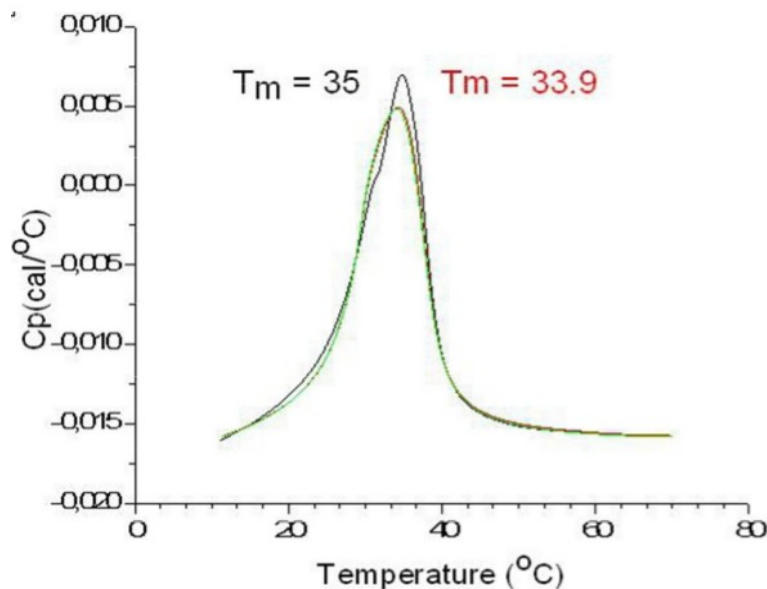


Figura 6.4.8. Termograma obtenido para el sistema (vii) a base de Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 95:5.

La Figura 6.4.9, muestra un patrón similar al de la muestra (vi); la proporción molar de Tween 80/Span 80/DPPC/Col en el sistema fue de 5:4:20:2 y presentó partículas de la menos 250 nm, al parecer tenemos de nueva cuenta una estructura con el DPPC estructurando bicapas que rodean un núcleo que, dados los componentes del sistema, sería rico en Tween-Span y eventualmente alojaría al Col (de confirmarse esto, este arreglo sería común para los ocho sistemas), por ello la T_m fue de 40.1 °C, prácticamente la T_m de una bicapa constituida sólo por DPPC.

En general, todos los termogramas han mostrado el patrón calorimétrico típico de una bicapa a base de DPPC, éste muestra una temperatura de pretransición de alrededor de 34.5-35.4 °C que corresponde al tránsito hacia la fase de gel ondulatorio (P_{β}). Existe otra transición, la principal, T_m y corresponde al paso de la fase P_{β} hacia la fase de líquido cristalino, L_{α} , ésta se presenta en los 40-43.3 °C [Pentak, 2014; Socaciu *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2007]. Todos los Lipomic obtenidos, no presentaron pretransición y la principal fue cercana a la que muestran bicapas de DPPC; es importante mencionar que emulsiones lipídicas, hechas como medios de transporte de fármacos y a base de dimiristoil fosfatidil colina, DMPC, DPPC, aceite de coco y clometiazol, presentan también la T_m , desde luego que en este caso corresponde a la temperatura de transición principal de la mezcla DMPC/DPPC y, conforme existe en el sistema clometiazol, la T_m se corre hacia la izquierda, esto señala que la inserción del clometiazol en la capa de lípidos está sucediendo, por ello se pierde ordenamiento y el pico se presenta a temperaturas más bajas que para una capa de DMPC/DPPC [Nordén *et al.*, 2001], este fenómeno es común a sistemas liposomales cuando el Colesterol y/o cualquier otro compuesto

hidrófobo se ancla en la bicapa, cuanto mayor sea la cantidad de estos, mayor es el corrimiento [Carbone et al, 2014; Malcolmson *et al.*, 1997; Zhao, 2007]. Las estructuras obtenidas mediante esta propuesta experimental, presentan muy bajas cantidades de Tween 20 y 80, según sea el caso, por ello la transición principal no fue muy diferente a la de bicapas de DPPC puro. Micelas mixtas a base de DMPC y óxido de dodecil dimetil fosfina, APO12, muestran que el pico calorimétrico desaparece cuando el fosfolípido no está formando una bicapa, fenómeno que sucede en una micela mixta [Kresheck & Mihelich, 2003]. La información anterior señala que el DPPC de las estructuras está organizado en bicapas que pueden ser más de una, así mismo, no se tienen micelas mixtas.

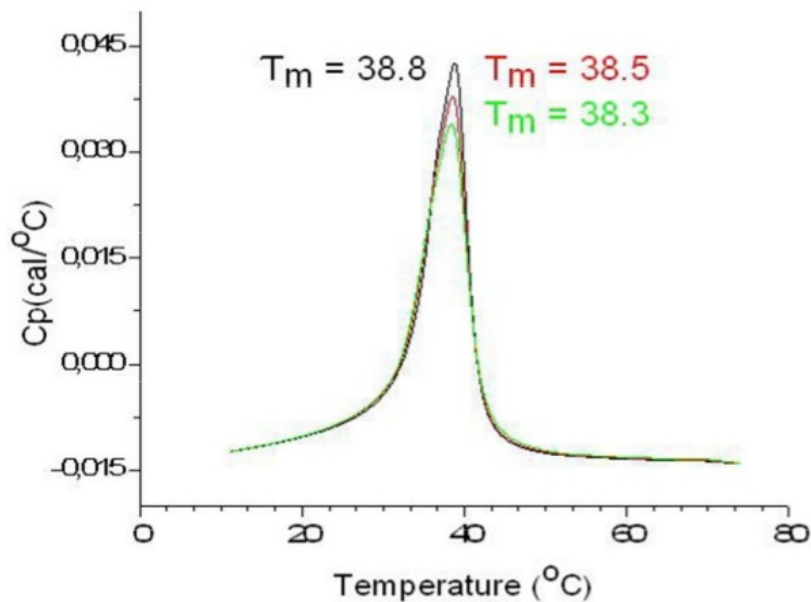


Figura 6.4.9. Termograma obtenido para el sistema (viii) a base de Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 95:5.

6.5 Estudios de Microscopía de Fluorescencia

La Figura 6.5.1 muestra la imagen MCF del sistema (i); ésta muestra un campo con estructuras puntuales rojas que deben ser de escasos nanómetros, al parecer el sistema (i) presenta estructuras completamente hidrófobas, por ello el fosfolípido fluoromarcado está presente en toda la estructura. Los estudios CDB han mostrado que el DPPC está organizado en bicapas, con lo que es posible inferir que la partícula presente en el sistema (i) debe ser un núcleo micelar mixto como el de la Figura 4.1.3.1, donde la cantidad de DPPC es baja, circundando esta estructura, se encuentra al menos una bicapa de DPPC. La Figura 6.5.2 muestra un esquema de esta partícula, nueva en identidad estructural y en ruta de obtención que llamaremos Lipomic.

En la microscopía confocal de fluorescencia de la muestra (ii), Figura 6.5.3 (se aprecian partículas pequeñas, con diámetro promedio de hasta 50nm, similar al sistema (i). Al parecer todas las estructuras son completamente hidrófobas, por ello el DPPC debe estar en bicapas rodeando un núcleo micelar mixto rico en Tween 20/Span 20 y desde luego que la bicapa de DPPC presenta al menos dos proporciones de Tween 20/Span 20 ligeramente diferentes, por ello los dos picos de T_m cercanos, el sistema (i) y el (ii), presentan una estructura como la de la Figura 6.5.2.

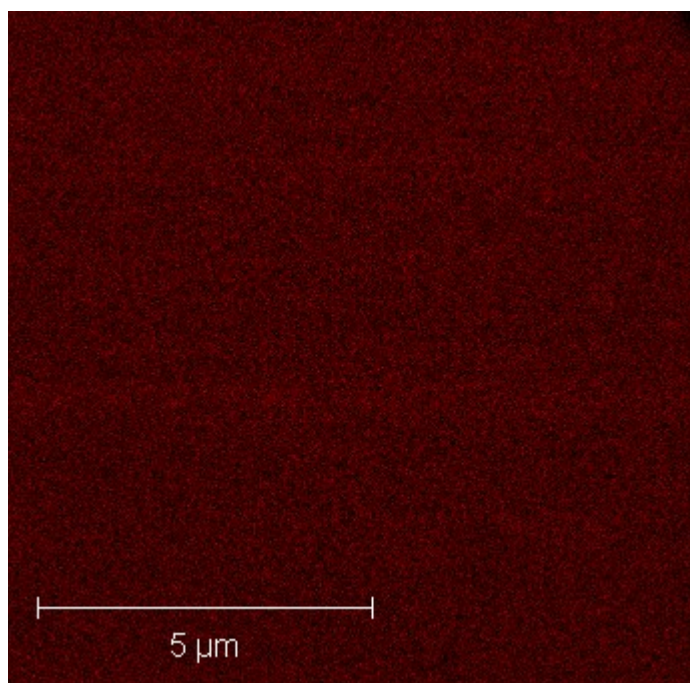


Figura 6.5.1. Micrografía por MCF del sistema (i) a base de Tween 20-Span 20 80:20 y DPPC-Col 100:0.

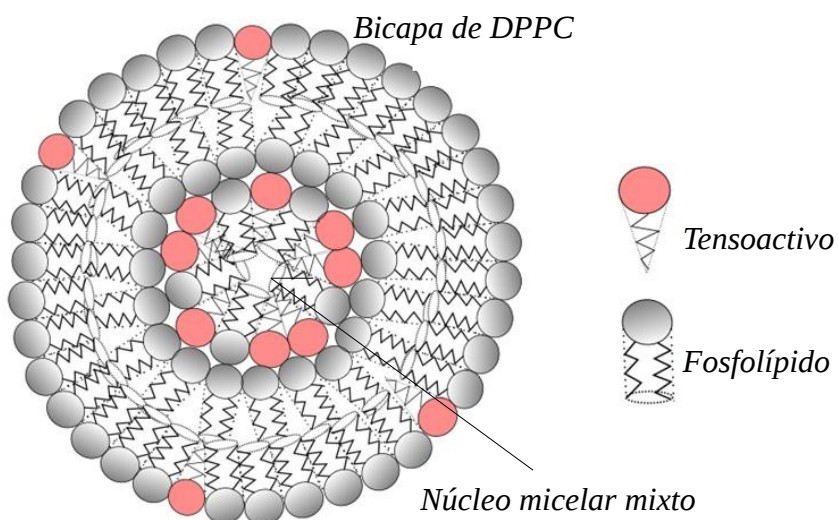


Figura 6.5.2. Representación de la partícula que se ha denominado como Lipomic, un núcleo rico en Tween/Span y escasas moléculas de DPPC, es estabilizado por al menos una bicapa de DPPC que lo rodea.

La Figura 6.5.4, corresponde a la micrografía MCF del sistema (iii), ésta es semejante a las obtenidas para los sistemas (i) y (ii). Posiblemente el sistema iii también está compuesto por partículas de emulsificación de no más de 100 nm; como lo mostró el tamaño, la partícula debe ser similar a la de la Figura 6.5.2, sólo que el núcleo presenta una cantidad mayor de Tween-Span y una bicapa de DPPC con menos presencia de estos tensoactivos, por ello la T_m del termograma, prácticamente la T_m de una bicapa de DPPC.

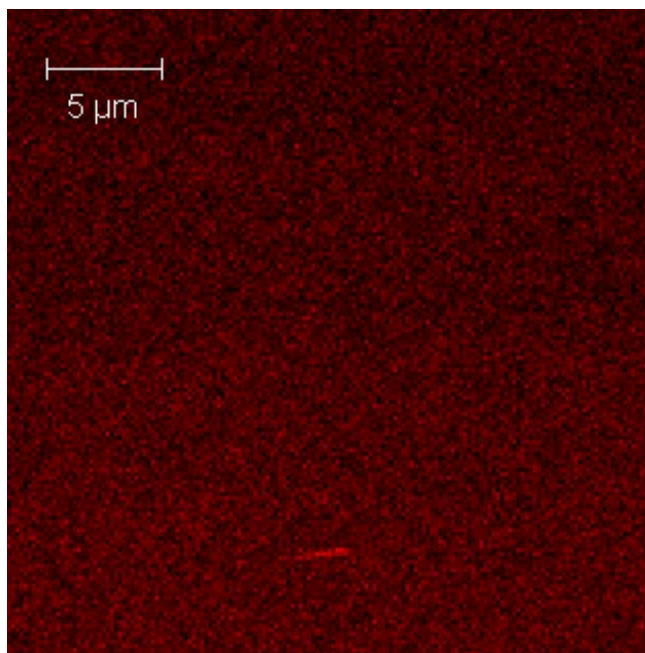


Figura 6.5.3. Micrografía por MCF de la muestra (ii), se aprecia la coloración típica del DMPC-RhB puntual en prácticamente todo el campo, similar al sistema (i).

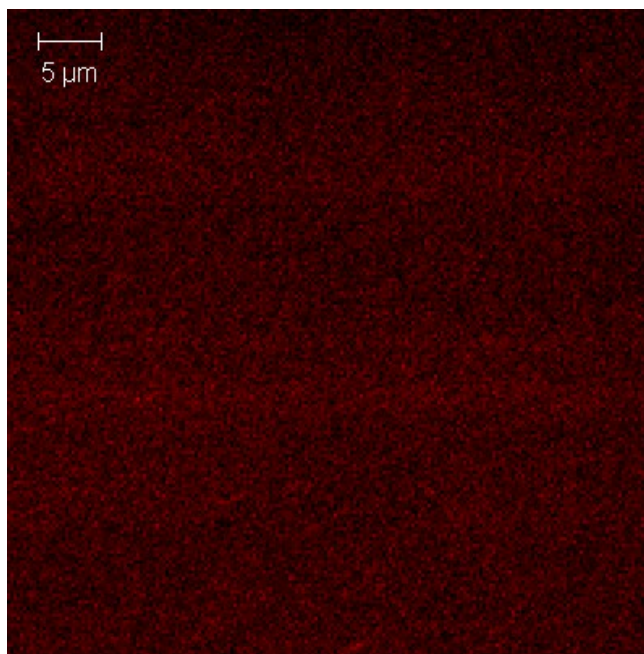


Figura 6.5.4. Micrografía por MCF del sistema (iii) a base de Tween 80-Span 80 100:0 DPPC-Col 100:0.

La Figura 6.5.5, muestra que el sistema *iv* presenta estructuras completamente hidrófobas, tal como se ha mostrado para los tres sistemas previos, el estudio CDB sugiere que el DPPC está dispuesto en más de una bicapa, análogo a un liposoma MLV con cantidades de Tween 80-Span 80 intercalado

prácticamente de cero, la simetría del pico y la T_m , además del tamaño de partícula mayor que el de los sistemas (i)-(iii); la mezcla de tensoactivos estaría en el núcleo micelar mixto.

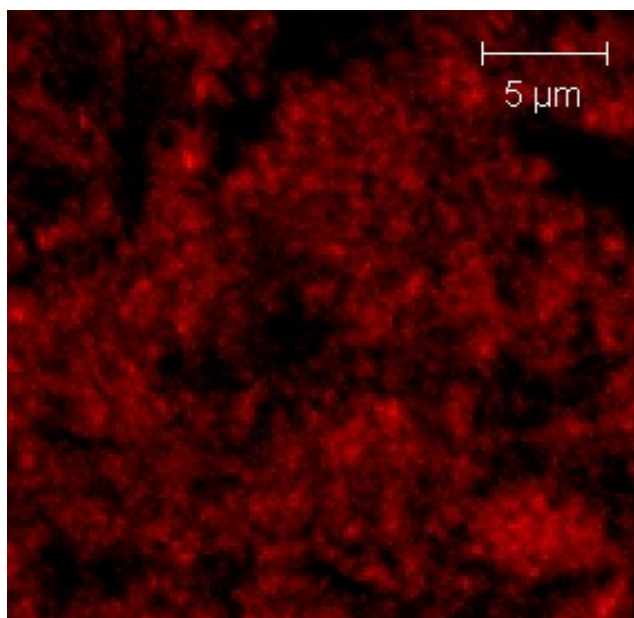


Figura 6.5.5. Micrografías por MCF del sistema (iv) a base de Tween 80-Span 90:10 DPPC-Col 100:0.

Las micrografía del sistema (v), muestra, al igual que todos los sistemas previos, partículas emulsificadas, donde el DPPC se encuentra estructurando bicapas, las cuales deben estar presentando sobre todo Tween 80 intercalado, a bajas proporciones, por ello el patrón calorimétrico (Figura 6.5.2), estaría representando la estructura obtenida en este sistema.

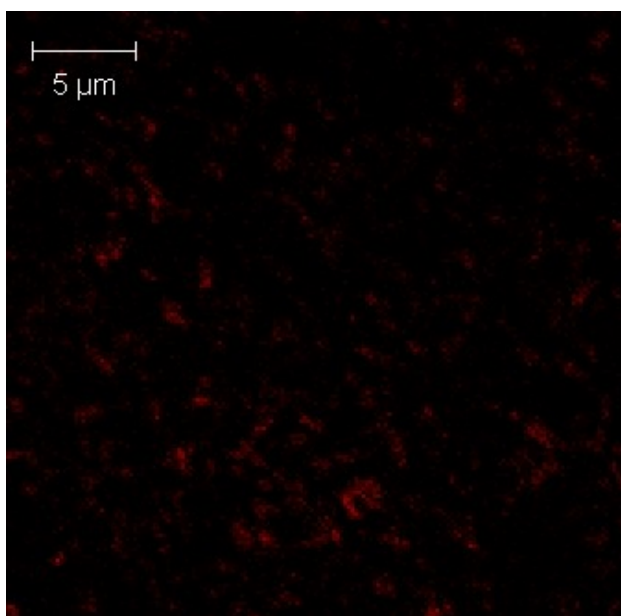


Figura 6.5.6. Micrografías por MCF del sistema (v) a base de Tween 80-Span 80:20 DPPC-Col 100:0.

La Figura 6.5.7, muestra dos micrografías MCF del sistema (vi); se observan dos tipos de estructuras, unas muy semejantes a estructuras liposomales (Figura 6.5.7 vi-RhB), resultados similares a los reportados en un trabajo previo [Subgonkot *et al.*, 2013]. La otra estructura es de una partícula similar a la que se observó en los sistemas previos, totalmente hidrófoba pero de diámetro promedio mayor. EL empleo de un fluoróforo hidrofílico en el mismo sistema, puso de manifiesto que en efecto hay estructuras con un interior acuoso circundado por una bicapa de fosfolípidos (Figura 6.5.7 vi-NaFi), es decir, liposomas. el sistema vi presenta tanto Lipomic (Figura 6.5.2) como liposomas.

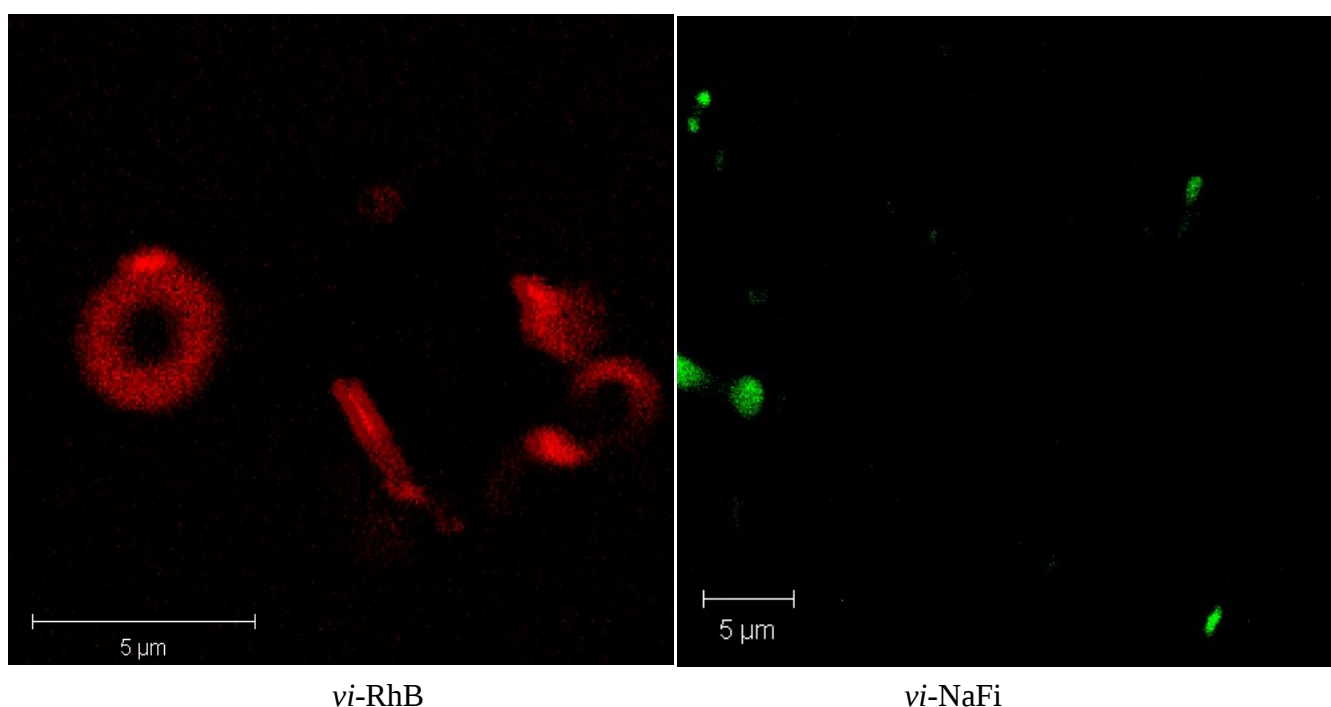


Figura 6.5.7. Micrografías por MCF del sistema (vi), ambas imágenes corresponden al mismo sistema, vi-RhB se obtuvo por marcado de la suspensión con RhB y vi-NaFi por marcado con NaFi, se observa la morfología de las estructuras hidrófobas y del interior acuoso de las liposomales.

Una micrografía adicional del sistema (vi), se muestra en la Figura 6.5.8, se observa un campo más amplio que los de la Figura 6.5.7, sigue siendo constante la presencia de estructuras totalmente hidrófobas y de liposomas.

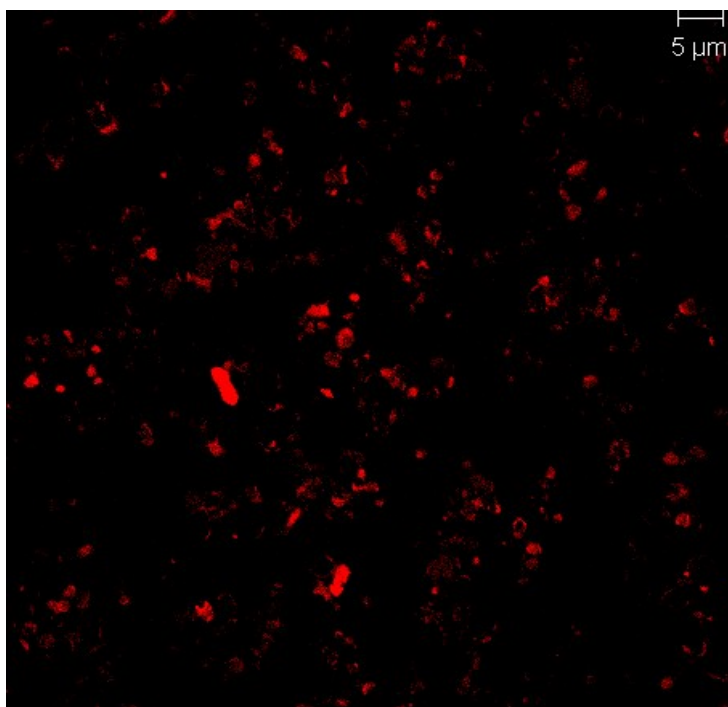


Figura 6.5.8. Micrografía MCF complementaria del sistema (vi).

A continuación, se muestra la micrografía MCF de sistema (vii).

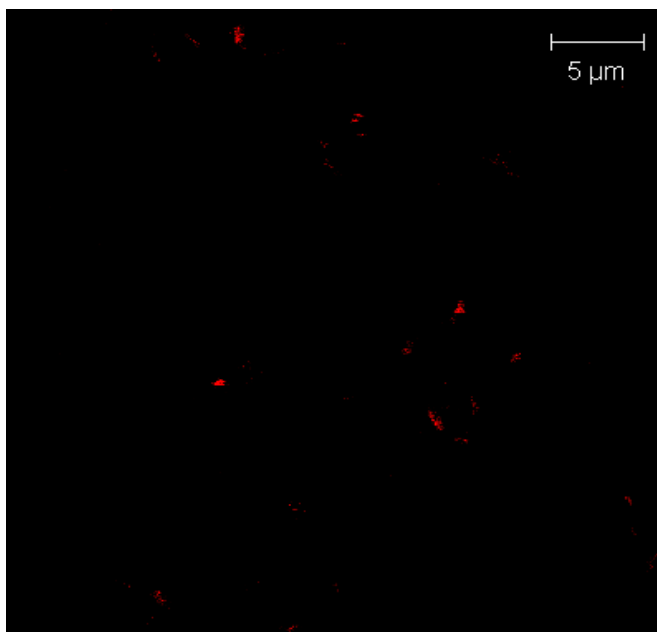


Figura 6.5.9. Se aprecian las estructuras hidrófobas del sistema (vii).

Las micrografía de la Figura 6.5.9, muestra la presencia en el sistema de partículas de emulsificación, la mayoría de tamaños pequeños, ya los estudios de tamaño mostraron que en el sistema hay partículas mayores a 250 nm.

A continuación, se muestran tres micrografías MCF obtenidas de un punto de la misma trayectoria del sistema (vii) con menor proporción de DPPC (Figura 6.5.10). La composición del medio fue Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 95:5 en porcentajes respectivos de 3.29%w/w y 2.25%w/w, o en relación molar de 28:7:40:4 de Tween 80/Span 80/DPPC/Col, el tiempo de estabilidad aproximado fue de 13 días y el tamaño promedio de las partículas fue 250nm. Se observan en las tres imágenes a-c, partículas de emulsificación de morfologías diversas y algunos liposomas, uno de los campos observados muestra al parecer un proceso de fusión (Figura 6.5.10 c), posiblemente la diferencia de tamaños y naturaleza estructural de las partículas, favorezca su fusión y por ello este sistema que llamaremos (vii_a), no supera los 13 días como suspensión estable.

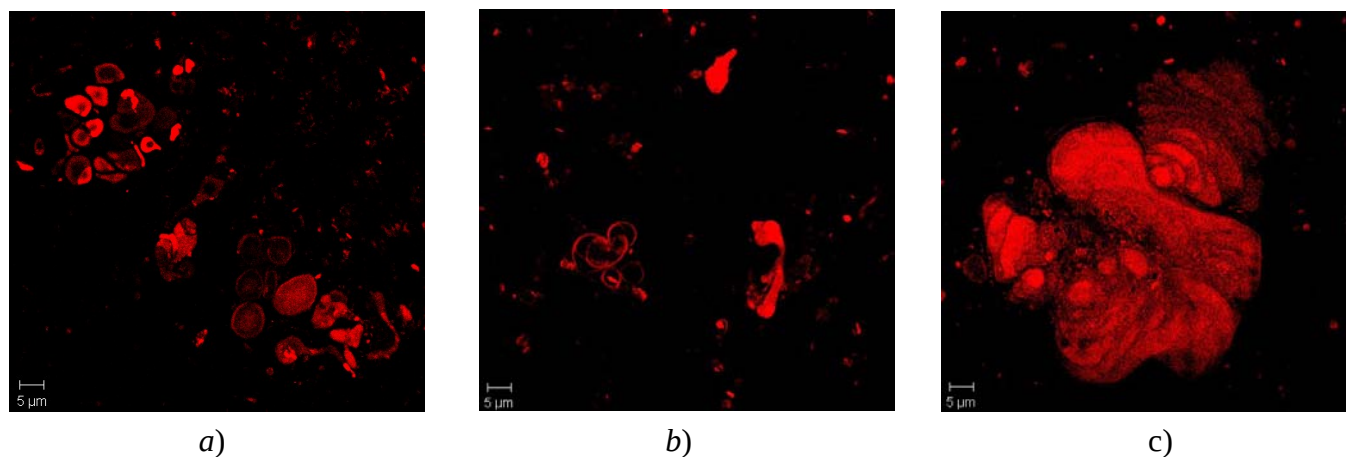


Figura 6.5.10. Micrografías por MCF del sistema (vii), las imágenes corresponden al mismo sistema pero diferentes campos.

La Figura 6.5.11, muestra la micrografía correspondiente al sistema (viii).

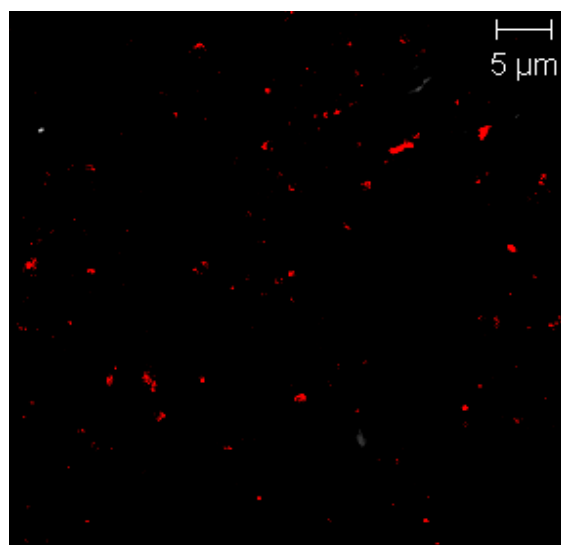


Figura 6.5.11. Imagen por MCF del sistema (viii). Se observan partículas totalmente hidrófobas.

Las micrografía del último sistema estable muestra a la partícula que hemos denominado Lipomic, por ello la emisión de fluorescencia en toda la estructura. Los estudios CDB ya habían mostrado que el ordenamiento del DPPC en todos los sistemas era similar, las micrografías MCF sólo han confirmado que la partícula obtenida mediante la nueva propuesta experimental es estructuralmente nueva.

Todas las imagenes MCF, han revelado que la partícula denominada como Lipomic, alojó al RhB en toda su estructura, si el DPPC forma bicapas, según los estudios calorimétricos, esto apoya que la nueva estructura consta de un nucleo micelar mixto rodeado por al menos una bicapa de DPPC, Figura 6.5.2.

6.6 Estudios de Microscopía electrónica y de fuerza atómica

A continuación, se muestran los resultados de las micrografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido (MEB) y Microscopía de fuerza atómica (MFA), sólomente para el sistema (vi) fueron obtenidas micrografías de las dos técnicas (vi-MEB y vi-MFA). La Figura 6.6.1 corresponde a los sistemas (i) y (ii), la 6.6.2 a los sistemas (iii) y (iv), la Figura 6.6.3 muestra los sistemas (v) y la imagen vi-MEB, la 6.6.4 muestra la imagen vi-MFA y el sistema (vii), finalmente la Figura 6.6.5 muestra el sistema (viii).

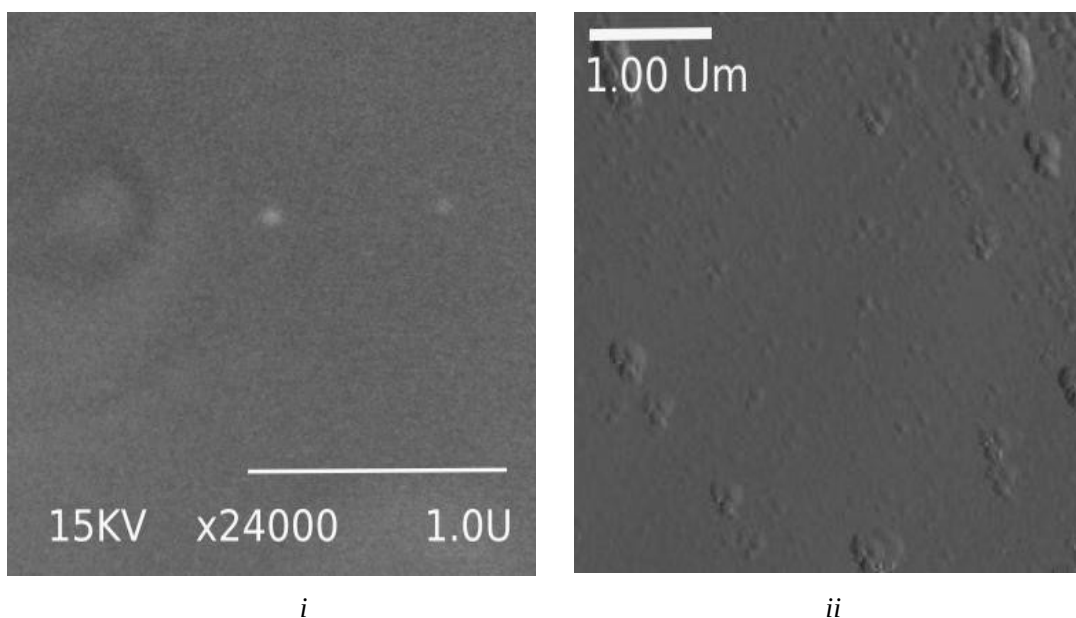
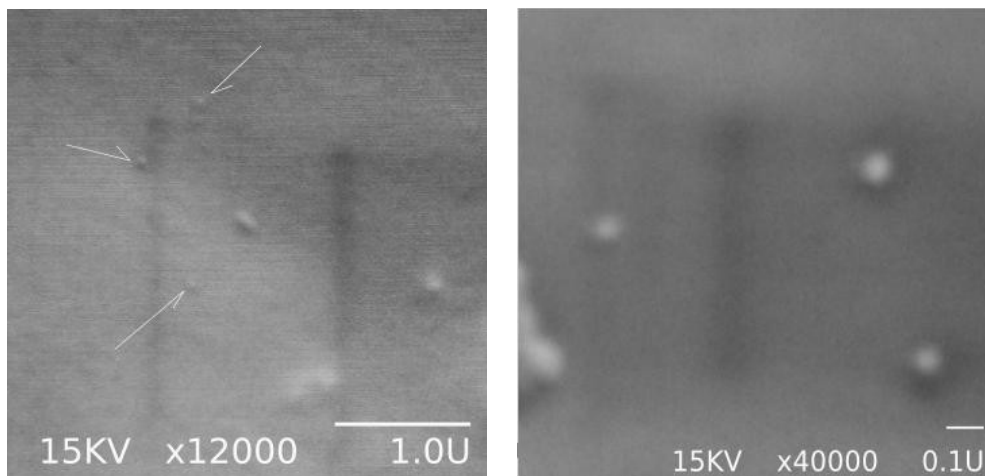


Figura 6.6.1, micrografía MEB del sistema (i) y micrografía MFA del sistema (ii).

La Figura 6.6.1 muestra la morfología esférica de las estructuras (i) y (ii); el tamaño promedio de éstas coincide con los datos obtenidos por DDL, en ambos sistemas las estructuras no fueron mayores a los 100 nm (Tabla 3).

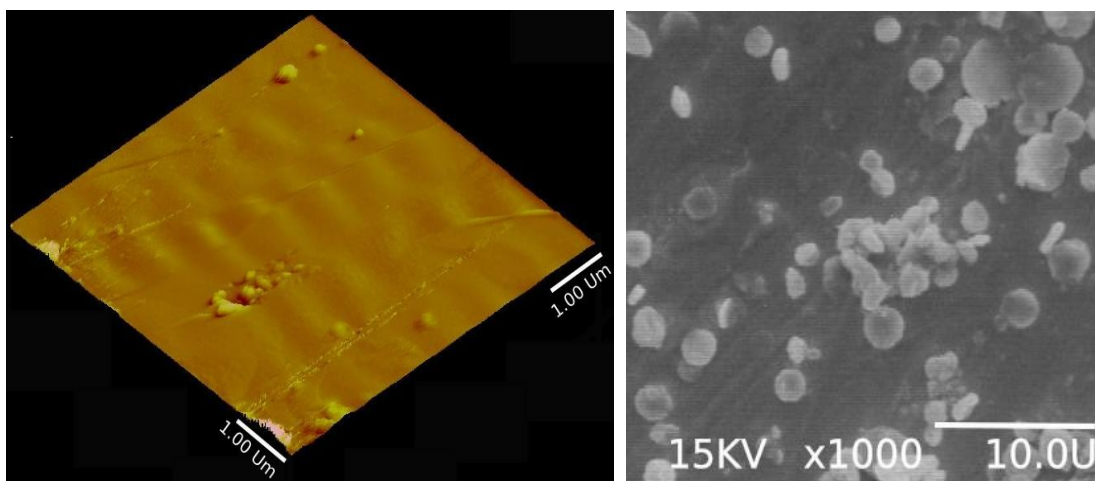


(iii)

(iv)

Figura 6.6.2, Micrografías MEB de los sistemas (iii) y (iv). Las flechas señalan algunas estructuras.

En la Figura 6.6.2 se aprecian las estructuras esféricas de los sistemas (iii) y (iv). El tamaño de partícula coincide con el tamaño medido mediante DDL, tal cual se observó en los dos sistemas previos.



(v)

vi-MEB

Figura 6.6.3, Micrografía MFA del sistema (v) y micrografía MEB del sistema (vi).

La Figura 6.6.3, muestra las estructuras del sistema (v) por MFA; se observa la morfología esférica y su tamaño, mayor que para las estructuras de los sistemas previos y alrededor de 1/4 de micra; respecto al sistema (vi), se observan dos tipos de estructuras, unas esféricas y otras alargadas, coincide este patrón con la imagen obtenida por MCF (Figura 6.5.7), así mismo, hay correspondencia entre el tamaño estimado por MEB y los datos de DDL y MCF.

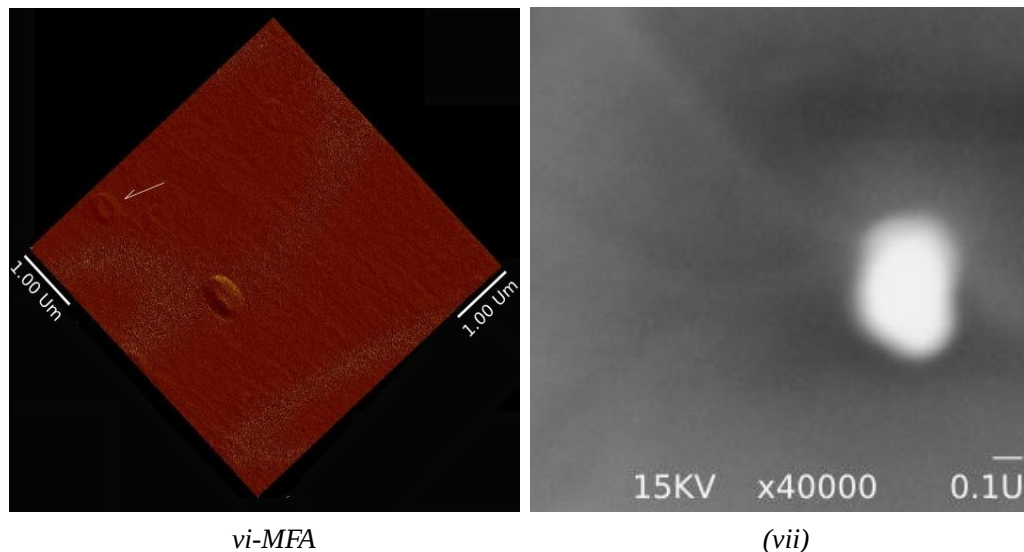


Figura 6.6.4, Micrografía MFA del sistema (vi) y micrografía MEB del sistema (vii). La flecha señala una estructura liposomal apenas visible.

La Figura 6.6.4 muestra un patrón de MFA típico para un liposoma, esto confirma la presencia de estas estructuras en el sistema (vi). La micrografía MEB del sistema (vii), muestra una de las estructuras presentes con morfología poco esférica igual a la que se observa en la imagen de MCF, coincide el tamaño mayor a los 200 nm (Tabla 3).

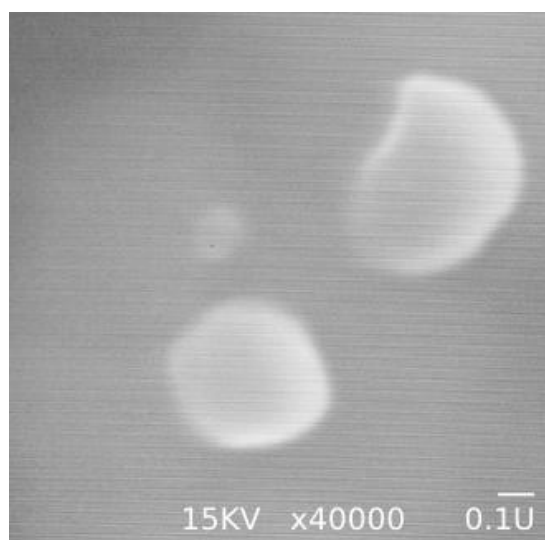


Figura 6.6.5, micrografía MEB del sistema (viii).

La micrografía MEB del sistema (viii) muestra estructuras esferoides de más de 300 nm. Todas las microscopías MEB o MFA sirvieron para mostrar la morfología de las partículas de los ocho sistemas estables, además para verificar el tamaño que se estimó con DLS.

6.7 Resumen de análisis de resultados

La distribución que presenta el DPPC en las estructuras obtenidas (Lipomic) es en una bicapa, similar al de las estructuras liposomales. Los termogramas de las Figuras 6.4.1-6.4.10 muestran el pico calorimétrico de la transición de la fase conocida como P_{β} a la fase L_{α} [Pentak, 2014], pero no presentan la pretransición que todo termograma de una bicapa a base de DPPC muestra; esto implica que las bicapas de los Lipomic llegan a presentar algunos monómeros de tensoactivo intercalado provocando que haya zonas asimétricas en la bicapa, se sabe que éstas dan la apariencia a la zona de ondulaciones, de hecho, el colesterol promueve también "dominios" mucho más ordenados en la bicapa y esto afecta la pretransición [Cevc et al, 1991; Malcolmson *et al.*, 1997; Nordén *et al.*, 2001; Pentak, 2014]. Todos los termogramas, excepto el del sistema (iii), mostraron un cambio en el perfil calorimétrico en el segundo y tercer barrido, aunque el tercero fue prácticamente el mismo que el segundo, esto sugiere que el calor promueve un reacomodo de la bicapa, así mismo, el ancho del pico calorimétrico (función de la cantidad de bicapas, entre menor número de éstas el pico es más ancho), corresponde a multicapas [Belsito *et al.*, 2005; Kresheck & Mihelich, 2003; Panicker, 2007], el sistema (iv) debe ser el de mayor número de bicapas de DPPC. La emisión de fluorescencia en toda la estructura de la partícula, implica que el fosfolípido fluoromarcado, está formando una micela mixta al interior de la estructura, lugar apto para construirse a partir de monómeros cónicos como el Tween-Span (curvatura positiva) [Heerklotz & Epanand, 2001; Jespersen *et al.*, 2012; Lähdesmäki *et al.*, 2010]; rodeando este núcleo, se encuentra al menos una bicapa de DPPC, entorno con menor curvatura favorecido por monómeros cilíndricos. El colesterol posiblemente es alojado en la bicapa, pues esta zona es espacialmente más apta que el centro micelar mixto; quizá por ello nunca se vio una relación directa entre la cantidad de Tween-Span y colesterol. Los valores de T_m de todos los termogramas mostraron diferencias con respecto a la T_m de una bicapa de DPPC puro, por ello éstas en el sistema desarrollado no están constituidas sólo por fosfolípido, eventualmente alojan cantidades mínimas de Colesterol y Tween; el Span debido a su hidrofobicidad, posiblemente no lo esté pues la bicapa le favorece un efecto hidrófobo constante, mientras el núcleo micelar mixto no. El sistema (vi), con presencia de dos estructuras, mostró sólo un pico en su termograma, esto es indicio de que ambas partículas, una con un núcleo hidrófobo y la otra con uno acuoso, presentan prácticamente la misma composición en su bicapa de DPPC, de lo contrario, se habría visto más de un pico en el termograma, este dato apoya el hecho de que el núcleo se constituye preferentemente de Tween-Span y la bicapa sólo llega a alojar algunos monómeros. Los sistemas con partículas menores a 100 nm podrían presentar propiedades farmacéuticas interesantes debido a que la inmunogenicidad en torno a una estructura de transporte de fármacos, se incrementa con el tamaño [Chandan *et al.*, 2010].

7
Conclusiones

1. Mediante estudios de equilibrio de fases, fue posible diseñar trayectorias que permitieron la obtención de una nueva generación de estructuras nanométricas con posible uso en el campo farmacéutico. Dipalmitoil fosfatidilcolina y Colesterol fueron empleados en la obtención de la estructura denominada Lipomic mediante un método reproducible a partir de estados de equilibrio de baja aleatoriedad correspondientes a sistemas micelares cercanos al punto de enturbiamiento.

2. Se obtuvo una estructura nueva, constituida por un núcleo micelar mixto a base de Tween-Span, rodeado por al menos una bicapa de Dipalmitoil fosfatidilcolina; esta estructura podría ser un vehículo de transporte de fármacos de naturaleza hidrofóbica; dependiendo de la composición del sistema, es posible obtener pequeñas partículas coloidales similares a las de una microemulsión (sistemas *i-iii*) o partículas mayores, incluyendo liposomas (sistema *vi*).

3. En este trabajo fue posible obtener estructuras nanométricas sin el empleo de disolventes orgánicos (una meta de la química verde) y sin métodos mecánicos como la extrusión o cualquier otro proceso semejante. La obtención de liposomas o emulsiones, sistemas semejantes a los obtenidos, se dan mediante el empleo de disolventes orgánicos y métodos mecánicos para dotarlos, en promedio, del mismo tamaño de partícula.

Índice de Figuras

2.1.1 Esquema que muestra la zona interfásica ubicada entre las fases α y β	pag. 14
2.1.3.1 Coeficientes de actividad experimentales a 25°C para Metanol y NaCl en agua	pag. 19
2.1.4.1 Curva típica de π vs x	pag. 20
2.1.4.2 Comportamiento típico de la curva de π vs $\ln x$	pag. 21
2.2.1 Interfase curva que separa las fases α y β	pag. 25
2.2.2 Superficie curva no esférica	pag. 26
3.1.1 Estructura del Dodecil (éster) sulfato de sodio	pag. 28
3.1.1.1 Esquema general del sistema vapor-agua-tensoactivo	pag. 29
3.1.2.1 Estructura molecular del sorbitol	pag. 29
3.1.2.2 Estructuras de los ésteres de sorbitán (20) polietoxilados	pag. 30
3.1.2.3 Moléculas de Sorbitán	pag. 31
3.1.2.4 Ésteres de Sorbitán derivados del ácido láurico	pag. 31
3.2.1.1 Diagrama binario de equilibrio de fases del tensoactivo $C_{12}E_6$	pag. 32
3.2.1.2 Diagrama binario ilustrativo	pag. 32
3.2.1.3 Organización supramolecular de los monómeros de un tensoactivo.....	pag. 33
3.2.2.1 Diagrama ternario de equilibrio	pag. 33
4.1.1.1 Emulsiones O/W y W/O	pag. 36
4.1.1.2 Efecto Young-laplace	pag. 37
4.1.1.3 Micrografías de fluorescencia de tres emulsiones a base de fosfolípidos	pag. 38
4.1.1.4 Termogramas obtenidos por CDB de dos emulsiones a base de fosfolípidos	pag. 39
4.1.2.1 Estructura liposomal	pag. 39
4.1.2.2 Estructura química del 1-2 Dipalmitoyl-sn-glicero-3-fosfoetanolamina	pag. 40
4.1.2.3 Esquema que muestra la conformación espacial de un tensoactivo	pag. 40
4.1.2.4 Esquema comparativo de un tensoactivo y un fosfolípido	pag. 41
4.1.2.5 Micrografías electrónicas por ESEM de una formulación liposomal	pag. 41
4.1.2.6 Micrografías MCF y MFA	pag. 42

4.1.2.7 Termogramas del sistema DPPC/2000PEG-DPPE/DPPG/Paclitaxel	pag. 42
4.1.3.1 Esquema de la organización de los Fosfolípidos y tensoactivos en una micela mixta	pag. 43
4.1.3.2 Termogramas del sistema DMPC/APO 12	pag. 43
4.1.3.3 Esquema que muestra los dos tipos de curvatura de una estructura de asociación	pag. 44
5.1.1 Diagrama ternario de equilibrio de Agua/Tween-Span/DPPC-Col acoplado al binario de equilibrio de temperatura vs Composición	pag. 46
5.2.1 Esquema del equipo de tensiometría empleado	pag. 47
5.4.1 Diagrama binario de equilibrio del tensoactivo etoxilado de elección	pag. 48
6.1.1 Curva de π vs $\ln x_{\text{tween}}$ para tween 20	pag. 51
6.1.2 Curva de π vs $\ln x_{\text{tween}}$ para tween 80	pag. 51
6.1.3 Curva de π vs x_{tween20} ($x_{\text{Tween20}} \leq 1.2 \times 10^{-6}$)	pag. 52
6.1.4 Curva de π vs x_{tween80} ($x_{\text{Tween20}} \leq 1 \times 10^{-6}$)	pag. 52
6.2.1 Diagrama binario de equilibrio de Tween 20 y Tween 80	pag. 53
6.3.1.1 Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 20-Span 20 80:20 y DPPC-Col 100:0 y curva de estabilidad correspondiente	pag. 54
6.3.2.1 Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 80-SPAN 80 100:0 y DPPC-Col 100:0 y la curva de estabilidad correspondiente	pag. 55
6.3.2.2 Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 80-SPAN 80 100:0 y DPPC-Col 100:0 y la curva de estabilidad correspondiente	pag. 55
6.3.2.3 Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 80-SPAN 80 80:20 y DPPC-Col 100:0 y curva de estabilidad	pag. 56
6.3.2.4 Diagrama pseudo ternarios para el sistema Tween 80-SPAN 80 80:20 y DPPC-Col 95:5 y curva de estabilidad	pag. 56
6.4.1 Termograma obtenido para el sistema (i) a base de Tween 20-Span 20 80:20 y DPPC-Col 100:0 ...	pag. 58
6.4.2 Termograma obtenido para el sistema (ii) a base de Tween 20-Span 20 80:20 y DPPC-Col 100:0 ..	pag. 59
6.4.3 Termograma obtenido para el sistema (iii) a base de Tween 80-Span 80 100:0 y DPPC-Col 100:0 .	pag. 60
6.4.4 Termograma obtenido para el sistema (iv) a base de Tween 80-Span 80 90:10 y DPPC-Col 100:0 .	pag. 60
6.4.5 Termograma obtenido para el sistema (iv _a) a base de Tween 80-Span 80 90:10 y DPPC-Col 100:0	pag. 61

6.4.6 Termograma del sistema (v) a base de Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 100:0	pag 62
6.4.7 Termograma obtenido para el sistema (vi) a base de Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 95:5 ..	pag 62
6.4.8 Termograma obtenido para el sistema (vii) a base de Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 95:5 .	pag 63
6.4.9 Termograma obtenido para el sistema (viii) a base de Tween 80-Span 80 80:20 y DPPC-Col 95:5	pag 64
6.5.1 Micrografía por MCF del sistema (i) a base de Tween 20-Span 20 80:20 y DPPC-Col 100:0	pag 65
6.5.2 Representación de la partícula que se ha denominado como Lipomic	pag 65
6.5.3 Micrografía por MCF de la muestra (ii)	pag. 66
6.5.4 Micrografía por MCF del sistema (iii)	pag. 66
6.5.5 Micrografías por MCF del sistema (iv)	pag. 67
6.5.6 Micrografías por MCF del sistema (v)	pag. 67
6.5.7 Micrografías por MCF del sistema (vi)	pag. 68
6.5.8 Micrografía MCF complementaria del sistema (vi)	pag. 69
6.5.9 Se aprecian las estructuras hidrófobas del sistema (vii)	pag. 69
6.5.10 Micrografías por MCF del sistema (vii _a)	pag. 70
6.5.11 Imagen por MCF del sistema (viii)	pag. 70
6.6.1 Micrografia MEB del sistema (i) y micrografía MFA del sistema (ii)	pag. 71
6.6.2 Micrografías MEB de los sistemas (iii) y (iv)	pag. 72
6.6.3 Micrografia MFA del sistema (v) y micrografía MEB del sistema (vi)	pag. 72
6.6.4 Micrografia MFA del sistema (vi) y micrografía MEB del sistema (vii)	pag. 73
6.6.5 Micrografia MEB del sistema (viii)	pag. 73

Índice de Abreviaturas

Hispanas

Área Superficial	A
Actividad	a_i
Calorimetría diferencial de barrido	CDB
Concentración micelar crítica	cmc
Colesterol	Col
Punto de enturbiamiento	cp
Capacidad calorífica a presión constante	C_p
Parámetro crítico de empaquetamiento	c_{pp}
Dispersión dinámica de luz	DDL
Cambio de energía interfasial de exceso	dE
Cambio en la entalpía en un proceso	dH
Cambio en los mol de tensoactivo adsorbido en la interfase	dn^*_i
1,2 Dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina	DPPC
Cambio en el calor de un sistema	dq
Cambio en la Entropía de un sistema	dS
Cambio en la Energía interna de un sistema.....	dU
Energía libre de Helmholtz	F
Energía Libre de Gibbs	G
Entalpía	H
Microscopía confocal de fluorescencia	MCF
Microscopía electrónica de barrido	MEB
Microscopía de fuerza atómica	MFA
Liposomas multicapas	MLV
Fluoresceína de sodio	NaFi
Presión	P
Constante universal delos gases	R
1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-N-(sulfonil de lisamina rodamina B) (sal de amonio)	RhB
Temperatura	T
Temperatura crítica de solubilidad inferior	TCSI
Temperatura de transición principal.....	T_m
Temperatura de transición	T_T
Energía interna absoluta de superficie	U^*
Liposomas unicapas	ULV
Volumen interfasial	V^*
Volumen molar parcial	\bar{V}_i
Fracción mol de la especie con actividad superficial	x_i

Griegas

Coficiemte de actividad iésimo	γ_i
Concentración superficial de tensoactivo	Γ
Cobertura	θ
Potencial químico de fase volumétrica o de bulto	μ_i^b
Potencial químico de superficie	μ_i^*
Presión de superficie	π
Tensión superficial	σ
Tensión interfasial aceite-agua	$\sigma_{o/w}$

Índice de Tablas

Tabla 1. Potenciales termodinámicos básicos	página 12
Tabla 2. Ésteres de sorbitan y su valor de HLB	página 30
Tabla 3. Ésteres de sorbitán polietoxilados y su valor de HLB	página 30
Tabla 4. Parámetros superficiales para Tween 20 y Tween 80	página 52
Tabla 5. Temperaturas críticas de solubilidad inferior experimentales.....	página 53
Tabla 6. Sistemas sometidos a estudios instrumentales	página 57

Bibliografía

- Ambrosini A., Bossi G., et al. (1998). *Lipid-drug interaction: thermodynamic and structural effects of antimicrobial fluconazole on DPPC liposomes*. Chemistry and Physics of lipids. 95:37-47.
- Atwood D. (2008). *Physical Pharmacy* (edición 1). Gran Bretaña: Pharmaceutical press. pp 43-62.
- Baehr H. D. (1965). *Tratado Moderno de Termodinámica*. (s/n). España: José Montesó editor. pp 18-213.
- Basu S.C., Basu M. (2010). *Liposome, Methods and Protocols. Serie: Methods in Molecular Biology*. Volumen 199. (s/n). Estados Unidos: Human Press. pp. 3-16.
- Beard E. A. (2008). *Chemical Biophysics*. (s/n). E.U.A.: Cambridge. pp 7-17.
- Belsito S., Bartucci Rosa., et al. (2005). *Paclitaxel interaction with phospholipid bilayers: high-sensitivity differential scanning calorimetric study*. Thermochimica Acta. 427:175–180.
- Ben-Naim A. (1980). *Hydrophobic Interactions*. (s/n). E.U.A.: Plenum Press. pp 6-46.
- Ben-Naim A. (2006). *Molecular theory of solutions*. (s/n). Reino Unido: Oxford University Press. pp 85-155.
- Bermúdez-Salguero, Gracia-Fadrique J. (2011). *Analysis of Gibbs adsorption equation and thermodynamic relation between Gibbs standard energies of adsorption and micellization through a surface equation of state*. Journal of Colloid and Interface Science. 355:518-519.
- Biltonen R., Lichtenberg D. (1993). *The use of differential scanning calorimetry as a tool to characterize liposome preparations*. Chemistry and Physics of Lipids, 64:129-142.
- Birdi K.S. (2010). *Surface and Colloid Chemistry*. (s/n). E.U.A.: CRC Press. pp 1-18, 39-68.
- Butt H., Graf K. (2003). *Physics and Chemistry of Interfaces*. (s/n). Alemania: Wiley-VCH. pp 1-7, 26-37, 246-272, 280-282.
- Carbone C., Campisi A., et al. (2014). *FA-loaded lipid drug delivery systems: Preparation, characterization and biological studies*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 52:12–20.
- Cevc G., et al. *Polymorphism of the bilayer membranes in the ordered phase and the molecular origin of the lipid pretransition and rippled lamellae*. Biochimica et biophysica acta. 1062:59-69.
- Chandan T., Gupta V., et al. (2010). *Particle size Influences the Immune Response Produced by Hepatitis B Vaccine Formulated in Inhalable Particles*. Pharmaceutical Research. 27:905-919.
- Chen M., Soda Y., et al. (2013). *A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials*. International Journal of Pharmaceutics 454:478–485.
- Chi-Feng H., Chia-Lang F., et al. (2007). *The effect of oil components on the physicochemical properties and drug delivery of emulsions: Tocol emulsion versus lipid emulsion*. International Journal of Pharmaceutics. 335:193–202.
- Connors K.A. (2002). *Thermodynamics of pharmaceuticals systems*. (s/n). Estados Unidos: John Wiley & Sons Inc. pp 17-49, 135-147.
- De Smet Y., Deriemaeker L. (1999). *On the Determination of Ostwald Ripening Rates from Dynamic Light Scattering Measurements*. Langmuir. 15:2327-2332.

- Florence A.T., Atwood D. (2006). *Physicochemical Principles of Pharmacy*. (4a ed.). Reino Unido: Pharmaceutical Press. pp 177-185, 202-254.
- Folmer B. M. (2003). *Sterol surfactants: from synthesis to applications*. *Advances in Colloid and Interface Science*. 103:99-119.
- Funari S. S., Nuscher B., et al. (2001). *Detergent-phospholipid mixed micelles with a crystalline phospholipid core*. *PNAS* 98(16): 8938-8943.
- Gabizón A. (2001). *Stealth liposomes and tumor targeting: One step further in the quest for the magic bullet*. *Clinical Cancer Research*. 7:223-225.
- Gracia-Fadrique J., Brocos P., et al. (2002). *Activity Coefficients at Infinite Dilution from Surface Tension Data*. *Langmuir*. 18:3604-3608.
- Harkins W. D., Jordan H. F. (1930). *A Method for the determination of surface and interfacial tension from the maximum pull on a ring*. *Journal of the American chemical society*. 52:1751-1771.
- Heerklotz H., Epanand R.M. (2001). *The Enthalpy of acyl chain packing and the apparent water-accessible apolar surface area of phospholipids*. *Biophys. J*. 80:271-279.
- Hernández-Baltazar E., Gracia-Fadrique J. (2005). *Elliptic solution to the Young–Laplace differential equation*. *Journal of Colloid and Interface Science*. 287:213-216.
- Hiemenz C. P. (1997). *Principles of Colloid and surface chemistry*. (edición 3) E.U.A.:Marcel Dekker Inc. pp 255-265, 355-444.
- Hillert M. (2007). *Phase Equilibria, phase diagrams, and phase transformation*. (s/n). Reino Unido: Cambridge University Press. pp 1-80.
- Howell J.R., Buckius R.O. (1990). *Principios de Termodinámica para Ingenieros*. (Edición 1). México: McGraw Hill. pp 33-68, 118-207, 438-485, 524-548.
- Ishii F., Nagasaka Y. (2004). *Interaction between erythrocytes and free phospholipids as an emulsifying agent in fat emulsions or drug carrier emulsions for intravenous injections*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 37:43–47.
- Ishii F., Nii T. (2005). *Properties of various phospholipid mixtures as emulsifiers or dispersing agents in nanoparticle drug carrier preparations*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 41:257–262.
- Jespersen H., Andersen J. H., et al. (2012). *Lipids, curvature stress, and the action of lipid prodrugs: Free fatty acids and lysolipid enhancement of drug transport across liposomal membranes*. *Biochimie* 94:2-10.
- Jing X., Deng L., et al. (2014). *A novel polyethylene glycol mediated lipid nanoemulsion as drug delivery carrier for paclitaxel*. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. 10:371 – 380.
- Juárez C. (2006). *Elaboración y caracterización de nanoesferas lipídicas cargadas con cis-Diaminodicloroplatino(II) y marcadas con núcleos radioactivos de Indio-111 con potencial como sistema de quimio-radiación en tratamiento de cáncer*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 19-29, 37-39.

Jumaa M., Kleinebudde P., et al. (1999). *Physicochemical properties and hemolytic effect of different lipid emulsion formulations using a mixture of emulsifiers*. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*. 73:293–301.

Kieu T., Hoang N., et al. (2002). *Ostwald Ripening of Alkane in Water Emulsions Stabilized by Polyoxyethylene (20) Sorbitan Monolaurate*. *Langmuir*. 18:1485-1489.

Kim C. (2004). *Advanced Pharmaceutics, Physicochemical principles*. (s/n). Estados Unidos: CRC Press. pp 12-41, 44- 207, 220-241.

Kooijman E.E., Chupin V., et al. (2003). *Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid*. *Traffic*. 4:162-174.

Koojiman E.E., Chupin V., et al. (2005). *Spontaneous Curvature of Phosphatidic Acid and Lysophosphatidic Acid*. *Biochemistry*. 44:2097-2102.

Kothekar S. C., Ware A. M., et al. (2007). *Comparative Analysis of the Properties of Tween-20, Tween-60, Tween-80, Arlacel-60, and Arlacel-80*. *Journal of Dispersion Science and Technology*. 28:477-484.

Kresheck G., Mihelich J. (2003). *Observation of complex thermal transitions for mixed micelle solutions containing alkyldimethylphosphine oxides and phospholipids and the accompanying cloud points*. *Chemistry and Physics of Lipids*. 123:45-62.

Lähdesmäki K., et al. (2010). *Membrane simulations mimicking acidic pH reveal increased thickness and negative curvature in a bilayer consisting of lysophosphatidylcholines and free fatty acids*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1798:938–946.

Laughlin R.L (1994). *The aqueous phase behaviour of Surfactants*. (s/n). E.U.A.: Academic Press. pp 13-51, 66-102, 117-137.

Lechuga M.M. (2005). *Biodegradación y Toxicidad de Tensioactivos comerciales*. Tesis de Doctorado. Universidad de Granada. España. pp 28-40, 51-89, 110-115, 122-125.

Levine I. N. (2004). *Fisicoquímica Vol. 1*. (edición 5). España: Mc Graw Hill. pp 61-90- ,475-483.

Li Y., Jin W., et al. (2013). *Development of intravenous lipid emulsion of vinorelbine based on drug-phospholipid complex technique*. *International Journal of Pharmaceutics*. 454:472-477.

Liang H., Yang Q., et al. (2011). *Phospholipid–Tween 80 mixed micelles as an intravenous delivery carrier for paclitaxel*. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 37(5): 597–605.

Malcolmson R.J., et al. (1997). *DSC of DMPC liposomes containing low concentrations of cholesteryl esters or cholesterol*. *Journal of membrane science*. 123:243-253.

Martin A. (1993). *Physical Pharmacy: Physical Chemical Principles in the Pharmaceutical Sciences* (edición 4). E.U.A.: Lea & Febiger. pp 54-77, 355-386.

Martínez C.J. (2016). *Caracterización fisicoquímica de la nanoencapsulación de ibuprofeno en vesículas mixtas de Liposomas de L-alfa-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) y N-nonil-beta-D-glucopiranosido (NGP)*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 29-63.

Moroi Y. (1992). *Micelles, Theoretical and Applied Aspects* (s/n). E.U.A.: Plenum Press. pp 1-8, 41-47, 97-103, 149-167.

- Mukherjee P., Padhan S. K. (2011). *Clouding behaviour in surfactant systems*. Advances in Colloid and Interface Science. 162:59–79.
- Müller I. A (2006). *History of Thermodynamics*. (s/n). Alemania: Springer. pp 9-32.
- Nordén T. P., Siekmann B., et al. (2001). *Physicochemical characterization of a drug-containing phospholipid-stabilised o/w emulsion for intravenous administration*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 13:393-401.
- Novelo-Torres M., Gracia-Fadrique J. (2003). *Idealidad en Superficies Fluidas*. Educación Química. 14(4):220-224.
- Novelo-Torres M., Gracia-Fadrique J. (2005). *Concentración micelar crítica mediante la ecuación de adsorción de Gibbs*. Educación Química. 16(1):63-67.
- Olvera E. (2008). *Identificación de Fuerzas Intermoleculares en la Interfase mediante Ecuaciones de Langmuir*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 1-29.
- Otten D., Löbbecke L., et al. (1995). *Stages of the Bilayer-Micelle Transition in the System Phosphatidylcholine-C12E8 as studied by Deuterium- and Phosphorous-NMR, Light Scattering, and Calorimetry*. Biophysical Journal. 68:584-597.
- Pardo-Cervantes A., Viades Trejo J., et al. (2011). *Activity Coefficients at Infinite Dilution and Critical Micelle Concentrations of Poly(oxy-1,2-ethanedyl), α -Tridecyl- ω -hydroxy Ethers ($C_{13}E_{i=6,10,18}$) in Aqueous Media by the Volmer Surface Equation of State and Group Contributions*. J. Chem. Eng. Data. 56:2812–2817.
- Panicker L. (2007). *Interaction of propyl paraben with dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer: A differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance study*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 61:145–152.
- Pentak D. (2014). *Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC*. Termochimica Acta. 584:36-44.
- Pentak D. (2014). *Physicochemical properties of liposomes as potential anticancer drugs carriers. Interaction of etoposide and cytarabine with the membrane: Spectroscopic studies*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 122:451–460.
- Peterson T., Siekmann B. (2001). *Physicochemical characterisation of a drug-containing phospholipid-stabilised o/w emulsion for intravenous administration*. European Journal of Pharmaceutical Sciences 13:393–401.
- Prausnitz J. M., Gomez de Acevedo E., et al. (2000). *Termodinámica molecular de los equilibrios de fases*. (s/n). España. pp 175-189.
- Prigogine I., Defay R. (1954). *Chemical Thermodynamics*. (s/n). Inglaterra: Longmans Green and Co Ltd. pp 1-9, 20-27, 32-40, 71-92, 174-186.
- Puskás I. Csempez F. (2007). *Influence of cyclodextrins on the physical stability of DPPC-liposomes*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 58:218–224.
- Rangel C. O., Pessoa A., et al. (2005). *Micellar solubilization of drugs*. Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 8(2):147-163.

Rupp C., Steckel H., et al. (2010). *Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: The influence of surfactants with different molecule structures*. International Journal of Pharmaceutics. 387:120–128.

Ruozi B., Tosi G., et al. (2005). *Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: Two techniques for rapid characterization of liposomes*. European Journal of Pharmaceutical Sciences. 25:81-89.

Rusanov A. I., Prokhorov V. A. (1996). *Interfacial Tensiometry. Serie: Studies in Interface Science*, volumen 3. (s/n). Holanda: Elsevier. pp 3-45.

Salager J.L. (2002). *Surfactants Types and Uses. FIRP Booklet #E300-A, Versión #2*. (s/n). Venezuela.

Salinas O. (2014). *Caracterización Físicoquímica de la conversión de vesículas de l-alfa-dipalmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) a micelas mixtas mediante la adición de n-Octil-beta-D-glucopiranosido (OGP)*. Universidad Nacional Autónoma de México. México. pp 19-29, 37-39.

Schik M. J. (1987). *Nonionic Surfactant, Physical Chemistry, surfactant science series*, volumen 23. (s/n). E.U.A.: Marcel Dekker Inc. pp 2-7, 15-20, 109-133, 236-240.

Serro A.P., Galante R., et al. (2014). *Effect of tetracaine on DMPC and DMPC + cholesterol biomembrane models: Liposomes and monolayers*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 116:63–71.

Shinoda K.. (1977). "Iceberg" formation and solubility. Journal of Phys. Chem. 81(13):1300-1302.

Smith J.M., Van Ness H. C. (2004). *Termodinámica en Ingeniería Química*. (edición 6). México: Mc Graww Hill. pp 9-11, 16.

Stillwell W. (2013). *An Introduction to biological Membranes*. (s/n). Gran Bretaña: Elsevier. pp 43-48.

Socaciu C., Jessel R., et al. (2000). *Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy*. Chemistry and Physics of Lipids. 106:79-88.

Šturcová A., Schmidt P., et al. (2010]. *Role of hydration and water coordination in micellization of Pluronic block copolymers*. Journal of Colloid and Interface Science. 352:415–423.

Subgonkot T., Wonglertnirant N., et al. (2013). *Visualization of ultradeformable liposomes penetration pathways and their skin interaction by confocal laser scanning microscopy*. International Journal of Pharm. 441:151-161.

Sznitowska M., Klunder M., et al. (2007). *Paclitaxel Solubility in Aqueous Dispersions and Mixed Micellar Solutions of Lecithin*. Chem. Pharm. Bull. 56(1):70-74.

Tadros T. F. (2005). *Applied Surfactants*. (s/n). Alemania: Wyley-VCH. pp 1-33, 53-84, 115-159, 309-334, 413-418, 433-465, 487-501.

Taylor P. (1998). *Ostwald ripening in emulsions*. Advances in Colloid and Interface Science. 75:107-163.

Thomas A., Dirk L. (2007). *Phase separation in the isolation and purification of membrane proteins*. BioTechniques 43:427-440.

Vamparys L., Gautier R., et al. (2013). *Conical Lipids in Flat Bilayers Induce Packing Defects Similar to that Induced by Positive Curvature*. *Biophysical Journal*. 104:585–593.

Viades-Trejo J. E., Amigo A., et al. (2006). *Activity coefficients at infinite dilution for surfactants*. *Fluid phase equilibria*. 250:158-164.

Viades-Trejo J., Gracia-Fadrique J. (2006). *Curvatura y termodinámica*. *Educación Química*. 18(2):122-126.

Wang Z., Zhou W. (2009). *Lamellar Liquid Crystals of Brij 97 Aqueous Solutions Containing Different Additives*. *Journal of Solution Chemistry*. 38: 659–668.

Weiss J. (2000). *Mass Transport Phenomena in Oil-in-Water Emulsions Containing Surfactant Micelles: Ostwald Ripening*. *Langmuir*. 16:6833-6838.

Weissberger A. (1987). *Organic Solvents*. Edición 4, Vol. II. Nueva York EUA: John Wiley & Sons. 75-76.

Weissig V. (2010). *Liposomes Methods and Protocols*. Serie: Methods in Molecular Biology. Volumen XX. (s/n). E.U.A.: Human Press. Pp 15-24, 325-362.

Yang R., Zhang X., et al. (2013). *Role of phospholipids and copolymers in enhancing stability and controlling degradation of intravenous lipid emulsions*. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Engineering Aspects* 436: 434–442.

Zhang H., Feng F., et al. (2008). *Formulation of food-grade microemulsions with glycerol monolaurate: effects of short-chain alcohols, polyols, salts and nonionic surfactants*. *European Food Research Technology*. 226:613-619.

Zhao L., Feng S., et al. (2007). *DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane*. *International Journal of Pharmaceutics*. 338:258–266.

RESEARCH ARTICLE

Structures similar to lipid emulsions and liposomes. Dipalmitoylphosphatidylcholine, cholesterol, Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80 in aqueous media

Carlos Juárez-Osornio and Jesús Gracia-Fadrique

Facultad De Química, Departamento De Físicoquímica, Universidad Nacional Autónoma De México (UNAM), México D.F., México

Abstract

In the present work, we show that we obtained nanometric structures made of water, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC), cholesterol (Chol), and a mixture of ethoxylated and non-ethoxylated sorbitan fatty acid esters (Tween 20, Span 20, Tween 80, and Span 80) by mixing all of them near the cloud point temperature (*cp*) of the ethoxylated surfactant. The influence that the constituents had on the size of the particle was determined by a pseudo-ternary phase diagram of water/Tween–Span/DPPC–Chol; the colloidal particles obtained were studied by differential scanning calorimetry, confocal fluorescence microscopy, scanning electron microscopy, and atomic force microscopy. These studies were made for all the systems with at least 23 d of colloidal stability. The most stable system was obtained with the Tween 80–Span 80 pair, behaving as a typical suspension for 48 d; this system was made of water, Tween 80–Span 80 (80:20), DPPC–Chol (95:5) in a corresponding molar ratio of 48:37:100:10. The colloidal particles obtained were a kind of emulsion and liposome structures. The second stable system was obtained with the same mixture, but in a molar ratio of 8:6:9:0, its structure was also a kind of emulsion particles. In both systems and in other less stable ones, the “emulsion particle” was completely new, it structurally corresponds to a nucleus of mixed micelles surrounded by at least one bilayer of DPPC.

Introduction

One of the goals of current pharmaceutical research is the development of some vehicles or structures with drug-carrying capacity, by increasing the amount of these drug carriers, we could probably improve many medical treatments for diseases like AIDS or Cancer (Carbone et al., 2014; Chen et al., 2013; Kandadi et al., 2011; Murgia et al., 2010; Torchilin, 2005). Liposomes are probably the most elaborate drug carriers; since they are made of biocompatible compounds as phospholipids and cholesterol (Chol), and since they have a closed structure in a spherical geometry with a central aqueous core, this site can transport hydrophilic compounds (Pentak, 2014; Pippa et al., 2012; Ruozi et al., 2005). The assembly of phospholipids in the lipid bilayer of liposomal membrane can be explained by the only spatial distribution of phospholipids possible: geometrically they are cylinders, as shown by their effective packing parameter (*ep*) (Murgia et al., 2010; Otten et al., 1995; Rupp et al., 2010); but there is another possible arrangement of these cylinders in a non-closed geometry which is simply known as lamellar structure (Atia & Givli, 2012; Siminovitch et al., 1987). In some works, phospholipids have been used as interfacial

Keywords

Cloud point, drug carrier, phase diagram,
Tween 20, Tween 80

History

Received 14 January 2016
Revised 26 February 2016
Accepted 26 March 2016
Published online 16 May 2016

stabilizers in lipid pharmaceutical emulsions (Carbone et al., 2014; Jing et al., 2014; Li et al., 2013) or in the production of mixed micelles in which the phospholipid/surfactant ratio leads to the formation of non-liposomal structures (Krescheck & Mihelich, 2003; Liang et al., 2011; Rupp et al., 2010). The use of compounds as phospholipids or surfactants in the formation of nanometric structures with a potential use as drug carriers, requires the knowledge and control of the critic parameters of the manufacturing process such as the temperature and the amount of constituents in the system, because the kind of nanometric structure obtained is their function (Sagar et al., 2007). Phase diagrams are the best tools for the control and reproducibility of any method for obtaining drug carriers in which surfactants and phospholipids are used. Ethoxylated sorbitan fatty acid esters can build different kind of nanometric structures depending on their concentration and temperature, their binary phase diagram shows that most surfactants at amounts smaller than 20%w/w, present spherical structures called micelles (Mukherjee et al., 2011; Tadros, 2005), an increase in temperature promotes the insertion of more surfactant monomers into the micelles; because the hydrogen bonds between the oxygen of the ether group of the ethylene oxide chain of a surfactant and the hydrogen of the water molecules of hydration break, as a consequence, the aggregation number

Address for correspondence: Carlos Juárez-Osornio. E-mail: osornioo@gmail.com

of micelles increases, these structures grow, and the medium becomes turbid at a particular temperature known as cloud point temperature (cp). The minimum value of cp is known as lower critical solution temperature ($LCST$), if the increase in temperature is constant, the system will separate into two phases: a surfactant-rich phase and a surfactant-poor phase (Inoue & Misono, 2008). In the area near the cp , at a temperature below the cp , the water-micelle interfacial tension is very low and there are big micelles with capacity for containing, under the specific thermodynamic conditions of the cp , substances like phospholipids and Chol for promoting the assembly of non-micellar structures with different morphology, size, stability and pharmaceutical properties. For some works surfactant solutions are used at a cp temperature or even higher in order to remove organic solutes from water (Melo et al., 2014; Mukherjee et al., 2011), this confirms the importance of micellar solutions of ethoxylated surfactants near the cp for capturing or attracting the hydrophobic compounds. A similar phenomenon of separation of phases, can be produced by addition of inorganic or organic salts to nonionic surfactants in aqueous media, this alternative is important for removing organic thermolabile molecules from water (Álvarez et al., 2012).

In this work, we show that we obtained a new kind of nanometric structure with possible use as a drug carrier and liposomes, they are made of DPPC, Chol, they are compounds used in liposome manufacturing and Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80, they are nonionic surfactants used in pharmaceutical industry due to their low cost, biodegradability and biocompatibility (Álvarez et al., 2015). We found the controlled conditions for obtaining the nanometric structures by using binary phase diagrams of ethoxylated surfactants and pseudo-ternary phase diagrams of all substances.

Materials and methods

Materials

For the experiments we used 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphatidylcholine (DPPC, Sigma, 99% purity, St. Louis, MO), Chol (Aldrich, 98% purity, Milwaukee, WI), sorbitan monolaurate (Span 20, Fluka Chemika, Steinheim, Germany), sorbitan monooleate (Span 80, Sigma, St. Louis, MO), polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween[®] 20, Sigma, Taufkirchen, Germany), and polyoxyethylene sorbitan monooleate (Tween[®] 80, suitable for cell culture, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany). For the instrumental analysis we used fluorescein sodium salt (NaFi, fluorescent tracer, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), dextrose (anhydrous, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(lissamine rhodamine B sulfonyl) (ammonium salt) (RhB, purity >99%, Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL), and NaCl (ACS reagent, J.T. Baker, Deventer, The Netherlands).

Methods

General method

We used pairs of DPPC–Chol and Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80 and water; all of them were mixed by a rotary evaporator (Buchi r-3, Switzerland) at a cp temperature

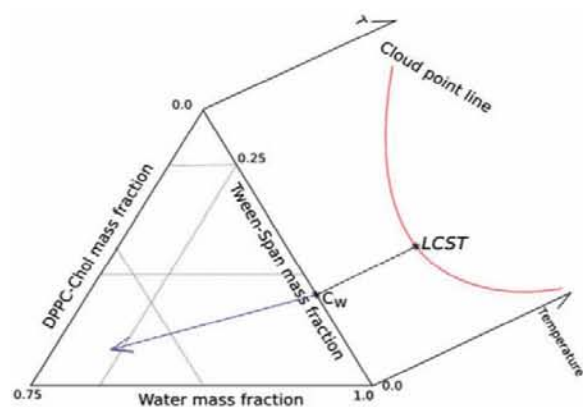


Figure 1. Pseudoternary phases diagram coupled to binary phase diagram. Some amount of ethoxylated surfactant in water (C_w , in the example, it could be the corresponding $LCST$ is on Tween–Span/water axis of ternary diagram and at the same time is the basis x-axis on binary diagram of surfactant, the addition of DPPC–Chol to Tween–Span/water system, takes to the inside of ternary diagram (blue arrow), the addition is at room temperature, after, the system is mixed at the temperature corresponding to the cp of the amount of surfactant in the case of Tween 20 or at a temperature of 1 or 2 °C below the cp in the case of Tween 80. The particles obtained after process are shown as function of size in different colors in the pseudoternary phase diagram.

corresponding to the amount of Tween 20 used or at a temperature near the cp of the amount of Tween 80 used, without taking into consideration the amount of Span (Figure 1). The mixture was stirred 35 min at 120 rpm at a normal atmospheric pressure, after that, the system was cooled, a sample was obtained, and the size of the particle and the colloidal stability time (maximum system time as a colloidal suspension without flocculation) were determined at room temperature. A pseudo-ternary phase diagram of the system of work, can show different zones corresponding to the size of the particle obtained and a plot of the amounts of DPPC–Chol and Tween–Span versus time of colloidal stability can show the most stable systems. The instrumental analysis was made for all systems with at least 23 d of colloidal stability for elucidating the kind of particles that were obtained by this new method.

Critical micelle concentration of Tween 20 and Tween 80

Tween 20 or Tween 80 solutions were made in deionized (Simplicity[®] Millipore, Darmstadt, Germany) and filtered water (PVDF membrane 0.2 μ m of pore size, Pall Gelman, Port Washington, NY) and the surface tension for each one of them was determined by the equipment which was designed and described in a previous work (Pardo-Cervantes et al., 2011), the critical micelle concentration (cmc) values were obtained by the Gibbs adsorption isotherm integrated near the cmc (Equation 1; Novelo-Torres & Gracia-Fadrique, 2005).

$$\pi = \pi_{max} - \Gamma_{max}RT \ln X_{cmc} + \Gamma_{max}RT \ln X \quad (1)$$

Where $\pi = (\sigma_0 - \sigma)$ is the surface pressure, σ_0 is the surface tension of pure water at 20 °C, σ is the surface tension of the solution of surfactant, π_{max} is the maximum surface pressure, Γ_{max} is the two-dimensional maximum surfactant surface concentration, R is the gas constant, T is the absolute

temperature, X_{cmc} is the mol fraction of cmc and X is the mol fraction of surfactant; Equation (1) predicts a linear behavior between π and $\ln X$ data, only near the cmc (where $\Gamma \rightarrow \Gamma_{max}$, $X \rightarrow X_{cmc}$ and $\pi \rightarrow \pi_{max}$), its intercept is $\pi_{max} - \Gamma_{max}RT \ln X_{cmc}$ and the slope is $\Gamma_{max}RT$.

Binary phase diagram of surfactants in water

Different Tween 20 or Tween 80 solutions were made on deionized and filtered water, all of them were heated and the cp was obtained through visual determination, the plot of cp versus surfactant (%w/w) was made with the data. The Tween 20 solutions were smaller than 10%w/w and the Tween 80 ones were less than 18%w/w.

Pseudo-ternary phase diagram of water/Tween–Span/DPPC–Chol and colloidal stability time

The amounts of surfactants that we worked with were bigger than the previously evaluated cmc . Using the binary phase diagram of the ethoxylated surfactants as a template (without taking into consideration the amount of Span), many trajectories were made for mixing all constituents at the temperature corresponding to the cp of the amount of surfactant in the case of Tween 20 or at a temperature of 1 or 2 °C below the cp in the case of Tween 80. The starting mixture was water, DPPC–Chol (in three mass ratio of 100:0, 95:5, and 90:10 respectively) and Tween 20–Span 20 or Tween 80–Span 80 (in both cases, in three mass respective ratio of 100:0, 95:5, and 90:10), the constituents were mixed in a rotary evaporator for 10 min at less than 30 rpm at room temperature, then they were heated (as previously mentioned) by 35 min at 120 rpm under normal pressure; the suspension obtained was cooled at room temperature and the size of the particle of the sample taken was measured by dynamic light scattering (DLS) (Nicomp 380 ZLS, software ZPW388 version 1.89 supplied by the manufacturer, San Diego, CA) at 25 °C (± 0.2 °C, Peltier thermoelectric element of Nicomp 380ZLS), at 0.8902 cp of dynamic viscosity and a 1.333 refractive index, they are parameters of water at 25 °C (Weissberger, 1987), the average size was determined by a Gaussian analysis (plot by volume), different colored areas were drawn with the data regarding the size of the particle, all of them based on a particular size range, in the respective pseudo-ternary phase diagram. Stability time studies were made for all the obtained systems; this parameter corresponds to the time when the suspension is not separated into two phases, with the data a 3D stability time plot was made based on the mass percentage of Tween–Span and DPPC–Chol.

Differential scanning calorimetry

Calorimetric studies were made to analyze the kind of spatial arrangement of the DPPC in the obtained structures. The scanning calorimetric experiments were performed using a Microcal VP-DSC (Northampton, MA); prior to the scans, all solutions were degassed while stirred under vacuum, then an excess pressure of 3 atm was applied to each sample cell during the scans, these were performed from 10 to 80 °C with scan rate of 1 K min⁻¹. Water versus water scans were performed prior to the scans of the different aqueous solutions

of the samples reported in this work. Sample scans were routinely executed three times in order to confirm the repeatability and thermosensitivity of the samples; between each scan the samples were left standing for 15 min at 10 °C in order to assure thermal equilibrium. The heat capacity profiles were analyzed after the subtraction of water versus water scan. The pre- and post-transition baselines were established from independent linear least squares adjustments to the data points of the pre- and post-transition regions, then a sigmoid baselines under the transition peak was built taking into account the profile of the transition peak and the experimental pre- and post-transition baselines; the data manipulation was done using the software supplied by the manufacturer. The thermograms obtained show the C_p value in Cal/°C because the composition of the analyzed systems did not match with the pure compounds.

Confocal fluorescence microscopy

Fluorescence studies were made to determine existence of aqueous central cores and the DPPC spatial arrangement in the obtained structures; the studies were made using RhB or NaFi. The first compound was put into the hydrophobic mixture in a mass ratio of DPPC/RhB 99:1; NaFi was prepared in deionized water at 0.2%w/v and final pH = 7.25 (± 0.001 , Orion 920A+, Thermo Electron Corporation, Waltham, WA) and it was added into the hydrophobic mixture, the non-encapsulated NaFi was extracted by Donnan membrane equilibrium (MWCO: 3500 Spectra/Por with a 29 mm diameter, SpectrumLabs, Los Angeles, CA) using a solution of Dextrose 3 mM and NaCl 3%w/w in a volume ratio of NaFi-suspension/dextrose–NaCl 1:20 with changes of solution every 12 h for 3 d. RhB-suspension or NaFi-suspension was analyzed under a 100× plan apochromatic oil-immersion objective with a Zeiss LSM 5 Pascal confocal system (Zeiss, Jena, Germany), using a 560 nm excitation wavelength for RhB or a 460 nm for NaFi.

Scanning electron microscopy and atomic force microscopy

The morphology and size of the obtained structures were confirmed by the scanning electron microscopy (SEM) or atomic force microscopy (AFM) studies; a drop of the suspension was put onto the stub of the samples analyzer, it was air dried, then it was covered with carbon and gold, and after that, it was examined by using a JEOL 35CF scanning electron microscopy (Tokyo, Japan). The samples studied by the AFM were air dried (7–8 d) and then examined by using a TMSPM multimode atomic force microscopy (Digital Instruments, Irvine, CA) at room temperature (only in sunny days), operating in tapping mode with a RTESP cantilever (0.01–0.025 Ohm–cm phosphorus (n) doped Si L 115–135 μ m w 30–40 μ m f 227–316 KHz, from Veeco, Plainview, NY). The average size of the particle was analyzed from the SEM or AFM images in order to compare it with the results obtained by DLS and confocal fluorescence microscopy (CFM).

Results

Critical micelle concentration

The determined cmc of the two ethoxylated surfactants is shown in Table 1. The surfactant amounts in this work were

Table 1. Critical micelle concentration of ethoxylated surfactants.

	cmc (mM)	cmc (%w/w)
Tween 20	7.95	9.7×10^{-3}
Tween 80	3.84	6.01×10^{-3}

Table 2. Lower critical solution temperature (LCST) of ethoxylated surfactants.

	LCST (% w/w, °C)
Tween 20	3.2, 35
Tween 80	5, 61.5

Binary phase diagram of Tween 20 and Tween 80

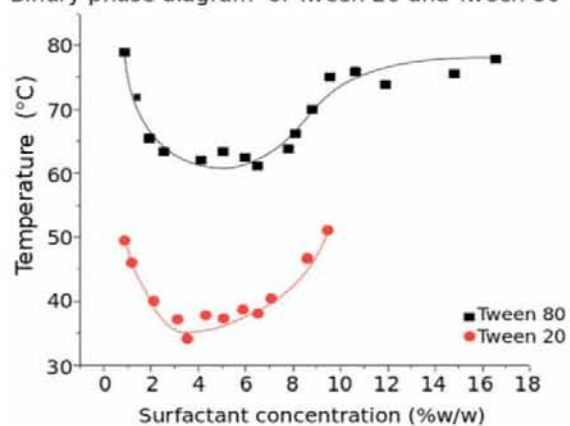


Figure 2. Binary phase diagram of ethoxylated surfactant, the plot shows an empiric fit line of experimental data.

bigger than the *cmc* determined. Tween 80 is more hydrophobic than Tween 20, their corresponding HLB values are 15 and 16.7 (Tadros, 2005), Tween 80 has shown the lowest *cmc*, in fact, the Tween 20 is a derivative of a 12 Carbon (12C) fatty acid, it is more hydrophilic than the other surfactant derivative of an unsaturated fatty acid of 18 Carbons (18C).

Binary phase diagram

The binary phase diagrams obtained for the two surfactants are shown in Figure 2. The diagram shows a *cp* at higher temperatures for Tween 80; the Tween 20 has a 12C hydrophobic tail, while the Tween 80 has an 18C one and it presents an unsaturation, probably the Tween 20 micelles present a more positive curvature than those of Tween 80 because the packing of its monomers geometrically similar to a cone is better in the micellar structures than the packing of Tween 80, which does not have the shape of a cone due to its unsaturation (Atia & Givli, 2012; Jespersen et al., 2012); probably due to this, the Tween 20 micellar structures are smaller than those of Tween 80 and they cannot uptake surfactant monomers at lower temperatures compared to Tween 80; another possible explanation is related to the solvation water molecules that surround every surfactant; the molecules of water that surround every monomer of Tween 80, show an organization called “iceberg”, this arrangement is due to the important cleavage of hydrogen bonds between water molecules and surfactant monomers (Shinoda, 1977), this means that the arrangement of the water molecules surrounding the hydrocarbon chain, due to the hydrophobic effect, is similar to the arrangement of ice since the movement

of the water molecules decreases; the 12C chain does not affect the hydrogen bonds or the molecular movement of water as the 18C chain does, due to this reason, the Tween 80-water system needs more energy to increase the mobility of the hydrocarbon chain first and then the breakdown of the “icebergs” surrounding the hydrocarbon chain, these phenomenon promotes the insertion of more surfactant monomers in growing micelles at higher temperatures for Tween 80 compared to Tween 20, as a consequence, the *cp* of Tween 20 is smaller than the *cp* of Tween 80. The *LCST* of the ethoxylated surfactants is shown in Table 2.

Pseudo-ternary phase diagram and colloid stability time

As a result of the experiments, eight stable colloidal suspensions were obtained from all the elaborate systems; they are shown on Table 3. In Figures 3–5, we only present the systems which produced the most stable suspensions, but there are other two systems, their charts are not shown and they are analogous to the charts shown in Figures 3–5. Every stable suspension obtained from the five systems (the ones in Figures 3–5 and the ones which are not shown there) is shown on Table 3. As a matter of fact, 18 systems were made: nine by using the pair Tween 20–Span 20 and the rest by using the pair Tween 80–Span 80. As previously mentioned, only eight stable suspensions were obtained from 5 of the 18 elaborate systems. Figure 3 corresponds to the system of Tween 80–Span 80 80:20, DPPC–Chol 95:5; three suspensions were obtained from this system (Table 3, rows 2–4). One of them was the most stable suspension obtained by this new method. Figure 4 corresponds to the system of Tween 80–Span 80 80:20, DPPC–Chol 100:0 and Figure 5 corresponds to the system of Tween 20–Span 20 80:20 and DPPC–Chol 100:0; all figures show a pseudo-ternary phase diagram with its corresponding stability plot, the color code corresponds to the size range of the particle, including a color for the heterogeneous zones which refer to the suspensions with small white floating particles at the end of process, a few minutes later, the suspensions separated into two phases.

In Figure 3(a), suspension that was stable for 48 d is shown along with two suspensions that are less stable (36 and 26 d, see Table 3), the size of their particles is of 250 nm at least, probably the Chol could only improve the colloidal stability in systems with Tween 80–Span 80 80:20 because in the rest of systems, an increase of the heterogeneous zones in the phase diagram was observed as a function of the amount of Chol. In Figure 4(a), maximum colloidal stability of 38 d for suspensions with particles with a size near to 250 nm is shown, all of them without Chol. In Figure 5, the results shown are interesting because it is possible to obtain suspensions with small particles by using this new method with the Tween 20–Span 20 pair without Chol and a colloidal

Table 3. Systems analyzed by DSC, CFM, SEM, and AFM.

System	Surfactant amount (% w/w)	DPPC-Chol amount (% w/w)	DPPC/Chol/Tween/ Span molar ratio	Figure number	Symbol	Stability time (days)	Mean diameter (nm)	Error diameter (standard deviation in %)
Tween 80–Span 80 80:20 DPPC–Chol 95:5	3.25	3.2	100:10:48:37	3	vi	48	987.7	54.4
Tween 80–Span 80 80:20 DPPC–Chol 95:5	7.9	4.3	20:2:19:15	3	vii	36	201.6	47.8
Tween 80–Span 80 80:20 DPPC–Chol 95:5	4.15	7.8	20:2:5:4	3	viii	26	378.1	57
Tween 80–Span 80 80:20 DPPC–Chol 100:0	4.5	2.3	9:0:8:6	4	v	38	266	43.3
Tween 20–Span 20 80:20 DPPC–Chol 100:0	1.95	0.5	2:0:4:3	5	ii	30	37.9	83.7
Tween 20–Span 20 80:20 DPPC–Chol 100:0	1.9	0.97	1:0:1:1	5	i	29	57.1	75.3
Tween 80–Span 80 100:0 DPPC–Chol 100:0	9.1	6.1	5:0:4:0	–	iii	25	79.7	69.4
Tween 80–Span 80 90:10 DPPC–Chol 100:0	0.61	2.1	20:0:3:1	–	iv	22	101	51.5

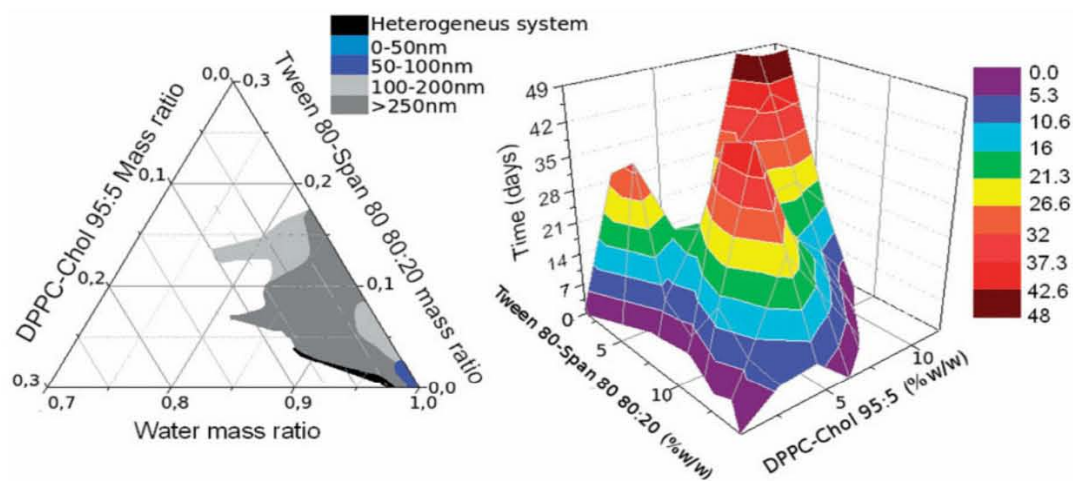


Figure 3. Pseudoternary phase diagram of Tween 80–Span 80 80:20, DPPC–Chol 95:5 and water and the corresponding stability plot. The most stable suspension was obtained with this system.

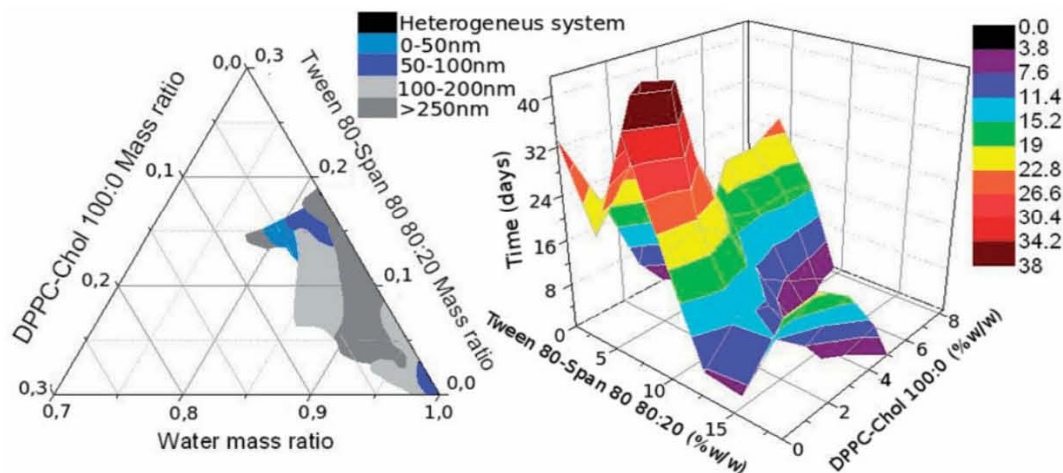


Figure 4. Pseudoternary phase diagram of Tween 80–Span 80 80:20, DPPC–Chol 100:0 and water and the corresponding stability plot. The most stable suspension obtained was a homogenous system by 38 d.

stability time of 29–30 d, a good drug carrier must be small, with diameters smaller than 100 nm. The other stable suspensions (Table 3, rows 8 and 9), were also obtained

with the Tween 80–Span 80 pair, their respective suspensions were stable for 25 and 23 d. In general, the less stable systems were found in the Tween 20–Span 20 pair, in fact, it was only

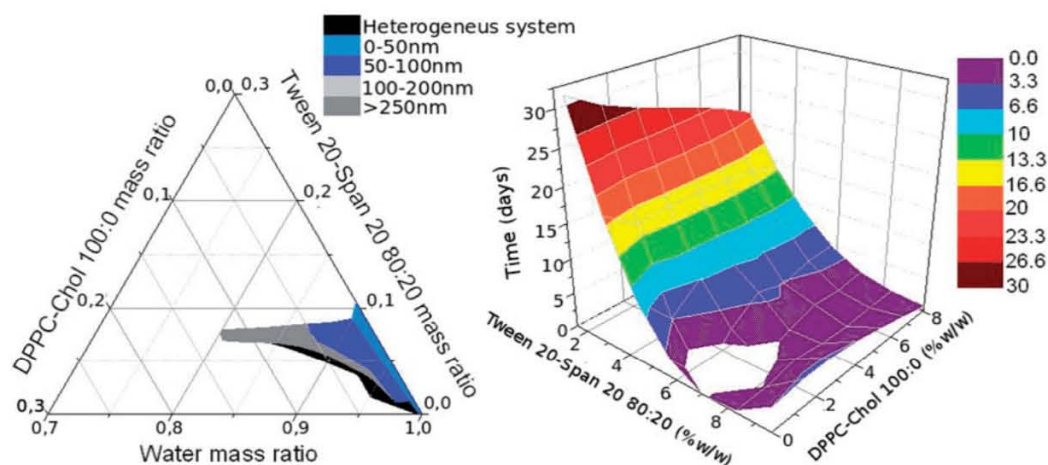


Figure 5. Pseudoternary phase diagram of Tween 20–Span 20 80:20, DPPC–Chol 100:0 and water and the corresponding stability plot. The most stable suspension was a homogenous system by 30 d and its particles were small, with diameters smaller than 100 nm.

possible to increase the colloidal stability up to 30 d when its respective mass ratio was 80:20 and without Chol, replacing the Tween 20 by Tween 80 increases the stability, the chemical structure of ethoxylated surfactant has influence on the stability and on the capacity of the nanometric structure for the absorption of Chol, the different spatial distribution of the surfactants implies that the packing of all substances improves with Tween 80. The systems shown in Table 3 were analyzed by differential scanning calorimetry (DSC), CFM, SEM, and AFM.

Instrumental analysis

Differential scanning calorimetry

In Figure 6, the thermograms of the eight systems of Table 3 with the same identification code are shown, each thermogram shows the three scans made in different colors and the corresponding main transition temperature (T_m , black for the first scan, red for the second and green for the third), regarding the T_m of the third scan, it was only shown when the T_m measured was different to the T_m of the second scan (red chart); the thermogram of the system *i* was the only one that showed two peaks (T_{m1} and T_{m2}).

In general, the thermograms of Figure 6 have shown the typical calorimetric pattern of DPPC when it is organized as a bilayer; this arrangement exhibits two phase transitions: a pre-transition (T_p) at approx. 34.5–35.4 °C (which separates the tilted gel phase, L_{β} , from the ripple gel phase, P_{β}) and the main transition (T_m) at 40–42.3 °C (Pentak, 2014; Socaciu et al., 2000; Zhao et al., 2007); the lipids are in a rigid and well-ordered arrangement under the T_m (ripple gel phase, P_{β}), and in a liquid-crystalline phase over the T_m (lamellar liquid-crystalline phase, L_{α}) (Cevc, 1990; Panicker, 2008), our nanometric structures do not show a pre-transition peak and their main transition is similar to the main transition of pure DDPC, similar to the liposomal structures made with this phospholipid (Pentak, 2014). Previous works about lipid emulsions and mixed micelles produced for transporting drugs have shown the thermogram obtained for these structures (Jing et al., 2014; Liang et al., 2011); regarding

the lipid emulsion made of dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC), DPPC, coconut oil, and clomethiazole (Nordén et al., 2001), the thermograms show the main transition of a lipid mixture that stabilizes the emulsion; when clomethiazole is added the calorimetric peak becomes wider; this is an evidence of the drug insertion in the lipid layer that surrounds the oil drop; Chol and other hydrophobic compounds do the same in lipid bilayers of liposomes and other lipid emulsions (Carbone et al., 2014; Malcolmson et al., 1997; Zhao et al., 2007); regarding the phospholipids-surfactant mixtures, for example, DMPC and dodecyltrimethylphosphine oxide (APO12) in which the amount of phospholipids is smaller than the surfactant, the mixed micelles are the favored structures, this is verified with calorimetric studies, the respective work showed how the calorimetric peak corresponding to phospholipids in a liposomal bilayer is lost at molar ratios of DMPC/APO12 of 1:0.95, this is due to the fact that the particle in the system does not have many molecules of DMPC for building a bilayer and the only possible structure that the compounds can build is a mixed micelle (Kresheck & Mihelich, 2003). The previously mentioned works and the thermograms of Figure 6 allow us to know that the nanometric structure made with this new method is not a typical mixed micelle and that the DPPC is organized as a bilayer as it is in liposomes or in layers as in the case of lipid emulsions; regarding the thermo-sensitivity of the nanometric structures obtained, only the system *iii* showed the same thermogram in their three DSC scans; this implies that the rest of the suspensions experienced a spatial reconfiguration of their constituents due to the heat, and after the third scan, the final structure is thermodynamically less stable than the first structure corresponding to first scan.

Confocal fluorescence microscopy

The images obtained by fluorescence studies of nanometric structures of Table 3 can be seen in Figure 7. The identification code of the systems is the same as the one shown in Table 3, only the system *vi* was marked with NaFi or RhB (*vi*-NaFi or *vi*-RhB images) because it presented

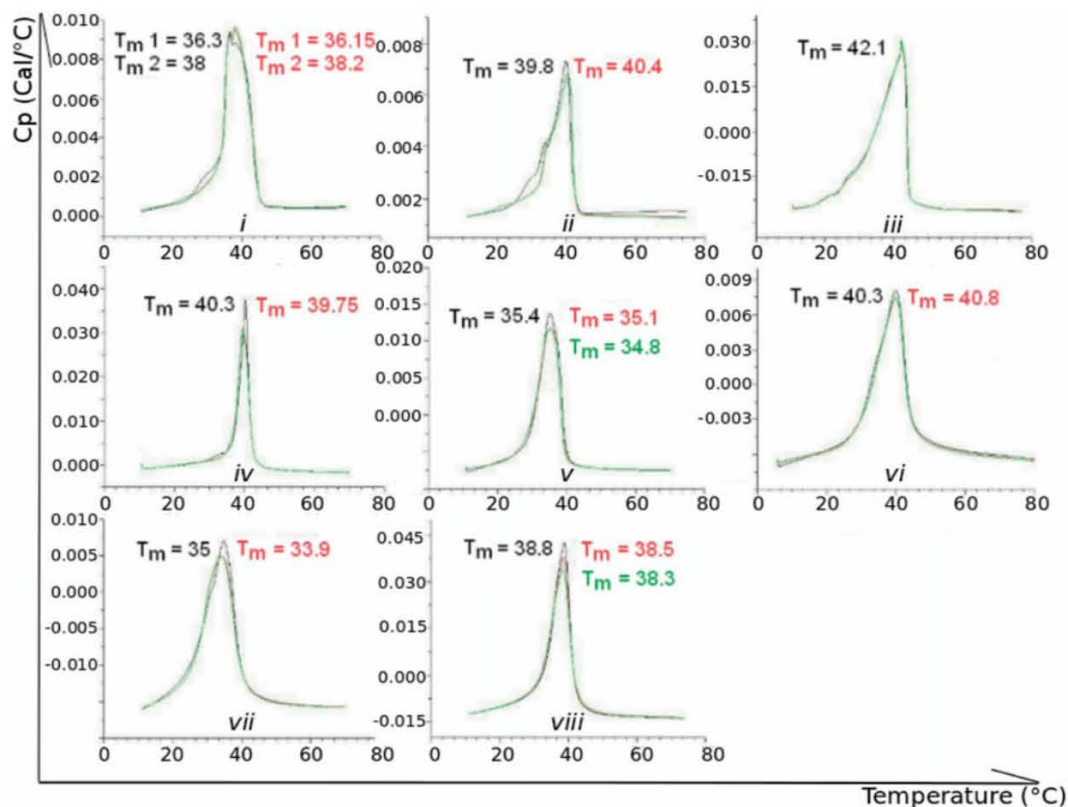


Figure 6. Thermograms of the eighth systems of Table 3 with the same identification code. In general, the second and third scan (red and green charts) were different to the first scan (black chart), in the case of thermogram *i*, T_{m1} and T_{m2} and the corresponding black charts, were obtained by the first scan, red T_m and charts correspond to second scan, as we have mentioned for the other systems.

structures that are similar to liposomes and other totally hydrophobic structures; NaFi could confirm the presence of a central hydrophilic core in the liposomal structures of the system *vi*; RhB can only show the distribution of the hydrophobic part in the rest of structures of all the systems; every micrograph shows a scale bar. As previously mentioned, the presence of liposomes and a kind of “emulsion particle” were only found in system *vi*; this “emulsion particle” is very similar to the hydrophobic particles in the rest of the systems, due to this reason, the RhB emits fluorescence in all the structure, except in the liposomal structure of the system *vi*, where its nucleus do not emits fluorescence (dark nucleus) as shown in previous works (Subongkot et al., 2013); the use of NaFi, a hydrophilic fluorescent marker, confirmed that the liposomal nucleus is an aqueous compartment (Figure 7, *vi*-NaFi image), not all the structures of the system *vi* have that hydrophilic core, systems *vi*-RhB and *vi*-NaFi were made with the same DPPC-Chol and Tween 80-Span 80 proportions. The new kind of “emulsion particle” (that we named “lipomic”) is only different in size and morphology. The DPPC arrangement should be the same for all the structures, as it has been shown in the DSC thermograms. It is important to mention that the size of the particle of the systems *i-iii* was smaller than the size of the particles of the system *iv-viii*, as it had been shown in the DLS studies (Table 3, eighth column) and the CFM micrographs.

Scanning electron microscopy and atomic force microscopy

The micrographs obtained by the SEM or AFM made for all the stable systems of Table 3 can be seen in Figure 8. For a particular system, we only show a SEM micrograph or an AFM micrograph; but for the system *vi* we show both micrographs. The morphology and the average size of the nanometric structure obtained can be seen in the micrographs, only in system *vi* the presence of two kinds of big particles was found; a group of them were more “translucent” than the rest of particles and not all of them were spherical, as it was previously shown in the CFM micrographs. The *vi*-AFM image showed two particles with a kind of a central region similar to the ones seen in the liposomal structures by AFM studies (Ruozi et al., 2005). In general, the structures of the systems *i-iii* were smaller than the rest of the structures, as it was shown in the CFM micrographs. Finally, the average sizes of all the particles observed in the SEM-AFM studies, were similar to the ones observed in the DLS studies (Table 3).

Discussion

In general, the spatial distribution of the DPPC in all the lipomic obtained by this new method, is in a bilayer, similar to a liposomal membrane. All the obtained thermograms correspond to the transition from P_{β} phase to L_{α} phase

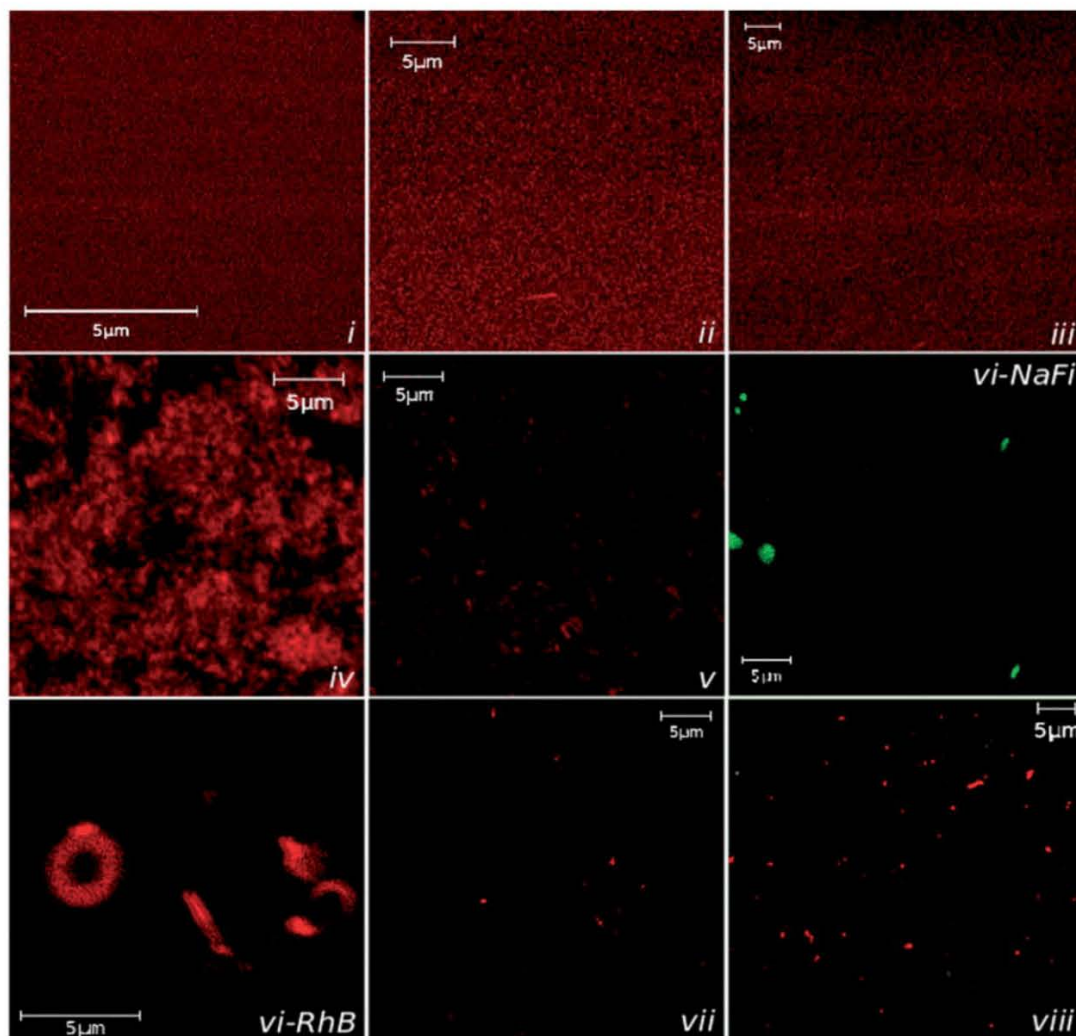


Figure 7. Micrographs CFM of the systems of the Table 3. In general, all systems show the existence of a totally hydrophobic particle, except in the system *vi*, where is possible to see hydrophobic particles and liposomes.

(Pentak, 2014), the pre-transition disappeared because all systems have a few non-DPPC molecules in the bilayer; as a consequence, the order of the bilayer is decreased because the non-DPPC molecules must be promoting the nonsymmetrical lamellar areas, which fosters the emergence of waves on the surface of the bilayer (Cevc, 1990; Malcolmson et al., 1997). In fact, the Chol distribution in the bilayer is not homogeneous, the areas near to the Chol-rich phases are more organized and the areas near the Chol-poor phases are less organized (Jespersen et al., 2012; Pinto et al., 2013), this probably increased the colloidal stability in the systems *vi–viii*, the only ones with Chol (Table 3). All systems, except system *iii*, exhibited a change in the calorimetric pattern between the first and second scan, the third scan was almost the same as the second scan which suggests that heat promoted a spatial reconfiguration of the constituents in the bilayer. The system *i*, shows two calorimetric peaks, this demonstrates that in the system there are two kinds of

nanometric structures in which the distribution of DPPC is very similar and/or some amounts of Tween 20 are in the bilayer in two different ratios, for this reason, the T_m values were different at 1.7°C in the first scan (black plot and black T_m of thermogram *i* of Figure 6); this was practically the same value for the second and third scans, where the heat must have promoted a spatial reconfiguration in the bilayer; the corresponding CFM micrograph showed a totally hydrophobic structure. The RhB, a lipid fluorescent tracer, was inserted in the bilayer and in the central core (the structures look like red points), this suggests that the nucleus must be a mixed micelle formed, in a bigger proportion, by Tween 20 and Span 20 and, in a smaller proportion by DPPC (and RhB when it is used) because the majority of the lipids are in the bilayer; some previous works have shown the influence the number of lipid bilayers have on the liposomes on the calorimetric pattern obtained, the broad peaks correspond to a low number of bilayers and narrow peaks correspond to a high number of

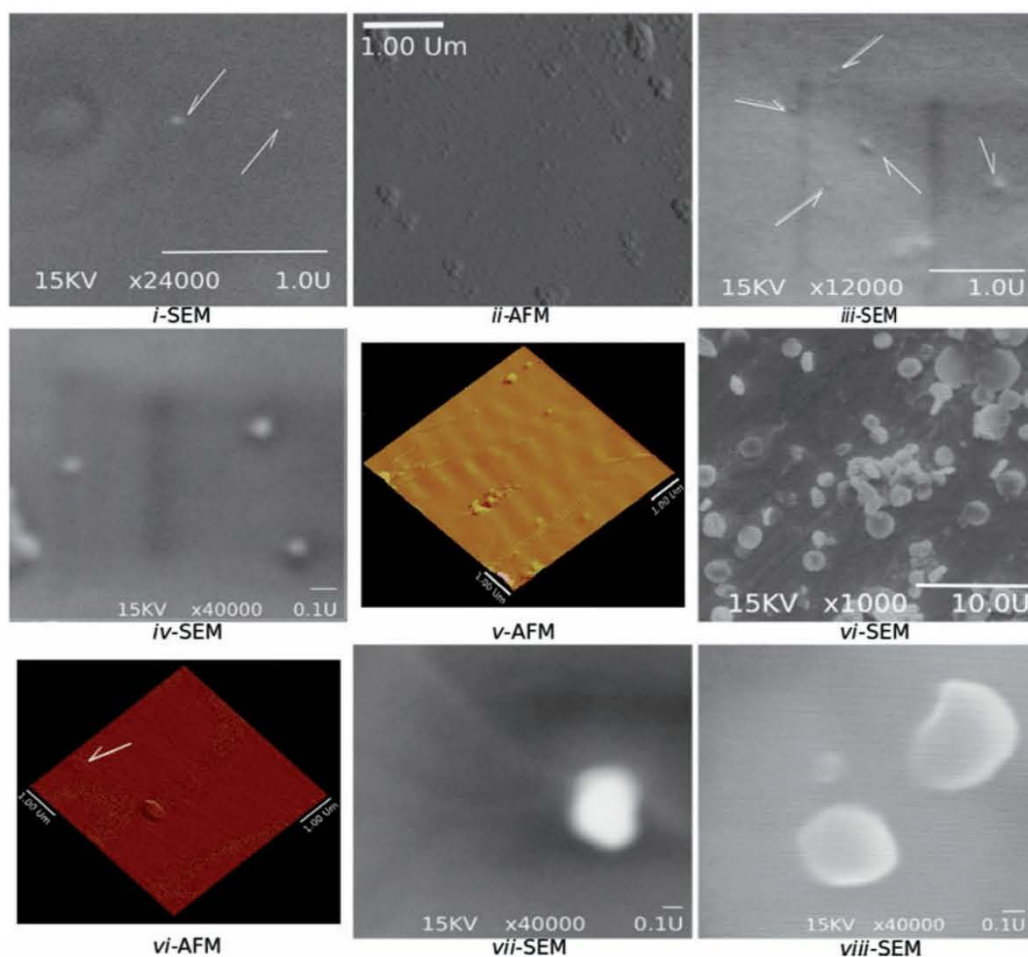


Figure 8. Micrographs SEM or AFM of the systems of the Table 3. Only for the system *vi* were made SEM and AFM studies; the white arrows point out some particles.

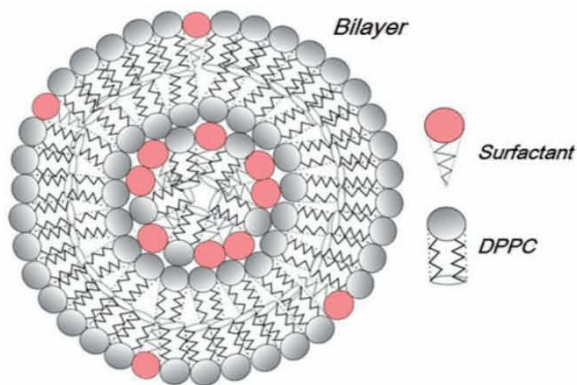


Figure 9. Lipomic, the new kind of particle. The structure was obtained by mixing of DPPC–Chol/Tween–Span/water in the proximity of *cp*, it has a mixed micelle in its nucleus, the DPPC molecules are forming a bilayer that surround it.

bilayers (Belsito et al., 2005; Kresheck & Mihelich, 2003; Panicker, 2008), probably in the structure of the system *i* there is at least one bilayer of DPPC, the Figure 9 shows a model of this new kind of nanometric structure with spherical

morphology (as shown in micrograph *i*-SEM of Figure 8). In general, the T_m showed different values at 4 or 2 °C to the T_m of a bilayer formed only by DPPC; many previous works have shown that this phenomenon happens when there are DPPC and other hydrophobic compounds in the bilayer (Belsito et al., 2005; Zhao et al., 2007), due to this reason, the T_m decreases as a function of the amounts and the kind of the other hydrophobic compounds inserted in the bilayer, this suggests that there are some molecules of Tween 20 in the DPPC bilayer, probably there are not any molecules of Span because this surfactant is more hydrophobic than Tween and it could prefer the central core. Regarding the size of the particle, the amount of Tween 20–Span 20 used (Table 3, eighth column) corresponds to the amounts of micellar solutions with small particles (binary phase diagram of Tween 20, where the surfactant is less than 2%w/w in water); due to this reason, the average size of the nanometric structures was small. The results of the calorimetric and the CFM studies for the systems *ii* and *iii* were very similar (fluorescent small points); in these systems there are small lipomic similar to the colloidal particles in the system *i*, but in the system *ii* apparently there are two kinds of structures, one of them is a micellar mixed surrounded by a DPPC bilayer with many

molecules of Tween 20, in fact in the system *ii*, there are more amounts of Tween 20 compared to system *i* (Table 3, fourth column), due to this reason it is possible to see a small peak near to 33.4 °C, the other particle must have less monomers of Tween in the bilayer because the corresponding peak is bigger and shows a T_m near to T_m of the bilayer of pure DPPC (black plot and black T_m of thermogram *ii* of Figure 6). Regarding the system *iii*, its calorimetric pattern and the CFM micrograph are suggesting the presence of a mixed micellar nucleus surrounded by a DPPC bilayer with a few monomers of Tween 80, analogous to the particles of systems *i* and *ii*, as shown in Figure 9. The molar ratio of DPPC/Tween 80–Span 80 of system *iv* has shown the biggest amounts of DPPC (Table 3, fourth column), it shows a calorimetric peak very similar to the peak corresponding to the DPPC multilayers in MLV liposomes (Belsito et al., 2005). Probably the majority of the Tween 80–Span 80 forms the central mixed micelle of the lipomic obtained, where the rest of DPPC forms more than one bilayer around the nucleus of the particle (it is similar to the particle of Figure 9 with more than one bilayer); because of this, the C_p was the highest of the C_p 's obtained, the multilayer of DPPC implies more hydrophobic interactions between lipids, in addition to this, the average size of the particles was bigger than the average size of the particles in systems *i–iii*, as it can be observed in the CFM and SEM micrographs (images *iv* of Figures 7 and 8). The particles of system *v* must be similar to the particles of systems *i–iv*, this is supported by the calorimetric pattern and the CFM micrograph. The bilayer of DPPC should have some amounts of monomers of Tween 80 and there must be at least one bilayer surrounding the central mixed micelle made of Tween 80–Span 80. The morphology of the structures is spherical as shown in the CFM and AFM studies (micrographs *v* of Figures 7 and 8).

Regarding the system *vi*, this was the only system that showed the presence of liposomes and lipomic. The thermogram only showed one peak with T_m near to the T_m of the liposomes of DPPC (black plot and black T_m of thermogram *vi* of Figure 6), probably there are not many molecules of Chol and/or Tween 80 inserted into the bilayer, due to this reason the T_m did not decrease much; this was the case of the systems *i* and *v*. In addition to this, the Chol must be inside the bilayer because there is not a lot of space in the packing of the constituents in the central mixed micelle, compared to the DPPC bilayer, for accepting the Chol or because the curvature of the mixed micelle would change a lot if the Chol were inserted in that place, increasing the risk of destabilization (Atia & Givli, 2012; Vamparys et al., 2013), due to this reason a direct relation between the amounts of Tween–Span and the amounts of integrated Chol was never observed. The system *vi* has confirmed two points: (1) the spatial arrangement of DPPC in all lipomic corresponds to a tipic bilayer which is only different in the number of bilayers and/or in the kind and amount of the non-lipid compounds inserted; due to this reason, the liposomal structures and the hydrophobic structures of system *vi*, only different in their kind of nucleus (as observed in *vi*-NaFi and *vi*-RhB micrographs of Figure 7) have shown one calorimetric peak; (2) the nucleus is formed by Tween–Span and, of course, by some amounts of DPPC, depending on the system, the lipid bilayer can insert some

monomers of Tween, but the majority of them form the mixed micelle; only in the system *vi*, all the compounds found the thermodynamic conditions for building two kind of structures; one of them is a liposomal structure and the composition of its DPPC bilayers was practically the same as the bilayers of the lipomic, due to this reason, the corresponding thermogram only shows one calorimetric peak; this confirms that surfactants were not inserted in the liposomal structures. The only region with capacity to capture them is the bilayer (under the *cp* conditions of the system *vi*). In the other structures with a mixed micelle in its core a similar phenomenon must be happening; this suggests that a temperature near to the *cp*, does not allow the insertion of Tween nor Span because the bilayer is subject to a strong hydrophobic effect compared to the central core, in addition to this, the packing of the nucleus of the particle, structure with a curvature that is more positive than the bilayer, requires monomers with a conic geometry and the bilayer requires monomers with cylindrical geometry (Heerklotz & Epend, 2001; Vamparys et al., 2013). Finally, the average size of particles corresponds to big structures, as shown in the results of the CFM, SEM, and AFM studies (micrographs *vi* of Figures 7 and 8). Many structures were spherical and the rest were like a wire. The systems *vii* and *viii*, showed thermograms and CFM micrographs that are similar to the rest of the systems, their structures must be similar to the particle of Figure 9. The structure of system *viii* has more DPPC bilayers than the particles of system *vii* because the calorimetric pattern of system *viii* (Figure 6) is narrower than the other, in fact the average size of the particles of system *vii* is smaller than the one of the particles of the system *viii* (eighth column of Table 3 and micrographs *vii* and *viii* of Figures 7 and 8). In addition to this, the morphology of systems *vii* and *viii* was less spherical than the rest of the particles.

Finally, it was possible to obtain a new generation of structures named lipomic due to the conditions of the *cp* which promote the growing of the mixed micelles of the Tween–Span pair that eventually contains some DPPC monomers and the rest of the DPPC are attracted to the surface of the mixed micelle due to the high hydrophobic effect for building the bilayer (Heerklotz & Epend, 2001), eventually, some molecules of Tween and/or Chol are anchored to the bilayer. A recent work has shown the influence of an organic salt in aqueous systems of Tween 20 or Tween 80 (Álvarez et al., 2015); choline chloride can trigger phase segregation when the temperature is increased, the Tween 80 is more easily “salted out” than the Tween 20; there is a possibility that the choline group of DPPC could have promoted a similar effect and it could have helped in the building of the lipomic because the DPPC could be increasing the arrival of monomers of Tween to the central mixed micelle, because it is a different phase than the aqueous phase that surround the particle, it is like a “phase segregation”.

Conclusions

We obtained structures with DPPC organized in a bilayer as they do in liposomes; the model of the lipomic (Figure 9), as we have called to the particle, can explain all thermograms

obtained and the CFM micrographs of systems 4–8 (SEM and AFM too), but concerning to the systems with small particles (systems 1–3), their fluorescent micrographs showed red pints (Figure 6), due to the resolution of the microscope and the size of the structures, probably there are not particles with an aqueous central core, they would be similar to the particles of the systems 4–8; the lipomic is a mixed micelle nucleus made of Tween–Span and some DPPC monomers, surrounded by at least one bilayer of DPPC, this structure could be another option for carrying hydrophobic compounds, this is the case of skin drugs (Li et al., 2013; Subongkot et al., 2013). Depending on the constituents of the systems, it is possible to obtain small colloidal particles, similar to the particles of microemulsions (systems *i–iii*) or big particles, including a system with liposomes and a kind of lipid emulsion particles (systems *iv–viii*). Depending on the administration site, a system could be better than the other and probably, the drug capturing efficiency of the lipomic could be better for the hydrophobic compounds.

The production of liposomes or lipid emulsions, systems which are very similar to the hydrophobic particle obtained in this work, involves the use of organic solvents and mechanical methods in order to give to the particles the same average size (extrusion, sonication, etc.) (Jing et al., 2014; Kandadi et al., 2011; Pippa et al., 2012; Socaciu et al., 2000; Zhao et al., 2007). Through this experimental proposal, it was possible to obtain nanometric structures without organic solvents (a green chemistry goal) and without methods like extrusion, which involve the use of hazardous solvents and an additional experimental process, respectively. It was possible to get nanometric structures in a controlled way and based on equilibrium phase studies, this way, the reproducibility of the method is guaranteed.

Acknowledgements

The authors wish to thank to Ph.D. Silvia Pérez-Casas (Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Química UNAM) for the DPPC donated, to Ph.D. María J. Bernad-Bernad (Departamento de Farmacia, Facultad de Química UNAM) for the Span 20, Span 80, and Tween 20 donated, to Ph.D. Luis A. Medina-Velázquez (Departamento de Física, Instituto de Física UNAM) for the RhB donated. We also thank to the Ph.D. Ernesto Carrillo-Nava (Departamento de Fisicoquímica, Facultad de Química UNAM) for the DSC studies, the data manipulations and suggestions, to the Ph.D. Saé Muñoz-Hernández (Instituto Nacional de Cancerología, México) and Ph.D. Miguel Tapia-Rodríguez (Unidad de microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas UNAM) for the support in CFM studies, to Ph.D. Guillermina González-Mancera (Laboratorio de microscopía electrónica de barrido, Facultad de Química UNAM) for the support in SEM studies and Ph.D. Abel Moreno-Cárcamo (Instituto de Química UNAM) for the AFM microscope.

The Ph.D. student J-O.C. is especially grateful to the CONACyT (México) for the fellowship given. The authors wish to thank the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México for its financial support through the PAPIIT Project IN114015.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest.

References

- Àlvarez MS, Esperança J, Deive FJ, et al. (2015). A biocompatible stepping stone for the removal of emerging contaminants. *Sep Purif Technol* 153:91–8.
- Àlvarez MS, Moscoso F, Deive FJ, et al. (2012). On the phase behaviour of polyethoxylated sorbitan (Tween) surfactants in the presence of potassium inorganic salts. *J Chem Thermodyn* 55:151–8.
- Atia L, Givli S. (2012). Biological membranes from the perspective of smart materials – a theoretical study. *Int J Solids Struct* 49:2617–24.
- Belsito S, Bartrucci R, Sportelli L, et al. (2005). Paclitaxel interaction with phospholipid bilayers: high-sensitivity differential scanning calorimetric study. *Thermo Chim Acta* 427:175–80.
- Carbone C, Campisi A, Musumeci T, et al. (2014). FA-loaded lipid drug delivery systems: preparation, characterization and biological studies. *Eur J Pharm Sci* 52:12–20.
- Cevc G. (1990). Polymorphism of the bilayer membranes in the ordered phase and the molecular origin of the lipid pretransition and rippled lamellae. *Biochim Biophys Acta* 1062:59–69.
- Chen M, Soda Y, Izawa K, et al. (2013). A versatile drug delivery system using streptavidin-tagged pegylated liposomes and biotinylated biomaterials. *Int J Pharm* 454:478–85.
- Heerklotz H, Epanand RM. (2001). The enthalpy of acyl chain packing and the apparent water-accessible apolar surface area of phospholipids. *Biophys J* 80:271–9.
- Inoue T, Misono T. (2008). Cloud point phenomena for POE-type nonionic surfactants in a model room temperature ionic liquid. *J Colloid Interf Sci* 326:483–9.
- Jespersen H, Andersen JH, Ditzel JH, et al. (2012). Lipids, curvature stress, and the action of lipid prodrugs: free fatty acids and lysolipid enhancement of drug transport across liposomal membranes. *Biochimie* 94:2–10.
- Jing X, Deng L, Gao B, et al. (2014). A novel polyethylene glycol mediated lipid nanoemulsion as drug delivery carrier for paclitaxel. *Nanomedicine* 10:371–80.
- Kandadi P, Syed MA, Goparaboina S, et al. (2011). Brain specific delivery of pegylated indinavir submicron lipid emulsions. *Eur J Pharm Sci* 42:423–32.
- Kresheck GC, Mihelich J. (2003). Observation of complex thermal transitions for mixed micelle solutions containing alkyldimethylphosphine oxides and phospholipids and the accompanying cloud points. *Chem Phys Lipids* 123:45–62.
- Li Y, Jin W, Yan H, et al. (2013). Development of intravenous lipid emulsion of vinorelbine based on drug-phospholipid complex technique. *Int J Pharm* 454:472–7.
- Liang HJ, Yang Q, Deng L, et al. (2011). Phospholipid-Tween 80 mixed micelles as an intravenous delivery carrier for paclitaxel. *Drug Dev Ind Pharm* 37:597–605.
- Malcolmson RJ, Higinbotham J, Beswick PH, et al. (1997). DSC of DMPC liposomes containing low concentrations of cholesterol esters or cholesterol. *J Membrane Sci* 123:243–53.
- Melo RP, Barros-Neto EL, Moura MCPA, et al. (2014). Removal of reactive blue 19 using nonionic surfactant in cloud point extraction. *Sep Purif Technol* 138:71–6.
- Mukherjee P, Padhan SK, Dash S, et al. (2011). Clouding behaviour in surfactant systems. *Adv Colloid Interface Sci* 162:59–79.
- Murgia S, Falchi AM, Mano M, et al. (2010). Nanoparticles from lipid-based liquid crystals: emulsifier influence on morphology and cytotoxicity. *J Phys Chem B* 114:3518–25.
- Nordén TP, Siekmann B, Lundquist S, et al. (2001). Physicochemical characterization of a drug-containing phospholipid-stabilised o/w emulsion for intravenous administration. *Eur J Pharm Sci* 13:393–401.
- Novelo-Torres M, Gracia-Fadrique J. (2005). Concentración micelar crítica mediante la ecuación de adsorción de Gibbs. *Educ Quim* 16: 63–7.
- Otten D, Löbbecke L, Beyer K, et al. (1995). Stages of the bilayer-micelle transition in the system phosphatidylcholine-C12E8 as studied by deuterium- and phosphorus-NMR, light scattering, and calorimetry. *Biophys J* 68:584–97.

- Panicker L. (2008). Interaction of propyl paraben with dipalmitoyl phosphatidylcholine bilayer: a differential scanning calorimetry and nuclear magnetic resonance study. *Colloids Surf B* 61:45–152.
- Pardo-Cervantes A, Viades-Trejo J, Gracia-Fadrique J. (2011). Activity coefficients at infinite dilution and critical micelle concentrations of poly(oxy-1,2-ethanediyl), α -tridecyl- ω -hydroxy ethers ($C_{13}E_{i=6,10,18}$) in aqueous media by the volmer surface equation of state and group contributions. *J Chem Eng Data* 56:2812–17.
- Pentak D. (2014). Alternative methods of determining phase transition temperatures of phospholipids that constitute liposomes on the example of DPPC and DMPC. *Thermochim Acta* 584:36–44.
- Pinto SN, Fernandes F, Fedrov A, et al. (2013). A combined fluorescence spectroscopy, confocal and 2-photon microscopy approach to re-evaluate the properties of sphingolipid domains. *Biochim Biophys Acta* 1828:2099–110.
- Pippa N, Pispas S, Demetzos C, et al. (2012). The delineation of the morphology of charged liposomal vectors via a fractal analysis in aqueous and biological media: physicochemical and self-assembly studies. *Int J Pharm* 437:264–74.
- Ruozi B, Tosi G, Forni F, et al. (2005). Atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy: two techniques for rapid characterization of liposomes. *Eur J Pharm Sci* 25:81–9.
- Rupp C, Steckel H, Müller B. (2010). Mixed micelle formation with phosphatidylcholines: the influence of surfactants with different molecule structures. *Int J Pharm* 387:120–8.
- Sagar GH, Arunagirinathan MA, Bellare JR, et al. (2007). Self-assembled surfactant nano-structures important in drug delivery: a review. *Indian J Exp Biol* 45:133–59.
- Shinoda K. (1977). “Iceberg” formation and solubility. *J Phys Chem* 81: 1300–2.
- Siminovitch DJ, Wong PT, Mantsch HH. (1987). High-pressure infrared spectroscopy of ether- and ester-linked phosphatidylcholine aqueous dispersions. *Biophys J* 51:465–73.
- Socaciu C, Jessel R, Dielh HA. (2000). Competitive carotenoid and cholesterol incorporation into liposomes: effects on membrane phase transition, fluidity, polarity and anisotropy. *Chem Phys Lipids* 106: 79–88.
- Subongkot T, Wonglertnirant N, Songprakhon P, et al. (2013). Visualization of ultradeformable liposomes penetration pathways and their skin interaction by confocal laser scanning microscopy. *Int J Pharm* 441:151–61.
- Tadros TF. (2005). *Applied surfactants: introduction*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
- Torchilin VP. (2005). Fluorescence microscopy to follow the targeting of liposomes and micelles to cells and their intracellular fate. *Adv Drug Deliv Rev* 57:95–109.
- Vamparys L, Gautier R, Vanni S, et al. (2013). Conical lipids in flat bilayers induce packing defects similar to that induced by positive curvature. *Biophys J* 104:585–93.
- Weissberger A. (1987). *Organic solvents. Physical properties and methods of purification*. 4th ed. Vol. II. New York:: John Wiley & Sons, 75–6.
- Zhao L, Feng S, Kocherginsky N, et al. (2007). DSC and EPR investigations on effects of cholesterol component on molecular interactions between paclitaxel and phospholipid within lipid bilayer membrane. *Int J Pharm* 338:258–66.